

ABORDAGEM EPIGENÉTICA NO TRATAMENTO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL: REVISÃO INTEGRATIVA

Karine Mayumi Kimura,¹ Willer Daniel Silverio,² Marjori Leiva Camparoto,³

RESUMO

Na síndrome do X frágil (SXF), a perda de expressão do gene FMR1 é causada pela expansão instável da repetição (CGG)_n na região 5' não traduzida. Até o momento, não há tratamento farmacológico direcionado à etiopatogenia instituído. Com os avanços da epigenética, há evidências de novas abordagens terapêuticas alvo-específicas em células de pacientes portadores. O objetivo do estudo foi investigar o conteúdo das publicações sobre as terapias epigenéticas para a SXF. Foi realizada uma revisão integrativa, nas bases de dados PubMed, BVS e EMBASE, por meio dos descritores: “DNA demethylation” OR “Histone deacetylase inhibitor” OR “Histone acetylation” OR “Epigenetic treatment” AND “Fragile X syndrome”. A partir da busca foram encontrados 172 artigos heterogêneos, e destes, selecionados 22, conforme os critérios de exclusão estabelecidos. Dentre as drogas testadas para a reativação transcricional estão em destaque os inibidores de histona desacetilase (HDAC) e os inibidores de DNA metiltransferase (DNMT), sendo as principais avaliadas a 5-aza-2-desoxicitidina (5-azadC), a 5-azadesoxicitidina e TSA. A 5-azadC foi a mais estudada, apresentando resultados promissores em relação à reativação do FMR1, com restauração da expressão entre 8% e 70% em relação aos níveis encontrados em células de indivíduos normais, sendo a dose da substância intimamente ligada à sua eficácia. No entanto, quanto maior a dose do 5-azadC, maior a toxicidade, limitando seu uso terapêutico. O presente estudo demonstrou que ainda há poucas pesquisas no ramo da terapia epigenética, desta forma, novos compostos devem ser investigados a fim de encontrar uma droga eficiente e segura para a SXF.

Palavras chave: Síndrome do X Frágil; Epigenética; Terapêutica.

EPIGENETIC APPROACH IN THE TREATMENT OF FRAGILE X SYNDROME: INTEGRATIVE REVIEW

ABSTRACT

In fragile X syndrome (SXF), the loss of expression of the FMR1 gene is caused by unstable expansion of the repetition (CGG)_n in the 5' untranslated region. To date, there is no pharmacological treatment directed to the etiopathogenesis instituted. With the advances in epigenetics, there is evidence of new target-specific therapeutic approaches in cells of carrier patients. The aim of the study was to investigate the content of publications on epigenetic therapies for SXF. An integrative review was carried out in the PubMed, BVS and EMBASE databases, using the descriptors: “DNA demethylation” OR “Histone deacetylase inhibitor” OR “Histone acetylation” OR “Epigenetic treatment” AND “Fragile X syndrome”. From the search, 172 heterogeneous articles were found, of which 22 were selected, according to the established exclusion criteria. Among the drugs tested for transcriptional reactivation, histone deacetylase inhibitors (HDAC) and DNA methyltransferase inhibitors (DNMT) are highlighted, the main ones being evaluated for 5-aza-2-deoxycytidine (5-azadC), 5-azadesoxycytidine and TSA. 5-azadC was the most studied, presenting promising results in relation to the reactivation of FMR1, with restoration of expression between 8% and 70% in relation to the levels found in cells of normal individuals, the dose of the substance being closely linked to its effectiveness. However, the higher the dose of 5-azadC, the greater the toxicity, limiting its therapeutic use. The present study demonstrated that there is still little research in the field of epigenetic therapy, therefore, new compounds must be investigated in order to find an efficient and safe drug for SXF.

Keywords: Fragile X Syndrome; Epigenetics; Therapeutics.

¹ Estudante de graduação do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP, Brasil. Email: karine.mayumik@gmail.com.

² Estudante de graduação do Curso de Biomedicina da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP, Brasil. Email: willersilverio1415@gmail.com.

³ docente do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP, Brasil. Email: marjorilc@gmail.com.

INTRODUÇÃO

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF) é um dos distúrbios monogênicos mais comuns relacionado à deficiência intelectual com padrão de herança dominante ligado ao cromossomo X, cuja causa é a expansão de uma sequência repetida $(CGG)_n$ na região 5' não traduzida do gene FMR1, localizado em Xq27.3 (1).

Na população geral, o comprimento de repetição fica entre 6-54 tripletos, com uma média de 30. Em indivíduos portadores de alelos com 45-54 repetições, embora não apresentem a SXF, em 14% dos casos são instáveis e podem expandir para a faixa de pré-mutação quando transmitidos pela mãe (2). Os portadores de pré-mutação (55-200 tripletos) podem apresentar um QI reduzido relacionado com a alteração da produção de FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), e também um amplo espectro de manifestações clínicas (3).

