

MARIANE FERRACIN MARTUCCI

**Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de  
genes *imprinted***

São Paulo  
2015



**MARIANE FERRACIN MARTUCCI**

**Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de  
genes *imprinted***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Prof. Dr. Felipe Perecin

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3182 FMVZ	<p>Martucci, Mariane Ferracin Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes <i>imprinted</i> / Mariane Ferracin Martucci. -- 2015. 79 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Cirurgia, São Paulo, 2015.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin.</p> <p>1. Bovino. 2. Desenvolvimento. 3. Epigenética. 4. Reprogramação. 5. Genes <i>imprinted</i>. I. Título.</p>
----------------	---



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes imprinted", protocolado sob o nº 2378/2011, utilizando 25 (vinte e cinco) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Felipe Perecin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Impacts of reproductive biotechnologies in epigenetic control of imprinted genes", protocol number 2378/2011, utilizing 25 (twenty five) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Felipe Perecin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 12 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTUCCI, Mariane Ferracin

Título: Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes  
*imprinted*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

À minha doce filha **Júlia** fonte de amor incondicional,

Ao meu amor **Guilherme** pelo companheirismo, carinho e paciência,

Ao meu pai “**Totonho**” pela compreensão, apoio e exemplo,

À minha mãe **Lana** pelo carinho, dedicação e apoio constantes,

À minha irmã **Marcele** pelo companheirismo ímpar,

Ao meu avô **Dorival**, meu cunhado **Renato**, minha afilhada **Luísa**

e toda minha **família** pelos conselhos e torcida

Dedico este trabalho

Agradecimento especial

À Dra. Fabiana Bressan, exemplo de determinação, competência e dedicação à ciência. Pela confiança, sabedoria e apoio. Por dividir experiências, mostrar caminhos e pela ajuda fundamental na correção e finalização desta tese.

Muito Obrigada!

## Agradecimentos

À Deus, princípio de todas as coisas;

À minha família, onde encontro meu porto seguro;

Aos meus pais Luís Antônio e Lana Mara, que permitiram que eu apostasse no meu futuro;

À minha filha querida Júlia, fonte de amor incondicional e apoio;

À minha irmã e companheira Marcelle, pelo apoio e incentivo constantes;

Ao meu marido Guilherme, pelo carinho, companhia, incentivo e paciência;

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, pelo convite e apresentação à FZEA, pela confiança e conselhos de amigo;

Ao Prof. Dr. Felipe Perecin, por me aceitar em sua equipe, por confiar em meu trabalho, possibilitar a realização desta tese e pela orientação precisa e exemplar;

Aos pós doutorandos Dra. Fabiana Bressan, Dra. Lilian Oliveira e Dr. Juliano Coelho da Silveira pelos ensinamentos constantes e suporte;

Aos técnicos do laboratório, especialmente à Márcia Monteiro, Arina Rocchetti e Lindsay Baltel pela ajuda e auxílio fundamentais;

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles e à Dra. Fabiana Bressan pela participação na banca de qualificação e suas sugestões pertinentes;

À minha amiga querida Fabiane Zaffalon, por me acolher em Pirassununga, por fazer parte da minha estada no Canadá durante o doutorado sanduíche e pelo apoio nas horas difíceis;

À minha querida amiga de todas as horas, Vanessa de Oliveira, pela ajuda, apoio. Companhia e carinho;

As minhas amigas do coração Laryssa Ribeiro e Kalyne Bertolin por tornarem minha passagem pela universidade de Montreal muito mais divertida;

Aos meus colegas de laboratório que se tornaram amigos no decorrer da jornada científica: Maite del Collado, Amanda Martins, Gabriella Mamede, Naira Pierre, Juliana Casals, Laís Pessoa, Aline Souza, Ana Carolina Mançanares, Natália Nardelli, Carolina Macabelli, Alessandra Pinheiro, Mariana Trés, Marina (IC), Rodrigo Barreto, Rafael Sampaio, Juliano Sangalli, Tiago de Bem, Pedro Ratto, Fábio Cury, Atanásio Vidane, Matheus Maldonado, Gabriel Sassarão.

Ao Prof. Dr. Lawrence Charles Smith pela orientação durante o doutorado sanduíche e suas adoráveis técnicas Jacinthe Therrien, a qual se tornou uma amiga especial e France Fillion;

Aos Profas. Dras. Ana Flávia de Carvalho, Daniele dos Santos Martins e Celina Mançanares, pelo companheirismo e incentivo;

Ao Prof. Dr. Mário Binelli pelas dicas e apoio durante o trabalho;

À amiga Ivana Nogueira pelo incentivo ímpar e amizade sincera;

À secretaria da pós-graduação, pela prontidão em ajudar;;

A todos os funcionários da biblioteca que nos recebem com tanta presteza e gentileza;

A todos os funcionários deste departamento sempre dispostos a ajudar;

Aos animais, que sem saber a razão, dão a sua vida para a realização de trabalhos científicos;

À Capes, pelo apoio financeiro;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste estudo e que por ventura não estejam citados neste agradecimento.

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."

*Theodore Roosevelt*

## RESUMO

MARTUCCI, M. F. **Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes *imprinted***. [Impact of reproductive biotechniques on the epigenetic regulation of imprinted genes]. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) são utilizadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária com o objetivo principal de corrigir infertilidades adquiridas ou herdadas. A transferência nuclear de célula somática (TNCS) ocupa um lugar de destaque na veterinária pela possibilidade de geração de indivíduos geneticamente idênticos, permitindo a produção de rebanhos homogêneos de alto mérito genético e servindo como modelo de estudo para técnicas de reprogramação. Porém, a utilização de TRAs, e em especial da TNCS, é considerada responsável pelo aumento na geração de conceptos portadores de alterações durante e após o desenvolvimento embrionário e fetal. A provável causa principal é a alteração na regulação da reprogramação epigenética devido à manipulação de gametas e embriões no período inicial do desenvolvimento, levando a alterações na regulação epigenética de genes *imprinted*. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar marcas epigenéticas e expressão de genes *imprinted* no desenvolvimento de conceptos bovinos produzidos por TNCS ou inseminação artificial (IA). Para tal, foram coletadas amostras de tecido muscular e membranas corioalantoideana e amniótica de animais na fase pré natal (fetal) e tecidos muscular, nervoso e hepático na fase pós natal (animais nascidos saudáveis – adultos ou não) de animais derivados de IA ou TNCS. Foi analisada a expressão dos genes *imprinted* H19, IGF2, IGF2R e Airn quando possível, assim como a metilação do DNA no locus H19/IGF2 na fase pós natal. Foi observado que na fase pré natal não foi detectada expressão do IGF2, enquanto que a expressão de H19 é aumentada em relação ao IGF2R, porém, sem diferenças entre os grupos nos tecidos estudados. Na fase pós natal, o padrão de expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R indica diminuição da expressão gênica relativa no fígado de animais TNCS e no aumento da expressão gênica do H19 na musculatura de animais adultos (saudáveis) bovinos produzidos por TNCS, apesar de o padrão de metilação dos genes *imprinted* IGF2/H19 não ser

diferente entre organismos considerados saudáveis e não saudáveis. Os resultados deste projeto contribuem para o entendimento dos mecanismos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento embrionário e fetal, em especial aqueles relacionados à dinâmica das alterações epigenéticas envolvidas no *imprinting* genômico.

Palavras-chave: Bovino. Desenvolvimento. Epigenética. Reprogramação. Genes *imprinted*.

## ABSTRACT

MARTUCCI, M. F. **Impact of reproductive biotechniques on the epigenetic regulation of imprinted genes.** [Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes *imprinted*]. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Assisted reproductive technologies (ARTs) are usually used in both human and veterinary medicine aiming the correction of heritable or acquired infertilities. The somatic cell nuclear transfer technique (SCNT) is of particular importance in veterinary as it enables the generation of genetically identical organisms, allowing the production of homogeneous genetically improved herds, and also serving as a model for reprogramming studies. However, the use of TRAs, SCNT in special, may be responsible for the increase of developmental-related abnormalities in the conceptuses. Such phenotypes are probably caused by a disruption during the epigenetic reprogramming due to the manipulation of gametes and embryos during the early development period, and therefore leading to disturbances in the epigenetic regulation of imprinted genes. The present study aimed to evaluate epigenetic marks and expression of imprinted genes in different developmental periods of cattle generated by SCNT or artificial insemination (AI). For that, corionic/alantoic and amniotic membranes from fetuses and muscular, nervous and hepatic tissues from born animals, healthy (adult) or not, produced by SCNT or AI were collected. The expression of the imprinted genes H19, IGF2, IGF2R and Airn was analyzed as well as the DNA methylation at locus H19/IGF2 in post-natal period. It was observed that IGF2 was not detected during pre-natal period, whereas H19 expression is increased when compared to IGF2R in the groups studied herein. At post-natal period the IGF2, H19 and IGF2R expression patterns infers the decrease of relative gene expression in the liver and the increase of H19 expression in the muscle of SCNT adult animals. The methylation pattern of IGF2/H19 locus, however, did not differ between healthy or not animals. The results described herein may contribute to the understanding of the epigenetic mechanisms related to embryonic and fetal development, and in special, to those related to the epigenetic dynamics during genomic imprinting.

Key words: Bovine. Development. Epigenetics. Reprogramming. Imprinted genes.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>EPIGENÉTICA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>CONSEQUENCIAS DAS TRAs NO IMPRINTING GENÔMICO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>REGULAÇÃO DO IMPRINTING NO LOCUS H19/IGF2.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Coleta do material.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Extração do DNA genômico .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Quantificação do DNA genômico (DNAg) extraído.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Tratamento do DNAg com bissulfito de sódio.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>39</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Purificação e Extração do DNA do gel de agarose.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Clonagem do produto do PCR no vetor (ligação no vetor e transformação em bactérias competentes).....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.7</b>	<b>Mini-prep (extração do DNA plasmidial).....</b>	<b>43</b>
<b>5.2.8</b>	<b>Sequenciamento e análise de metilação do DNA plasmidial.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Extração do RNA total.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Quantificação do RNA total extraído .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Transcrição reversa.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Quantificação dos transcritos por PCR quantitativo em tempo real .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES IMPRINTED NO PERÍODO PRÉ-NATAL DE BOVINOS CLONES E DERIVADOS DE IA.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1.1</b>	<b>Expressão gênica musculatura.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Expressão gênica corioalantoide.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.3</b>	<b>Expressão gênica âmnio.....</b>	<b>51</b>
<b>6.2</b>	<b>ANÁLISE DA METILAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES IMPRINTED NO PERÍODO PÓS-NATAL DE BOVINOS CLONES OU DERIVADOS DE IA.....</b>	<b>52</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Expressão gênica e metilação do fígado.....</b>	<b>53</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Expressão gênica e metilação da musculatura .....</b>	<b>55</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Expressão gênica e metilação do SNC.....</b>	<b>58</b>
<b>6.3</b>	<b>COMPARAÇÃO GERAL.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) tais como a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e a transferência nuclear de célula somática (TNCS) têm sido demonstradas como responsáveis pelo aumento na geração de conceptos portadores de alterações durante e após o desenvolvimento embrionário e fetal. As causas que levam a tais alterações ainda não são completamente elucidadas, embora existam relatos de que a estimulação hormonal, a superovulação, a manipulação e exposição dos gametas e embriões ao ambiente *in vitro* (como meio de cultura, temperatura, atmosfera gasosa entre outros) no qual os embriões são produzidos desempenhem um papel fundamental neste contexto (HIENDLEDER et al., 2006; LAZARAVICIUTE et al., 2014).

Essas alterações provocadas pelo ambiente não alteram o genoma global, visto que mantêm o DNA intacto, mas sim o padrão epigenético, o qual controla a expressão gênica e é herdável. Evidências em estudos realizados em animais sugerem que algumas alterações epigenéticas estão associadas a alterações em genes *imprinted* (LE BOUC et al., 2010; MARKET-VELKER; FERNANDES; MANN, 2010; SANTOS et al., 2010).

Os genes *imprinted* caracterizam-se por serem expressos de modo monoalélico, sendo a determinação do alelo expresso dependente de sua origem parental, diferentemente da maioria dos genes nos mamíferos. Tal determinação é fruto de marcações epigenéticas estabelecidas na linhagem germinativa, as quais são mantidas após a fertilização e durante o desenvolvimento (FERGUSON-SMITH; SURANI, 2001; JONES; TAKAI, 2001).

Muitos genes *imprinted* são expressos em tecidos placentários e fetais durante o desenvolvimento e são essenciais para o correto desenvolvimento placentário e para o controle do crescimento fetal (BRESSAN et al., 2009). Por esta razão, muitas das alterações observadas em animais ou seres humanos obtidos por biotecnologias reprodutivas são atribuídas a modificações epigenéticas apresentadas por estes genes.

Em ruminantes, espécies de interesse tanto econômico quanto científico, sendo recentemente apontado como um adequado modelo de estudo do desenvolvimento embrionário inicial (BERG et al., 2011), aproximadamente 20 genes

já foram reportados como *imprinted* (geneimprint.com). Dentre estes, é conhecido que alguns podem ser relacionados com as anormalidades observadas em animais produzidos por técnicas reprodutivas, como por exemplo, o mRNA não traduzido imprintado matematicamente expresso, não codificador de proteína (*H19*), o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina – 2 (*IGF2R*, do inglês *Insulin-like growth factor 2 receptor*), o polipeptídeo ribonucleoproteína nuclear pequeno N (*SNRPN*, do inglês *Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N*) e o transcrito anti senso não codificante do *IGF2R* (*AIRN*).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo de pesquisa indicaram a existência de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), entre taurinos e zebuínos tanto na região diferencialmente metilada (DMR) como na região transcrita dos genes *IGF2* e *H19*. A análise das sequências permitiu identificar, através dos polimorfismos, a origem parental dos alelos e seus padrões de metilação (SUZUKI et al., 2011; SMITH et al., 2015).

Dessa forma, utilizando modelos experimentais baseados na produção de indivíduos híbridos (*Bos taurus* x *Bos indicus*) que permitem o rastreamento através de SNPs as modificações epigenéticas alelo específicas, bem como realizar ensaios de expressão gênica alelo específica, este projeto visa avaliar os níveis de metilação da região diferencialmente metilada (DMR), relacionando-os com os níveis de expressão gênica dos genes *imprinted* *H19/IGF2* e *IGF2R*, permitindo, desta forma, avaliar o impacto da técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos por transferência de núcleo no *imprinting* dos genes citados acima, sendo comparados fetos e animais clones com outros produzidos por inseminação artificial.

Os resultados deste projeto contribuirão para o entendimento dos mecanismos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento embrionário e fetal, em especial aqueles relacionados à dinâmica das alterações epigenéticas envolvidas no *imprinting* genômico; igualmente, os resultados gerados poderão representar importante avanço na busca por protocolos de produção *in vitro* de embriões que minimizem as alterações epigenéticas observadas, visando o aumento da eficiência nas taxas de produção embrionária.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INTRODUÇÃO

Tanto em humanos quanto em animais, técnicas de reprodução assistida (TRAs) vem sendo amplamente empregadas, seja para a correção de condições de baixa fertilidade, infertilidades congênitas ou adquiridas ou mesmo, como no caso da produção animal, para a geração de animais com maior valor econômico em menor tempo. Porém, maiores perdas gestacionais são observadas nestas condições, e as causas prováveis ainda não são bem elucidadas (CEELEN; VERMEIDEN, 2001; LUCIFERO et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que as próprias TRAs tais como a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *intracytoplasmic sperm injection*) e a transferência nuclear de células somática (TNCS ou clonagem) provocam alterações epigenéticas nos conceptos gerados, muitas vezes interferindo na capacidade de desenvolvimento a termo ou mesmo no nascimento de indivíduos saudáveis (SMITH et al., 2012; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

É conhecido que durante o período de desenvolvimento embrionário inicial eventos críticos de remodelação da cromatina levam à expressão gênica necessária para a manutenção do desenvolvimento embrionário e fetal adequados. Nesta fase, fatores ambientais são capazes de modificar tais marcações epigenéticas, sendo que a estimulação hormonal e/ou a superovulação, a exposição dos gametas e embriões aos meios de cultivo, a micromanipulação de gametas e embriões, dentre outros procedimentos *in vitro*, já foram reportados como potenciais influências (LE BOUC et al., 2010; MARKET-VELKER; FERNANDES; MANN, 2010).

