

Expressão génica e metilação do DNA: causa ou consequência* ?

Maria Margarida Chagas de Ataíde Ribeiro**

* Este artigo teve como base um trabalho elaborado no âmbito da disciplina de Citogenética do Mestrado de Produção Vegetal do Instituto Superior de Agronomia.

** ESACB. Quinta da Sr^a de Méculos. 6000 CASTELO BRANCO. (Professora adjunta).

Como deve ser citado: **RIBEIRO M.M.** 1997. Expressão génica e metilação: causa ou consequência. *Agroforum*. 11:9-14.

1. Introdução

Num mesmo organismo pluricelular existem diferentes tipos de células e as diferenças são induzidas pelo controle dos genes que são transcritos (activados) em cada célula. Algum processo deverá actuar no DNA para que esses diferentes tipos de células se formem durante o desenvolvimento do ser vivo, de outra forma, todas as células somáticas do organismo, possuidoras da mesma carga cromossômica, seriam idênticas. O processo de controle da transmissão de genes activados e desactivados, de uma geração de células às seguintes, ainda não está bem esclarecido. O que se sabe é que muitas células mantêm as suas características únicas quando são estabelecidas em cultura *in vitro*. Os mecanismos regulatórios envolvidos devem ser estáveis e, uma vez estabelecidos, são transmitidos às células-filha quando a célula se divide. Existem vários modelos para explicar os mecanismos da regulação génica. A metilação do DNA (uma modificação química que se observa pela ligação de um grupo metil ao carbono 5 da citosina - Fig. 1), suprime a transcrição de determinados genes e também promove a alteração da estrutura da cromatina para formas mais condensadas. Mas, o modelo proposto para explicar a influência da metilação do DNA na expressão génica, não deixa de ser polémico pois, para uma grande parte dos genes envolvidos nesse último fenómeno, torna-se necessário o controle adicional de determinadas proteínas regulatórias.

Pretendemos expor alguns dos argumentos e evidências a favor e contra a relação causal entre a expressão génica e a metilação do DNA e, em particular, a influência deste processo nos fenómenos da inactivação dos genes, da marcação parental do genómio, da diferenciação e do envelhecimento das células e organismos.

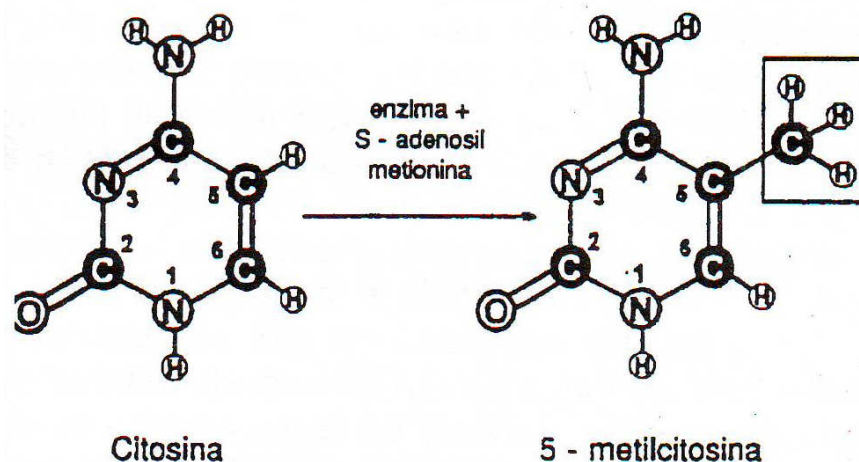


Fig. 1 - Processo de metilação da citosina (Adaptado de Holliday, 1989).

2. Causa ou consequência

No início dos anos 70, alguns estudos incidiram sobre o efeito da metilação de bases do DNA na acção das enzimas de restrição, cujo papel é destruir o DNA dos bacteriófagos e portanto impedir (restringir) o fago de ser incorporado nas bactérias. O DNA dos procariontes contém bases ligadas covalentemente a um grupo metil, a 6-metil adenosina (6mA) e a 5-metilcitosina (5mC). A metilação destas bases protege as bactérias das enzimas que elas próprias fabricam. Essas enzimas, que têm a propriedade de reconhecer e cortar o DNA em sequências de nucleótidos específicas (Tab 1) são, em geral, incapazes de o fazer se essas sequências forem metiladas. Por exemplo, a enzima HpaII (obtida a partir de

Haemophilus parainfluenza II), corta normalmente a cadeia de DNA quando encontra a sequência CCGG mas, já não o faz, se a segunda citosina estiver metilada. O DNA deixa de ser digerido pelas enzimas de restrição quando está fortemente metilado ou pelo menos se o estiver, nas sequências que deveriam ser cortadas (Doerfler, 1983).