Em pacientes com SXF, a repetição de CGG se expande para mais de 200, podendo atingir 1.000 repetições (4). Os alelos FMR1 com repetição expandida representam a mutação completa, sendo que a hipermetilação e a remodelação da cromatina promovem o silenciamento de FMR1, causando ausência ou *déficit* na produção da proteína denominada FMRP (5). Essa deficiência ou ausência faz com que o indivíduo tenha uma série de combinações de características físicas, problemas comportamentais e deficiências cognitivas. Entre os problemas comportamentais e cognitivos característicos da síndrome, podemos destacar a ansiedade, agressividade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e instabilidade de humor (6).

Embora a SXF se manifeste em ambos os sexos, homens que possuem a mutação apresentam quadro clínico mais grave do que mulheres com a mesma alteração (7). Segundo Salcedo-Arellano (8), 30% dos indivíduos do sexo feminino e 90% do sexo masculino portadores de mutações completas tem deficiência intelectual, sendo que 60% dos homens são diagnosticados com o transtorno do espectro autista (TEA).

Recente literatura tem discutido duas abordagens alvo-específica para o tratamento da SXF. A primeira com a finalidade de normalizar as funções defeituosas devido à falta de FMRP, atuando nas vias em que ela está envolvida e, uma segunda, a fim de restaurar a expressão do FMR1 atuando nos mecanismos epigenéticos envolvidos na inativação transcripcional (9).

Com o conhecimento adquirido das muitas funções da proteína FMRP, especialmente no nível sináptico, numerosos ensaios farmacológicos foram realizados para tentar compensar

a função alterada de receptores neuronais específicos. No entanto, considerando as várias vias desreguladas conhecidas, incluindo a via GABAérgica, e o grande número de mRNAs relacionados com a FMRP, a reativação do gene FMR1 seria uma melhor opção (10).

A terapia epigenética pode ser considerada mais eficaz no tratamento da SXF, devido a sua atuação direta no bloqueio da transcrição (9). O primeiro composto testado em células derivadas de pacientes com SXF foi o fármaco 5-aza-desoxicidina, que restaurou a transcrição e a tradução do gene FMR1 (11). Desde então, muitas pesquisas foram realizadas *in vitro*, analisando potenciais medicamentos que poderiam reativar o gene FMR1 ou aumentar a eficácia da 5-azadC, como os inibidores de histona desacetilase (tricostatina A, butirato e 4-fenilbutirato), além da acetil-L-carnitina e do ácido valpróico.

Porém, apesar de toda a expectativa na terapia epigenética, existem ainda muitas dúvidas quanto à aplicabilidade dessa modalidade de tratamento, e muitas delas relacionadas com a ativação gênica inespecífica e a desregulação de elementos transponíveis em células normais, além do potencial mutagênico e carcinogênico (12). Assim, a revisão teve como alvo identificar as terapias epigenéticas para a SXF e integrar os resultados, bem como discutir sobre os possíveis efeitos secundários ao tratamento.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, cujo estudo envolveu a coleta de dados realizada a partir de fontes secundárias, por meio de levantamento bibliográfico, com abordagem sobre as terapias epigenéticas na Síndrome do X-Frágil.

O levantamento de dados foi em janeiro do ano de 2021, por meio de consultas nas plataformas de pesquisa especializadas em saúde: PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e EMBASE.

Estudos publicados até o presente momento da busca foram incluídos, a partir dos descritores de interesse, através das seguintes combinações na língua inglesa: “DNA demethylation” OR “Histone deacetylase inhibitor” OR “Histone acetylation” OR “Epigenetic treatment” AND “Fragile X syndrome”, sendo excluídas publicações com modelos animais, outras terapias sem ser a epigenética e as que não continham dados empíricos.

Após a extração das informações dos estudos incluídos na pesquisa foi realizado a organização dos dados, para facilitar a comparação dos estudos em tópicos específicos como intervenções, amostras e resultados, permitindo agrupar os principais pontos abordados pelos autores e comparar os resultados mais relevantes verificados por eles.

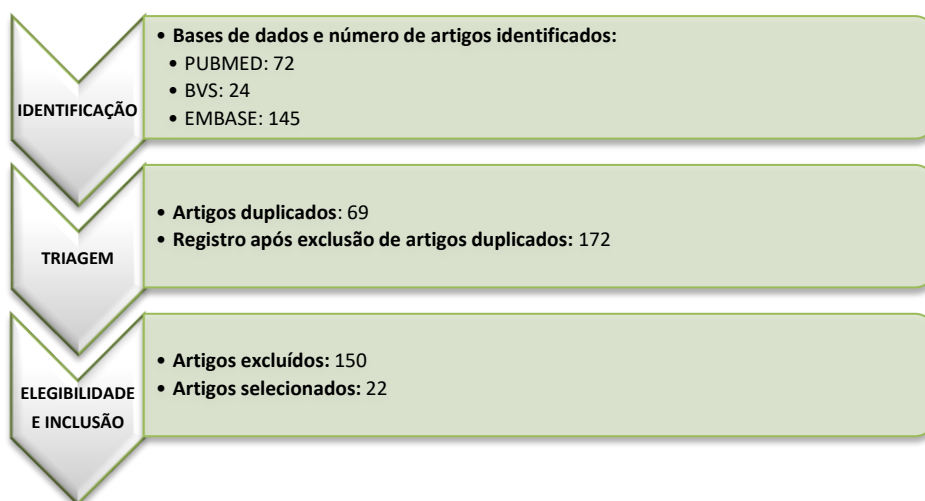
O modo de visualização das informações adotado foi o quadro, no qual foi possível a comparação entre todos os estudos selecionados e, portanto, a identificação de padrões, diferenças e a sublocação desses tópicos como parte da discussão geral.