Desta maneira, esta revisão tem como objetivo descrever e discutir os mecanismos epigenéticos e consequências de sua desregulação no desenvolvimento inicial em animais e humanos, destacando o possível efeito das TRAs na manutenção de marcas epigenéticas, especificamente no *imprinting* genômico dos indivíduos derivados.

## 2.2 EPIGENÉTICA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Após a fertilização, o zigoto dá origem a um organismo multicelular formado por mais de 200 tipos celulares diferentes. Este evento é dependente de modificações epigenéticas que controlam a expressão de determinados genes, permitindo o comprometimento e diferenciação em células e tecidos específicos (MANN; BARTOLOMEI, 2002; NAFEE et al., 2008; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008).

A metilação do DNA e as modificações pós traducionais nas proteínas histonas são os principais mecanismos epigenéticos envolvidos no desenvolvimento embrionário, sendo responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos padrões de expressão gênica tecido específicos através da repressão transcricional e da remodelação da cromatina (LI, 2002).

As modificações pós traducionais nas proteínas histonas ocorrem nas caudas dos resíduos de aminoácidos que se projetam do nucleossomo. Estas modificações incluem acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (LACOSTE; CÔTÉ, 2003). As diferentes combinações entre as modificações covalentes das histonas formam um código, conhecido como “código das histonas”. Estas modificações pós traducionais determinam a estrutura, o padrão de condensação e a atividade transcricional da cromatina (STRAHL; ALLIS, 2000; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

Além das alterações diretas na estrutura da cromatina, as modificações pós traducionais das histonas permitem a interação da cromatina com uma série de outras proteínas, com ação enzimática ou não (BERGER, 2002). De modo geral, a acetilação das proteínas histonas está associada a genes transcionalmente ativos enquanto que sua metilação é geralmente associada à repressão transcricional.

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais estudados (BIRD, 2002; YOO; JONES, 2006), o qual se dá pela ligação covalente de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) ao carbono da posição 5 da citosina de um dinucleotídeo CpG que se transformará em 5-metilcitosina. A reação é catalisada por uma enzima, a DNA metiltransferase (DNMT) que usa a S-adenosilmetionina (SAM) como doadora do grupo metil (ARENAS-HUERTERO; RECILLAS-TARGA, ).

Nos mamíferos, a metilação do DNA tem papel importante na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na

modificação da cromatina, sendo sua correta regulação essencial para o desenvolvimento embrionário normal (SURANI, 1998; NG; BIRD, 1999).

Os padrões de metilação do genoma nas células somáticas diferenciadas são geralmente estáveis e hereditários, entretanto, durante o desenvolvimento embrionário a metilação do DNA se altera de forma orquestrada por meio da desmetilação e “de novo” metilação<sup>1</sup>. Durante o desenvolvimento das células germinativas, ainda durante a embriogênese, ocorre uma alteração nos quais os padrões de metilação prévios são apagados, ou seja, os genes ficam desmetilados em ambos os alelos. Posteriormente, um padrão de metilação específico para cada sexo é novamente estabelecido, desta maneira estabelecendo o *imprinting* genômico (REIK; WALTER, 2001). Desta maneira, a expressão de genes sujeitos ao *imprinting* genômico depende da sua herança, paterna ou materna. Nos genes *imprinted* paterno o alelo herdado do pai é epigeneticamente modificado prevenindo sua transcrição, levando à expressão somente do alelo herdado da mãe, e o contrário ocorre nos genes *imprinted* maternos (FERGUSON-SMITH; SURANI, 2001; JONES; TAKAI, 2001).

Tais células primordiais germinativas continuarão seu desenvolvimento e diferenciação durante a embriogênese e também durante a vida pós natal dos organismos, gerando os gametas. Logo após a fertilização, o embrião inicial passa por uma nova onda de desmetilação que “apaga” quase todo o padrão de metilação herdado dos pais, desta vez excetuando-se os genes *imprinted*; seguida de uma “de novo” metilação determinando os padrões de metilação, e conseqüentemente, a expressão gênica do embrião (KAFRI et al., 1992).

O *imprinting* genômico foi descoberto há cerca de vinte anos, como resultado de experimentos de transferência pronuclear em camundongos. Atualmente, cerca de uma centena de genes são conhecidamente *imprinted* em camundongos e humanos, e algumas dezenas também já foram relatados como *imprinted* em animais domésticos, incluindo 31 em bovinos ([www.geneimprint.org](http://www.geneimprint.org)). Diversos genes *imprinted* estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento fetal, enquanto outros influenciam o comportamento ou outras características (revisado por (DELAVAL; FEIL, 2004; BRESSAN et al., 2009)).

---

<sup>1</sup> “de novo” metilação: adição de grupamento metil em fita de DNA sem que a fita oposta contenha citosinas metiladas.

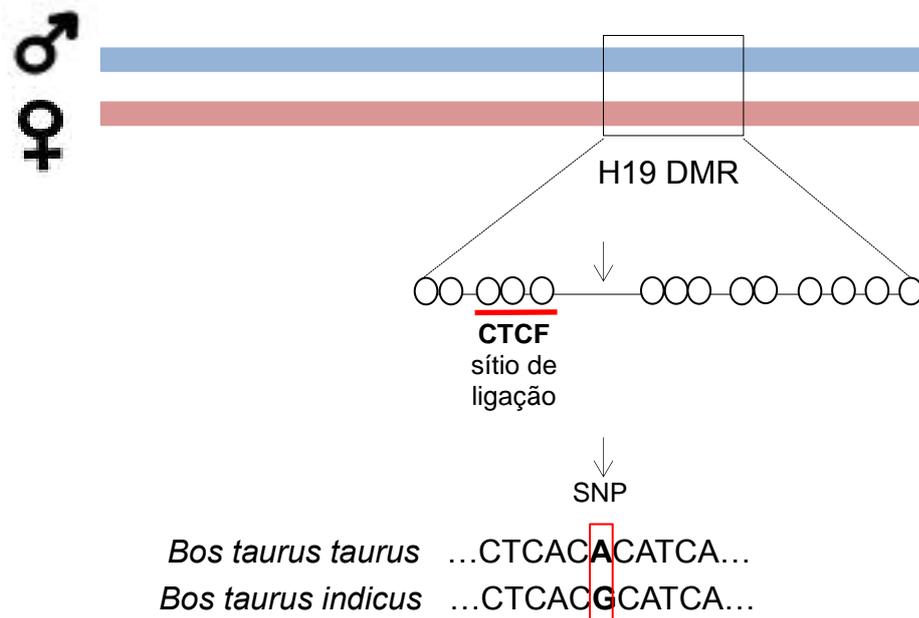
A expressão alélica de genes específicos pode explicar a teoria do conflito parental, no qual genes paternos maximizam o desenvolvimento fetal, e reciprocamente, a fêmea se auto protege, através da supressão da expressão de genes indutores de crescimento pelo alelo materno. O estado de *imprinting* de certos genes confere à fêmea um melhor controle sobre o desenvolvimento fetal, sem efeitos deletérios sobre isto ou sua própria vida (MOORE; HAIG, 1991; REIK; WALTER, 2001).

Neste contexto, o fenômeno de *imprinting* genômico tem sido demonstrado como essencial para a placentação e desenvolvimento normais do organismo (MIOZZO; SIMONI, 2002; FOWDEN et al., 2006). O período de embriogênese e placentação são particularmente suscetíveis a alterações na expressão gênica, incluindo na regulação dos genes *imprinted* (NOTHIAS et al., 1995). Alterações na aquisição ou manutenção de genes *imprinted* são determinantes não somente durante a gestação mas também durante a vida pós natal, geralmente levando a fenótipos letais durante o desenvolvimento inicial, ou então, a fenótipos relacionados a diversas síndromes e enfermidades pós natais.

Análises deste tipo de metilação no DNA genômico (gDNA) podem ser obtidas diretamente através do uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação ou após a conversão do gDNA catalisada por ácido com bissulfito de sódio, o qual é seletivo para C comparado com 5mC (HAYATSU, 2008).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo de pesquisa indicaram a existência de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), entre taurinos e zebuínos tanto na região diferencialmente metilada (DMR) como na região transcrita dos genes *IGF2* e *H19*. A análise das sequências permitiu identificar, através dos polimorfismos, a origem parental dos alelos e seus padrões de metilação (SUZUKI et al., 2011; SMITH et al., 2015), como ilustra a figura 1.

Figura 1 - SNPs *Bos taurus* x *Bos indicus* no gene *H19*



**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Identificação dos SNPs no sítio de ligação do CTCF no gene H19. Adaptado de SUZUKI et al., 2011.

### 2.3 CONSEQUENCIAS DAS TRAS NO IMPRINTING GENÔMICO

A utilização de TRAs, como por exemplo, a fertilização *in vitro* (FIV) em humanos e animais, ou a clonagem por transferência de núcleo em animais, ainda que utilizadas com o objetivo de aumentar ou otimizar a geração de novos indivíduos, frequentemente resultam em proles com alteração no peso ao nascimento e taxas de sobrevivência neonatal reduzidas.

Em humanos e camundongos alterações nas marcações epigenéticas, tais como a metilação de DNA e a modificação pós traducional de proteínas histonas foram observadas nos genes *imprinted* IGF2, H19, SNURF, PEG3, GNAS entre outros após a realização de técnicas de reprodução assistida (LAPRISE, 2009).

Uma condição bastante conhecida é o nascimento de bebês macrossômicos ou crias grandes, situação conhecida em ruminantes por Síndrome da cria gigante (do

inglês *Large offspring syndrome* ou LOS; (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998)). A LOS assemelha-se à Síndrome Beckwith–Wiedemann (do inglês *Beckwith–Wiedemann syndrome* ou BWS) em humanos. Ambos podem ter como causa modificações exclusivamente epigenéticas que levam a distúrbios no *imprinting* da região de controle do *imprinting* (do inglês Imprinting control region ou ICR) 1 e 2 do gene IGF2 levando à sua expressão bialélica e à redução na expressão do H19.

Os genes IGF2/H19 também estão envolvidos na Síndrome Russell–Silver (RSS, do inglês *Russell–Silver syndrome*), que é caracterizada pela hipometilação na região ICR1 ou 2 dos genes IGF2-H19, levando a uma redução na expressão do IGF2 e à expressão bialélica do H19, por vezes levando ao retardo de crescimento intrauterino e pós natal (BLIEK et al., 2006). De fato, os fenótipos dos pacientes acometidos com as síndromes BWS e RSS incluem distúrbios de crescimento, assimetria corporal, retardo mental e aparecimento de tumores (AMOR; HALLIDAY, 2008).

Embora a clonagem de mamíferos tenha sido alcançada com sucesso, a porcentagem da prole viva é baixa, principalmente devido ao tamanho fetal reduzido e menor quantidade de sítios de implantação placentários. Estudos atribuem estas alterações à reprogramação anormal das células doadoras de núcleo usadas para a clonagem. A incapacidade dos oócitos de restaurar completamente o estado diferenciado de uma célula somática à seu estado pluripotente e indiferenciado é normalmente evidenciada por padrões aberrantes de metilação do DNA estabelecidos através do genoma durante o desenvolvimento do blastocisto (SUZUKI et al., 2011).

A produção de embriões por TNCS tem como consequência a expressão gênica desregulada, comparada a embriões produzidos por meio de outras técnicas, como a FIV ou a gestação natural, principalmente no período pré implantacional (MEIRELLES et al., 2010). Como exemplo, a expressão anormal de genes *imprinted*, tais como o gene H19, transcrito maternalmente e o gene IGF2R, em embriões obtidos através de TNCS causa perdas gestacionais entre o período de pré implantação e a vida neonatal em ovinos, bovinos e camundongos (PERECIN et al., 2009).

Em bovinos, evidências recentes obtidas por nosso grupo de pesquisas (PERECIN et al., 2009; SUZUKI et al., 2009, 2011; SMITH et al., 2015), bem como por outros pesquisadores (COULDREY; LEE, 2010; HORI et al., 2010)

demonstraram que as alterações epigenéticas em genes *imprinted* estão relacionadas à baixa eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear. Acredita-se que algumas das anormalidades observadas em animais produzidos por TNCS, tais como a LOS, podem estar associadas ao gene IGF2R.

#### 2.4 REGULAÇÃO DO *IMPRINTING* NO LOCUS IGF2/H19

A importância da regulação do *imprinting* genômico na geração e desenvolvimento de indivíduos saudáveis foi demonstrada por Kono et al. em 2004, quando o nascimento de camundongos partenogenéticos foi provado ser possível através da correção da relação de expressão entre os genes H19 e IGF2. A regulação do *imprinting* neste locus IGF2/H19 está ilustrada na figura 2. Uma vez que o processo de aquisição do *imprinting* genômico ocorre nas fases finais da gametogênese, oócitos recuperados antes deste período (antes do período de crescimento) são considerados neutros em relação ao *imprinting*, e ambos H19 e IGF2 são expressos. Através da deleção do H19 nestes oócitos, conseqüentemente interferindo no *imprinting* do IGF2, foi demonstrado que oócitos partenogenéticos contendo a expressão adequada de IGF2/H19 foram capazes de gerar indivíduos vivos a termo (KONO et al., 2004).

O gene H19 possui um papel importante como gene supressor de tumor e regulador trans de genes coexpressos pertencentes à rede de genes *imprinted*, responsável por controlar o crescimento fetal e pós natal em camundongos (GABORY; JAMMES; DANDOLO, 2010).

O alelo materno do gene H19 é ativo, por isso desmetilado, enquanto que o alelo paterno está inativo, característica conferida pela metilação do DNA e maior resistência da cromatina paternal à ação de enzimas nucleases (SASAKI; ISHIHARA; KATO, 2000). O H19, que produz um RNA não codificante, é fortemente expresso em tecidos embrionários e extra embrionários durante o desenvolvimento e sua regulação é expressamente diminuída após o nascimento (IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008).

O primeiro gene *imprinted* a ser descrito foi o gene *Igf2r* em camundongos (BARLOW et al., 1991). Este gene *imprinted* paterno e expresso pelo alelo materno é um regulador negativo do crescimento fetal através do sequestro de *Igf2* para o interior de lisossomos e sua subsequente degradação (LAU et al., 1994; LUDWIG et al., 1996; MURPHY; JIRTLE, 2003). Em ovelhas, embriões partenogéticos que expressam altos níveis de IGF2R possuem crescimento retardado quando comparados aos controles (FEIL et al., 1998; HAGEMANN et al., 1998; YOUNG et al., 2003). A ausência da expressão do IGF2R em embriões ovinos submetidos a condições de cultivo *in vitro*, como já discutido, está associada ao crescimento fetal exacerbado ou LOS (YOUNG et al., 2001), de tal maneira que uma patente que objetiva o diagnóstico de LOS em embriões produzidos *in vitro* através dos níveis de IGF2R já foi depositada (Patent n. WO200018902-A).