Tab. 1 - Exemplos de endonucleases de restrição e respectivos sítios de corte no DNA. Todas as enzimas, excepto a MspI, são inibidas quando a sequência CG é substituída pela 5mCG. Notar que todas as sequências são palíndromas, i. é., têm a mesma sequência de nucleótidos numa cadeia e na complementar (Adaptado de Ehrlich & Wang, 1981).

Endonuclease	Sequência de reconhecimento
HpaII	CCGG
MspI	CCGG ou C5mCGG
HhaI	GCGC
XhoI	CTCGAG
SmaI	CCCGGG
SacII	CCGCGG
SalI	GTCGAC
XorII	CGATGC

O DNA dos animais e plantas superiores contém citosina metilada na sequência CG, embora nas plantas a sequência CXG (X=qualquer base), também possa ser metilada (Doerfler, 1983; Holliday, 1989). Só uma fracção das citosinas dessas sequências é metilada e a distribuição da metilação não é ao acaso. Altos níveis de citosina metilada são encontrados em regiões não expressas do genómio, na heterocromatina (local altamente condensado da cromatina), na região centromérica, em certos tipos de DNA satélite, etc. (Klass & Amasino, 1989).

Certos estudos demonstraram que os genes estão muito pouco metilados em tecidos onde são activamente expressos e muito metilados em tecidos (ou no mesmo tecido noutra estádio de desenvolvimento) onde estão silenciosos (Cedar, 1988). Então, provavelmente a metilação do DNA deverá estar envolvida na expressão génica. A cromatina que contém genes activamente expressos é mantida numa estrutura que a torna mais susceptível ao ataque das nucleases e, presumivelmente, mais acessível aos factores de transcrição do que a cromatina que contém genes inactivos. A hélice do DNA está normalmente enrolada para a direita, numa estrutura designada de B e, parece ser alterada, após o processo de metilação. A estrutura em Z, que enrola para a esquerda (Fig. 2) torna-se mais comum no DNA fortemente metilado. Em geral, os segmentos de DNA mais favoráveis à conformação em Z, são as sequências repetidas de dinucleótidos de citosina e guanina. A presença de citosina metilada modifica o equilíbrio entre a estrutura B e Z, o que parece ser devido à condição hidrofóbica do grupo metil (Rich *et al.*, 1984).

Talvez a metilação influencie profundamente a alteração da estrutura da cromatina e que, de alguma forma, isso conduza à inactivação génica. As sequências muito repetidas do genómio parecem favorecer a forma em Z do DNA e essas regiões são, em geral, menos sensíveis às endonucleases. Existem evidências de que essas zonas são fortemente metiladas e também que contêm muitos genes inactivos (Felsenfeld & McGhee, 1982; Rich *et al.*, 1984; Klaas & Amasino, 1989). Ainda não é clara a relação entre o aparecimento da forma em Z do DNA, a sua metilação e a inactivação dos genes: no entanto, uma relação causal entre os fenómenos é uma ideia muito atractiva.

