

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *PEG3* EM DIFERENTES  
REGIÕES DE CÉREBRO DE BOVINOS DA RAÇA NELORE**

**Ribeirão Preto – SP  
2009**

**HÉLIDA REGINA MAGALHÃES**

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *PEG3* EM DIFERENTES  
REGIÕES DE CÉREBRO DE BOVINOS DA RAÇA NELORE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Genética da Faculdade  
de Medicina de Ribeirão Preto – USP  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências. Área de concentração:  
Genética.**

**Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Cardoso**

**Ribeirão Preto – SP  
2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Magalhães, Héliida Regina

Análise do padrão de metilação do gene *Peg3* em diferentes regiões de cérebro de bovinos da raça Nelore. Ribeirão Preto, 2009.

70 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Cardoso, Vera Lucia

1. Imprinting Genômico. 2. Metilação. 3. *Peg3*. 4. Bovinos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Hélida Regina Magalhães

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Departamento de Genética da Faculdade  
de Medicina de Ribeirão Preto – USP para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.  
Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Aos meus pais,

*Heloisa e Marcos*, pelo amor, apoio e incentivo, que me tornaram forte e confiante na busca dos meus ideais.

À minha família,

pelo carinho e compreensão, nos momentos de ausência sentidos, mas necessários para a realização deste trabalho.

Ao *Daniel*,

pelo companheirismo, pela paciência e pelo amor que tem me dedicado.

Com amor e gratidão,

*DEDICO.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Vera Lucia Cardoso, pela orientação, pela dedicação, e pela confiança que depositou em mim.

À Prof. Dra. Ester Silveira Ramos, pela co-orientação, por me receber em seu laboratório e tornar este trabalho possível.

Ao Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, pela amizade, dedicação, pelos ensinamentos que me deram base na genética molecular, e pela ajuda valiosa na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP de Araçatuba, pelas valiosas aulas de neuroanatomia.

Aos técnicos dos laboratórios do bloco C: Marli Aparecida Vanni Galerani, Silvio Avelino Santos, Reginaldo Aparecido Vila, Luiz Antônio Framartino Bezerra, Sebastião Paulo Framartino Bezerra e Marco Pinto Corrado, por estarem sempre prontos para ajudar nas tarefas do laboratório, e pela amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio e pelos ensinamentos que ajudaram na minha formação.

Aos pesquisadores e funcionários da APTA- Pólo Regional Centro Leste, Ribeirão Preto, pela colaboração e amizade, em especial à Dra. Lenira El Faro, pelas palavras de incentivo que me motivaram a seguir na vida acadêmica.

À Prefeitura do Campus, da USP de Pirassununga, por permitir a coleta das amostras de cérebro bovino no Matadouro-escola, em especial aos funcionários do Matadouro-escola pelo auxílio nas coletas.

Ao médico veterinário Dr. André Luiz K. Nogueira Vanzella, e aos demais funcionários do Frigorífico Barra Mansa, que também auxiliaram na coleta de materiais.

Aos colegas do laboratório de Epigenética e Reprodução do bloco C: Adriane, Lisandra, Paula, Jaqueline, Murilo, Marcus Vinícius, pela amizade, pelos socorros prestados, pelo consolo quando géis e PCRs davam errados, e pelas discussões que muito ajudaram na realização deste trabalho, devo muito a vocês.

Aos demais colegas do bloco C: Adriana, Alejandro, Andrea, Carol, Ciro, Cristiana, Flávia, Flávia Donabela, Felipe, Fernanda, Franciele, Jeferson, Juliana Cuzzi, Juliana Meola, Juliana Serafim, Karine, Marcelo, Mariana, Newton, Rita e Silvina, pelo agradável convívio e amizade. Tenho um carinho enorme por vocês!

## RESUMO

MAGALHÃES, H. R. **Análise do padrão de metilação do gene *Peg3* em diferentes regiões de cérebro de bovinos da raça Nelore.** 2009. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

O comportamento materno é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento do filhote mamífero. Durante a prenhez, as fêmeas recebem estímulos sensoriais e hormonais capazes de modificar e preparar o cérebro da mãe para o início dos padrões de comportamento materno (por exemplo, aumentando o número neurônios produtores de oxitocina no hipotálamo). Estudos têm identificado o hipotálamo como o principal responsável por estas mudanças, porém outras áreas do cérebro também estão envolvidas no processo do comportamento materno. *Peg3*, um gene marcado paternalmente expresso, é conhecido por controlar o comportamento materno em camundongos. Fêmeas nocautes para o gene *Peg3* falham em aumentar a ingestão de alimentos, na ejeção de leite e em algumas atividades maternas, como placentofagia e construção do ninho. Este estudo teve como objetivo determinar os padrões de metilação da região diferencialmente metilada de *Peg3* (*Peg3*DMR) de animais da raça Nelore de bovinos em diversas áreas do cérebro. Amostras foram coletadas das seguintes áreas: córtex frontal, occipital, temporal e parietal, hipocampo e hipotálamo, num total de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). O padrão de metilação destas amostras foi analisado pelo protocolo COBRA (do inglês, *Combined Bisulfite-Restriction Analysis*), que combina a modificação do DNA por bissulfito de sódio, amplificação por PCR e digestão por enzima de restrição. Foram encontrados diferentes padrões de metilação entre as amostras, ocorrendo uma predominância de hipometilação entre as amostras do sexo masculino, e padrões mais variados nas amostras do sexo feminino. As variações nos padrões de metilação ocorreram de maneira mais marcante entre as amostras de uma mesma região cerebral de diferentes



animais, do que entre as amostras de várias regiões de um mesmo animal. Os resultados indicam que pode haver uma variação no *status* de *imprinting* em nível populacional, porém estudos com um número maior de amostras são necessários para a verificação da significância estatística destas variações.