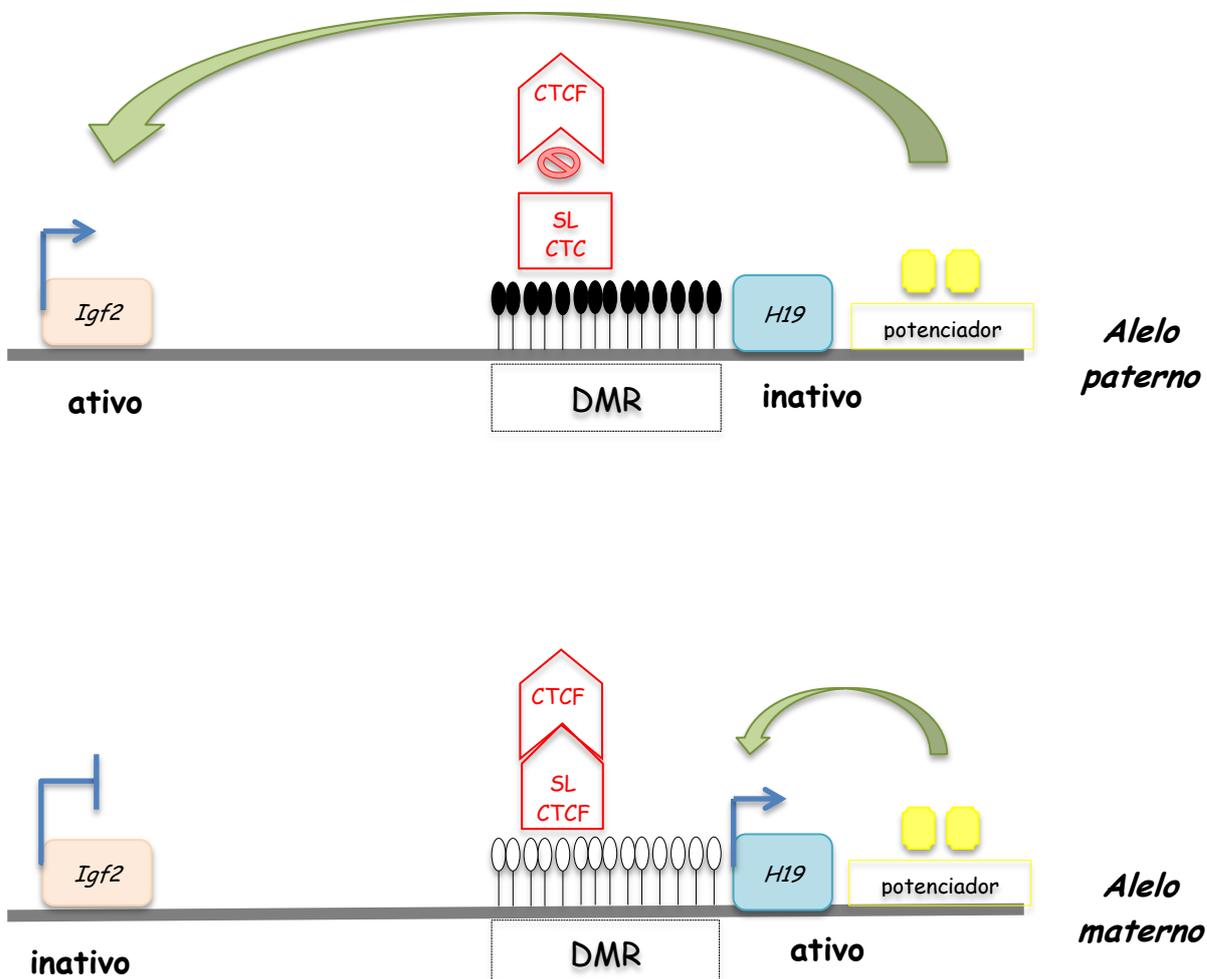
A regulação do *imprinting* no locus do IGF2R inclui as DMRs, as modificações pós traducionais de proteínas histonas e a presença do transcrito antisense do IGF2R, conhecido com Airn. As regiões de metilação do gene IGF2R incluem a ilha CpG presente na região promotora do gene, denominada DMR1 e outra situada no íntron 2, chamada DMR2. A importância da DMR1 no controle epigenético do gene IGF2R ainda permanece indefinida. Em murinos, a metilação do alelo materno na DMR2 determina a inibição da expressão do *Igf2r* no alelo paterno, pois a partir do alelo paterno não metilado há transcrição de um RNA não codificador denominado Airn, que impede a expressão paternal do *Igf2r* (SLEUTELS; ZWART; BARLOW, 2002; DELAVAL; FEIL, 2004). No entanto, diversas evidências demonstram que a metilação na DMR2 não é determinante ou fundamental no estabelecimento do *imprinting* genômico do gene IGF2R em algumas espécies, como no caso dos marsupiais, nos quais o IGF2R é *imprinted* apesar da ausência da DMR2 (KILLIAN et al., 2001); ou em humanos, que apresentam expressão bialélica do IGF2R apesar de possuírem a DMR2 (RIESEWIJK et al., 1996, 1998).

Por outro lado, as modificações pós traducionais nas proteínas histonas correlacionam-se em maior grau com o *imprinting* genômico do IGF2R (VU; LI; HOFFMAN, 2004). Acredita-se que a manutenção do *imprinting* genômico seja mais dependente de modificações nas proteínas histonas, o que impede a perda de *imprinting* durante a onda de desmetilação que ocorre logo após a fertilização (WAGSCHAL; FEIL, 2006; WAGSCHAL et al., 2008).

Figura 2 - Controle epigenético do *imprinting* genômico no locus *H19/IGF2* e *IGF2R* e *Airn*

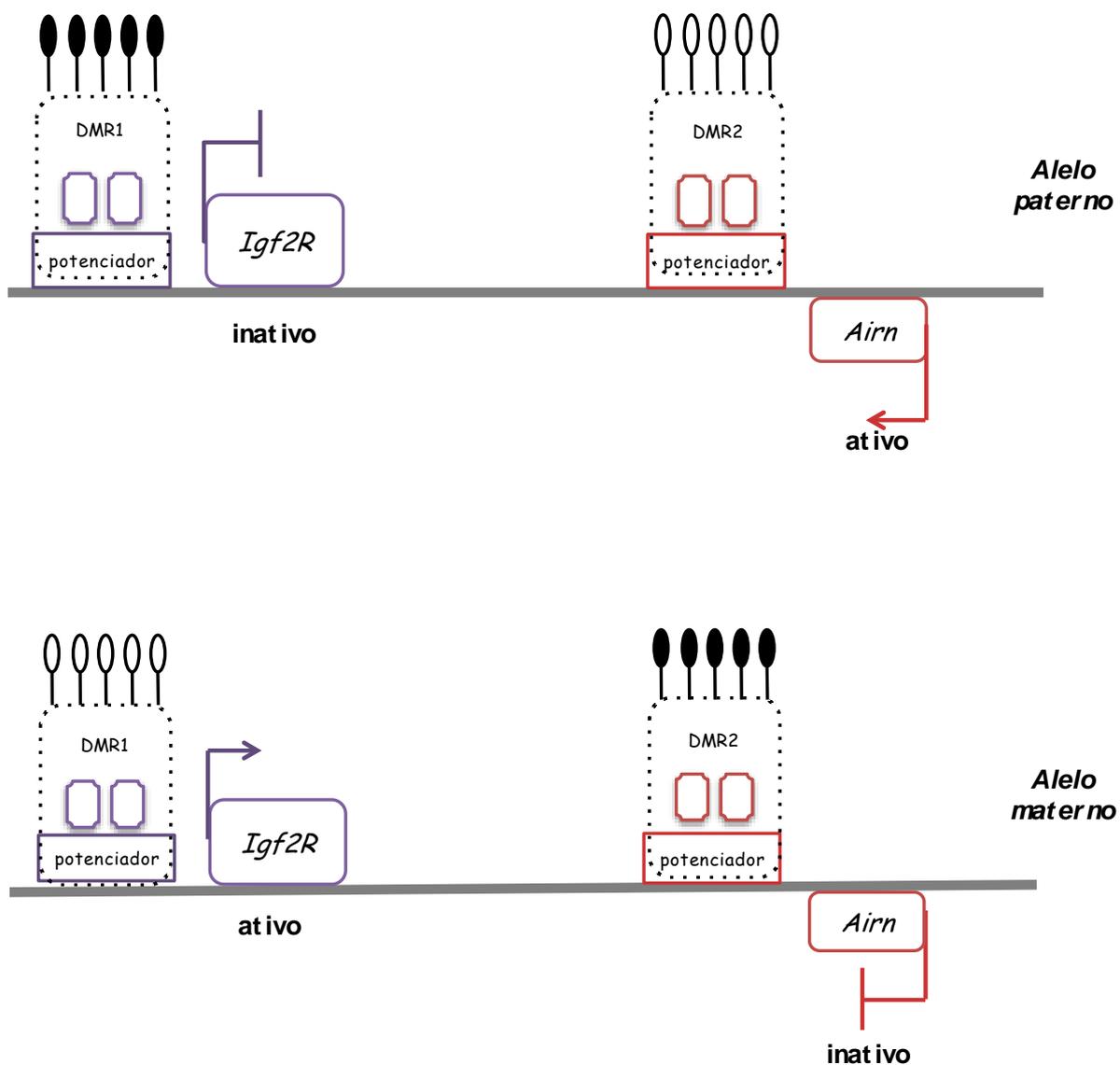
A

(Continua)



(Conclusão)

B



**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** A e B: Mecanismos de ativação e inibição da transcrição dos genes imprintados IGF2, H19, IGF2R e AIRn, respectivamente.

Em conclusão, erros epigenéticos são sabidamente associados a fenótipos pré e pós natal indesejáveis em animais de produção, sendo os prováveis principais responsáveis pela baixa eficiência das técnicas de reprodução atuais. Estratégias para a modificação epigenética durante o processo de reprogramação nuclear já são empregadas, porém, com resultados ainda insatisfatórios (SANGALLI et al., 2014).

OBJETIVOS

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcas epigenéticas e expressão de genes *imprinted* no desenvolvimento de conceptos bovinos produzidos por TNCS ou inseminação artificial.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica dos genes *imprinted* IGF2, H19 e IGF2R e AIRN em fetos e animais adultos saudáveis ou não, produzidos por TNCS ou IA;
- Determinar os níveis de metilação do DNA nas regiões diferencialmente metiladas (DMR) dos genes *imprinted* IGF2 e H19, em animais adultos produzidos por transferência de núcleo saudáveis ou não ou produzidos por inseminação artificial;
- Correlacionar a expressão gênica e o nível de metilação do DNA nas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em bovinos produzidos por TNCS ou IA.



#### 4 HIPÓTESES

1. O padrão de *imprinting* e de expressão dos genes IGF2/H19 e IGF2R nas fases pré e pós natal difere entre fetos e animais adultos bovinos produzidos por TNCS ou IA.
2. O padrão de metilação na DMR dos genes *imprinted* IGF2/H19 e IGF2R difere entre organismos considerados saudáveis e não saudáveis.
3. A produção in vitro de embriões por TNCS induz a hipometilação e elevação da expressão dos genes *imprinted* H19, IGF2 e IGF2R nas fases pré e pós natal de bovinos produzidos por TNCS ou IA.

MATERIAL E MÉTODOS

---

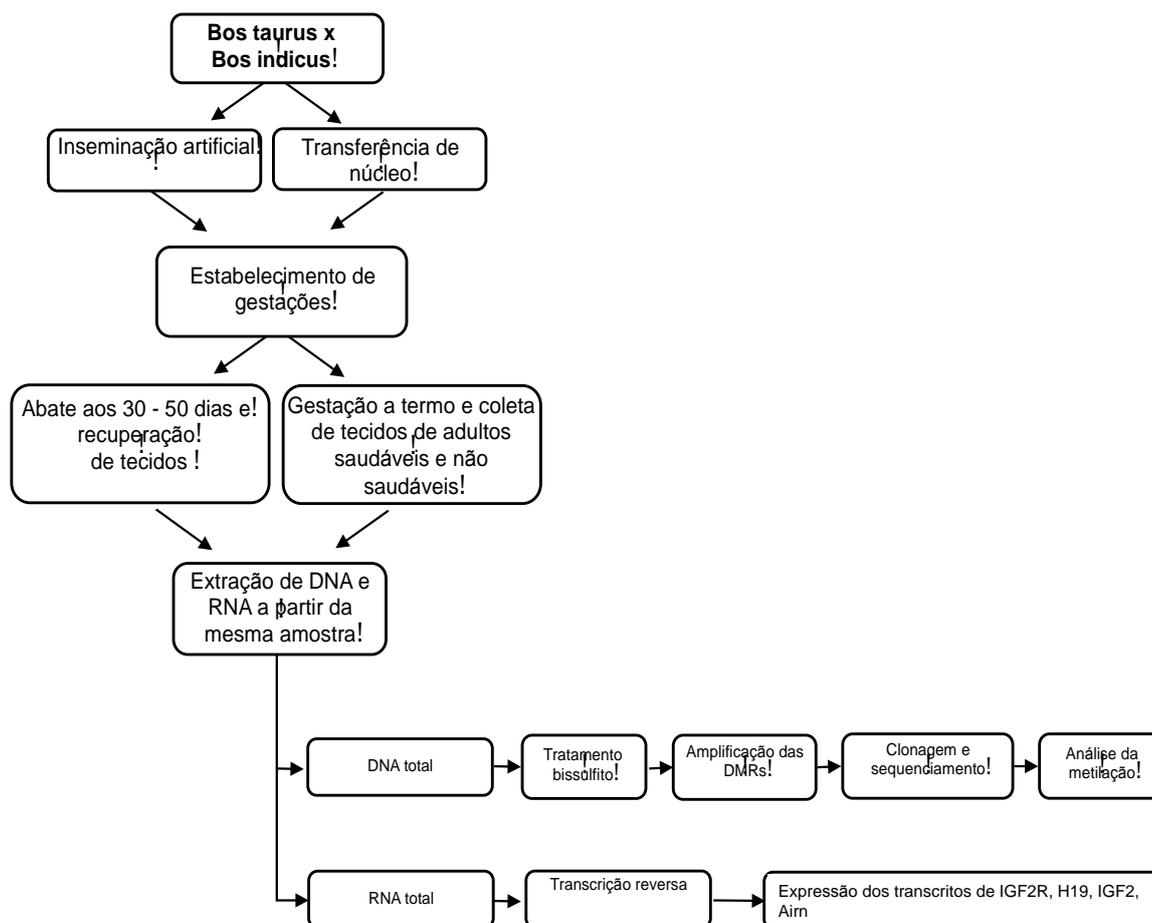
## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) protocolo número 2378/2011 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Área: animal, sob processo número 2012.1.14444.74.7 da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP). O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD), Departamento de Medicina Veterinária da (FZEA/USP), e contou com a colaboração do Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, do Centro de Pesquisa em Reprodução Animal (*Centre de Recherche en Reproduction Animale* – CRRA), da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de Montreal, Saint-Hyacinthe, Canadá. O laboratório do CRRA tem estudado genes *imprinted* em bovinos utilizando as técnicas de sequenciamento por bissulfito, e deu apoio ao desenvolvimento dessas técnicas no LMMD.

### 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os tecidos fetais e de anexos fetais recuperados dos embriões híbridos foram utilizados para estudos de metilação alelo específica das DMRs do gene IGF2/H19 após tratamento bissulfito através de sequenciamento de DNA. Os ensaios de expressão gênica incluíram quantificação de transcritos IGF2/H19, IGF2R e AIRN, conforme mostrado na figura 3

Figura 3 - Delineamento experimental gráfico



Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** O delineamento experimental gráfico mostra a utilização do modelo animal híbrido para a detecção de alterações no padrão de imprinting de animais híbridos *Bos taurus x Bos indicus* gerados pelas biotecnologias da reprodução transferência de núcleo ou inseminação artificial.

### 5.1.1 Coleta do material

Neste estudo foi analisada a manutenção do *imprinting* e a expressão gênica no locus H19/IGF2 e IGF2R/Airn em conceptos, neonatos e adultos bovinos híbridos F1 (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) produzidos por meio de inseminação artificial (IA) ou transferência nuclear de célula somática (TNCS).

