



S-adenosil-L-homocisteína como substância desmetilante de DNA no cultivo de células doadoras de núcleo

S-adenosyl-L-homocysteine as DNA demethylating substance in nucleus donor cells culture

J.M. Azevedo^{1,2}, M.M. Franco^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

²Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

*Correspondência: mauricio.franco@embrapa.br

Resumo

Fatores epigenéticos são responsáveis por controlar a expressão de genes e a diferenciação durante a vida celular. Entre eles, a metilação do DNA é o mais estudado. Cada tipo celular possui um padrão epigenético altamente especializado. Após a fecundação natural ou a clonagem por transferência nuclear (SCNT), um padrão epigenético preexistente deve ser apagado e restabelecido para garantir o correto desenvolvimento embrionário. Porém, nos clones, essa reprogramação é ineficiente, mas é possível que o uso de substâncias desmetilantes de DNA utilizadas durante o cultivo celular de células doadoras de núcleo possa desmetilar o DNA, aumentando a eficiência da técnica.

Palavras-chave: clonagem, SAH, XIST.

Abstract

Epigenetic factors are responsible for controlling gene expression and differentiation through the cell life. Among them, DNA methylation is the most studied. Each cell type possesses a specific and highly specialized epigenetic pattern. After natural fertilization or cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT), a pre-existing epigenetic pattern must be erased and reestablished to ensure correct embryo development. However, in cloning this reprogramming is inefficient and it is possible that the use of a DNA demethylating substance can improve the efficiency of the technique.

Keywords: cloning, SAH, XIST.

Introdução

A técnica da transferência nuclear, cujo princípio consiste na fusão de uma célula diploide com um ovócito enucleado (Fulka et al., 1998), apresenta-se como poderosa ferramenta biotecnológica. Mas apesar de o uso dessa ferramenta ter aumentado de maneira significativa, sua eficiência ainda é baixa (Westhusin et al., 2001; Niemann et al., 2008).

Após uma fecundação natural, um padrão epigenético preexistente nos gametas tem que ser desfeito para, em seguida, ser restabelecido. Essa reprogramação epigenética também deve ocorrer na clonagem, após a transferência nuclear (TN), ou seja, a célula doadora necessariamente deve ter seu padrão epigenético desfeito para depois ocorrer a reprogramação, o que, na clonagem, não acontece ou acontece de forma incompleta (Sasaki e Matsui, 2008). Substâncias desmetilantes de DNA têm sido utilizadas em estudos que mostram uma significativa redução dos níveis de metilação existentes. Ao desprogramar o núcleo doador antes da TN, a reprogramação epigenética poderá ocorrer de forma completa após a fusão, aumentando, assim, o sucesso da técnica. No entanto, é muito importante que substâncias desmetilantes de DNA não apresentem citotoxicidade celular, como, por exemplo, a S-adenosil-L-homocisteína.

Metilação de DNA

A metilação é uma ligação covalente ao DNA, estável, que ocorre pela adição de um grupamento metil (CH₃), proveniente da S-adenosil metionina, no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas, localizadas na posição 5' das guaninas na molécula de DNA, resultando na base modificada 5-metilcitosina (Ramchandani et al., 1999; Gebert et al., 2009).

Em torno de 70 a 80% das 5-metilcitosinas do genoma dos mamíferos estão concentradas em regiões de intensa repetição conhecidas como ilhas CpG, localizadas principalmente nas regiões promotoras de alguns genes, e um percentual muito menor está localizado nas sequências CpNpG (N = qualquer nucleotídeo) (Ramchandani et al., 1999; Gebert et al., 2009).

As ilhas CpGs representam aproximadamente 3% do genoma total e são foco de pesquisas em câncer,



no processo de diferenciação celular e na clonagem de mamíferos (Gebert et al., 2009).

A principal função da metilação é a repressão da expressão gênica. De maneira geral, ocorre silenciamento da transcrição de genes quando há hipermetilação de regiões promotoras, enquanto a hipometilação está associada à transcrição desses genes (Ng et al., 1999; Lister et al., 2009).

Reprogramação epigenômica

Após uma fecundação natural, um padrão epigenético preexistente nos gametas tem que ser desfeito para, em seguida, ser restabelecido (Sasaki e Matsui, 2008). O genoma do espermatozoide é ativamente desmetilado, enquanto no genoma proveniente do gameta feminino ocorre uma desmetilação passiva, deixando de ser metilado durante as divisões celulares (Reik et al., 2001; Szyf, 2007). Estudos mostram que na clonagem essa reprogramação não acontece ou acontece de forma incompleta (Sasaki e Matsui, 2008), gerando embriões com padrão hipermetilado. Essas alterações podem afetar de maneira negativa a qualidade dos embriões, causando alterações de genes *imprinted* e alteração de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, como, por exemplo, o gene XIST (Shi e Haaf, 2002; Ludwig et al., 2004; Sato et al., 2007).