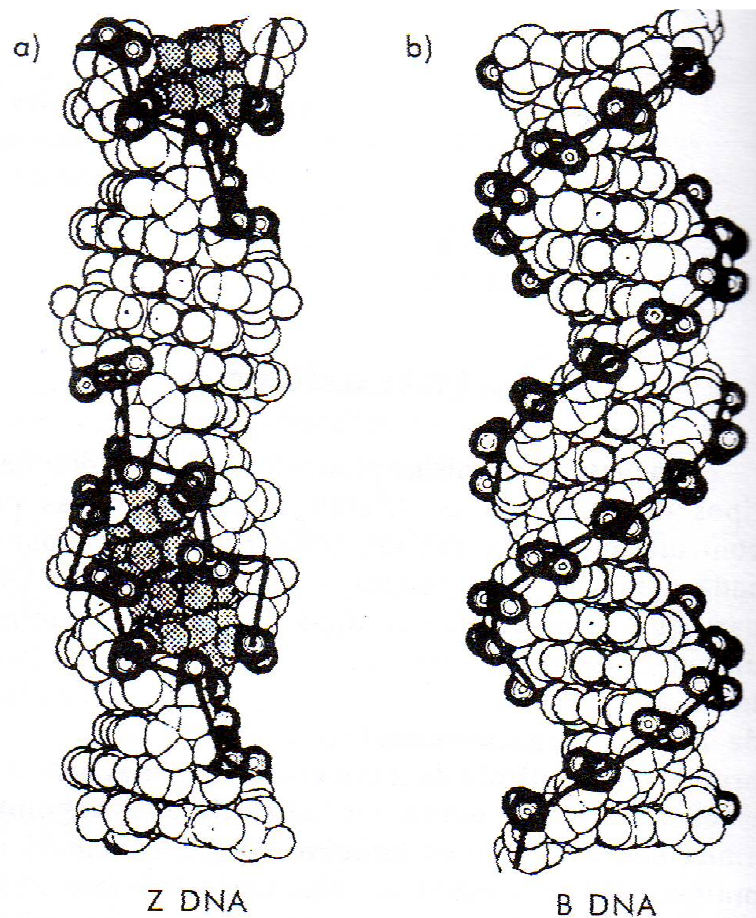


Fig. 2 - Z-DNA, enrolamento para a esquerda (a) e B-DNA, enrolamento para a direita (b) (Adaptado de Rich *et al.*, 1984).

3. Regulação da expressão génica e metilação

A regulação da transcrição genética é um processo que se desenrola a vários níveis e que envolve a interacção de um grande número de factores que actuam em sequências determinadas do DNA. Um desses elementos, é a configuração local do gene, que determina a acessibilidade de vários factores celulares requeridos no processo de transcrição. A metilação do DNA fornece um mecanismo de alteração da estrutura do DNA de forma estável e, pode por essa via, ter um papel na regulação da actividade génica (Holliday & Pugh, 1975; Cedar, 1988)

Não é só por mera analogia que se compara a informação do DNA com a linguagem escrita. A acentuação pode modificar inteiramente o sentido de uma palavra que se escreva da mesma maneira. Por exemplo, as palavras: **por** e **pôr** são, respectivamente, uma preposição e um tempo de verbo. Assim, pequenas modificações podem alterar drasticamente o sentido de uma frase. Também no DNA, a metilação de certas bases em posições muito específicas, fazem lembrar as alterações devidas à acentuação utilizada na linguagem escrita.

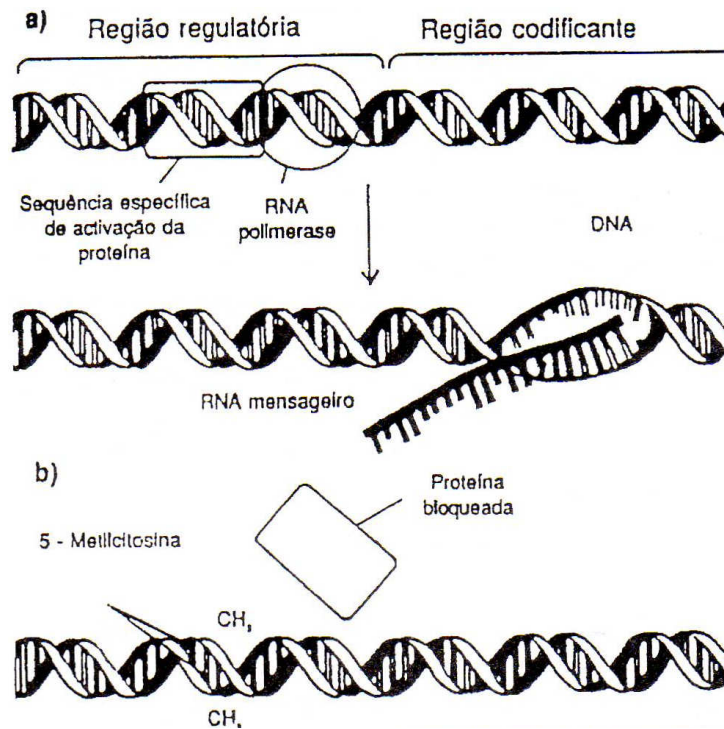


Fig. 3 - A transcrição de um gene pode ser iniciada quando uma proteína reconhece uma sequência específica de bases (a) A metilação em zonas regulatórias dos genes (b) pode inactivar o gene impedindo a sua ligação essencial a uma proteína activadora (Adaptado de Holliday, 1989).