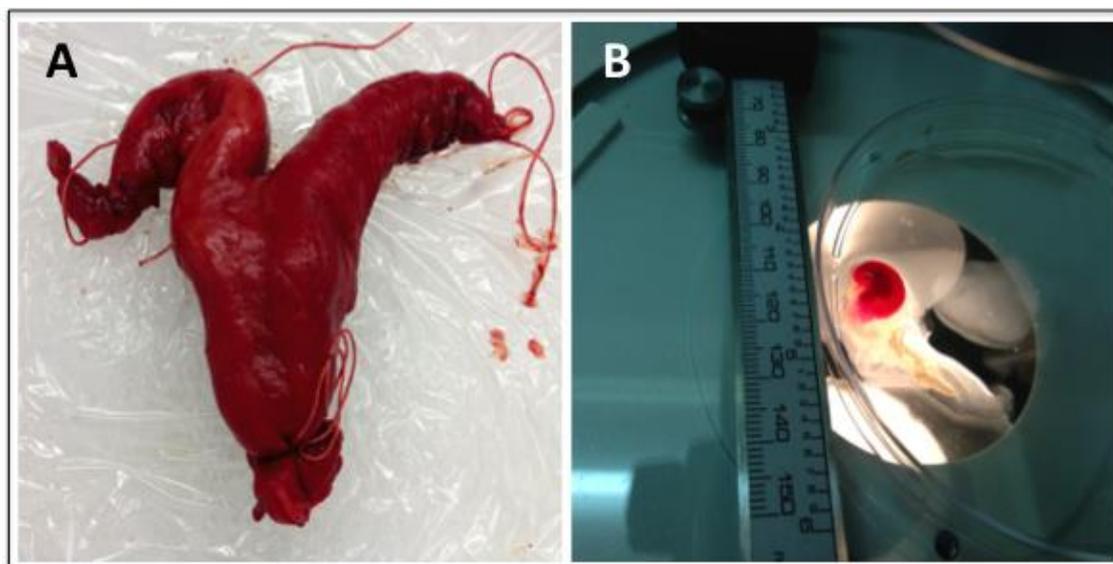
Tecidos obtidos de animais adultos (cérebro, coração, fígado e musculatura esquelética) foram coletados de animais com 3 anos de idade derivados de inseminação artificial ou clonagem abatidos de acordo com as normas do RIISPOA.

Tais animais não apresentavam problemas de saúde na hora do abate. Imediatamente após o abate, fragmentos dos tecidos foram coletados, acondicionados em nitrogênio líquido (LN<sub>2</sub>) ou RNA Later (Life Technologies) e levados ao laboratório para armazenagem a -80°C.

Tecidos de animais neonatos clonados que vieram ao óbito no período perinatal foram obtidos durante o procedimento de necropsia e processados como descrito anteriormente.

Para a coleta dos conceptos (30 a 45 de gestação) as fêmeas bovinas inseminadas foram abatidas como descrito anteriormente. Imediatamente após o abate, o trato reprodutivo das fêmeas inseminadas foi removido, acondicionado em gelo e transportado ao laboratório. Os cornos uterinos foram dissecados com um corte longitudinal na curvatura maior, expondo o feto e os anexos fetais (Fig. 4). Fragmentos de tecidos fetais (músculo esquelético do membro posterior) e das membranas fetais amniótica e corioalantoideana foram processadas como descrito anteriormente.

Figura 4 - Coleta e processamento do material biológico



**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** A: Útero bovino prenhe em gelo antes da dissecação para coleta. B: Imagem de embrião bovino com anexos fetais em placa de Petri.

## 5.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA

### 5.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado das amostras coletadas de SNC, musculatura e fígado de animais adultos produzidos por IA, de animais neonatos clonados mortos e adultos saudáveis produzidos por TNCS.

A extração do DNA genômico global (gDNA) foi realizada utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) segundo recomendações do fabricante. Desta maneira, 25mg do tecido foi macerado manualmente através de pistilo. O tecido macerado foi ressuspendido em 100µL de tampão ATL. Adicionou-se 20µL de proteinase K e incubou-se em banho seco a 56°C, agitando-se esporadicamente, durante 1 a 3h (SNC ou fígado) ou *overnight* (musculatura).

Adicionou-se 200µL de tampão AL, agitou-se em vortex (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) por 15 segundos e incubou-se a 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200µL de etanol 100%. Após agitar por 15 segundos, transferiu-se cuidadosamente todo o material para a coluna de purificação (com tubo coletor 2mL). Centrifugou-se a 8000g por 1 minuto. Todos os procedimentos de centrifugação foram realizados em microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a temperatura ambiente (TA). Descartou-se o filtrado e adicionou-se 500µL de tampão AW1 e centrifugou-se a 8000g por 1 minuto. Descartou-se o filtrado, acrescentou-se 500µL de tampão AW2 e centrifugou-se a 14000g por 3 minutos. A coluna foi transferida para novo tubo coletor 2mL e realizou-se uma centrifugação a velocidade máxima por 1 minuto. Transferiu-se a coluna para microtubo de 1,5mL e adicionou-se 200µL de tampão AE. Incubou-se a TA por 1 minuto e em seguida centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto, repetiu-se a adição de 200µL de tampão AE, incubou-se por 5 minutos a TA e centrifugou-se a 8000g por 1 minuto. O material foi conservado a 4°C e utilizado imediatamente para a quantificação e posteriores reações.

### 5.2.2 Quantificação do DNA genômico (DNAg) extraído

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND1000, Wilmington, DE), através de leitura a DO 260nm e DO 280nm.

A integridade das amostras foi analisada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

### 5.2.3 Tratamento do DNAg com bissulfito de sódio

O bissulfito de sódio catalisa a desaminação de citosinas a uracilas (posteriormente amplificadas como timinas pela PCR), enquanto as citosinas metiladas (5-metil-citosina, 5mC) permanecem inalteradas. Essa técnica permite a rápida identificação de 5mC em todos os sítios CpG do DNA genômico (SANDOVICI et al., 2003), como mostra o quadro 1.

Quadro 1 - O tratamento com o bissulfito de sódio dá origem a diferentes sequências de DNA para o DNA metilado e não metilado

	Sequência original	Após tratamento com bissulfito de sódio
DNA Não metilado	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
DNA Metilado	N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N	N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N

EpiTect Bisulfite Kit - Qiagen, 2006.

**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

O DNAg (2µg) isolado foi submetido à reação de desaminação utilizando-se o EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, Valencia, CA #cat. 59104) segundo recomendações do fabricante.

Para tal, dissolveu-se o mix de bissulfito através da adição de 800µl de água livre de RNase. Agitou-se o mix até a completa diluição, aqueceu-se a solução mix

bissulfito mais água a 60°C e agitou-se novamente, quando necessário. As reações de bissulfito foram preparadas em microtubos de PCR de 200µl com os componentes ordenados segundo listados no quadro 2.

Quadro 2 - Componentes da reação de Bissulfito

<b>Componente</b>	<b>Volume por reação (µl)</b>
<b>Solução de DNA (1ng - 2µg)</b>	Variável* (máximo 20µl)
<b>Água livre de RNase</b>	Variável*
<b>Mistura Bissulfito dissolvida</b>	85
<b>Tampão protetor do DNA</b>	35
<b>Volume total</b>	140

\*o volume combinado da solução de DNA e água livre de RNase deve totalizar 20µl. Ref. EpiTect Bisulfite Kit - Qiagen, 2006.

Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

As condições de ciclagem incluíram etapas de desnaturação e incubação alternadas, como segue: desnaturação a 95°C por 5 minutos, incubação a 60 °C por 25min, desnaturação a 95 °C por 5min, incubação a 60 °C por 85min (1h e 25min), desnaturação a 95 °C por 5min, incubação final a 60 °C por 175min (2h e 55min) terminando por uma pausa de 20 °C.

#### **5.2.4 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Após o tratamento com bissulfito de sódio, a DMR1 dos genes *imprinted* IGF2/H19 foi amplificada a partir do DNA dos tecidos pela reação em cadeia da polimerase (PCR), valendo-se de combinações entre os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti senso. Os oligonucleotídeos iniciadores listados no quadro 3, específicos para o DNA convertido com bissulfito foram desenhados dentro da região de controle do *imprinting* (ICR) do gene *imprinted* H19 para amplificar um

fragmento de 660 pares de bases (pb), abrangendo de \_3327 a \_2675 pb do exon 1 (acesso no GenBank no. NW\_001494547).

Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da DMR1 dos genes IGF2/H19 (SUZUKI et al., 2011).

Orientação	Sequência (5'→3')
Senso (IGF2/H19F)	TAT TTT AGA TAG GGT TGA GAG GTTG
Antisenso (IGF2/H19R)	ACA CCT TAA AAA ACT CAA ATA AAT ACC

Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

Cada reação de PCR foi realizada em triplicata utilizando os iniciadores descritos acima. A reação de PCR foi realizada em volume final de 50µL, contendo 1-2µL de DNA tratado com bissulfito, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3mM de mistura de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão de PCR 1X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) qsp 50µL. As condições de termociclagem incluíram um passo inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 53°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Após o último ciclo, um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C foi realizado. Cada reação de PCR continha um controle livre de amostra (branco). Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X (4,84g tris base; 1,15mL ácido acético; 2mL EDTA 0,5M pH 8,0 e 1000mL de água), contendo 3µL de brometo de etídio (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Após a eletroforese do gel, foi possível visualizar o produto de PCR no tamanho esperado de 600pb.

### 5.2.5 Purificação e Extração do DNA do gel de agarose

A extração e purificação do DNA do gel foram realizadas utilizando-se o kit comercial PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies,

Carlsbad, CA), segundo recomendações do fabricante. Pesou-se 400mg do gel excisado contendo o fragmento de DNA em um microtubo de 1,5mL. Adicionou-se 3 volumes de tampão de solubilização do gel (L3) para cada volume de gel (por exemplo, adicionou-se 1,2 ml de tampão de solubilização de gel por um pedaço de gel de 400mg). Os microtubos contendo o pedaço do gel e o tampão foram aquecidos em banho seco a 50°C por 10 minutos, invertendo-se os microtubos manualmente a cada 3 minutos para misturar e assegurar a dissolução completa do gel. Após a dissolução do gel, incubou-se por mais 5 minutos. Adicionou-se um volume do gel de isopropanol para assegurar a produção ideal de DNA, misturou-se bem.

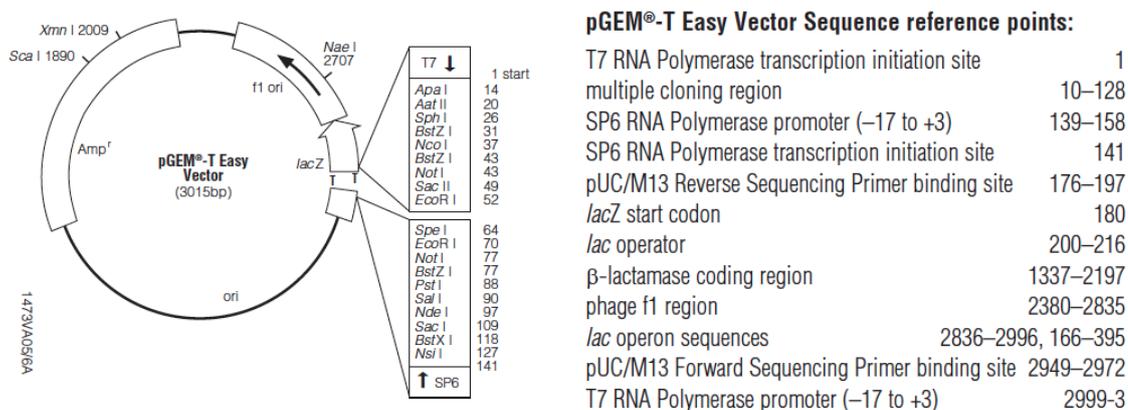
Procedeu-se para a purificação do DNA utilizando-se centrifugação. Transferiu-se a solução contendo o pedaço de gel dissolvido com o fragmento do DNA de interesse para o centro da coluna de extração rápida de gel acoplada a um tubo de lavagem. Centrifugou-se a 12.000g durante 1 minuto e descartou-se o filtrado, adicionou-se 500µL de tampão de lavagem (W1), contendo etanol à coluna de extração, centrifugou-se a 12.000g por 1 minuto e descartou-se o filtrado, centrifugou-se novamente a coluna à velocidade máxima por 2 minutos para remover qualquer resíduo de tampão de lavagem e etanol, descartou-se o tubo de lavagem e substituiu-o por um microtubo de 1,5µL, adicionou-se 50µL de tampão de eluição (E5), incubou-se a TA por 1 minuto e centrifugou-se a 12.000g por 1 minuto. O DNA foi estocado a -20°C até o momento da clonagem do DNA purificado em vetor.

#### **5.2.6 Clonagem do produto do PCR no vetor (ligação no vetor e transformação em bactérias competentes)**

A clonagem do produto de PCR contendo o DNA extraído e purificado do gel de agarose foi realizada utilizando-se o vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA; fig. 5, segundo o protocolo do fabricante. Centrifugou-se rapidamente os reagentes do kit e procedeu-se para a ligação adicionando-se 5µL de tampão de ligação rápida 2X, 1µL pGEM®-T Easy Vector (50ng), 1µL de T4 DNA

Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l) e 3 $\mu$ L do produto do PCR (300ng), misturou-se a reação por pipetagem manual e incubou-se por 1 hora a TA ou a 4 °C *overnight*.

Figura 5 - Mapa do plasmídeo P-GEM utilizado para a clonagem dos fragmentos de DNA



**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015). Adaptado de Promega Corporation ©2000–2013.

**Legenda:** Mapa e sequência do vetor circular pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector.

Previamente, placas de cultivo contendo 32g/L de meio LB agar (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 $\mu$ g/mL de antibiótico ampicilina (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA) e 50 $\mu$ g/ $\mu$ L de X-Gal (Promega, Madison, WI, USA) foram preparadas e estocadas a 4°C até o momento do uso. Previamente ao uso as placas foram equilibradas a temperatura ambiente. Centrifugou-se os microtubos contendo as reações de ligação e transferiu-se imediatamente a reação de ligação (10 $\mu$ L) para bactérias competentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), aliqüotadas a 50 $\mu$ L em um microtubo de 1,5mL, incubou-se por 5 minutos no gelo e em seguida o microtubo foi aquecido a 42°C por 45 segundos, esfriou-se no gelo durante 5 minutos e adicionou-se 250 $\mu$ L de meio de cultura LB Broth (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e 150 $\mu$ L da reação de transformação foi plaqueado nas placas de cultivo. As placas foram incubadas a 37°C *overnight* para a visualização das colônias.

Após a incubação, as placas foram acondicionadas a 4°C por 8 horas, a fim de se observar a intensificação da coloração azul e branca das colônias formadas. Adicionou-se 3mL de meio de cultura LB Broth (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) com ampicilina (100 $\mu$ g/mL) em um mínimo de 16 tubos BD Falcon<sup>™</sup> round-bottom (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) e cada colônia coletada

individualmente foi inserida neste ambiente e incubado a 37°C sob agitação (280rpm) *overnight*.