Palavras-chave: *imprinting* genômico, metilação, *Peg3*, bovinos.

## ABSTRACT

MAGALHÃES, H. R. **Methylation pattern assay of *Peg3* in several regions of Nellore cattle breed brain.** 2009. 70f. Dissertation (Master Degree) –Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The maternal behavior is essential to survival and development of mammalian offspring. Throughout pregnancy, females receive sensory and hormonal stimuli which promote modifications and prepare the mother's brain to the onset of maternal behavior patterns (for example, by increasing numbers of neurons producing oxytocin in the hypothalamus). Studies have identified the hypothalamus as the main responsible for these changes, but other areas of the brain are also involved in the maternal behavior process. *Peg3*, an imprinted paternally expressed gene, is known to control maternal behavior in mice. *Peg3* knockout females failed in increasing food intake, milk ejection and some maternal activities as placentofagia and nest building. This study aimed to determine the methylation patterns of the differently methylated region of *Peg3* (DMR-Peg3) of animals from Nellore cattle breed in several areas of the brain. Samples were collected from the following areas of cattle brain: the frontal, occipital, temporal and parietal cortices, hippocampus and hypothalamus, in a total of 8 animals (4 males and 4 females). The methylation pattern of these samples was analyzed by the protocol COBRA (Combined Bisulfite-Restriction Analysis), which combines DNA modification by sodium bisulfite, PCR amplification and digestion by restriction enzymes. It was found different methylation patterns among the samples. There was a predominance of hypomethylation among male samples, while different patterns were found among the female samples. Variation in the methylation patterns was more markedly observed among samples of the same cerebral region among different animals, then among samples of several regions within an animal. The results suggest that there may be a variation in the imprinting status at a

population level, but further assays, with an increased number of samples are needed to verify the statistical significance of this variation.

Keywords: genomic imprinting, methylation, *Peg3*, cattle.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação do íntron 1 do gene <i>Peg3</i> .....	26
Figura 1.2. Comparação do intervalo <i>Peg3 – Zim2</i> de humanos, camundongos e bovinos .....	28
Figura 3.1. Encéfalo do animal 3, antes dos cortes .....	36
Figura 3.2. Indicação (setas) das regiões do hipotálamo e hipocampo .....	36
Figura 4.1. Localização das ilhas CpG na região promotora do gene <i>Peg3</i> .....	43
Figura 4.2. Região amplificada por PCR .....	45
Figura 4.3. Gel de Poliacrilamida com os resultados das análises das amostras de Hipocampo .....	46
Figura 4.4. Encéfalo do animal 4, antes dos cortes .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Resultados das análises de metilação das diferentes regiões cerebrais pelo ensaio COBRA .....	47
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. <i>Imprinting</i> genômico.....	15
1.1.1. Metilação do DNA .....	18
1.2. Funções do <i>Imprinting</i> genômico .....	21
1.2.1. Comportamento materno.....	23
1.3. O gene <i>Peg3</i> .....	25
1.3.1. Efeitos da mutação do <i>Peg3</i> no comportamento materno.....	29
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1. Amostras .....	35
3.2. Extração de DNA Genômico .....	37
3.3. Caracterização da <i>Peg3</i> DMR e construção dos primers.....	38
3.4. Análise de metilação do DNA pelo ensaio COBRA ( <i>Combined Bisulfite Restriction Assay</i> ).....	39
3.4.1 Reação de modificação do DNA por bissulfito de sódio .....	39
3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	40
3.4.3. Digestão dos fragmentos gerados por PCR com a enzima <i>Bst</i> UI .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1. Caracterização da região da <i>Peg3</i> DMR estudada .....	43
4.2. Construção dos <i>primers</i> .....	44
4.3. Resultados do ensaio COBRA.....	45
4.4. Diferenças entre as regiões de um mesmo indivíduo.....	47
4.5. Diferenças entre indivíduos .....	52
4.5.1. Diferenças de sexo e idade.....	53
4.5.2. Hipermetilação do animal 6 .....	55
4.6. Diferenças estruturais do <i>Peg3</i> entre espécies .....	56
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>

## ***1. Introdução***

### **1.1. *Imprinting* genômico**

Em organismos diplóides, os genes normalmente são expressos de maneira bialélica (os alelos maternos e paternos são igualmente expressos), garantindo que mutações deletérias recessivas fiquem silenciadas e se manifestem apenas quando presentes em homozigose. Até o início da década de 1980, acreditava-se que cada cópia de um gene era funcionalmente equivalente, independente de qual parente ela tinha sido herdada. Embora os efeitos de origem parental já fossem reconhecidos há cerca de 3000 anos por criadores de mulas na Ásia Menor (SAVORY, 1970), foi apenas em 1984 que surgiram os primeiros experimentos que comprovaram este tipo de efeito em mamíferos. McGrath e Solter (1984), através de experimentos com embriões de camundongos ginogenéticos e androgenéticos (com material genético de origem exclusivamente materna e paterna, respectivamente), obtiveram evidências de que a presença dos genomas materno e paterno no embrião é imprescindível para que a embriogênese ocorra de forma normal. Nestes experimentos, enquanto no grupo de embriões controles (em que ambos os pronúcleos materno e paterno foram transplantados) 36% chegaram a nascer, nenhum dos embriões que tiveram transplantados dois pronúcleos de mesma origem (materna ou paterna) se desenvolveram a termo. No mesmo ano, também foram usados embriões ginogenéticos (SURANI; BARTON; NORRIS, 1984) e androgenéticos (BARTON; SURANI; NORRIS, 1984) de camundongos para estudar a contribuição de cada um dos genomas no desenvolvimento. Nestes experimentos, os embriões ginogenéticos tiveram crescimento retardado, desenvolvimento anormal dos tecidos extra-embrionários, e morreram por volta da metade da gestação. Por outro lado, os embriões androgenéticos tiveram desenvolvimento completo da placenta, mas também não sobreviveram até o parto. Assim, com base nestes resultados, concluíram que os genomas



materno e paterno são funcionalmente não-equivalentes, sendo que o genoma paterno estaria principalmente envolvido com o desenvolvimento de tecidos extra-embrionários, enquanto que o genoma materno seria essencial em alguns estágios da embriogênese.