O padrão de metilação do DNA é mantido ao longo das gerações de células através da acção das metiltransferases de manutenção. Existem evidências bioquímicas de que essas enzimas actuam na cadeia de DNA hemimetilada pouco após a replicação (Gruenbaum *et al.*, 1982). Só a cadeia sintetizada de novo será metilada. Existe uma simetria na metilação das duas cadeias pelo facto das sequências metiladas serem CG: as bases CG numa cadeia emparelham sempre com as bases GC, na outra. A inibição das metiltransferases (v. g. através de análogo da citosina) gera DNA desmetilado (Holliday, 1989)

No entanto, o esquema proposto para manutenção dos padrões de metilação do DNA ao longo de gerações de células não explica como é que eles podem ser alterados, durante o processo de desenvolvimento do organismo. Alguns cientistas propuseram que a presença de 5mC no DNA poderia actuar como um sinal que facilitaria quer a activação quer a inactivação de genes. Em especial, a metilação em zonas regulatórias dos genes (ou próximas), poderia levar à ligação de inibidores da transcrição ou então à não ligação de activadores, como pode ser observado na Figura 3 (Holliday, 1989).

4. Evidências

4.1. "Desligar" o cromossoma X!

Nas células somáticas das fêmeas dos mamíferos um dos dois cromossomas sexuais é inactivado. A metilação do DNA poderá estar envolvida no desactivar de um dos dois cromossomas X, que se verifica logo no início do desenvolvimento embrionário, em cada célula somática. O processo é aleatório, nalgumas células é desligado o cromossoma X

herdado da mãe e noutras o cromossoma X paternal (Holliday & Pugh, 1975; Razin & Riggs, 1980).

Existe uma região específica em cada cromossoma X conhecida por centro de inactivação, com um papel crucial na determinação da activação ou desactivação do cromossoma e que é reconhecido por uma enzima específica. Essa enzima, após o reconhecimento, metila ambas as cadeias desse centro, no cromossoma destinado a ficar inactivo. A metilação não se observa no cromossoma homólogo, supõe-se que a enzima tem uma baixa afinidade para o substrato e que se verifica uma reacção muito rápida que bloqueia a metilação neste cromossoma (Doerfler, 1983; Holliday, 1989). Este modelo foi confirmado através do uso da azacitidina. Esta substância é um análogo da citosina que bloqueia a acção das metiltransferases, talvez por ter um átomo de azoto a substituir o carbono 5. Os investigadores verificaram que os genes silenciosos do cromossoma X (inactivo) eram desreprimidos pela exposição das células ao análogo da citosina (Mohandas *et al.* 1981, citados em Doerfler, 1983).

O mecanismo pelo qual a azacitidina provoca desmetilação não é muito claro. O análogo da citosina é incorporado no DNA e inibe a metilação. A falta de um átomo de carbono "metilável" na posição 5 parece não explicar inteiramente o fenómeno, visto que a extensão da desmetilação excede largamente a quantidade de azacitidina incorporada. Por outro lado, nem todos os genes podem ser activados com o uso de concentrações não letais de azacitidina (Felsenfeld & McGhee, 1982; Wolf & Migeon, 1982). Talvez certos genes necessitem, para serem activados, de uma desmetilação mais intensa do que aquela obtida por níveis não tóxicos de azacitidina. Mas, este método de activação génica não é muito preciso: os efeitos observáveis da desmetilação que se obtêm a partir determinadas enzimas de restrição, pelo facto de passarem a cortar onde dantes não cortavam, não indicam necessariamente que o DNA foi desmetilado nos locais onde os genes estavam reprimidos. Por exemplo, resultados obtidos por Wolf & Migeon (1982), indicaram que a extensão das mudanças nos padrões de metilação do DNA no cromossoma X, após tratamentos com azacitidina, depende da sonda de DNA usada, ou seja, dos genes investigados. Neste caso, a relação exacta entre a inactivação do cromossoma X e a metilação do DNA permanece desconhecida.