### **5.2.7 Mini-prep (extração do DNA plasmidial)**

A purificação do DNA plasmidial foi realizada com o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Valencia, CA) conforme o protocolo do fabricante. Transferiu-se 2mL do conteúdo cultivado acima descrito para um microtubo de 2mL e centrifugou-se a >8000rpm (6800g) por 3 minutos a TA a fim de peletizar o cultivo bacteriano. As células bacterianas peletizadas foram ressuspensas em 250µl de tampão P1 e o conteúdo foi transferido para um microtubo, agitou-se vigorosamente através de vortex. Adicionou-se 250µl de tampão P2 e o tubo foi invertido gentilmente 4 a 6 vezes para a homogeneização até que a solução tornou-se viscosa e ligeiramente clara. Adicionou-se 350µl de tampão N3 e inverteu-se imediatamente de 4 a 6 vezes até que a solução se tornasse turva. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000rpm (17.900g) em microcentrífuga e ocorreu a formação de um pellet de coloração esbranquiçada. O sobrenadante foi aplicado através de pipetagem na coluna QIAprep, centrifugou-se por 30 a 60 segundos e descartou-se o filtrado. A coluna foi lavada com 0,75mL de tampão PE e centrifugada por 30 a 60 segundos. Descartou-se o filtrado e centrifugou-se por 1 minuto para remoção de tampão de lavagem residual. Colocou-se a coluna QIAprep em um microtubo limpo e adicionou-se 50µl de tampão EB ao centro da coluna para eluição do DNA, encubou-se por 1 minuto a TA e então centrifugou-se por 1 minuto.

### **5.2.8 Sequenciamento e análise de metilação do DNA plasmidial**

O DNA plasmidial purificado foi enviado para a plataforma de análises genômicas da Universidade de Laval, Quebec, Canadá (Plate-forme d'Analyses Génomiques de l'Université Laval) ou ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP-SP. As amostras de DNA sequenciadas foram analisadas através do programa ApE-A plasmid Editor v2.0.45.

As sequências geradas foram alinhadas com a sequência original através do programa *Multiple sequence alignment by Florence Corpet* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

O programa de análise gráfica utilizado para avaliar a da metilação das CGs foi o ApE-A plasmid Editor v.2.0.45 (Copyright© 2003-2009 by M. Wayne Davis). Para análise os dados foram transformados por Arco Seno. Foi realizada ANOVA seguido de teste de Duncan ao nível significância de 5%.

### 5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

#### 5.3.1 Extração do RNA total

Os fragmentos dos tecidos coletados animais adultos e de fetos dos grupos IA e TNCS foram descongelados e submetidos à extração de RNA com TRIzol (Gibco BRL), segundo protocolo do fabricante. Isoladamente, cada amostra foi imersa em nitrogênio líquido, macerada com pistilo em um cadinho e os fragmentos resultantes foram homogeneizados com 1mL de TRIzol. Centrifugou-se a 12000g por 10 minutos a 4°C, acrescentou-se 0,2mL de clorofórmio (Merck & Co.) e centrifugou-se novamente. O RNA foi removido da fase aquosa, precipitado com 0,5mL de álcool isopropílico (Mallinckrodt), lavado com etanol (Merck & Co.) 75% (v/v) e diluído em 50µL de água tratada com DEPC.

#### 5.3.2 Quantificação do RNA total extraído

A quantidade e a pureza do RNA total foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND1000, Wilmington, DE), através de leitura a DO 260nm e DO 280nm.

### 5.3.3 Transcrição reversa

Para a síntese de DNA de fita simples complementar (cDNA) a partir do RNA total utilizou-se o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) segundo recomendações do fabricante.

Os componentes do kit foram descongelados no gelo. O cálculo do volume dos componentes necessários para preparar o número de reações desejadas baseou-se no quadro 4.

Utilizou-se 1 µg de RNA total por 20µL de reação, que foi mantida em gelo. Diluiu-se o RNA para um volume final de 10µL.

Quadro 4 - Componentes da reação de Transcriptase Reversa (RT)

<b>Componentes</b>	<b>Volume/Reação (µL)</b>
10X RT buffer	2.0
25X dNTP mix (100mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4.2
<b>Total por Reação</b>	<b>10</b>

Ref. © Copyright 2006, 2007, 2010 Applied Biosystems.

**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

Agitou-se gentilmente a reação RT. Pipetou-se 10µL da reação 2X master mix diretamente no microtubo o RNA diluído, totalizando um volume de 20µL. Centrifugou-se brevemente o microtubo para concentrar o conteúdo da reação e evitar a formação de bolhas.

As reações foram incubadas em termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com o quadro 5.

Quadro 5 - Condições de ciclagem otimizadas para o uso do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

### 5.3.4 Quantificação dos transcritos por PCR quantitativo em tempo real

Os genes alvos foram IGF2, H19 e IGF2R enquanto ACTB e GAPDH foram usados como genes de referência. Os iniciadores utilizados para a PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram desenhados utilizando-se o v.3.1 software Primer Express (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) baseados em sequências disponíveis no GenBank (Quadro 6).

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System).

A quantificação relativa dos transcritos de mRNA específicos dos genes de interesse foi realizada em uma reação de volume final de 20µL contendo 0,2 mM dos oligonucleotídeos iniciadores mais 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2µL de cDNA diluído 8 vezes. Os cDNAs específicos dos genes amplificados para uma determinada amostra foram corridos em duplicata na mesma placa de PCR. Um controle isento do cDNA molde foi corrido sempre em paralelo com as amostras, utilizando-se 2µL de água ao invés do cDNA.

As condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de interesse foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 10min seguida por 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1min. A fluorescência do SYBR Green foi lida no final de cada passo de extensão (60°C). A eficiência dos primers foi avaliada através da realização de curvas utilizando cinco concentrações diferentes de cDNA (abrangendo uma gama de 60 vezes). A média estimada para cada conjunto de primers variou entre 93,6% e 95,2%. A especificidade dos produtos da PCR foi confirmada por meio de análise das curvas de dissociação. As razões de expressão foram normalizadas pela razão de expressão dos controles endógenos (GAPDH e

ACTB). Os valores de Ct foram calculados através do cálculo da média das duplicatas de amostras. Dados de expressão gênica de três repetições biológicas são apresentados.

Quadro 6 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em tempo real

<b>Símbolo do Gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Sequência do primer</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Temp. de anelamento (°C)</b>
<b>IGF2</b>	Insulin-like growth factor 2 (somatome din A)	NM_17408 7.3	F: GGTCAGCTGCTGTGACCTG R: TCCCCATTGATGTCTCTGCG		60
<b>H19</b>	Imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)		F: GCCCGGATATCGACGTTCC R: GCACCATCTCTTGTCATCTTGA G		60
<b>IGF2R</b>	Receptor 2 do fator de crescimento semelhante à insulina	NM_17435 2.2	F: CAGGTCTTGCAACTGGTGTAT GA R: ACGAAGCTGATGACGCTCTTG	83	60
<b>ACTB</b>	Actin beta	NM_17397 9.3	F:CAGCAGATGTGGATCAGCAA GC R: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	91	60
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeí do 3-fosfato desidrogenase	NM_00103 4034.2	F:AGCTCATTTCTGGTACGAC A R:ACTCTTCTCTCGTGCTCCT	127	60

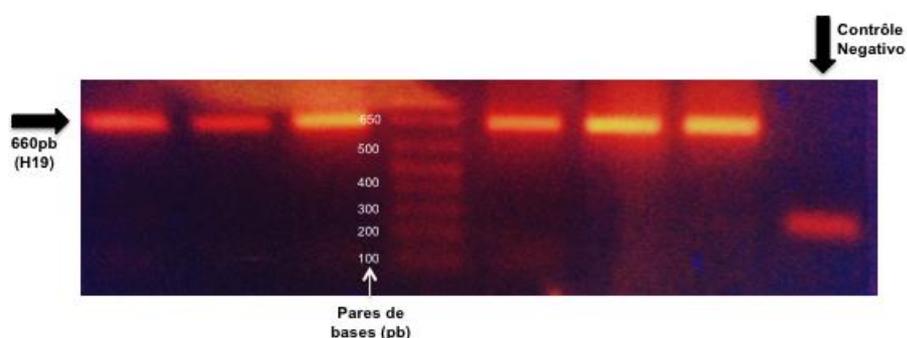
Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).



## 6 RESULTADOS

O padrão de metilação alelo específico da DMR e CTCF dos genes *imprinted* H19/IGF2 e IGF2R foi investigado através do alinhamento da sequência original com a sequência tratada com o bissulfito de sódio através do programa Multiple sequence alignment (Florence Corpet, 1988). A representação dos fragmentos de DNA sequenciados é mostrado na figura 6.

Figura 6 - Representação do tamanho dos fragmentos de DNA sequenciados



Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Resultado representativo do fragmento do produto de PCR (H19 – 660pb). O marcador molecular está representado com seus respectivos tamanhos em pares de base. Eletroforese em gel de 0,8%.

Os resultados serão apresentados segundo o período pré ou pós natal dos grupos estudados.

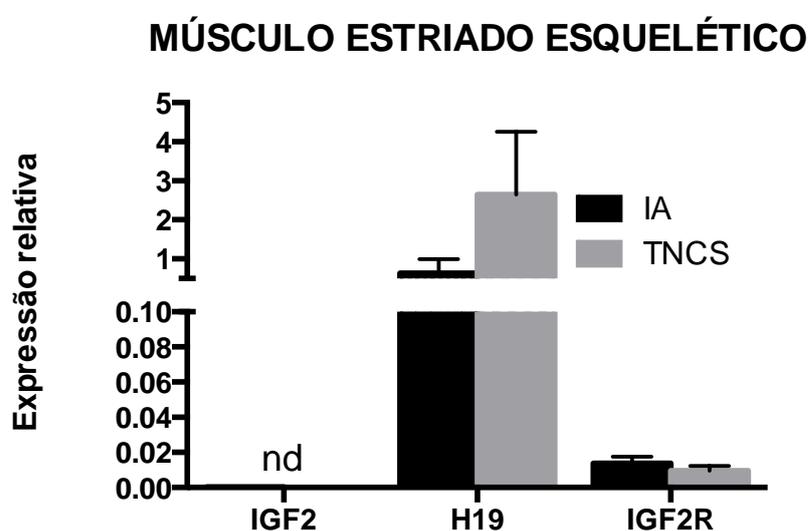
### 6.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES IMPRINTED NO PERÍODO PRÉ-NATAL DE BOVINOS CLONES E DERIVADOS DE IA

A expressão dos genes H19, IGF2, IGF2R e AIRN foi analisada nos fetos recuperados de gestações derivadas das técnicas de TNCS ou IA. De modo geral, não houve diferença entre os grupos estudados.

### 6.1.1 Expressão gênica musculatura

A expressão relativa dos transcritos IGF2, H19 e IGF2R na musculatura de fetos derivados de IA ou TNCS está apresentada na figura 7. Pode-se observar que não houve expressão de IGF2. Não houve diferença na expressão do H19 e ou IGF2R entre fetos clones ou derivados de IA.

Figura 7 - Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R na musculatura de fetos bovinos



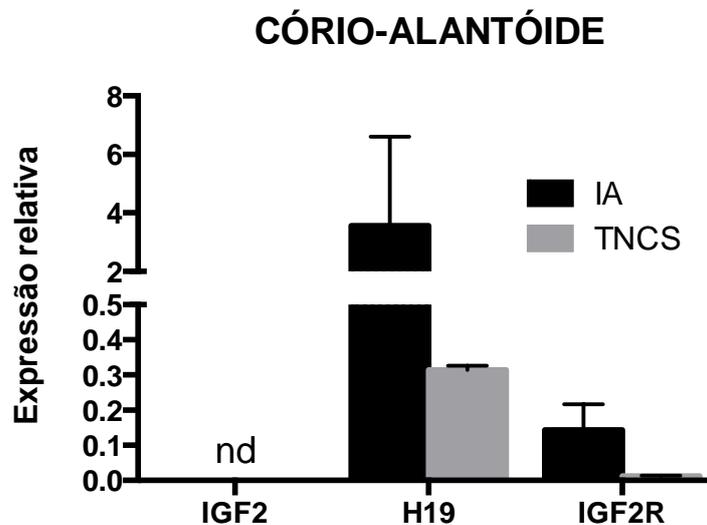
**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R na musculatura de fetos bovinos.

### 6.1.2 Expressão gênica corioalantoide

A expressão relativa dos transcritos IGF2, H19 e IGF2R na membrana corioalantoide de fetos derivados de IA ou TNCS está apresentada na figura 8. Pode-se observar que, assim como no músculo estriado esquelético, não houve expressão de IGF2 e não houve diferença na expressão do H19 e ou IGF2R entre fetos clones ou derivados de IA. É importante ressaltar que um indivíduo derivado de IA apresentou valores bastante diferente dos demais, com aumento da expressão.

Figura 8 - Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R na membrana corioalantoideana de fetos bovinos



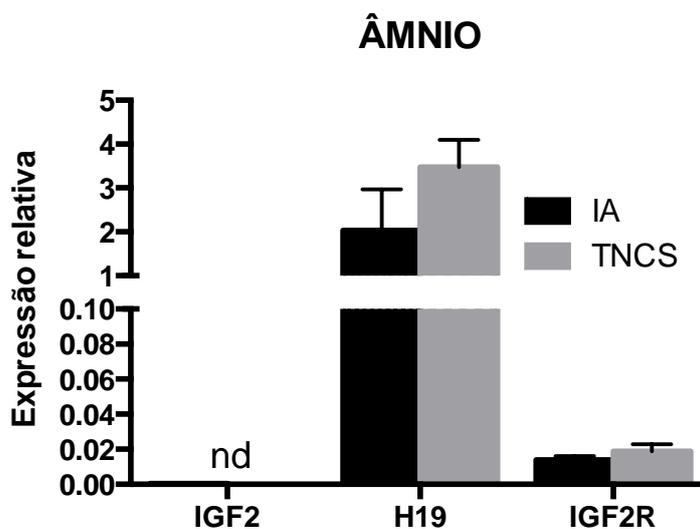
Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R na membrana corioalantoideana de fetos bovinos.

### 6.1.3 Expressão gênica âmnio

A expressão relativa dos transcritos IGF2, H19 e IGF2R na membrana amniótica de fetos derivados de IA ou TNCS está apresentada na figura 9. Pode-se observar que, assim como no músculo estriado esquelético e no tecido corioalantoideano, não houve expressão de IGF2 e não houve diferença na expressão do H19 e ou IGF2R entre fetos clones ou derivados de IA.

Figura 9 - Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R no âmnio de fetos bovinos



**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R no âmnio de fetos bovinos.

## 6.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES IMPRINTED NO PERÍODO PÓS-NATAL DE BOVINOS CLONES OU DERIVADOS DE IA

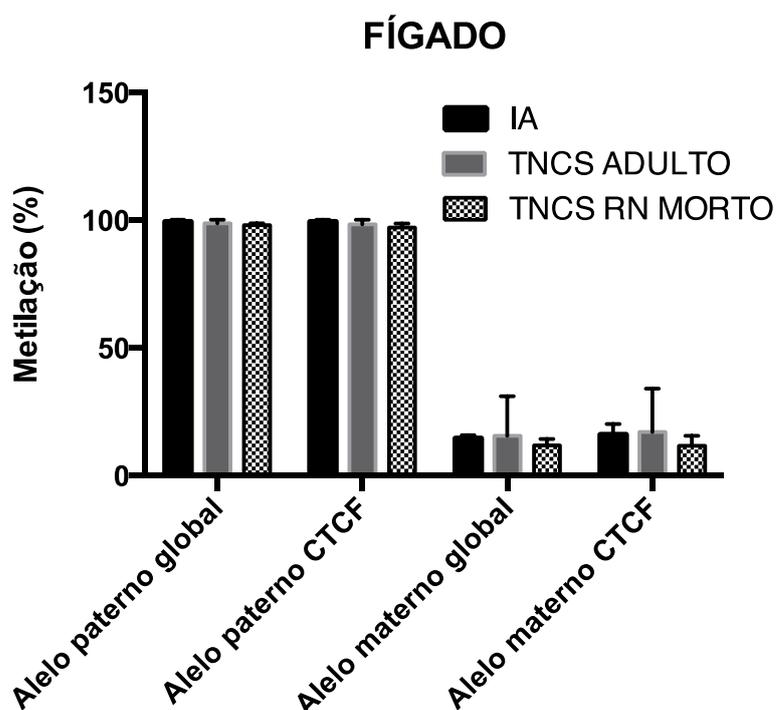
Nos animais adultos, além da expressão gênica foi possível o preparo das amostras para a análise da metilação de DNA dos genes *imprinted*. Para uma melhor visualização dos resultados, estes serão apresentados aqui juntos (expressão e metilação), segundo o tecido estudado, seguidos de uma comparação geral.