Outras evidências da diferença da contribuição dos genomas parentais foram obtidas nos casos de teratoma ovariano (LINDER; POWER, 1970) e mola hidatiforme completa em humanos (KAJII; OHAMA, 1977), que são estruturas de ocorrências naturais ginogenéticas e androgenéticas, respectivamente. Os teratomas ovarianos são compostos por uma massa desorganizada de tecidos embrionários, mas sem a presença de uma placenta. Por outro lado, na mola hidatiforme ocorre crescimento excessivo do trofoblasto, na ausência de um embrião (HITCHINS; MOORE, 2002).

Em 1987, grupos de pesquisa de diferentes laboratórios ao redor do mundo identificaram que a metilação do DNA era o fator que “marcava” os genes para este tipo de regulação (MONK; BOUBELIK; LEHNERT, 1987; REIK et al., 1987; SANFORD et al., 1987; SAPIENZA et al., 1987). No início dos anos 1990, foram identificados genes com um padrão de expressão que poderiam explicar as diferenças na contribuição dos genomas materno e paterno. Os genes *Igf2* (DeCHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991), *Igf2r* (BARLOW et al., 1991) e *H19* (BARTOLOMEI; ZEMEL; TILGHMAN, 1991), foram os primeiros genes marcados identificados em camundongos. Desde então, cerca de 90 genes em camundongos (*Mus musculus*), 70 em humanos (*Homo sapiens*) e 12 em bovinos (*Bos taurus sp*) foram identificados (MORISON; PATON; CLEVERLEY, 2001). Entretanto acredita-se que o número de genes marcados possa representar de 0,1 a 0,2 % dos genes presentes no genoma dos mamíferos (DINDOT et al., 2004).

O *imprinting* genômico é um mecanismo de controle da transcrição gênica no qual apenas um dos alelos é expresso dependendo de sua origem parental (REIK; WALTER, 2001). Em animais, o mecanismo de *imprinting* está presente nos mamíferos placentários,

mas ausente em todas as outras classes de vertebrados. Sugere-se que o *imprinting* tenha surgido há cerca de 100 milhões de anos na linhagem vertebrada, no momento da divergência dos mamíferos placentários dos monotremados, mas antes da divergência das classes placentárias e marsupiais (CURLEY *et al.*, 2004). Entretanto, a expressão gênica parental-específica no endosperma de plantas e na determinação sexual em alguns insetos sugere que o *imprinting* genômico pode ter evoluído de forma independente várias vezes em eucariotos, e que pode apresentar funções biológicas distintas (SLEUTELS; BARLOW, 2002).

Existem várias teorias que tentam explicar a origem e a função do *imprinting* genômico nos mamíferos, e entre elas a que parece apresentar um melhor embasamento é a “teoria do conflito”, a qual se baseia em um suposto “cabo de guerra” de interesse entre os sexos (GODFRAY, 1995). Ao contrário dos animais ovíparos que depositam uma quantidade fixa de nutrientes em um ovo, nos mamíferos placentários o embrião é nutrido continuamente através da placenta. Além disso, os filhotes mamíferos passam por um período de crescimento pós-natal em que são totalmente dependentes da produção do leite materno e outros cuidados como proteção contra predadores e manutenção da temperatura corporal (SLEUTELS; BARLOW, 2002).

Como é de interesse do pai que sua cria obtenha o máximo de recursos maternos possíveis para que se desenvolva normalmente, os genes expressos paternalmente estão envolvidos no crescimento placentário e no controle do comportamento da mãe nos cuidados com a cria, mesmo após o parto. Mas para a fêmea, todo esse processo tem um custo fisiológico e reprodutivo muito alto, e, portanto, é de interesse da mãe tentar minimizar seu prejuízo, garantindo sua própria sobrevivência e também a possibilidade de futuras gestações, e isso é feito através do silenciamento destes mesmos genes (HAIG, 2000).

As primeiras evidências deste conflito surgiram através de estudos com o gene *Igf2*, que é paternalmente expresso. Este gene codifica um fator de crescimento semelhante à

insulina que é responsável pelo crescimento do embrião. No alelo materno, este gene está silenciado enquanto que o gene *Igf2r*, cujo produto inibe o funcionamento do gene *Igf2* está sendo expresso (HITCHINS; MOORE, 2002).

### 1.1.1. Metilação do DNA

O mecanismo de *imprinting* genômico é mediado pela interação de fatores epigenéticos, de modo que a transcrição do gene é alterada, enquanto sua seqüência permanece inalterada. O principal e mais estudado mecanismo epigenético é a metilação alelo-específica do DNA (SHI, 2005).

Há evidências de que a metilação do DNA possa ter evoluído a partir de um mecanismo de defesa contra genomas parasitários presentes em bactérias, que utilizam metilação para proteger o próprio DNA da ação das enzimas de restrição (KANEKO-ISHINO; KOHDA; ISHINO, 2003). Os mamíferos podem ter adquirido este mecanismo através da inserção de elementos de transposição (transposons). Esses parasitas genômicos possuem seqüências terminais repetitivas capazes de “atrair” a metilação de uma maneira seqüência dependente por induzir a formação de estruturas secundárias incomuns durante a replicação do DNA. Essas repetições são geralmente encontradas dentro ou muito próximas das chamadas ilhas CpG, que são regiões ricas em dinucleotídeos CpG em sua seqüência (SLEUTELS; BARLOW, 2002).