4.2. "Marcação" parental do genótipo

Mendel nas suas experiências com linhas puras de ervilhas-de-cheiro, verificou que a geração proveniente do cruzamento de plantas com ervilhas redondas e plantas com ervilhas rugosas produzia sempre ervilhas redondas, independentemente do tipo de planta usada para "pai" ou para "mãe". Esta observação é verdadeira para uma grande quantidade de características. Recentemente, no entanto, geneticistas e embriologistas descobriram um tipo de características que não obedecem a essa regra. A transmissão destas características é governada por um fenómeno de **"marcação" do genótipo**. Este processo marca, temporariamente e de forma diferente, os genes provenientes das fêmeas ou dos machos (Fig. 4). Os descendentes que recebem os genes da mãe são consequentemente diferentes daqueles que recebem os genes do pai. Neste caso, deixa de ser indiferente de qual dos pais o gene é herdado (Sapienza, 1990).

Cattanach e Kirk (1985), utilizando uma metodologia de fusão dos cromossomas, obtiveram ratos completamente diferentes daqueles que continham o par maternal, quando o dador do par de cromossomas era o pai (ambas as cópias desse par de cromossomas era proveniente de um só dos pais). Concluíram que os genes eram modificados ou marcados de forma diferente consoante a sua proveniência fosse maternal ou parental. Os mesmos

investigadores demonstraram, também, que o efeito da marcação genómica não persistia na geração seguinte e, por isso, que não era uma alteração permanente no cromossoma. Então na meiose teria de haver uma reprogramação genética! Além disso, a marcação genómica parece ser fundamental para um desenvolvimento normal do embrião (os ratos possuidores de pelo menos um par de cromossomas de uma só linha parental, raramente são viáveis).

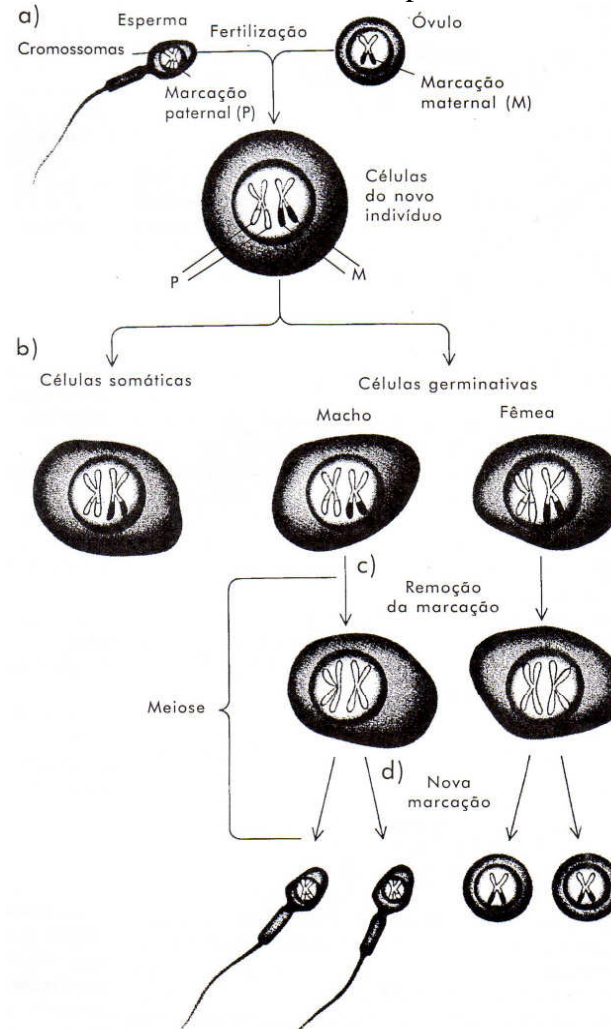


Fig. 4 - Marcação parental dos cromossomas, para compreensão ver texto (Adaptado de Holliday, 1989).

Os cromossomas são marcados de tal maneira que a sua origem materna ou paterna fica perfeitamente clara (Fig. 4-a), e pode persistir durante várias gerações de células somáticas (Fig. 4-b). A "marcação" que parece ser devida à activação ou inactivação diferencial dos cromossomas de origem materna e paterna é, no entanto, alterada durante a meiose. A marcação original é apagada e substituída pela marcação respectiva, devido ao sexo do indivíduo (Fig. 4-c). Então, os cromossomas do esperma (mesmo os cromossomas que passaram para o macho através da mãe) obtêm uma marcação masculina e os cromossomas do óvulo obtêm uma marcação feminina (Fig. 4-d).