Clonagem por transferência nuclear

A clonagem por transferência nuclear consiste na produção de indivíduos geneticamente idênticos (Fulka et al., 1998) a partir da transferência nuclear de uma célula somática (TNCS) para um ovócito enucleado. No entanto, a célula somática é uma célula diferenciada, possuindo um padrão epigenético muito diferente dos gametas e precisa se tornar indiferenciada novamente para o sucesso da técnica (Niemann et al., 2008).

Apesar da utilização e do sucesso da clonagem em várias espécies, a eficiência dessa técnica ainda é muito baixa. Em bovinos, ainda durante o período de cultivo *in vitro*, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos têm-se mostrado bastante variáveis, de 5 a 65% (Westhusin et al., 2001; Ding et al., 2008), e os resultados de obtenção de gestações a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (Wells et al., 1999; Ding et al., 2008).

Na tentativa de melhorar a eficiência da técnica, alguns estudos têm buscado alterar o estado epigenético da célula doadora de núcleo antes da reconstrução, pois o embrião proveniente da TN, além de se reprogramar em um espaço de tempo mais curto que no sistema natural (Sasaki e Matsui, 2008), a remetilação do DNA ocorre mais cedo, no estágio de quatro células (Kang et al., 2001). Consequentemente, as células mantêm um padrão hipermetilado, inviabilizando o desenvolvimento. Apenas os embriões que conseguem se reprogramar corretamente são capazes de se desenvolver até a fase adulta (Sasaki e Matsui, 2008).

Portanto, com a finalidade de se alcançar melhores índices de produção de embriões clones em animais, torna-se muito importante entender e controlar os mecanismos epigenéticos possivelmente susceptíveis às agressões dos sistemas de produção *in vitro* para que se obtenha um bom núcleo doador (Eilertsen et al., 2007).

Substâncias desmetilantes de DNA

Alguns estudos vêm adicionando ao cultivo celular diferentes substâncias para desmetilar o genoma, como, por exemplo, a 5-aza-2'-deoxicitidina (zdC), antibióticos (Mitramycin A e Nanomicin A), a procainamida, a procaina, a epigalocatequina-3-galato (ECGC) e a S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Algumas são incorporadas à molécula de DNA, como as substâncias análogas de nucleosídeos, impedindo a ação das DNMTs e, conseqüentemente, a metilação do DNA (Villar-Garea, 2005). Outras interagem com enzimas transmetilases, ou seja, impedem a metilação sem incorporar na molécula de DNA, as substâncias não análogas de nucleosídeos (Deng et al., 2003; Jeon et al., 2008). Entre as substâncias não análogas de nucleosídeos está a SAH.

A SAH é uma substância endógena, um dos produtos do metabolismo da metionina na célula, considerado por Jeon et al. (2008) um importante indutor de desmetilação do DNA.

SAM: S-adenosilmetionina/SAH: S-adenosil-L-homocisteína

A S-adenosilmetionina (SAM) é formada a partir de adenosina trifosfato (ATP) e metionina pela enzima metionina adenosiltransferase. As vias metabólicas que fazem o uso da SAM são transmetilação, transulfuração e aminopropilação.

O grupamento metil que está ligado ao átomo de enxofre na SAM é quimicamente reativo, permitindo a doação desse grupo para um substrato receptor em reação de transmetilação. Mais de 40 reações metabólicas envolvem a transferência de grupos metil da SAM para vários substratos, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Cantoni, 1952).

A família das DNA metiltransferases é responsável por catalisar a adição do grupamento metil na maioria das reações de transmetilação. Após a transferência desse grupamento metil, a SAM é convertida em

SAH (Mudd et al., 2001; Purohit et al., 2007; Fig. 1).

A SAH é hidrolisada a adenosina e homocisteína. A homocisteína, por sua vez, pode ser metabolizada por meio de duas vias: via da transulfuração e via da metionina sintetase (Mudd et al., 2001; Fig.1).

A via da metionina sintetase permite que a homocisteína seja remetilada. Existem duas vias bioquímicas que recuperam a metionina a partir da homocisteína: a do ácido fólico e a da betaína. A SAH é, então, recuperada em metionina e inicia-se o ciclo novamente (Klee et al., 1961; Selhub e Miller, 1992; Fig. 1).