O projeto foi aprovado no Programa Especial de Iniciação Científica (PEIC) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, sob o protocolo CPDI 4497.

RESULTADOS

A partir do levantamento de dados, foram encontrados 172 artigos heterogêneos utilizando as bases de dados: PubMed, BVS e EMBASE. Deste total, 22 estudos foram selecionados, considerando os critérios de exclusão estabelecidos. A figura 1 esquematiza o fluxo da seleção dos artigos.

Figura 1 - Fluxo da seleção dos artigos



Fonte: Dados da pesquisa.

Dos estudos selecionados, um foi indexado nas bases de dados no ano de 2019, um em 2017, três em 2016, dois em 2015, dois em 2013, um em 2012, um em 2010, dois em 2008, um em 2005, um em 2003, dois em 2002, dois em 1999, um em 1998, um em 1994 e um em 1986.

Para a reativação transcricional do gene FMR1 os trabalhos científicos envolveram, principalmente, os inibidores de histona desacetilase (HDAC) e os inibidores de DNA metiltransferase (DNMT), sendo 19 estudos envolvendo DNMT, e, 13 relacionados aos HDAC. Na classe dos inibidores DNMT foram testados: a 5-aza-2-desocitidina, 5-azacitidina, SGI-110, zebularina, SGI-1027, procainamida, hidralazina, RG108 e o dissulfiram; na classe

dos inibidores HDAC, foram pesquisados: a tricostatina A (TSA), acetil-L-carnitina, butirato de sódio, 4-fenilbutirato, nicotinamida, ácido valpróico, romidepsina, vorinostat, decano-hidroamato de sódio, metotrexato e splitomicina.

Além dessas duas classes, foi estudada a classe dos inibidores histona-lisina metiltransferase (EZH2), a partir das substâncias: GSK126, GSK343 e UNC1999. Protoporfirina IX e SB216763, não se enquadravam em nenhuma destas classes. Geliomicina, deserpidina e tibrofan, apresentam mecanismo de ação ainda desconhecido (13).

As intervenções estudadas em cada trabalho e seus principais resultados foram sintetizadas e apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Resultados obtidos da reativação transcricional do gene FMR1.

(continuação)

Título do artigo	Autor principal, periódico e ano	Intervenções	Amostra	Resultados
FMR1 reactivating treatments in Fragile X iPSC-Derived neural progenitors in vitro and in vivo (14).	Vershkov D, Cell Reports, 2019.	Reativação transcricional do gene FMR1 com inibidores DNMT nucleosídicos (5-azacitidina, 5-aza-2-desoxicitidina, SGI-110, zebularina) e com inibidores DNMT não nucleosídicos (SGI-1027, procainamida, hidralazina, RG108, dissulfiram).	Linagem de células derivadas de pacientes: iPSC derivado de 3 pacientes masculinos com SXF (não foram descritas as características genéticas).	Os inibidores DNMT nucleosídeo de primeira e segunda geração (5-azacitidina, 5-azadC e SGI-110), com exceção do análogo nucleosídeo zebularina, foram capazes de induzir de forma robusta, entre 10% até cerca de 25% a expressão do RNAm do FMR1 após 96h de tratamento; inibidores DNMT não nucleosídicos foram substancialmente menos eficazes na sua capacidade de reativar o gene dormente. 5-aza-2-desoxicitidina (5-azadC), 2µM, após 96h de tratamento, atingiu aproximadamente 25% de expressão do FMR1. 5-azadC, 5µM por 6 dias, aumentou cerca de 40% da expressão do FMR1, comparado à linhagem controle, e, após 6 dias da droga ser removida, um aumento máximo de 60-70%.
Inhibitors of histone deacetylases are weak activators of the FMR1 gene in fragile X syndrome cell lines (15).	Dolskiy AA, Biomed Res Int, 2017.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2-desoxicitidina, Tricostatina A, Romidepsina e Vorinostat.	Linagens celulares comerciais: GM04025, CPG7, GM06865, GM06895.	5-aza-2-desoxicitidina, 10µM, adicionada diariamente por 8 dias, apresentou expressão do FMR1, principalmente na linhagem GM04025. Tricostatina A, 0.5µM, atingiu 6% de expressão, comparado à linhagem controle. Romidepsina, 15nM a 250nM por 72h, promoveram morte celular sem a ativação do gene FMR1. Vorinostat, 5µM por 72h, levou a ativação da expressão do gene (14% de expressão), mas observou-se alta citotoxicidade.