Baseados nestes resultados, vários investigadores inferiram que a marcação genómica deveria ser o resultado de uma modificação no DNA, e a metilação do DNA poderia constituir uma explicação muito atraente. Os genes parentais estariam metilados de forma diferente dos maternos e essa metilação seria susceptível de ser alterada durante a formação dos gametas (Holliday, 1989; Sapienza, 1990; Frank *et al.*, 1991).

4.3. Diferenciação e envelhecimento

Se uma célula somática após a diferenciação origina um só tipo de células, podemos perguntar por que razão as células germinativas se mantêm totipotentes, i.é., com capacidade de regenerar todo um ser vivo por completo. Aparentemente as células germinativas seguem um percurso diferente das células somáticas. Quaisquer alterações epigenéticas¹ destas células são modificadas durante ou mesmo antes da meiose. Verifica-se uma reprogramação genética e pensa-se que a sua causa possa envolver alterações nos padrões de metilação. Evidências desses acontecimentos foram referidas por diferentes autores, por exemplo, Frank (1991) e colegas, com experiências efectuadas em cultura de embriões de ratos transgênicos, observaram que a reimpressão dos novos padrões de metilação era um processo que se verificava logo no início da formação do embrião, pela acção combinada de desmetilases e metilases "de novo".

A reprogramação dos gâmetas, pelo menos em animais, tem sido proposto como uma das funções da meiose, para além da recombinação e da reparação do DNA (Holliday, 1987b). Essa reprogramação é, como vimos, essencial para devolver aos gâmetas a capacidade de totipotência, mas tem sido considerada dispensável nas plantas, visto que uma só célula pode dar origem a um organismo inteiro. Palmgren *et al.* (1991), com tecidos de cenoura, concluíram que um dos níveis mais elevados de 5mC foi encontrado na fracção de células contendo as precursoras dos embriões somáticos, portanto a capacidade e a intensidade de desdiferenciação das células vegetais parece estar relacionada, também, com a metilação do DNA. Mas, Morrish & Vasil (1989), notaram que o DNA de uma gramínea (*Pennisetum purpureum* Schum) é muito metilado e que a perda de competência embrionária (em cultura de tecidos) parece não estar ligada a uma elevada alteração na metilação do DNA. Contudo, é possível, segundo os mesmos autores, que a competência celular seja controlada por mudanças nos padrões de metilação, que não são detectáveis pelas técnicas actuais. Talvez um método mais fino, v. g. a utilização de sondas de DNA, possa ser mais conclusivo.

Os tecidos celulares, excepto as linhas de procariotas permanentes², começam a funcionar de uma forma menos eficiente ao longo do tempo, i.é., envelhecem. Um dos modelos propostos explica que talvez exista uma acumulação de "erros" devido a deficiências graduais nos mecanismos de reparação do DNA. O padrão de metilação das células vai sendo alterado à medida que a célula envelhece, por perda de grupos metil, activando-se eventuais genes indesejáveis (Holliday, 1989). Se se assumir que existe uma determinada probabilidade de que um grupo metil seja perdido de cada vez que um célula se divide e que a metilação de "novo" não ocorre, ou então, que ocorre a uma taxa muito baixa, podemos concluir que o nível de metilação da célula deverá diminuir progressivamente (Holliday, 1987b). Foram feitas medições do nível de 5mC de células humanas, de hamster e de rato, em cultura. Os investigadores observaram que o nível de 5mC declinava em todas as espécies, ao longo das gerações sucessivas de células, mas mais lentamente para as células humanas que têm uma esperança média de vida mais alargada, do que as células de hamster e de rato (Wilson & Jones (1983) citados por Holliday, 1987b)

¹ As alterações na actividade dos genes durante o desenvolvimento do ser vivo são referidas como epigenéticas.

² As linhas permanentes podem escapar à senescência porque aparentemente possuem a capacidade de restaurar os grupos metil através da acção das metilases "de novo".