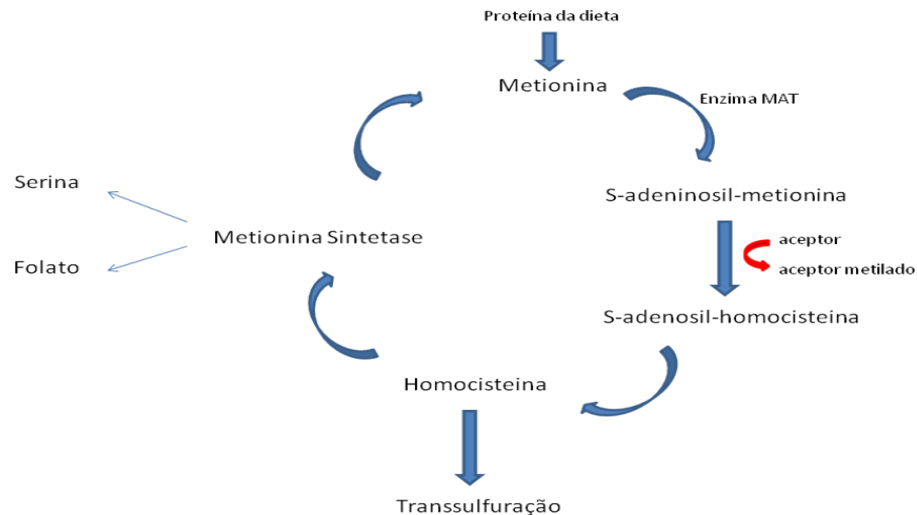


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (adaptado de Bydlowski., 1998).

Pesquisas mostram que a SAH ($C_{14}H_{20}N_6O_5S$) é uma substância desmetilante de DNA não análoga de nucleosídeo, proveniente da reação de transmetilação catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs; Purohit et al., 2007). A SAH possui muita afinidade pelas metiltransferases, fazendo com que essa molécula se ligue ao sítio ativo das DNMTs, diminuindo as reações de metilação (Jeon et al., 2008); portanto, mais metiltransferase celular é inibida pelo acúmulo intracelular de SAH. Assim, a razão entre SAM e SAH celular tem sido frequentemente utilizada como um indicador do potencial de metilação do DNA (Castro et al., 2005). Um importante fato é que a SAH é uma substância endógena, que não é incorporada à molécula de DNA e não possui efeitos citotóxicos.

O gene XIST

Nos mamíferos, existe um mecanismo chamado “compensação de dose”, no qual um dos cromossomos X está inativado nas células de mamíferos do sexo feminino, proporcionando um equilíbrio de dosagem entre machos e fêmeas em relação aos genes presentes no cromossomo X (Lyon, 1961).

Essa inativação é controlada por uma região genômica conhecida como centro de inativação do cromossomo X (XIC), que age no mesmo cromossomo, ou seja, em *cis* (Brown et al., 1991; revisto por Jeon et al., 2012). Nesse centro, encontra-se o gene XIST (*X inactive specific transcript*), que é fundamental para iniciar o processo de inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas (Kay, 1998; Dvash et al., 2010). Em mamíferos, a escolha de qual cromossomo X será inativado é aleatória, ou seja, tanto o X materno quanto o X paterno têm a mesma probabilidade de serem escolhidos para a inativação. A partir desse momento, todas as células oriundas de uma célula que já inativou um dos cromossomos X mantêm o mesmo padrão da célula-mãe, inativando o mesmo cromossomo (Kay, 1998; Dvash et al., 2010).

O gene XIST possui um comprimento total de 36.535pb, e está localizado no cromossomo X do genoma bovino. Esse gene transcreve um RNAm não codante de 22.812 nucleotídeos, portanto não sendo traduzido em proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>; Fig. 2).

Esse RNAm envolve o cromossomo a ser inativado, e sinalizações bioquímicas determinam marcas epigenéticas para manter um padrão de silenciamento local (Brockdorff, 2002; Liu et al., 2008), ou seja, o XIST, isoladamente, não é capaz de manter o processo de silenciamento nas linhagens celulares subsequentes, apenas induz a inativação do X em células embrionárias. Portanto, após induzir o processo de inativação do X, mecanismos específicos devem ser estabelecidos para que esse estado seja mantido nos descendentes clonais celulares. A metilação é um dos mecanismos mais relevantes, ocasionando o silenciamento dos genes.