No processo de metilação, grupos metil (CH<sub>3</sub>) são covalentemente adicionados ao carbono na posição 5 das citosinas localizadas nos dinucleotídeos CpG, numa reação catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). As DNMTs são enzimas

responsáveis pela metilação *de novo* ou de manutenção desses dinucleotídeos (SWALES; SPEARS, 2005). Os genes marcados estão geralmente localizados em *clusters* nos cromossomos e são regulados coordenadamente por uma Região Controladora de *Imprinting* (ICR; do inglês, *Imprinting Control Region*). Deleções nestas regiões podem afetar os padrões de *imprinting* de genes próximos, assim como de genes relativamente distantes (KIM *et al.*, 2003; SLEUTELS; BARLOW, 2002).

A metilação ocorre em regiões conhecidas como Regiões Diferencialmente Metiladas (DMR; do inglês, *Differently Methylated Region*), as quais abrigam as ICRs. Uma DMR pode estar posicionada a montante, a jusante ou mesmo dentro do próprio gene (SHI, 2005). Em geral, os padrões de metilação das DMRs são mantidos nos tecidos somáticos, independentemente do sexo do embrião, sendo apagados no início da migração das células germinativas primordiais. A metilação é apagada a cada ciclo reprodutivo, e é restabelecida nas células germinativas maduras, de modo a estabelecer os padrões sexo-específicos de metilação (LUCIFERO; CHAILLET; TRASLER, 2004). Entretanto, esses padrões são reversíveis e podem ser influenciados tanto pelo ambiente interno quanto externo à célula, permitindo assim uma variabilidade tecido e estágio-específica no status de *imprinting*. Existem fortes evidências demonstrando que fatores ambientais podem influenciar a metilação do DNA. Por exemplo, o fornecimento de dietas metil-suplementadas a grávidas agouti mutantes altera a regulação epigenética da expressão agouti na cria de camundongos (MOORE, 2001).

Defeitos nos padrões de *imprinting* são responsáveis pela etiologia de síndromes como Prader-Willi, Angelman e Tourette, sendo fortes candidatos também no surgimento de distúrbios mentais como autismo, esquizofrenia, transtorno bipolar e epilepsia (DAVIES; ISLES; WILKINSON, 2004). Muitos cânceres também são atribuídos à perda de *imprinting* de genes que estão envolvidos com crescimento e regulação do ciclo celular, fatores de reparo

de DNA e receptores de hormônios esteróides (DOWDY et al., 2005). Entre esses tumores encontram-se o tumor de Wilms e gliomas (HITCHINS; MOORE, 2002; MAEGAWA et al., 2001). Em bovinos, alterações em genes marcados têm sido relacionadas ao surgimento da Síndrome do Bezerro Grande (LOS, do inglês *Large Offspring Syndrome*) (MAHER, 2005).

A metilação do DNA pode inibir a transcrição por dois mecanismos principais. No primeiro mecanismo, o grupo metil interfere na ligação dos fatores de transcrição ao DNA metilado, impedindo a transcrição. No segundo, o grupo metil recruta proteínas ligadoras de metil-CpGs (MBDs), que por sua vez trazem histonas deacetilases (HDACs) que ativam a maquinaria de remodelagem da cromatina (o complexo NuRD) (LEE, 2003). A metilação do DNA tem sido freqüentemente ligada à inativação gênica, mas há alguns exemplos em que a metilação é responsável pela expressão do alelo ativo, como é o caso do gene *Igf2*, em que a metilação está presente no alelo expresso paterno.

Além da metilação do DNA, as modificações covalentes de histonas, como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e ribosilação, têm um papel fundamental na regulação epigenética. As histonas são proteínas associadas ao DNA responsáveis pela formação das subunidades estruturais básicas da cromatina, os nucleossomos. Assim, através destas modificações, as histonas são capazes de controlar transições dinâmicas entre os estados transcricionalmente ativos e silenciados da cromatina. O alelo ativo tem uma estrutura de eucromatina, que é mais acessível à maquinaria de transcrição, enquanto o alelo silenciado adquire uma conformação de heterocromatina, que reduz a acessibilidade do nucleossomo ao aparato de transcrição (HITCHINS; MOORE, 2002).

## 1.2. Funções do *Imprinting* genômico

A maioria dos genes marcados é expressa principalmente em células neurais, tecidos fetais e tecidos extra-embriônicos, e, portanto, parecem estar envolvidos no crescimento fetal, no funcionamento da placenta, e em aspectos do comportamento (KANEKO-ISHINO; KOHDA; ISHINO, 2003).

Aproximadamente metade dos genes marcados em mamíferos participa no controle do crescimento pré-natal. Tem sido relatado que a diminuição nos níveis de expressão de alguns genes expressos paternalmente (como *Igf2*, *Peg1* e *Peg3*) retarda o crescimento intra-uterino, enquanto que a deleção dos genes expressos maternalmente *Grb10*, *H19* ou *Igf2r*, resulta em hipercrecimento do feto. Entretanto, há também relatos de genes que regulam o crescimento pós-natal, como por exemplo, o gene *Rasgrf1*, que está envolvido na síntese e liberação do Hormônio de Crescimento (GH) (SHI, 2005).