Título do artigo	Autor principal, periódico e ano	Intervenções	Amostra	Resultados
Sustained expression of FMR1 mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27 (16).	Kumari D, Hum Mol Genet, 2016.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-azadesoxicitidina e inibidores EZH2 (GSK126, GSK343 e UNC1999).	Linhas celulares comerciais: GM04025, GM03200B, GM09145, GM07294, GM06897, GM06865, GM06895.	5-azadesoxicitidina (AZA), 10µM por 3 dias, induziu a ativação do gene FMR1 com até aproximadamente 8% de expressão, e, quando associado a 2,5µM GSK126, mostrou altos níveis de FMR1 mRNA no dia 6 e dia 10 se comparado ao tratamento com a utilização apenas do AZA. Tratamento com 5µM de inibidores EZH2 reduziu o crescimento celular. Inibidores EZH2 previnem ou adiam o re-silenciamento dos alelos da SXF, no entanto, como foi o caso do GSK126, utilizados isoladamente não demonstraram aumento significativo da expressão do gene.
Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells (17).	Tabolacci E, Epigenetics Chromatin, 2016.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicitidina.	Linhas celulares derivadas de pacientes: SXF (FXS1-250 repetições CGG; FXS2-450 repetições CGG); Controle (WT1, WT2; WTA, WTB, WTC).	5-aza-2-desoxicitidina, 1µM, por 7 dias consecutivos, atingiu reativação transcricional do FMR1 de até 40% na linhagem FXS2, comparado à linhagem controle. Em todas as linhagens, a reativação transcricional do gene persistiu por volta de 10 a 15 dias após a última dose da substância.
Defining the role of the CGGBP1 protein in FMR1 gene expression (18).	Goracci M, Eur J Hum Genet, 2016.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicitidina.	Linhas celulares comerciais: não foram descritas as características genéticas.	5-azadC, 1µM por 8 dias consecutivos, foi capaz de restaurar a transcrição de FMR1, em níveis de FMR1-mRNA de 25% a 35% da linhagem controle, e desmetilar seu promotor. Após o tratamento de desmetilação foi demonstrada que a ligação de CGGBP1 às regiões do promotor e éxon 1 foi restaurada.
High-throughput screening using iPSC-derived neuronal progenitors to identify compounds counteracting epigenetic gene silencing in fragile X syndrome (19).	Kaufmann M, J Biomol Screen, 2015.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicitidina.	Linhas celulares derivadas de pacientes: não foram descritas as características genéticas.	5-aza-2-desoxicitidina, 0,2µM, induziu a expressão da FMRP sem resultar em toxicidade significativa (como foi encontrado na concentração de 1µM). Embora um tratamento composto de 72h tenha restaurado a expressão de FMRP significativamente em comparação com ao grupo controle, um tratamento de 144h induziu uma expressão de FMRP ainda maior.
High-throughput screening to identify compounds that increase fragile X mental retardation protein expression in neural stem cells differentiated from fragile X syndrome patient-derived induced pluripotent stem cells (20).	Kumari D, Stem Cells Transl Med, 2015.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicitidina, Protoporfirina IX, SB216763, Geliomicina, Tibrofan, decano-hidroxamato de sódio e Deserpidina.	Linhas celulares comerciais: GM05161, GM0032B, GM04025, GM07294, GM06897, BJ, C10147, C10259, C10700, SCUi6, SC128, SC128 NSC, SC128 neurônios.	5-aza-2-desoxicitidina, 1µM, foi capaz de reativar o gene em células-tronco neurais (NSCs). Protoporfirina IX (PPIX) e SB216763 aumentaram os níveis de FMR1 mRNA em fibroblastos e NSCs. Baixos níveis de FMR1 mRNA em neurônios foram vistos após tratamento com SB216763, mas após o tratamento com PPIX foi negativo. Tratamento com decano-hidroxamato de sódio, deserpidina, geliomicina, ou tibrofan resultou em baixos níveis de reativação do gene FMR1 em SXF NSCs, mas apenas tibrofan foi positivo em neurônios.