Na inativação do X ocorrerá inicialmente a ação do gene XIST, mas é por meio da metilação do DNA que o padrão de inativação determinado pelo XIST será mantido (Fig. 3; Singer-Sam et al., 1990; revisto por Jeon et al., 2012).



Figura 2. Estrutura genômica do gene XIST. Em verde o comprimento total do gene (36.535pb); em azul o RNA mensageiro (22.812 nucleotídeos). (Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>).

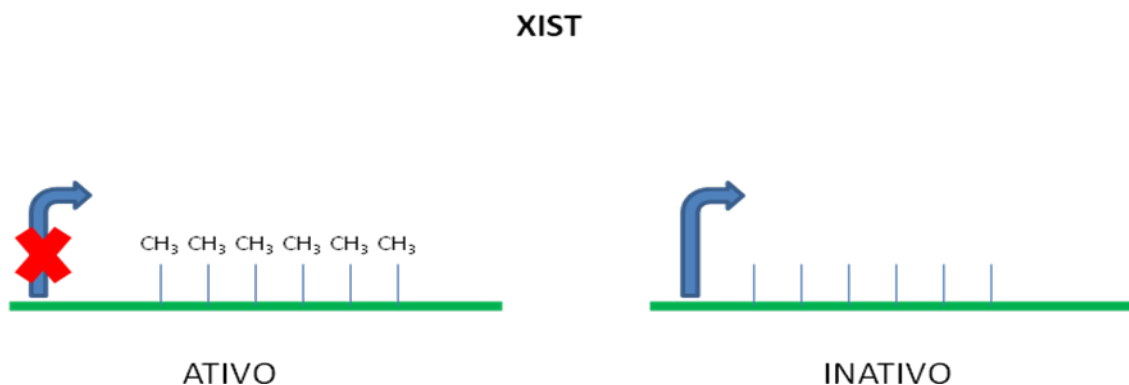


Figura 3. Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do gene XIST. Se a ilha CpG estiver metilada (CH₃) a expressão do gene é reprimida correspondendo ao padrão do cromossomo X ativo. Se a ilha CpG estiver desmetilada permite a expressão do gene XIST que participa da inativação do cromossomo X inativado (Arquivo pessoal).

A cromatina do X inativo sofre modificações geradas pela associação do RNA XIST e dos mecanismos específicos, como a metilação, tornando-se heterocromatina, a qual permanece condensada ao longo da maior parte do ciclo celular (De La Fuente et al., 1999).

Paralelamente a esses eventos, um outro gene, que está localizado a 15 kb abaixo do XIST em camundongos (Lee et al., 1999; Del Arenal et al., 2011), transcreve um RNA *antisense*. Este RNA *antisense* tem a função de manter o cromossomo X ativo, de modo que ele inibe a transcrição do gene XIST em *cis*, impede fisicamente o recrutamento de RNA polimerase para a transcrição (Luikenhuis et al., 2001) e recruta a DNMT3A para metilar o promotor do XIST (Del Arenal et al., 2011).

Portanto, esses dois *loci* (XIST e TSIX) precisam interagir de maneira correta para manter um padrão fisiológico. A transcrição do TSIX é regulada pelo gene XITE, ou seja, a transcrição de XITE promove a transcrição de TSIX, sendo assim considerado um dos responsáveis pela inativação do cromossomo X. Por isso, informações entre os genes XIST e TSIX homólogos devem ser trocadas para se estabelecer um padrão de regulação monoalélica de TSIX e de regulação do XIST em um cromossomo X e não no outro (Heard e Disteche, 2006; Del Arenal et al., 2011).

Considerações finais

Submeter a célula doadora de núcleo a um tratamento para sofrer uma desprogramação epigenética



antes da clonagem pode aumentar a eficiência da técnica. Acredita-se que o SAH, desmetilando o genoma do núcleo doador, seja capaz de aumentar a eficiência da clonagem de mamíferos, a produção de animais transgênicos e a produção de células-tronco a partir de células diferenciadas.

Os processos epigenéticos ainda são pouco conhecidos em várias espécies animais, inclusive na bovina. Necessitam de mais estudos para melhor se entender a reprogramação epigenética e, assim, subsidiar o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de clonagem por transferência nuclear.