A expressão de genes marcados na placenta é essencial para o crescimento e funcionamento deste órgão, e, portanto, é também um fator determinante no crescimento fetal. Genes responsáveis pelo desenvolvimento de diferentes regiões da placenta têm sido descobertos, como o *Igf2* (labirinto trofoblástico e espongiotrofoblasto), o *Peg1* (vasos sanguíneos do labirinto) e o *Peg3* (labirinto e espongiotrofoblasto). Nocautes destes genes resultam em placentas de tamanho reduzido (65, 85 e 72%, respectivamente), limitando assim a transferência de nutrientes e levando a uma redução no crescimento fetal. Deleções dos genes *H19*, *Igf2r* e *p57kip2*, ao contrário, resultaram em hiperplasia de todas as camadas da placenta (140, 140 e 144%, respectivamente) (REIK et al., 2003).

A influência dos genes marcados no neurodesenvolvimento foi comprovada através de estudos com ratos quimeras com células partenogênicas (PG) e androgenéticas (AG). Nestes

experimentos, as células PG e AG mostraram um padrão claro e recíproco de distribuição. As células PG foram encontradas apenas no córtex e estriado, enquanto as células AG apareceram principalmente no hipotálamo e na área pré-óptica (KEVERNE et al., 1996). Estes resultados sugeriram que os genomas materno e paterno devem ter impactos diferentes sobre o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (DAVIES; ISLES; WILKINSON, 2004). O hipotálamo compõe o sistema límbico, que, além de controlar o comportamento, também é responsável por controlar a temperatura corporal, as necessidades instintivas e emocionais, como fome, sede, agressividade, libido e outros comportamentos inatos. O córtex cerebral, por outro lado, é especializado em inibir, controlar e moderar as demandas instintivas do sistema límbico, mais uma vez confirmando a teoria do conflito (SHI, 2005).

Entretanto, a expressão persistente de alguns genes marcados em cérebros adultos pode indicar que, além de seu envolvimento na neurogênese, estes genes também podem interferir no funcionamento do cérebro adulto, regulando processos envolvidos com memória, cognição e comportamento (WILKINSON; DAVIES; ISLES, 2007).

Fenótipos de alteração de crescimento e de comportamento são comuns em síndromes causadas por dissomia uniparental, quando um indivíduo herda as duas cópias de um cromossomo específico de um único genitor, sem nenhuma cópia do outro genitor. No caso da Síndrome de Beckwith-Wiedemann, a dissomia uniparental paterna de uma região do cromossomo 11 resulta em crianças grandes ao nascimento, com macroglossia e hérnia umbilical, além de alterações nos rins, glândulas supra-renais e no fígado. Já no caso da síndrome de Prader-Willi, a dissomia uniparental materna da região cromossômica 15q11-q13 causa deficiência mental e graves distúrbios de aprendizagem, além de problemas comportamentais como crises temperamentais e distúrbios obsessivo-compulsivos, sendo que

de 5 a 10% dos pacientes pode também desenvolver psicoses na vida adulta (NICHOLLS, 2000).

### **1.2.1. Comportamento materno**

Segundo Crowell-Davis e Houpt (1986), o comportamento materno em mamíferos é definido como todo o cuidado dado pelas mães aos seus filhotes, desde o nascimento até que eles desenvolvam características e habilidades que assegurem sua própria sobrevivência, tornando-se independentes da dieta láctea e dos demais cuidados maternos.

O circuito neural responsável pelo comportamento materno é complexo, e envolve interações entre o sistema nervoso central e o sistema endócrino (SHI, 2005). Hormônios, neurotransmissores, neuropeptídeos e estímulos sensoriais, em conjunto, são responsáveis por modular o comportamento materno (BROWN, 1998). Muitos dos genes envolvidos com comportamento materno são expressos em regiões do cérebro, como a área pré-óptica medial (MPOA) e núcleos paraventriculares do hipotálamo, que regulam a produção de hormônios devido a sua ligação com as glândulas adrenais e pituitária (eixo HPA) (LI et al., 1999; NEUMANN, 2003). Também os hormônios da placenta aumentam a ingestão de alimentos da mãe, preparam o cérebro para o cuidado materno e a glândula mamária para a produção de leite. Próximo ao parto, o nível de progesterona diminui, e aumentam os níveis de estrógenos e prolactina (SHI, 2005).

A estimulação multisensorial na fêmea após a exposição aos filhotes e fatores ambientais também têm um papel fundamental no comportamento materno. Os sinais olfatórios, visuais e as vocalizações são importantes no reconhecimento dos filhotes logo após



o parto, sendo que fêmeas com anosmia canibalizam ou abandonam seus filhotes (SHI, 2005). O estímulo de sucção do filhote pós-parto é capaz de sustentar a produção de leite, e também silenciar o interesse sexual das fêmeas pelos machos, garantindo uma duração maior do cuidado materno (CURLEY et al., 2004).

O comportamento materno é extremamente diverso entre as várias espécies de mamíferos. A intensidade dos cuidados e o tempo gasto com os filhotes apresentam uma grande variação, de espécies que são minimamente maternais (como os coelhos, que gastam poucos minutos do dia em contato com seus filhotes) até espécies, incluindo alguns primatas, que mostram comportamento materno por todo o seu ciclo de vida (SHI, 2005).

As variações em comportamentos relacionados ao cuidado materno também têm sido documentadas em um grande número de subespécies e cruzamentos de animais domesticados. Em bovinos, observa-se uma diferença em relação ao comportamento materno no que se refere à habilidade materna e à produção de leite nas raças de diferentes origens e especializações (leite ou corte). Imediatamente após o parto, as vacas iniciam uma seqüência de atividades que são importantes no processo de reconhecimento dos bezerros pelas mães, como o comportamento de cheirar e investigar o bezerro. Também o ato de lambar ajuda a fortalecer o vínculo entre a mãe e o bezerro, além de estimular a circulação periférica e a termogênese no bezerro (PARANHOS DA COSTA; CROMBERG, 1998). Logo após o nascimento, os bezerros se levantam, procuram pelas tetas e começam a mamar. Segundo Selman, McEwan e Fisher (1970), os bezerros que tiveram um menor período entre o parto e a primeira mamada foram os mais aptos a sobreviverem.