De modo geral, não houve diferença significativa na metilação quando comparados os grupos experimentais deste estudo, porém, foram observadas diferenças na expressão gênica do H19 nos tecidos coração e fígado; IGF2 no fígado, IGF2R no músculo, assim como IGF2R/Airn no fígado.



A análise de metilação alelo específica no locus H19/IGF2 do fígado nos grupos do período pós natal estudado não apresentou diferenças entre os três grupos experimentais (Figura 11). O grupo IA apresentou em média 14,5% e 16% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 99,2% e 99,3% de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS adulto apresentou em média 15,5% e 16,7% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 98,7% e 98,3% de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS recém nascido morto apresentou em média 11,8% e 11,7% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 98,1% e 97,1% de metilação global e no CTCF no alelo paterno.

Figura 11 - Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo específica dos genes H19/IGF2 no fígado

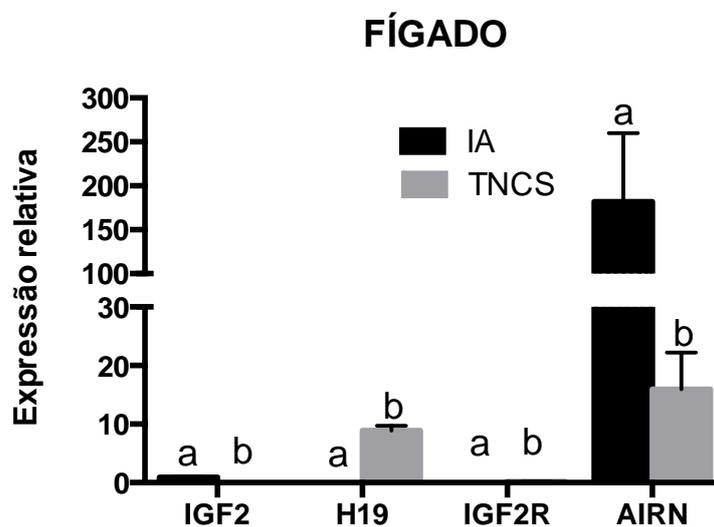


Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo específica dos genes H19/IGF2 no fígado.

De maneira interessante, a análise da expressão gênica no fígado dos grupos do período pós natal estudados mostrou que o grupo IA apresentou aumento na expressão dos genes H19 (0,029), IGF2 (0,93015), IGF2R (0,04451) e Airn (181,96,  $p= 0,10$ ; Figura 12).

Figura 12 - Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e AIRN no fígado



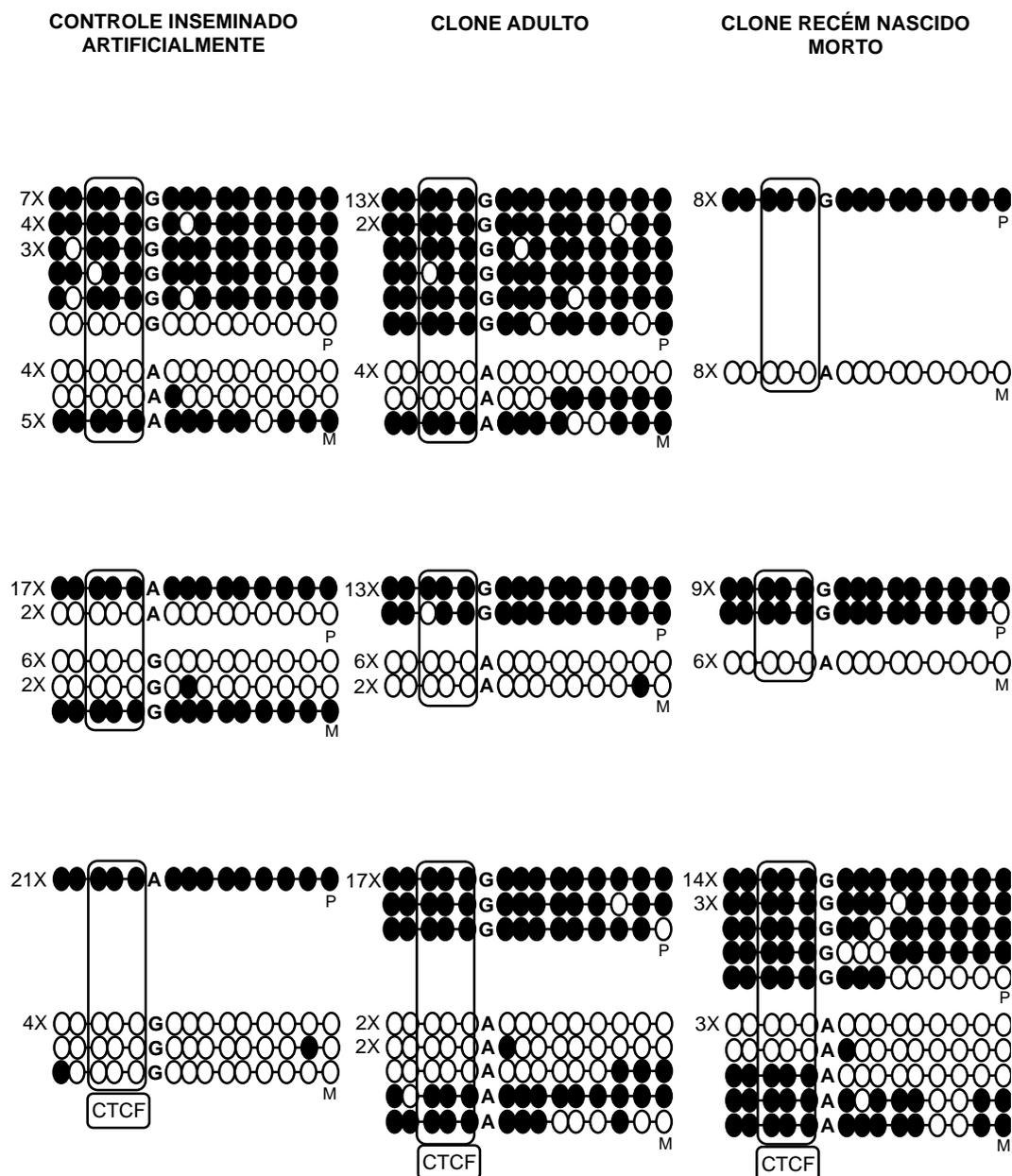
**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e AIRN no fígado.

### 6.2.2 Expressão gênica e metilação da musculatura

A análise das ilhas de metilação nas regiões DMR e CTCF da musculatura esquelética foi realizada de maneira alelo específica como demonstrado na figura 13.

Figura 13 - Exemplo de análise das ilhas de metilação no locus H19/IGF2 (DMR e CTCF) da musculatura dos 3 grupos experimentais



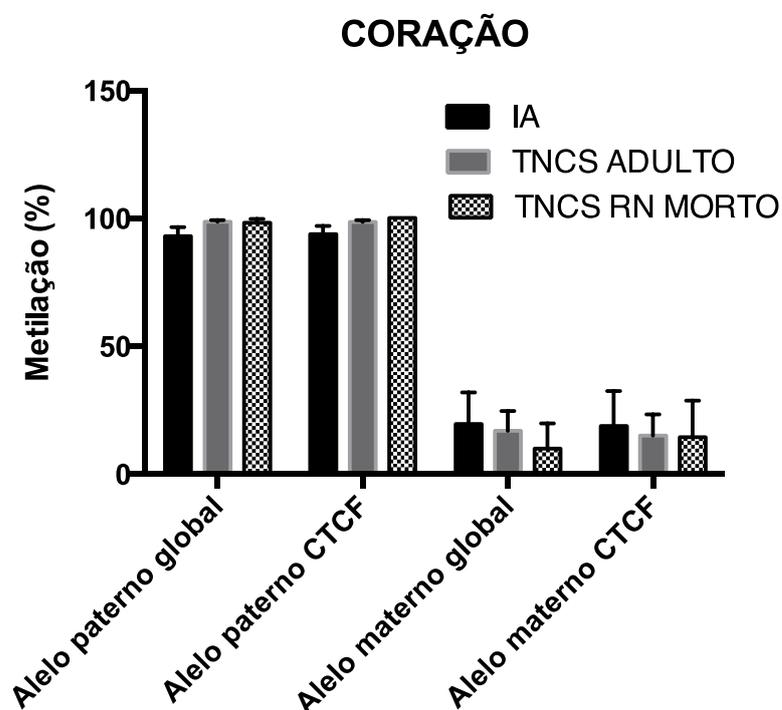
Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

Legenda: Exemplo de análise das Ilhas de metilação no locus H19/IGF2 (DMR e CTCF) da musculatura dos 3 grupos experimentais.

A análise de metilação alelo específica no locus H19/IGF2 da musculatura nos grupos do período pós natal estudado não apresentou diferenças entre os três grupos experimentais (Figura 14). O grupo IA apresentou em média 19,5% e 18,8% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 93% e 93,9%

de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS adulto apresentou em média 14,9% e 15% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 98,7% e 98,6% de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS recém nascido morto apresentou em média 9,9% e 14,3% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 98,2% e 100% de metilação global e no CTCF no alelo paterno.

Figura 14 - Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo-específica dos genes H19/IGF2 no coração

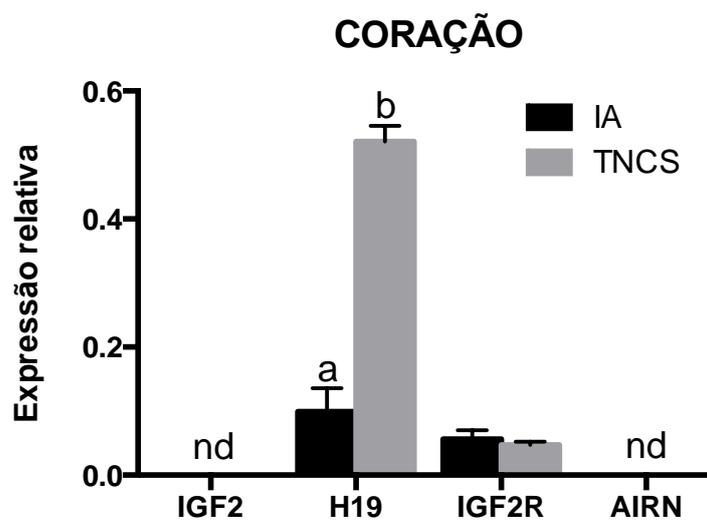


Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo-específica dos genes H19/IGF2 no coração.

A análise da expressão gênica revelou a diminuição da expressão do gene H19 no grupo TNCS (0,52123) em relação ao grupo IA (0,09947). Não houve diferença na expressão do gene IGF2R entre os grupos, e não houve expressão dos genes IGF2 e Airn neste tecido (Figura 15).

Figura 15 - Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e Airn no coração de bovinos em período pós-natal



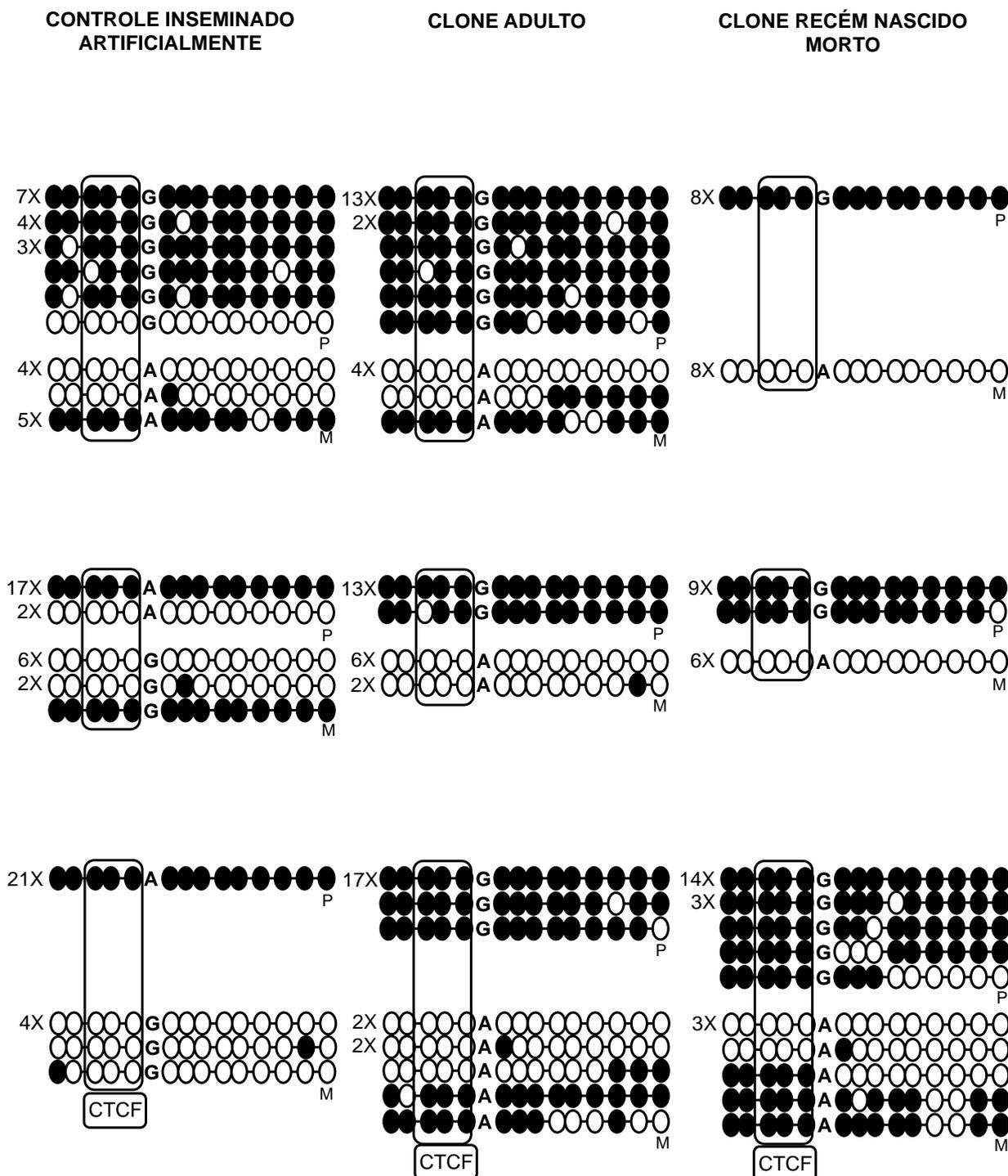
Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

Legenda: Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e Airn no coração de bovinos em período pós-natal.

### 6.2.3 Expressão gênica e metilação do SNC

A análise das ilhas de metilação nas regiões DMR e CTCF do SNC foi realizada de maneira alelo específica como demonstrado na figura 16.