Título do artigo	Autor principal, periódico e ano	Intervenções	Amostra	Resultados
Methotrexate treatment of FraX fibroblasts results in FMR1 transcription but not in detectable FMR1 protein levels (21).	Brendel C, J Neurodev Disord, 2013.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicidina e Metotrexato.	Linhas celulares comerciais: fibroblastos derivados de paciente masculino com SXF e de indivíduo masculino saudável (não foram descritas as características genéticas).	Metotrexato na concentração de 2µg/ml restaurou a expressão de FMR1 em até cerca de 70%, aumentando com o tempo de exposição, havendo um aumento acentuado na expressão entre os dias 12 e 14. No entanto, o estudo não foi capaz de mostrar de forma confiável qualquer expressão de FMRP nas células do paciente tratadas com MTX ou 5-aza-2-desoxicidina na concentração de 1µg/ml.
Role of CTCF protein in regulating FMR1 locus transcription (22).	Lanni S, PLoS Genet, 2013.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicidina.	Linhas celulares comerciais: GM04026, GM05381, GM03349, GM07492, E3, S1, MA, WT1, WT2.	5-aza-2-desoxicidina, 1µM por 7 dias, de uma linha linfoblastóide de FXS, não foi observado qualquer alteração significativa na viabilidade celular. Foi obtido uma reativação transcricional de 25% do FMR1 e um aumento relativo de oito vezes do transcrito FMR1-AS1. O tratamento com 5-azadC não restaurou a ligação de CTCF ao gene FMR1 reativado no éxon 1, promotor e região limítrofe.
Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives (23).	Bar-Nur O, J Mol Cell Biol, 2012.	Reativação transcricional do gene FMR1 com Tricostatina A, 5-azacitidina.	Linhas celulares derivadas de pacientes: FX-iPS (não foram descritas as características genéticas).	Tricostatina A não teve efeito significativo na reativação de FMR1 em células FX-iPS. 5-azacitidina (5-azaC), 1µM por 7 dias, resultou na redução de até 45% e o tratamento com 5-azaC, 10µM, resultou em redução de até 60% da metilação média no promotor FMR1 em comparação com as células FX-iPS não tratadas. O tratamento com 5-azaC atingiu restauração da expressão do gene FMR1 de 15% e 45%, comparado à linhagem controle. Uma combinação de tratamento com 5-azaC e TSA culminou com um ligeiro aumento na expressão de FMR1 em comparação com o tratamento com 5-azaC isoladamente.
Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys (24).	Torrioli M, Am J Med Genet A, 2010.	Reativação transcricional do gene FMR1 com ácido valproico.	Linhas celulares derivadas de pacientes: não foram descritas as características genéticas.	Pacientes tratados com ácido valproico por 6 meses, em dose inicial de 10mg/kg/dia, até a dose máxima de 30mg/kg/dia nos primeiros 30 dias do estudo, dependendo da resposta e tolerabilidade. A quantificação de FMR1-mRNA no sangue periférico dos pacientes não mostrou alterações significativas.
Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation (25).	Tabolacci E, Pharmacogenet Genomics, 2008.	Reativação transcricional do gene FMR1 com ácido valproico e 5-azadesoxicidina.	Linhas celulares derivadas de pacientes: E3, S1, E6 e linhagem controle derivada de indivíduo masculino saudável.	Ácido valproico, 2mmol/l por 3 dias, houve uma pequena porcentagem de reativação transcricional (até 3.7% da linhagem controle) e a proteína FMRP era indetectável. O gene permaneceu metilado, enquanto as histonas foram acetiladas e uma variação modesta da metilação das histonas foi observada. 5-azadesoxicidina, 1µmol/l por 3 dias, apresentou uma reativação maior, em uma das linhagens estudadas, de cerca de 10%, comparada à linhagem controle.

Título do artigo	Autor principal, periódico e ano	Intervenções	Amostra	Resultados
SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome (26).	Biacci R, PLoS Genet, 2008.	Reativação transcricional do gene FMR1 com splitomicina, nicotinamida, Tricostatina A, 5-azadesoxicidina.	Linhagens celulares comerciais: GM02168, GM06895, GM00357, GM03200B, GM04025, GM09145, GM05131, GM05848.	Nicotinamida, 15mM, aumentou os níveis de mRNA de FMR1 em cerca de 3 vezes, tendo pouco ou nenhum efeito sobre a quantidade de mRNA de FMR1 produzido em células normais. Células linfoblastoides foram tratadas com 5-azadesoxicidina, 10µM por 72h, alcançando níveis de cerca de 20% reativação do gene em comparado à linhagem controle; splitomicina 700uM, por 24h, alcançando cerca de 1% de reativação; e, Tricostatina A, 3µM por 24h, atingindo cerca de 19% de reativação.
Differential epigenetic modifications in the FMR1 gene of the fragile X syndrome after reactivating pharmacological treatments (27).	Tabolacci E, Eur J Hum Genet, 2005.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-aza-2'-desoxicidina e acetil-L-carnitina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: E3, S1, E6 e 2 linhagens controle de indivíduos masculinos saudáveis.	5-aza-2-desoxicidina, 1µM por 7 dias, apresentou reativação transcricional do gene em torno de 8-15% da linhagem de controle. Acetil-L-carnitina, 10mM por 7 dias, não induziu a reativação do gene.
Fragile X (CGG)n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect (28).	Chandler SP, BMC Mol Biol, 2003.	Reativação transcricional do gene FMR1 com Tricostatina A.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: linhagem com 140 repetições CGG, e, linhagem controle com 27 repetições CGG.	Tricostatina A, 30nM por 18h, levou a uma reativação quase completa (próxima à 100%) da linhagem com 140 repetições CGG, a níveis de transcrição que se aproximam ou superam os observados com a linhagem com 27 repetições CGG.
Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome (4).	Coffee B, Am J Hum Genet, 2002.	Reativação transcricional do gene FMR1 com Tricostatina A, Butirato de sódio, 5-aza-2'-desoxicidina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: E3, E4, J1. Linhagem celular comercial: GM3200A.	5-aza-2-desoxicidina (azadC), 1µM, na linhagem com 230 repetições CGG, alcançou reativação da transcrição em mais de 35% comparado à linhagem controle, mas, após 8 dias do tratamento o FMRP se tornou indetectável (< 5% do normal); na linhagem com 530 repetições CGG, após o tratamento com 1µM azadC por 5 dias, resultou 20 dias depois, em completo remetilação do DNA e transcrição do FMR1 indetectável. TSA, 330nM por 24 horas, na linhagem com 530 repetições, restaurou a acetilação H4 do normal, mas pouco ou nenhum efeito sobre a acetilação H3, não sendo observado reativação transcricional do FMR1. O butirato de sódio, 10nM por 24 horas, aumentou a acetilação H4 até os níveis normais, pequeno aumento da metilação H3K4 e sem redução da metilação do H3K9, não sendo observado reativação transcricional.
Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine (29).	Petrobono R, Nucleic Acids Res, 2002.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-azadesoxicidina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: E3, S1, S5.	5-azadesoxicidina, 10mM, após 3 dias do tratamento apresentou 0.1 a 0.4% dos níveis de RNAm considerando a linhagem controle. Os níveis de RNAm alcançaram até 24% da linhagem controle, após 8 dias do 5-azadC.