Ventorp e Michanek (1991) encontraram uma latência média a primeira mamada de 249 minutos em bovinos leiteiros (variando de 50 a 704 minutos), enquanto que Paranhos da Costa, Cromberg e Ardesch (1996), estudando gado de corte, encontraram as médias de 106 ( $\pm$  60), 208 ( $\pm$ 114), 213 ( $\pm$ 117) e 156 ( $\pm$ 106) minutos para as raças Nelore, Guzará, Gir e Caracu,

respectivamente. Estas diferenças são provavelmente devidas à seleção artificial aplicada sobre as populações em programas de melhoramento genético (NEWMAN, 1994). Para facilitar o manejo do gado leiteiro, tais raças têm sido selecionadas para um comportamento menos rígido. Porém, no caso do gado de corte, são selecionadas vacas com maior habilidade materna, já que o bezerro com maior peso ao desmame é mais lucrativo numa produção.

Vários genes já foram identificados como sendo importantes para o comportamento materno, como o *Fosb*, *Dbh*, *Peg1* e *Peg3*, entre outros. Fêmeas homozigotas para mutações nestes genes apresentam variações no comportamento materno que podem levar a um aumento na taxa de mortalidade da cria, porém nenhuma anormalidade estrutural foi observada nas secções de cérebros de fêmeas mutantes (LI et al., 1999).

### **1.3. O gene *Peg3***

O *Peg3* (*Paternally Expressed Gene 3*), também conhecido como *Pw1*, é um gene expresso paternalmente que codifica uma proteína multifuncional contendo 12 domínios de ligação ao DNA tipo dedos de zinco (*zinc fingers*) e também domínios ricos em prolina, o que indica que deve agir como um fator de transcrição e na interação proteína-proteína (DOWDY et al., 2005). Possui nove éxons distribuídos sobre uma região de 30 Kb de comprimento, e a sua estrutura genômica é bem conservada entre as muitas espécies já estudadas.

O *Peg3* foi o primeiro gene marcado identificado no domínio de *imprinting* proximal do cromossomo 7 de camundongos. Em humanos, essa região é sintênica com a região cromossômica 19q13.4, que tem sido ligada à ocorrência de molas hidatiformes, câncer ovariano e gliomas (MURPHY; WYLIE; JIRTLE, 2001). Não há relatos da ocorrência de

UPDs para o cromossomo 19 em humanos, mas indivíduos com trissomia parcial de 19q são caracterizados por baixo peso ao nascer, retardo psicomotor, face flácida, orelhas anormais e um pescoço curto com excesso de dobras de pele (MURPHY; WYLIE; JIRTLE, 2001).

A *Peg3*DMR possui dois elementos de seqüência conservada e múltiplos sítios de ligação para o YY1, um fator de transcrição que age como promotor sensível à metilação (Figura 1.1). Estudos recentes demonstraram que esses elementos possuem atividade de ativação e bloqueio da transcrição e, portanto, deve ter um papel importante no controle do *imprinting* neste domínio (KIM et al., 2003; SONG et al., 2008).

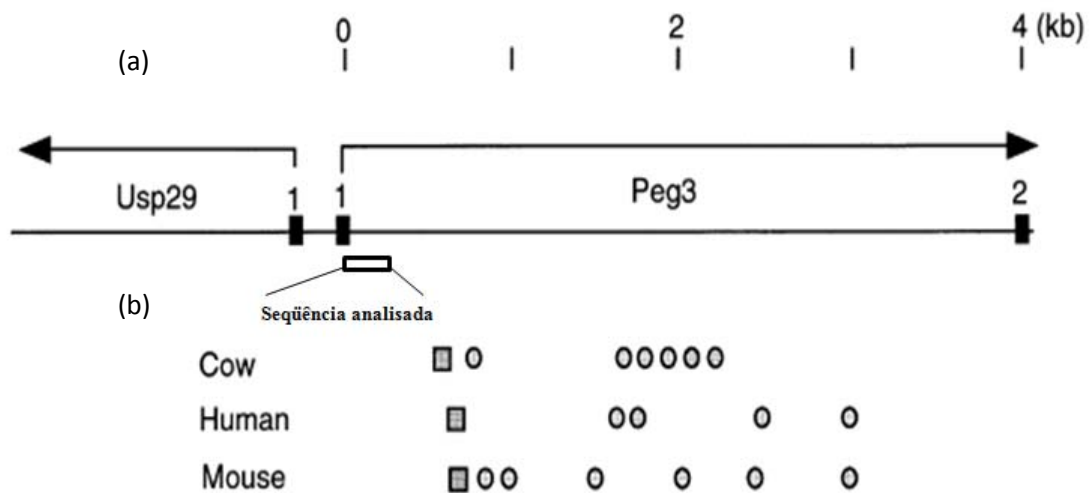


Figura 1.1. Figura adaptada de Kim et al (2003). Representação do íntron 1 do gene *Peg3*. (a) Os retângulos preenchidos indicam a posição dos éxons 1 e 2. O retângulo em branco indica a posição da seqüência analisada. (b) Comparação da seqüência entre as três espécies camundongos, humanos e bovinos. Os quadrados e círculos representam os elementos de seqüência conservada 1 e 2, respectivamente.