Figura 16 - Exemplo de análise das Ilhas de metilação no locus H19/IGF2 (DMR e CTCF) do SNC dos 3 grupos experimentais

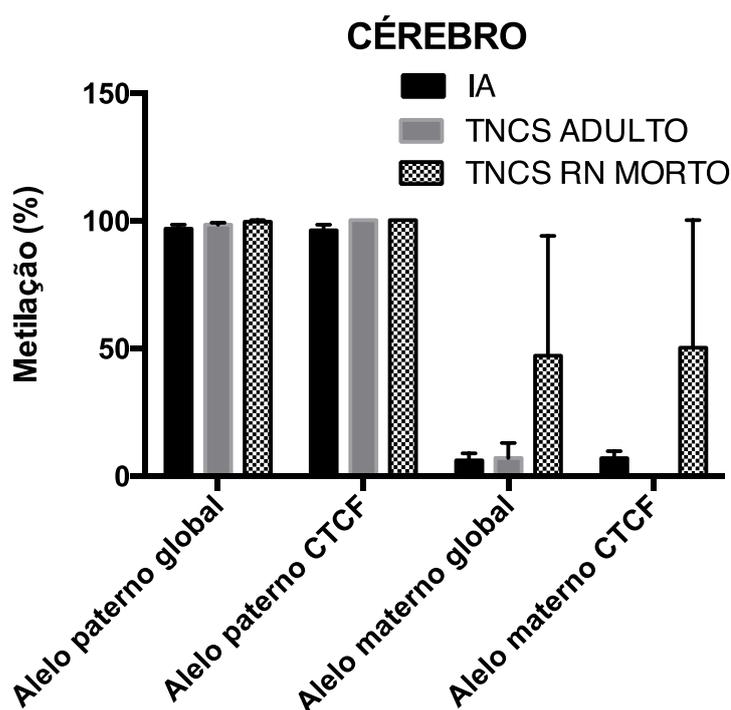


Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Exemplo de análise das Ilhas de metilação no locus H19/IGF2 (DMR e CTCF) do SNC dos 3 grupos experimentais.

A análise de metilação alelo específica no locus H19/IGF2 do SNC nos grupos do período pós natal estudado não apresentou diferenças entre os três grupos experimentais (Figura 11). O grupo IA apresentou em média 4,5% e 5,2% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 93,9% e 94,1% de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS adulto apresentou em média 6,9% e 0% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 98,3% e 100% de metilação global e no CTCF no alelo paterno. O grupo TNCS recém nascido morto apresentou em média 47% e 50% de metilação global e no CTCF no alelo materno, respectivamente, e 99,4% e 100% de metilação global e no CTCF no alelo paterno.

Figura 17 - Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo-específica dos genes H19/IGF2 no cérebro

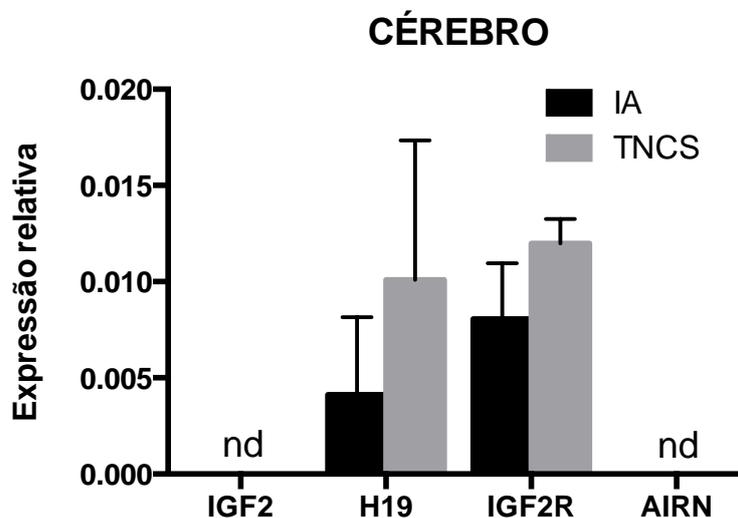


**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Análise da metilação global (DMR) e no CTCF alelo-específica dos genes H19/IGF2 no cérebro.

A análise da expressão gênica mostrou que não houve diferenças entre os grupos na expressão dos genes H19 e IGF2R, enquanto que a expressão dos genes IGF2 e Airn não foi detectada (Figura 18).

Figura 18 - Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e Airn no cérebro de bovinos em período pós-natal



Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

**Legenda:** Expressão dos genes IGF2, H19, IGF2R e Airn no cérebro de bovinos em período pós-natal.

### 6.3 COMPARAÇÃO GERAL

Neste estudo a metilação do locus H19/IGF2 foi analisada nos grupos experimentais de desenvolvimento pós natal. Não houve diferença entre os grupos, e os valores estão descritos no quadro abaixo (quadro 7) para uma melhor visualização dos resultados.

Quadro 7 - Porcentagem de metilação na DMR e CTCF do locus H19/IGF2 nos tecidos fígado, musculatura e SNC de animais derivados de IA ou clones

	Metilação global materna (%)			Metilação global paterna (%)			Metilação CTCF materna (%)			Metilação CTCF paterna (%)		
	IA	TNC S Adulto	TNC S RNM	IA	TNC S Adulto	TNC S RNM	IA	TNC S Adulto	TNC S RNM	IA	TNC S Adulto	TNC S RNM
Fígado	14,5	15,5	11,8	99,2	98,7	98,1	16	16,7	11,7	99,3	98,3	97,1
Musculatura	19,5	14,9	9,9	93	98,7	98,2	18,8	15	14,3	93,9	98,6	100
SNC	4,5	6,9	47	93,9	98,3	99,4	5,2	0	50	94,1	100	100

Fonte: (MARTUCCI, M. F., 2015).

Já a análise da expressão de genes *imprinted* foi possível nos indivíduos durante do desenvolvimento pré e também pós natal. O resumo dos valores encontrados, quando comparados os grupos entre si, encontra no quadro abaixo (Quadro 8).

Quadro 8 - Expressão relativa dos genes H19, IGF2, IGF2R e Airn nos tecidos e grupos estudados

	H19		IGF2		IGF2R		Airn	
	IA	TNCS RNM	IA	TNCS RNM	IA	TNCS RNM	IA	TNCS RNM
<b>Pré-natal</b>								
Corio- alantóide	3,564	0,315	0,000172 8	0,0000251 0	0,14351	0,01215	nd*	nd
Âmnio	2,036	3,478	0,0004489 2	0,0001443 0	0,01393 9	0,01894 0	nd	nd
Musculatur a	0,638	2,645	0,0002127	0,0000992	0,01373 6	0,00953 3	nd	nd
<b>Pós-natal</b>								
Fígado	0,029	8,921	0,93015	0,00060	0,04451	0,16505	181,9 6	15,96
Musculatur a	4,832	3,060	0,0000075 9	0,0000665 9	0,07069 4	0,00961 1	nd	nd
SNC	0,00413 3	0,01010 0	nd	nd	0,00806 7	0,01200	nd	nd

- nd: não detectado

**Fonte:** (MARTUCCI, M. F., 2015).

DISCUSSÃO

---

## 7 DISCUSSÃO

O *imprinting* genômico, processo pelo qual certos genes são expressos diferencialmente de acordo com a origem parental é independente do modelo clássico de hereditariedade mendeliana. Ambos o estabelecimento e a manutenção de *imprinting* genômico durante a embriogênese são essenciais para o desenvolvimento embrionário e placentário adequados. Por exemplo, o gene *imprinted* H19 é silenciado no alelo paterno, permitindo, assim, a expressão paterna do IGF2. Por outro lado, o H19 é expresso a partir do alelo materno não silenciado, onde bloqueia expressão materna do IGF2.

A análise da expressão gênica e metilação de genes *imprinted* é uma ferramenta importante para o entendimento do processo de reprogramação epigenética que organismos derivados de TRAs são resultantes. Falhas na regulação transcricional destes genes são provavelmente a causa da baixa eficiência na produção *in vitro* animal, porém, metodologias efetivas para superar tais entraves ainda não são conhecidas.

Além da baixa eficiência de geração de indivíduos a partir de TRAs, algumas síndromes causadas pela desregulação epigenética também são frequentemente reportadas. A síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS ; OMIM 130650), por exemplo, é uma condição de supercrescimento infantil com a ocorrência de 1 a cada 13.700 partos naturais em humanos. A BWS tem sido associada à desregulação de dois conjuntos de genes *imprinted* e as crianças concebidas com o uso de TRAs parecem ter uma maior incidência da síndrome. Assim como ocorre em humanos, as TRAs em ruminantes podem também induzir o crescimento excessivo, referido como síndrome da cria grande, a LOS (do inglês *Large Offspring Syndrome*). Chen et al. analisaram se a LOS apresentava uma perda de *imprinting* similar ao observado na BWS, e foram observadas semelhanças fenotípicas e epigenéticas entre LOS e BWS, sendo portanto proposta a utilização de animais portadores de LOS como modelos para investigar a etiologia da BWS (CHEN et al., 2013).

Uma alta incidência de distúrbios do crescimento tem sido relatada em recém nascidos produzidos por FIV, sugerindo que tal processo seja prejudicial para o crescimento embrionário e fetal. Baseado nesses dados, Le et al. em 2013 utilizaram um modelo de camundongo para avaliar as alterações do crescimento observadas

em descendentes produzidos por FIV ao longo do desenvolvimento, suas correlações com a expressão gênica dos genes *Igf2/H19* e *Igf2r* e os mecanismos epigenéticos reguladores envolvidos em alterações no fígado e músculo esquelético. Os autores observaram alterações no peso dos recém nascidos, bem como alterações no locus *Igf2/H19*, tanto em fígado quanto em músculo esquelético de camundongos concebidos por FIV. Tais alterações podem estar associadas com mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e com o micro RNA *miR-483*. Em conclusão, os autores demonstraram a necessidade do monitoramento da prole saudável produzida por FIV durante todas as fases da vida (LE et al., 2013).

A expressão de *Airn* é necessária para iniciar o silenciamento gênico paterno específico do gene *Igf2r*, seguido pelo ganho somático de metilação *imprinted* do DNA no promotor deste gene silenciado. Santoro et al. em 2013, utilizaram sistemas induzíveis para o controle da expressão de *Airn* durante as fases de diferenciação de células-tronco embrionárias em camundongos, e mostraram que embora a expressão de *Airn* seja necessária e suficiente para iniciar e manter o silenciamento do *Igf2r*, a metilação do DNA introduz uma informação epigenética adicional, cuja função é proteger o estado de silenciamento gênico (SANTORO et al., 2013).

Em um estudo realizado em bovinos, Farmer et al. em 2013, detectaram a expressão de AIRN em tecido fetal no período pós implantacional, enquanto que no período pré implantacional a expressão foi ausente. Segundo o estudo, todas as amostras de fígado fetal analisadas aos dias 35 a 55 e ao dia 70 de gestação expressaram IGF2R e AIRN. Uma proporção crescente de conceptos gerados por transferência de blastocistos produzidos *in vivo* expressaram AIRN entre os dias 15 e 18 de gestação, o que levou os autores a sugerir que a expressão *imprinted* de IGF2R/AIRN é estabelecida durante este período peri implantacional, no qual ocorre o reconhecimento materno da gestação em bovinos. Amostras de fígado fetal bovino analisadas aos 70 dias de gestação, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, não apresentaram diferença em relação à expressão do mRNA de IGF2R, enquanto que a expressão de AIRN foi reduzida nas amostras derivadas de embriões produzidos *in vitro*, o que levou os autores à conclusão de que os métodos de produção embrionária podem alterar os níveis de AIRN em fetos durante o período pós implantacional (FARMER et al., 2013).

A clonagem animal por TNCS é provavelmente a TRA que melhor evidencia a influência da reprogramação epigenética no fenótipo do indivíduo gerado, sendo que

variações fenotípicas relacionadas principalmente a características de crescimento, em particular durante as fases pré-natais do desenvolvimento, já foram reportados em animais geneticamente idênticos. É relatada a expressão diferencial de genes *imprinted* no período. Ainda não é claro, porém, se tais anormalidades persistem durante a vida pós-natal e com isso poderiam ser caracterizados possíveis padrões de reprogramação mais adequados após a utilização de TRAs (TABANO et al., 2010).

De acordo com Smith et al. em revisão de 2015, a análise do gene IGF2R paternalmente *imprinted* em embriões bovinos no dia 17 de gestação mostrou que, embora o padrão de metilação da DMR seja reduzido na TNCS, a expressão é consistentemente bialélica, independente do método de produção dos embriões (*in vivo*, *in vitro* ou TNCS). Aos dias 45 de desenvolvimento, a DMR do IGF2R estava hipermetilada nos tecidos fetais, enquanto que na placenta encontrou-se significativamente menos metilada, particularmente no grupo TNCS e mesmo assim, a expressão bialélica de IGF2R estava presente em todos os tecidos, independente da TRA utilizada para produzir os embriões.

De acordo com esses dados, os autores acima citados sugeriram que o IGF2R não estava fortemente *imprinted* em qualquer fase do desenvolvimento em bovinos, o que indica que outros mecanismos epigenéticos além da metilação da DMR estão envolvidos no controle da expressão gênica alelo específica. Desta maneira, os erros epigenéticos provavelmente possuem efeitos importantes sobre o fenótipo pré e pós natal de animais domésticos, contudo, os animais que se desenvolvem a termo podem manter padrões normais de metilação das regiões reguladoras responsáveis por controlar a expressão de genes *imprinted*, independente do seu estado de saúde, o que sugere que embriões com epimutações fatais são seletivamente eliminados antes do nascimento (SMITH et al., 2015).

Como já discutido previamente, para que ocorra o desenvolvimento normal do organismo é necessária uma regulação epigenética apropriada da expressão gênica durante a distribuição celular e diferenciação tecidual. Neste contexto, Marcho et al. em 2015 mostraram a regulação temporal e linhagem específicas da metilação do DNA e de modificações nas proteínas histonas no locus *Igf2r/Airn*, correlacionando-os com o estabelecimento do padrão *imprinted* durante a gastrulação em camundongos. De acordo com os autores, o *Igf2r* é expresso por ambos os alelos no

epiblasto no dia 6,5 do desenvolvimento e após o início da gastrulação, o locus torna-se *imprinted* na linhagem embrionária, com o *Airn* expresso pelo alelo paterno e o *Igf2r* restrito à expressão alélica materna. Os autores salientaram que a linhagem extraembrionária não sofreu alteração na expressão *imprinted*, embora tenha ocorrido aumento da metilação na DMR2 materna, sugerindo a existência de mecanismos distintos atuantes nas linhagens embrionárias e extraembrionárias (MARCHO et al., 2015).

No presente estudo a expressão destes genes *imprinted* sabidamente importantes durante o processo de desenvolvimento embrionário e fetal de mamíferos foi estudada em período pré e pós natal de bovinos originados através das biotecnologias de IA ou TNCS. Ainda, foi possível o estudo da metilação alelo específica de um importante locus *imprinted*, o IGF2/H19, nos tecidos em fase pós natal.

Tecidos coletados durante o desenvolvimento pré natal podem ser divididos em extraembrionários (corioalantoide e âmnio) e embrionário (musculatura). Quando analisada a expressão dos genes H19, IGF2 e IGF2R não foram observadas diferenças, porém, um dos indivíduos derivado de IA apresentou aumento de expressão em relação aos outros.

Tecidos coletados durante o período pós-natal foram analisados quanto à metilação da DMR e CTCF para o locus H19/IGF2R, assim como à análise de expressão dos genes H19, IGF2, IGF2R e AIRN. O transcrito AIRN foi estudado no fígado uma vez que sua expressão não é relatada na maioria dos outros órgãos (YOTOVA et al., 2008).

O padrão de metilação alelo específico da DMR e CTCF dos genes *imprinted* H19/IGF2 e IGF2R foi investigado através do alinhamento da sequência original com a sequência tratada com o bissulfito de sódio. A identificação de polimorfismos de base única (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP) permitiu a análise parental específica de transcritos e de sequências genômicas, uma vez que pouco é sabido sobre os genes *imprinted* em animais domésticos, incluindo bovinos. A utilização do modelo bovino híbrido F1, permitiu identificar SNPs na proximidade da DMR e polimorfismos exônicos, que possibilita a análise do estado *imprinted* de vários genes, incluindo os genes maternalmente expressos H19 e IGF2R, e o gene SNRPN, expresso paternalmente (SMITH et al., 2012).