(conclusão)

Título do artigo	Autor principal, periódico e ano	Intervenções	Amostra	Resultados
Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene (30).	Chiurazzi P, Hum Mol Genet, 1999.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-azadesoxicitidina, 4-fenilbutirato de sódio e Tricostatina A.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: E3, E4, E6, E7.	4-fenilbutirato (4-PBA), 10mM por 48h, alcançou 1,6% de reativação do FMR1, comparado à linhagem controle. Tricostatina A, 0,5µM por 48h, alcançou 1,4% de reativação. 5-azadesoxicitidina (5-azadC), 2µM, alcançou 16% de reativação. Com a adição de 4-PBA, 5mM a cada 48h, atingiu 0,9% de reativação; com a adição de 5-azadC, 1µM, diariamente, 24%. 5-azadC, 1µM, adicionada diariamente por 72h, alcançou 5% de reativação do FMR1, e, após ser combinada com 4-PBA, 5mM adicionado nas últimas 24h, alcançou 15%.
Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells (31).	Coffee B, Nat Genet, 1999.	Reativação transcricional do FMR1 com 5-aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.	Linhagens celulares comerciais: GM3200A, TN7.	5-aza-2-desoxicitidina (5-azadC), 1µM adicionado a cada 48h, aumentou a quantidade de ambas as histonas (H3 e H4) associadas ao FMR1 normal. Análise por RT-PCR mostrou reativação da transcrição após tratamento das células dos pacientes com X-frágil com 5-azadC. Tricostatina A, 100ng/ml, resultou em uma restauração da acetilação da H4, mas leve aumento da acetilação da H3, não sendo observado reativação transcricional, continuando indetectável após 96 horas de tratamento.
In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome (32).	Chiurazzi P, Hum Mol Genet, 1998.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-azadesoxicitidina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: pacientes masculinos com SXF (300 a 800 repetições CGG), e linhagens de indivíduos masculinos normais.	5-azadesoxicitidina, 0,5-1µM adicionado toda 24-48h por 7 dias, detectou-se transcrição do FMR1 em até 50% da linhagem controle.
Butyrate and acetyl-carnitine inhibit the cytogenetic expression of the fragile X in vitro (33).	Pomponi MG, Am J Med Genet, 1994.	Reativação transcricional do gene FMR1 com Butirato de sódio e Acetil-L-carnitina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: não foram descritas as características genéticas.	Butirato de sódio e acetil-L-carnitina obtiveram efeitos similares de supressão da expressão do sítio frágil fra(X)(q27.3), atingindo um pouco mais de 60%. A média de supressão atingiu 51,2% com butirato de sódio (doses testadas: 0,7mM; 1,4mM; 3,2mM), e, 32% com ALC (doses testadas: 0,05µM; 0,1µM; 0,25µM; 1µM; 2µM; 5µM; 10µM; 50µM).
DNA demethylation induced by 5-azacytidine does not affect fragile X expression (34).	Glover TW, Am J Hum Genet, 1986.	Reativação transcricional do gene FMR1 com 5-azacytidina.	Linhagens celulares derivadas de pacientes: MGL29, TL9911 (não foram descritas as características genéticas).	5-azacytidina, 20µM por 24h, demonstrou apenas 25% dos níveis normais de expressão do X-frágil. Nas culturas que foram detectadas desmetilação do DNA, após o tratamento, os dados mostraram que isso não afetou a expressão do X frágil. Após 24 e 48h do tratamento, não foi detectável a demetilação.

Fonte: Dados da pesquisa.

DISCUSSÃO

Na síndrome do X frágil, os alelos apresentam expansão de mais de 200 repetições do CGG, causando repressão da transcrição do FMR1, a partir de diferentes modificações epigenéticas, tais como, desacetilação das histonas 3 e 4, demetilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4), metilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9) e trimetilação da lisina 27 na histona 3 (H3K27) (10). Assim, os estudos abordados nesta revisão tiveram como alvo a reativação do gene FMR1 através dos mecanismos epigenéticos.