Existem outras evidências experimentais que relacionam o envelhecimento com a desmetilação. Hayflick & Moorhead (1961) citados por Rusting (1992), constataram que os fibroblastos humanos, em cultura, não se podem dividir indefinidamente, existe um limite preciso ao número de divisões (aproximadamente 50, a partir do embrião recentemente formado). Esse limite é chamado o limite de Hayflick e foi reconfirmado várias vezes. Como conclusão, foi inferido que a duração de células em cultura *in vitro*, será função do número de divisões mióticas e não da idade cronológica. Este aspecto poderá estar directamente ligado a uma diminuição dos locais metilados, cada vez que se efectua uma divisão, o que foi observado em tratamentos usando azacitidina, que levaram à morte prematura das células. Também se constatou que o número de cromossomas X inactivos, que vão sendo gradualmente activados, aumenta com o envelhecimento (Holliday, 1987a). Mas, Palmgren *et al.* (1991) não encontraram nenhuma correlação entre o estado do desenvolvimento, a idade do tecido de cenoura e o nível de metilação do DNA. Contudo, como o DNA das plantas é bastante mais metilado do que o DNA dos animais (mais de 40% dos resíduos de citosina das plantas estão modificados, contra 4 a 6% nos mamíferos) talvez os métodos usados para a medição da 5mC, neste caso, possam não ter sido suficientemente precisos. Outros autores encontraram, nas plantas, uma elevada relação entre a sensibilidade às nucleases, a configuração da cromatina e uma redução do nível de metilação do DNA (Klaas & Amasino, 1989).

5. Considerações finais

A metilação do DNA, parece de facto estar metido em "tudo", o que está de acordo com o pressuposto inicial de que de alguma maneira é determinante no controle de expressão genética, o que por sua vez faz com que um ser vivo seja o que é! Mas a metilação do DNA não é universal, por exemplo a 5mC não foi detectada na *Drosophyla*, pelo menos com os meios técnicos de que se dispõe, além disso, este mecanismo não explica tudo o que se passa a nível de comportamento celular, pois existem outros níveis de regulação e controle (interacção entre proteínas e DNA, "comunicação" entre células, etc.) e também muitos estudos dão origem a resultados contraditórios. Enfim, todo um novo campo se abriu, mas como sempre em ciência, as pistas encontradas levam a muito mais dúvidas.

Agradecimentos: Agradeço a revisão do manuscrito ao colega Joaquim Pedro Silva do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

Bibliografia

- Cattanach B. M., Kirk M. 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*. **315**:496- 498.
- Cedar H. 1988. DNA methylation and gene activity. *Cell*. **53**:3-4.
- Doerfler W. 1983. DNA methylation and gene activity. *Annual Review of Biochemistry*. **52**:93-124.
- Ehrlich M., Wang R. Y-H. 1981. 5-Methylcitosina in eukaryotic DNA. *Science*. **212**:1350-1357.
- Felsenfeld G., McGhee J. 1982. Methylation and gene control. *Nature*. **296**:602-603.

- Frank D., Keshet I., Shani M., Levine A., Razin A. , Cedar H. 1991. Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature*. **351**:239- 241.
- Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. 1982. Substrate and sequence specificity of a euckariotic DNA methylase. *Nature*. **295**:620-622.
- Holliday R. 1987a. X chromosome reactivation. *Nature*. **327**:661-662.
- Holliday R. 1987b. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. **238**:163-238.
- Holliday R. 1989. A different kind of inheritance. *Scientific American*. June. p.40-48.
- Holliday R., Pugh J. E. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. **187**:226-232.
- Klaas M., Amasino R. M. 1989. DNA methylation is reduced in DNaseI sensitive regions of plant chromatin. *Plant Physiology*. **91**:451-454.
- Morrish F. M., Vasil I. K. 1989. DNA methylation and embryogenic competence in leaves and *callus* of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Plant Physiology*. **90**:37-40.
- Palmgren G., Mattsson O., Okkels F. 1991. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines and cell types of *Daucus carota*. *Plant Physiology* . **95**:174-178.
- Razin A., Riggs A. D. 1980. DNA methylation and gene function. *Science*. **210**:604-610.
- Rich A., Nordheim A., Wang A. H-J. 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Annual Review of Biochemistry*. **53**: 791-846.
- Rusting R.L. 1992. Why do we age ? *Scientific American*. December. p.87-95.
- Sapienza C. 1990. Parental imprinting of genes. *Scientific American*. October. p.26-32.
- Wolf S., Migeon B. R. 1982. Studies of X chromosome DNA methylation in normal human cells *Nature*. **295**:667-671.