Os resultados das análises da metilação global e da região CTCF dos alelos paterno e materno encontrados neste estudo não mostraram diferenças entre os tecidos analisados, sendo presente a metilação no alelo paterno e desmetilação no alelo materno. Suzuki Jr et al. (2011) relataram expressão monoalélica do alelo materno no gene H19 em animais IA e FIV, porém, animais clonados (TNCS) apresentaram alta perda de metilação no alelo paterno (SUZUKI et al., 2011).

Recentemente, foi mostrado que os fetos são perdidos em quase 80% das gestações geradas por TNCS confirmadas ao 30<sup>o</sup> dia de gestação (SMITH et al., 2012). Segundo Suzuki et al. o sítio de ligação CTCF é severamente desmetilado no alelo paterno na maioria dos embriões TNCS no dia 17 de prenhez, já no período pós implantação, a partir de 30 a 50 dias, os níveis de metilação e expressão paterna do gene H19 em embriões TNCS foram semelhantes aos controles, sugerindo que os embriões com desmetilação generalizada da DMR do gene H19 são incapazes de implantar.

Smith et al. em 2015, alegaram que de modo geral, a DMR de genes *imprinted* tais quais o IGF2/H19, SNRPN e IGF2R são extensivamente hipometilados em embriões derivados de TNCS e em menor escala em embriões derivados de FIV no estágio inicial do desenvolvimento, mostrando que a reprogramação da cromatina e a cultura *in vitro* de oócitos e/ou embriões provocam o apagamento epigenético do loci *imprinted* (SMITH et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as alterações epigenéticas na DMR do gene H19 não estão associadas à mortalidade pós natal de bovinos clonados, o que corrobora com Wang et al. 2013, que identificaram 78 genes *imprinted* através de sequenciamento de RNA, os quais apresentaram influência paterna e na expressão de origem parental na placenta e não no feto. E ainda segundo esses autores, alguns desses genes exibiram variabilidade no estado de *imprinting* entre os indivíduos, resultando numa assinatura epigenética única para cada placenta, o que contribui para a variação no ambiente intrauterino e, assim, apresenta a oportunidade para uma seleção natural para operar sobre a regulação diferencial de origem parental (WANG et al., 2013).

Independentemente do grupo experimental, todos os tecidos analisados mostraram metilação completa dos sítios CpG dentro da região DMR do gene H19, indicando que este locus não está diretamente envolvido no fenótipo pós natal de clones que não conseguem sobreviver as primeiras horas após o nascimento.

CONCLUSÕES

---

## 8 CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível observar que na fase pré natal não foi detectada expressão do IGF2. A expressão de H19 é aumentada em relação ao IGF2R, porém, sem diferenças entre os grupos nos tecidos estudados.

Já na fase pós natal, o padrão de metilação na DMR e CTCF dos genes imprinted IGF2/H19 não diferiu entre organismos considerados saudáveis e não saudáveis, porém, o padrão de expressão dos genes IGF2, H19 e IGF2R indica diminuição da expressão gênica relativa no fígado de animais TNCS e no aumento da expressão gênica do H19 na musculatura de animais adultos bovinos produzidos por TNCS.

REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- AMOR, D. J.; HALLIDAY, J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 12, p. 2826–34, dez. 2008.
- ARENAS-HUERTERO, F.; RECILLAS-TARGA, F. [Chromatin epigenetic modifications in cancer generation]. **Gaceta Médica de México**, v. 138, n. 6, p. 547–55, jan. .
- BARLOW, D. P.; STÖGER, R.; HERRMANN, B. G.; SAITO, K.; SCHWEIFER, N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 84–7, 3 jan. 1991.
- BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON, D. J.; WELLS, D. N.; BROADHURST, R.; DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Trophoctoderm lineage determination in cattle. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 244–55, mar. 2011.
- BERGER, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. **Current Opinion In Genetics & Development**, v. 12, n. 2, p. 142–8, abr. 2002.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.
- BLIEK, J.; TERHAL, P.; VAN DEN BOGAARD, M.-J.; MAAS, S.; HAMEL, B.; SALIEB-BEUGELAAR, G.; SIMON, M.; LETTEBOER, T.; VAN DER SMAGT, J.; KROES, H.; MANNENS, M. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 4, p. 604–14, abr. 2006.
- BRESSAN, F. F.; DE BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; LOPES, F. L.; AMBROSIO, C. E.; MEIRELLES, F. V; MIGLINO, M. A. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. **Placenta**, v. 30, n. 10, p. 823–834, 2009.
- CEELEN, M.; VERMEIDEN, J. P. Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. **Twin Research : The Official Journal of the International Society for Twin Studies**, v. 4, n. 5, p. 412–6, out. 2001.
- CHEN, Z.; ROBBINS, K. M.; WELLS, K. D.; RIVERA, R. M. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics** : official journal of the DNA Methylation Society, v. 8, n. 6, p. 591–601, jun. 2013.
- COULDREY, C.; LEE, R. S. DNA methylation patterns in tissues from mid-gestation bovine foetuses produced by somatic cell nuclear transfer show subtle abnormalities in nuclear reprogramming. **BMC Developmental Biology**, v. 10, p. 27, jan. 2010.
- DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, n. 2, p. 188–95, abr. 2004.

FARMER, W. T.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; BISCHOFF, S. R.; FARIN, C. E. Expression of antisense of insulin-like growth factor-2 receptor RNA non-coding (AIRN) during early gestation in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 1-2, p. 64–73, abr. 2013.

FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep. **Mammalian Genome** : official journal of the International Mammalian Genome Society, v. 9, n. 10, p. 831–4, out. 1998.

FERGUSON-SMITH, A. C.; SURANI, M. A. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1086–9, 10 ago. 2001.

FOWDEN, A. L.; SIBLEY, C.; REIK, W.; CONSTANCIA, M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. **Hormone Research**, v. 65 Suppl 3, p. 50–8, jan. 2006.

GABORY, A.; JAMMES, H.; DANDOLO, L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. **BioEssays** : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, v. 32, n. 6, p. 473–80, jun. 2010.

HAGEMANN, L. J.; WEILERT, L. L.; BEAUMONT, S. E.; TERVIT, H. R. Development of bovine embryos in single in vitro production (sIVP) systems. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 2, p. 143–7, out. 1998.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 84, n. 8, p. 321–30, jan. 2008.

HIENDLEDER, S.; WIRTZ, M.; MUND, C.; KLEMP, M.; REICHENBACH, H.-D.; STOJKOVIC, M.; WEPPERT, M.; WENIGERKIND, H.; ELMLINGER, M.; LYKO, F.; SCHMITZ, O. J.; WOLF, E. Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 1, p. 17–23, jul. 2006.

HORI, N.; NAGAI, M.; HIRAYAMA, M.; HIRAI, T.; MATSUDA, K.; HAYASHI, M.; TANAKA, T.; OZAWA, T.; HORIKE, S. Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 303–12, dez. 2010.

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.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1074–80, 10 ago. 2001.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1068–70, 10 ago. 2001.

KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; MCCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. **Genes & Development**, v. 6, n. 5, p. 705–14, maio 1992.

KILLIAN, J. K.; NOLAN, C. M.; STEWART, N.; MUNDAY, B. L.; ANDERSEN, N. A.; NICOL, S.; JIRTLE, R. L. Monotreme IGF2 expression and ancestral origin of genomic imprinting. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 291, n. 2, p. 205–12, 15 ago. 2001.

KONO, T.; OBATA, Y.; WU, Q.; NIWA, K.; ONO, Y.; YAMAMOTO, Y.; PARK, E. S.; SEO, J.-S.; OGAWA, H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. **Nature**, v. 428, n. 6985, p. 860–4, 22 abr. 2004.

LACOSTE, N.; CÔTÉ, J. [The epigenetic code of histones]. **Médecine Sciences: M/S**, v. 19, n. 10, p. 955–9, out. 2003.

LAPRISE, S. L. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 11, p. 1006–1018, nov. 2009.

LAU, M. M.; STEWART, C. E.; LIU, Z.; BHATT, H.; ROTWEIN, P.; STEWART, C. L. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2953–63, 15 dez. 1994.

LAZARAVICIUTE, G.; KAUSER, M.; BHATTACHARYA, S.; HAGGARTY, P.; BHATTACHARYA, S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. **Human Reproduction Update**, 24 jun. 2014.

LE BOUC, Y.; ROSSIGNOL, S.; AZZI, S.; STEUNOU, V.; NETCHINE, I.; GICQUEL, C. Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. **Annales D'endocrinologie**, v. 71, n. 3, p. 237–8, maio 2010.

LE, F.; WANG, L. Y.; WANG, N.; LI, L.; LI, L. J.; ZHENG, Y. M.; LOU, H. Y.; LIU, X. Z.; XU, X. R.; SHENG, J. Z.; HUANG, H. F.; JIN, F. In vitro fertilization alters growth and expression of Igf2/H19 and their epigenetic mechanisms in the liver and skeletal muscle of newborn and elder mice. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 3, p. 75, mar. 2013.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews, Genetics**, v. 3, n. 9, p. 662–73, set. 2002.

LUCIFERO, D.; MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S.; TRASLER, J. M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 8, p. 839–49, 15 abr. 2004.

LUDWIG, T.; EGGENSCHWILER, J.; FISHER, P.; D'ERCOLE, A. J.; DAVENPORT, M. L.; EFSTRATIADIS, A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds.

**Developmental Biology**, v. 177, n. 2, p. 517–35, 1 ago. 1996.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, p. REVIEWS1003, jan. 2002.

MARCHO, C.; BEVILACQUA, A.; TREMBLAY, K. D.; MAGER, J. Tissue-specific regulation of *Igf2r*/*Airn* imprinting during gastrulation. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, p. 10, jan. 2015.

MARKET-VELKER, B. A.; FERNANDES, A. D.; MANN, M. R. W. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 6, p. 938–50, dez. 2010.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V.; KOMNINO, E. R.; SANGALLI, J. R.; NETO, P. F.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 1, p. 88–97, jan. 2010.

MIOZZO, M.; SIMONI, G. The role of imprinted genes in fetal growth. **Biology of the Neonate**, v. 81, n. 4, p. 217–28, jan. 2002.

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics: TIG**, v. 7, n. 2, p. 45–9, fev. 1991.

MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 25, n. 6, p. 577–88, jun. 2003.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. K. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 115, n. 2, p. 158–68, jan. 2008.

NG, H. H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 9, n. 2, p. 158–63, abr. 1999.

NOTHIAS, J. Y.; MAJUMDER, S.; KANEKO, K. J.; DEPAMPHILIS, M. L. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 38, p. 22077–80, 22 set. 1995.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, v. 29 Suppl A, p. S29–35, mar. 2008.

PERECIN, F.; MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MERIGHE, G. K. F.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetics and Molecular Research**: GMR, v. 8, n. 1, p. 76–85, jan. 2009.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews, Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, jan. 2001.

RIESEWIJK, A. M.; SCHEPENS, M. T.; WELCH, T. R.; VAN DEN BERG-LOONEN, E. M.; MARIMAN, E. M.; ROPERS, H. H.; KALSCHEUER, V. M. Maternal-specific methylation of the human IGF2R gene is not accompanied by allele-specific transcription. **Genomics**, v. 31, n. 2, p. 158–66, 15 jan. 1996.

RIESEWIJK, A. M.; XU, Y. Q.; SCHEPENS, M. T.; MARIMAN, E. M.; POLYCHRONAKOS, C.; ROPERS, H. H.; KALSCHEUER, V. M. Absence of an obvious molecular imprinting mechanism in a human fetus with monoallelic IGF2R expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 1, p. 272–7, 7 abr. 1998.

SANDOVICI, I.; LEPPERT, M.; HAWK, P. R.; SUAREZ, A.; LINARES, Y.; SAPIENZA, C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 13, p. 1569–78, 1 jul. 2003.

SANGALLI, J. R.; CHIARATTI, M. R.; DE BEM, T. H. C.; DE ARAÚJO, R. R.; BRESSAN, F. F.; SAMPAIO, R. V.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; KING, W. A.; MEIRELLES, F. V. Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic Acid. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e101022, jan. 2014.

SANTORO, F.; MAYER, D.; KLEMENT, R. M.; WARCZOK, K. E.; STUKALOV, A.; BARLOW, D. P.; PAULER, F. M. Imprinted Igf2r silencing depends on continuous Airn lncRNA expression and is not restricted to a developmental window. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 6, p. 1184–95, mar. 2013.

SANTOS, F.; HYSLOP, L.; STOJKOVIC, P.; LEARY, C.; MURDOCH, A.; REIK, W.; STOJKOVIC, M.; HERBERT, M.; DEAN, W. Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. **Human Reproduction**, v. 25, n. 9, p. 2387–2395, 15 jul. 2010.

SASAKI, H.; ISHIHARA, K.; KATO, R. Mechanisms of Igf2/H19 imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 5, p. 711–5, maio 2000.

SLEUTELS, F.; ZWART, R.; BARLOW, D. P. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. **Nature**, v. 415, n. 6873, p. 810–3, 14 fev. 2002.

SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A. K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A. C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic

anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 4, p. 107–14, ago. 2012.

SMITH, L. C.; THERRIEN, J.; FILION, F.; BRESSAN, F.; MEIRELLES, F. V. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 58, 25 fev. 2015.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–5, 6 jan. 2000.

SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 309–12, 1 maio 1998.

SUZUKI, J.; THERRIEN, J.; FILION, F.; LEFEBVRE, R.; GOFF, A. K.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 947–56, maio 2011.

SUZUKI, J.; THERRIEN, J.; FILION, F.; LEFEBVRE, R.; GOFF, A. K.; SMITH, L. C. In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. **BMC Developmental Biology**, v. 9, p. 9, jan. 2009.

TABANO, S.; COLAPIETRO, P.; CETIN, I.; GRATI, F. R.; ZANUTTO, S.; MANDÒ, C.; ANTONAZZO, P.; PILERI, P.; ROSSELLA, F.; LARIZZA, L.; SIRCHIA, S. M.; MIOZZO, M. Epigenetic modulation of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction. **Epigenetics** : official journal of the DNA Methylation Society, v. 5, n. 4, p. 313–24, 16 maio 2010.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics** : official journal of the DNA Methylation Society, v. 9, n. 6, p. 803–15, jun. 2014.

VU, T. H.; LI, T.; HOFFMAN, A. R. Promoter-restricted histone code, not the differentially methylated DNA regions or antisense transcripts, marks the imprinting status of IGF2R in human and mouse. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 19, p. 2233–45, 1 out. 2004.

WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 113, n. 1-4, p. 90–8, jan. 2006.

WAGSCHAL, A.; SUTHERLAND, H. G.; WOODFINE, K.; HENCKEL, A.; CHEBLI, K.; SCHULZ, R.; OAKEY, R. J.; BICKMORE, W. A.; FEIL, R. G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 3, p. 1104–13, fev. 2008.

WANG, X.; MILLER, D. C.; HARMAN, R.; ANTCZAK, D. F.; CLARK, A. G. Paternally expressed genes predominate in the placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 26, p. 10705–10, 25 jun. 2013.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 37–50, jan. 2006.

YOTOVA, I. Y.; VLATKOVIC, I. M.; PAULER, F. M.; WARCZOK, K. E.; AMBROS, P. F.; OSHIMURA, M.; THEUSSL, H.-C.; GESSLER, M.; WAGNER, E. F.; BARLOW, D. P. Identification of the human homolog of the imprinted mouse Air non-coding RNA. **Genomics**, v. 92, n. 6, p. 464–73, dez. 2008.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–4, fev. 2001.

YOUNG, L. E.; SCHNIEKE, A. E.; MCCREATH, K. J.; WIECKOWSKI, S.; KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A. J.; WILMUT, I.; LOI, P.; FEIL, R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 12, p. 1433–42, dez. 2003.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–63, set. 1998.