A transcrição bidirecional é uma característica de alguns genes marcados, que produzem transcritos *sense* e também *antisense* (KIM et al., 2004), como por exemplo, o *Air* (RNA *antisense* do *Igf2r*). Glasgow et al. (2005) identificaram a presença do transcrito *antisense Peg3* (*APeg3*) em cérebros de ratos. Em 2008, Choo, Kim e Kim (2008) localizaram o *APeg3* na região 3' não traduzida (UTR) do *Peg3* em três espécies de mamíferos

(camundongos, humanos e bovinos). *APeg3* também é paternalmente expresso e este transcrito pode se parear com o transcrito de *Peg3*, sendo provável que esteja envolvido na regulação pós-transcricional do *Peg3* (CHOO; KIM; KIM, 2008).

Comparando *Peg3* de humanos, camundongos e bovinos, Kim et al. (2004) descobriram algumas diferenças inter-específicas. A primeira diferença observada é que o *Peg3* de bovinos tem uma deleção de aminoácidos que resulta na perda de função da unidade dedo de zinco número 2. Outra diferença foi observada nos domínios ricos em prolina nestas três espécies. O *Peg3* de camundongos contém dois destes domínios (um entre os *fingers* 5 e 6, e outro entre os *fingers* 10 e 11), enquanto que no *PEG3* humano está faltando o primeiro domínio, e em bovinos o primeiro destes domínios ricos em prolina contém uma expansão da seqüência de aminoácidos com cerca de 80 cópias de um motivo de 9 aminoácidos. Este primeiro domínio do *Peg3* de camundongos também contém uma expansão de 12 cópias de um motivo de 10 aminoácidos, mas a seqüência nestas duas espécies não é similar. Já o segundo domínio rico em prolina é altamente conservado nestas três espécies, com uma média de 80% de conservação da seqüência de aminoácidos, o que sugere que este domínio possui papel importante na função de proteína do *Peg3* de mamíferos.

Outra diferença observada é a ocorrência de *splicing* alternativo do éxon 3 em humanos e bovinos, mas não em camundongos. Este *splicing* alternativo resulta em três isoformas do *Peg3*, sendo a isoforma mais curta a forma dominante em todos os tecidos testados. Em camundongo, a forma única presente é equivalente à forma mais curta do *Peg3* de bovinos e humanos (KIM et al., 2004).

O gene *PEG3* humano compartilha um grupo de 7 pequenos éxons na região 5' com o gene também paternalmente expresso *ZIM2*, que está localizado *downstream* do gene *PEG3*, o que não ocorre em camundongos e bovinos (Kim et al, 2000). A ausência desta sobreposição nestas espécies pode ser explicada pela presença de dois genes, *Zim1* em

camundongos e *Ast1* em bovinos, que podem ter sido inseridos entre o *Peg3* e o *Zim2*, em cada uma das espécies mais recentemente, indicando que rearranjos evolucionários têm alterado a estrutura de genes em domínios de *imprinting* conservados (Figura 1.2). Esta inserção dos genes *Zim1* e *Ast1* modificou os padrões de *imprinting* do gene *Zim2*, que passou a ser maternalmente expresso em camundongos e bialélicamente expresso em bovinos (Kim et al, 2004).

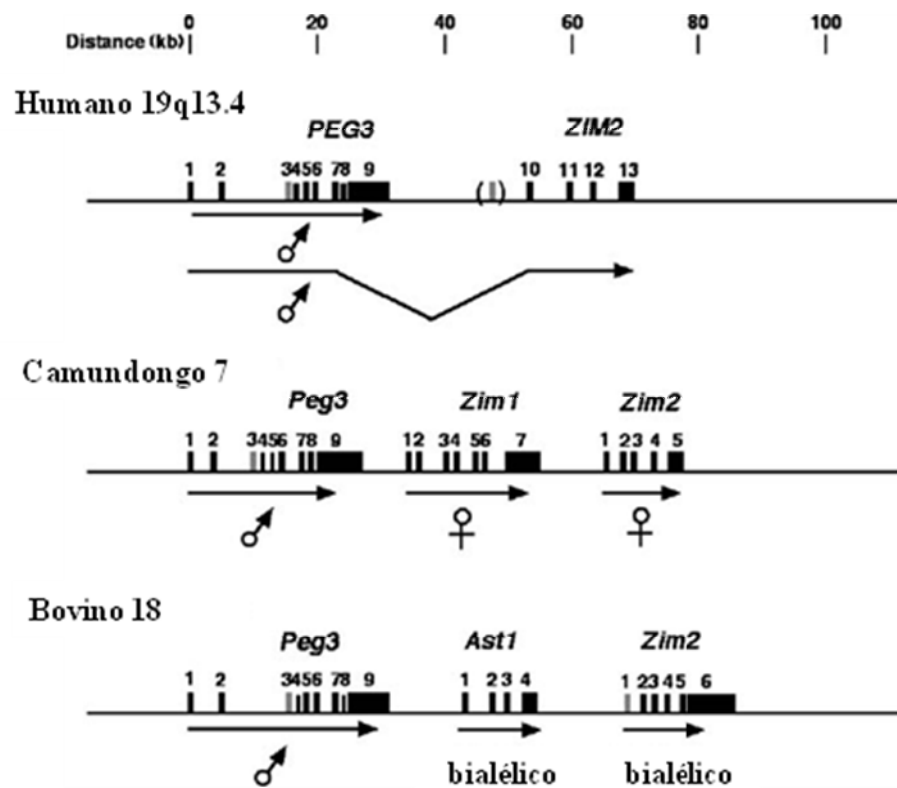


Figura 1.2. Figura adaptada de Kim et al (2004). Comparação do intervalo *Peg3*–*Zim2* de humanos, camundongos e bovinos. Os éxons estão representados nos retângulos pretos. Os retângulos em cinzas são os domínios ricos em leucina. A direção de transcrição de cada gene está indicada pelas setas. O status de *imprinting* está indicado pelos símbolos: ♀= maternalmente expresso; ♂= paternalmente expresso.