Os medicamentos mais evidenciados na terapia foram os inibidores de DNA metiltransferase e inibidores de histona desacetilase. Sendo as principais drogas estudadas a 5-aza-2-desocitidina, 5-azacitidina e a tricostatina A.

Diferentes concentrações das substâncias foram analisadas, inclusive, houve variações no tempo de exposição às culturas de células derivadas dos portadores da SXF, como o 5-azaC que apresentou concentração entre 0.2 a 20 μ M e tempo de exposição entre 24h a 8 dias. No entanto, as inúmeras variações culminam na falta de um padrão para avaliação, podendo ter prejudicado a eliminação de viés dos trabalhos desenvolvidos na área.

Ainda com relação às variações, podemos inferir nas amostras utilizadas nas pesquisas. Nem todos os artigos descreveram as características genéticas das linhagens de células abordadas, interferindo também na integração dos resultados obtidos, já que a eficiência da terapia epigenética parece estar altamente relacionada ao número de repetições CGG do gene mutado. Chiurazzi et al. (30) correlacionou a extensão da reativação do FMR1 com o tamanho da mutação completa, eles encontraram resposta ao tratamento menor em linhagens contendo mais de 600-700 repetições CGG do que em linhagens com 270-370 e 370-530 repetições.

Os efeitos adversos da terapia epigenética não foram apurados com rigor e muitas pesquisas nem os abordavam. Doloskiy et al. (15) notou que as linhagens testadas apresentaram significativa diminuição da viabilidade celular após o tratamento com tricostatina A e voninostat.

Com relação ao 5-azadC, Lanni et al. (22) e Vershkov et al. (14) verificaram que não houve nenhuma mudança significativa da viabilidade ao utilizar 5-azadC na concentração de 1 μ M e 2 μ M, diferente do que foi encontrado por Kaufmann et al. (19) que notou toxicidade a 1 μ M, e, maior eficácia sem efeitos tóxicos significativos, na concentração de 0,2 μ M. Chiurazzi et al. (30) acreditava que os efeitos tóxicos eram atingidos quando a dose do 5-

azadC fosse acima de 10 μ M, o que causaria a formação de adutos de DNA por ligação irreversível ao núcleo catalítico das metiltransferases de DNA.

Maior eficácia na reativação do gene foi vista vinculada a terapia utilizando a classe dos DNMT, quando comparada à classe dos HDAC, provavelmente, devido ao silenciamento do gene FMR1 estar mais dependente da hipermetilação do DNA, do que do estado de acetilação das histonas.

A 5-azadC foi a substância mais estudada e que apresentou resultados promissores em relação à reativação do FMR1, resultando na restauração da expressão entre 8% e 70% comparado aos níveis encontrados em células de indivíduos normais, sendo a dose intimamente ligada à sua eficácia. No entanto, quanto maior a dose do 5-azadC, maior a toxicidade, limitando seu uso terapêutico.

CONCLUSÃO

As pesquisas no ramo da terapia epigenética apresentam um nítido avanço nas mais diversas patologias, no entanto, quando se trata da Síndrome do X frágil, ainda há poucos estudos. A 5-azadC foi o medicamento mais promissor dentre os analisados, mas apresenta elevada citotoxicidade ao atingir melhor eficiência. Desta forma, novos compostos devem ser investigados a fim de encontrar uma droga ideal para uma terapia eficiente e segura na SXF.

REFERÊNCIAS

1. Mor-Shaked H, Eiges R. Reevaluation of FMR1 Hypermethylation Timing in Fragile X Syndrome. *Front Mol Neurosci*. 2018 fev 6;11:31.
2. Nolin SL, Glicksman A, Ding X, Ersalesi N, Brown WT, Sherman SL, Dobkin C. Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010. *Prenat Diagn*. 2011 out;31(10):925-31.
3. Basuta K, Lozano R, Schneider A, Yrigollen CM, Hess D, Randi JH, Tassone F. A family with two female compound heterozygous for the FMR1 premutation alleles. *Clin Genet*. 2014 mai;85(5):458–463.
4. Coffee B, Zhang F, Ceman S, Warren ST, Reines D. Histone Modifications Depict an Aberrantly Heterochromatinized FMR1 Gene in Fragile X Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002 out;71(4):923–932.
5. Xie N, Gong H, Suhl JA, Chopra P, Wang T, Warren ST. Reactivation of FMR1 by CRISPR/CAS9-Mediated Deletion of the Expanded CGG-Repeat of the Fragile X Chromosome. *PLoS One*. 2016 out 21;11(10):e0165499.