Referências

- Brockdorff N.** X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *XIST* RNA. *Trends Genet Rev*, v.18, p.352-358, 2002.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF.** A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, v.349, p.38-44, 1991.
- Cantoni GL.** The Nature of the Active Methyl Donor Formed Enzymatically from L-Methionine and Adenosinetriphosphate. *J Am Chem Soc*, v.74, p.2942-2943, 1952.
- Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EEW, Clode N, Graca LM, Blom HJ, Jakobs C, Almeida IT.** Intracellular S-adenosyl-homocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med*, v.83, p.831-836, 2005.
- De La Fuente R, Hahnel A, Basrur PK, King WA.** X inactive specific transcript (*XIST*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod*, v.60, p.769-775, 1999.
- Del Arenal ME, Rocha ST, Heard E.** Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Hum Genet*, v.130, p.307-327, 2011.
- Deng C, Lu Q, Zhang Z, Rao T, Attwood J, Yung R, Richardson B.** Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signalling. *Arthritis Rheum*, v.48, p.746-756, 2003.
- Ding X, Wang Y, Zhang D, Guo Z, Zhang Y.** Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, v.70, p.622-630, 2008.
- Dvash T, Lavon N, Fan G.** Variations of X chromosome inactivation occur in early passages of female human embryonic stem cells. *Plos ONE*, v.5, n.6, p.1, 2010.
- Eilertsen KJ, Power RA, Harkins LL, Misica P.** Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci Rev*, v.98, p.129-146, 2007.
- Fulka J JR, First NL, Loi P, Moor RM.** Cloning by somatic cells nuclear transfer. *Bioessays*, v.20, p.847-851, 1998.
- Gebert C, Wrenzycki C, Herrmann D, Groger D, Thiel J, Reinhardt R, Lehrach H, Hajkova P, Lucas-Hahn A, Carnwath JW, Niemann H.** DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics*, v.94, p.63-69, 2009.
- Heard E, Distechi CM.** Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev*, v.20, p.1848-1867, 2006.
- Jeon BG, Coppola G, Perrault SD, Rho GJ, Betts DH, King WA.** Sadenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, v.135, p.815-828, 2008.
- Jeon Y, Sarma K, Lee JT.** New and Xisting regulatory mechanisms of X chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev*, v.22, p.62-71, 2012.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK.** Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, v.28, p.173-178, 2001.
- Kay GF.** Xist and X chromosome inactivation. *Mol Cell Endocrinol*, v.140, p.71-76, 1998.
- Klee WA, Richards HH, Cantoni GL.** The synthesis of methionine by enzymic transmethylation. Existence of two separate homocysteine methyltransferases on mammalian liver. *Biochim Biophys Acta*, v.25, p.157-164, 1961.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D.** Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature Genet*, v.21, p.400-404, 1999.
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J.** Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, v.462, p.315-322, 2009.
- Liu JH, Yin S, Xiong B, Hou Y, Chen DY, Sun QY.** Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev*, v.75, p.598-607, 2008.
- Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Varon R, Horsthemke B.** Increased prevalence of imprinting defects in Angelman Syndrome (AS) patients born to infertile couples. *Fertil Steril*, v.82, suppl.2, p.49, 2004.
- Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R.** Antisense transcription through the *XIST* locus mediates TSIX function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, v.21, p.8512-8520, 2001.
- Lyon MF.** Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, v.190, p.372-373, 1961.
- Mudd SH, Llevy HL, Skovby F, Kraus JP.** Disorders of transulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS,



- Walled D (Ed.). The metabolic basis of inherited disease. 8.ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p.1279-1327.
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A.** MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genet*, v.23, p.58-61, 1999.
- Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RSF.** Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reprod Rev*, v.135, p.151-163, 2008.
- Purohit P, And A, Auerbach.** Acetylcholine receptor gating: movement in the α -subunit extracellular domain. *J Gen Physiol*, v.130, p.569-579, 2007.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M.** DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Ntl Acad Sci*, v.96, p.6107-6112, 1999.
- Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.
- Sasaki H, Matsui Y.** Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, v.9, p.129-140, 2008.
- Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T.** Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod*, v.22, p.26-35, 2007.
- Selhub J, Miller JW.** The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*, v.55, p.131-138, 1992.
- Shi W, Haaf T.** Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.329-334, 2002.
- Singer-Sam J, Grant M, Lebon j M, Okuyama K, Chapman V, Monk M, Riggs AD.** Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol*, v.10, p.4987-4989, 1990.
- Szyf M.** The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci*, v.100, p.7-23, 2007.
- Villar-Garea A.** Epigenetic transcriptional repression of tumor supresor genes and its reversion by drugs. 2005. Tese (Doutorado) - Departamento de Laboratório de Epigenética, Universidade de Valencia, Espanha, 2005.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, v.60, p.996-1005, 1999.
- Westhusin ME, Long CR, Shin T, Hill JR, Looney CR, Pryor JH, Piedrahita JA.** Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology*, v.55, p.35-49, 2001.
-