6. Rosot N, Franco VDF, Riechi TIJS. A síndrome do X Frágil e o estabelecimento de fenótipos cognitivos-comportamentais: uma revisão sistemática de literatura. *Ciênc cogn.* 2017 jun;22(1):30-40.
7. Viveiros MTM. Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2013.
8. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martínez-Cerdeño V. Fragile X syndrome: clinical presentation, pathology and treatment. *Gaceta Médica de México.* 2020;156(1):60-66.
9. Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional Reactivation of the FMR1 Gene. A Possible Approach to the Treatment of the Fragile X Syndrome. *Genes (Basel).* 2016 ago 17;7(8).pii:E49.
10. Tabolacci E, Chiurazzi P. Epigenetics, fragile X syndrome and transcriptional therapy. *Am J Med Genet A.* 2013 nov;161A(11):2797-808.
11. Bagni C, Tassone F, Neri G, Hagerman R. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest.* 2012 dez 3;122(12):4314–4322.
12. Oliveira JC. Epigenética e doenças humanas. *Semina cienc. biol. Saúde.* 2012 jan-jun;33(1):21-34.
13. Kumari D, Gazy I, Usdin K. Pharmacological Reactivation of the Silenced FMR1 Gene as a Targeted Therapeutic Approach for Fragile X Syndrome. *Brain Sci.* 2019 fev 12;9(2).pii:E39.
14. Vershkov D, Fainstein N, Suissa S, Golan-Lev T, Ben-Hur T, Benvenisty N. FMR1 reactivating treatments in Fragile X iPSC-Derived neural progenitors in vitro and in vivo. *Cell Rep.* 2019 mar 5;26(10):2531-2539.e4.
15. Dolskiy AA, Pustyl'nyak VO, Yarushkin AA, Lemskaya NA, Yudkin DV. Inhibitors of histone deacetylases are weak activators of the FMR1 gene in fragile X syndrome cell lines. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3582601.
16. Kumari D, Usdin K. Sustained expression of FMR1 mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27. *Hum Mol Genet.* 2016 set 1;25(17):3689-3698.
17. Tabolacci E, Mancano G, Lanni S, Palumbo F, Goracci M, Ferrè F, Helmer-Citterich M, Neri G. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. *Epigenetics Chromatin.* 2016 mar 24;9:12.
18. Goracci M, Lanni S, Mancano G, Palumbo F, Chiurazzi P, Neri G, Tabolacci E. Defining the role of the CGGBP1 protein in FMR1 gene expression. *Eur J Hum Genet.* 2016 mai;24(5):697-703.

19. Kaufmann M, Schuffenhauer A, Fruh I, Klein J, Thiemeyer A, Rigo P, Gomez-Mancilla B, Heidinger-Millot V, Bouwmeester T, Schopfer U, Mueller M, Fodor BD, Cobos-Correa A. High-throughput screening using iPSC-derived neuronal progenitors to identify compounds counteracting epigenetic gene silencing in fragile X syndrome. *J Biomol Screen*. 2015 out;20(9):1101-11.
20. Kumari D, Swaroop M, Southall N, Huang W, Zheng W, Usdin K. High-throughput screening to identify compounds that increase fragile X mental retardation protein expression in neural stem cells differentiated from fragile X syndrome patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015 jul;4(7):800-8.
21. Brendel C, Mielke B, Hillebrand M, Gärtner J, Huppke P. Methotrexate treatment of FraX fibroblasts results in FMR1 transcription but not in detectable FMR1 protein levels. *J Neurodev Disord*. 2013;5(1):23.
22. Lanni S, Goracci M, Borrelli L, Mancano G, Chiurazzi P, Moscato U, Ferrè F, Helmer-Citterich M, Tabolacci E, Neri G. Role of CTCF protein in regulating FMR1 locus transcription. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003601.
23. Bar-Nur O, Caspi I, Benvenisty N. Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J Mol Cell Biol*. 2012 jun;4(3):180-3.
24. Torrioli M, Vernacotola S, Setini C, Bevilacqua F, Martinelli D, Snape M, Hutchison JA, Di Raimo FR, Tabolacci E, Neri G. Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A*. 2010 jun;152A(6):1420-7.
25. Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, Chiurazzi P, Neri G. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 ago;18(8):738-41.
26. Biacsi R, Kumari D, Usdin K. SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome. *PLoS Genet*. 2008 mar;4(3):e1000017.
27. Tabolacci E, Pietrobono R, Moscato U, Oostra BA, Chiurazzi P, Neri G. Differential epigenetic modifications in the FMR1 gene of the fragile X syndrome after reactivating pharmacological treatments. *Eur J Hum Genet*. 2005 mai;13(5):641-8.
28. Chandler SP, Kansagra P, Hirst MC. Fragile X (CGG)_n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect. *BMC Mol Biol*. 2003 mar 21;4:3.
29. Pietrobono R, Pomponi MG, Tabolacci E, Oostra B, Chiurazzi P, Neri G. Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res*. 2002 jul 15;30(14):3278-85.
30. Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 1999 nov;8(12):2317-23.

31. Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet.* 1999 mai;22(1):98-101.
32. Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998 jan;7(1):109-13.
33. Pomponi MG, Neri G. Butyrate and acetyl-carnitine inhibit the cytogenetic expression of the fragile X in vitro. *Am J Med Genet.* 1994 jul 15;51(4):447-50.
34. Glover TW, Coyle-Morris J, Pearce-Birge L, Berger C, Gemmill RM. DNA demethylation induced by 5-azacytidine does not affect fragile X expression. *Am J Hum Genet.* 1986 mar;38(3):309-318.