A hipermetilação do *PEG3* encontrada em linhagens de células de gliomas em humanos indica que o *PEG3* deve funcionar como um gene supressor de tumor (MAEGAWA et al., 2001). A proteína Peg3 parece estar envolvida na via de sinalização de TNF (*Tumor*

*necrosis factor*), interagindo com o Fator 2 Associado a receptor TNF (MAEGAWA et al., 2001). Também está envolvida no controle do ciclo celular, e tem um papel fundamental na via de morte celular mediada por *p53*. A expressão do *Peg3* é induzida por danos isquêmicos (YAMAGUCHI et al., 2002) e acredita-se que *Peg3* acelera a morte neural através da translocação de proteínas Bax do citoplasma para a mitocôndria (CURLEY et al., 2004).

### **1.3.1. Efeitos da mutação do *Peg3* no comportamento materno**

Os filhotes de roedores são quase que completamente surdos, cegos, imóveis e são incapazes de manter a temperatura corporal ao nascimento, e, portanto, sua sobrevivência depende muito dos cuidados da mãe. Filhotes mutantes de camundongo são menos competentes em mamar do que filhotes normais, eles tardam em desenvolver seu sistema de auto-termorregulação, e também têm peso ao nascer reduzido e desmame atrasado (SHI, 2005). Curley et al. (2004), através do cruzamento de machos homozigotos mutantes com fêmeas normais comprovaram estes efeitos. A ninhada mutante tinha o mesmo número de filhotes da ninhada controle, embora o número de filhotes que sobreviveram ao primeiro dia após o parto tenha sido menor. O peso médio do filhote na ninhada mutante foi menor do que na ninhada controle, e o tamanho da placenta também foi reduzido. As mães de filhotes mutantes ganharam menos peso na última semana de gestação, o que indica uma falha nos sinais placentários que fazem a mãe aumentar as reservas de energia. Os filhotes mutantes ganharam menos peso aos 28 dias de idade do que os controles, embora todos tenham sido amamentados por fêmeas normais. Após o desmame, também tiveram o início da puberdade

atrasado, com fêmeas mutantes entrando na puberdade por volta dos 60 dias de idade, sendo o normal 40 dias.

Ainda nos experimentos de Curley et al. (2004), foi feito o cruzamento de fêmeas mutantes com machos normais, resultando em todos os filhotes normais. A mãe portadora de uma mutação no alelo paterno do gene *Peg3* teve dificuldades em cuidar adequadamente de sua cria, e freqüentemente falhou em suas principais atividades, como a placentofagia, construção de ninhos, alimentação, e a manutenção da temperatura corporal dos filhotes pelo ato de agachar por cima deles. Uma redução significativa do peso dos filhotes foi observada, sendo essa diferença independente do tamanho da ninhada. As mães mutantes também falharam em responder aos sinais endócrinos da placenta, e não aumentaram a ingestão de alimentos. Também tiveram a ejeção de leite prejudicada pela redução do número de neurônios produtores de oxitocina no hipotálamo (SHI, 2005). Conseqüentemente, seus filhotes perderam peso no primeiro dia após o nascimento enquanto filhotes de mães normais ganharam peso, e também tiveram um início atrasado da puberdade (CURLEY et al., 2004).

Independentemente se a mutação estava presente na mãe ou nos filhotes, os efeitos foram similares. Em ambos os casos, a mutação foi responsável por retardo no crescimento tanto pré quanto pós-natal dos filhotes, resultando em um atraso no desenvolvimento que acompanhou o filhote até no período pós-desmame, além de um aumento na taxa de mortalidade. Quando apenas a mãe possuía mutação no alelo paterno do *Peg3*, a taxa de mortalidade de sua cria foi de 28%, quando a mãe era normal e a cria era mutante, a mortalidade passava a ser de 32%, e quando mãe e cria eram ambas mutantes, essa taxa de mortalidade chegou a 94% (CURLEY et al., 2004).

Os efeitos fenotípicos da mutação do *Peg3* em indivíduos adultos são devidos às disfunções hipotalâmicas, provavelmente como conseqüência de uma falha da resposta do hipotálamo aos sinais dos hormônios placentários e ao contato visual e olfativo com a cria,

que são responsáveis por dar início às atividades maternas. As disfunções hipotalâmicas nos filhotes são responsáveis pelo atraso no início da termogênese, e os efeitos que retardam o desenvolvimento tanto pré-natal como pós-natal são provavelmente secundários a ação do *Peg3* na placenta. A cria mutante tem uma redução de até 25% no tamanho da placenta, o que interfere na transferência dos nutrientes maternos para o feto. (CURLEY et al., 2004).

Outros efeitos da mutação do *Peg3* também foram apresentados por Curley et al. (2005), que identificaram o *Peg3* como um gene candidato para a regulação de certos aspectos metabólicos em camundongos, como por exemplo, a taxa de gordura corpórea, ingestão de alimentos, temperatura corpórea e consumo de oxigênio.

Apesar das demonstrações do efeito de *Peg3* em diversos processos, pouco se sabe sobre a função desse gene em bovinos. Para esclarecer melhor aspectos moleculares desse gene em bovinos, como os padrões de *imprinting* tecido específicos, os padrões de metilação do DNA em diversos tecidos (principalmente o tecido cerebral) devem ser desvendados. O estabelecimento dos epigenótipos cerebrais de *Peg3* em espécies como bovinos poderá auxiliar em estudos futuros dos padrões de comportamento desses animais.



## ***2. Objetivos***

Este trabalho teve como objetivo verificar os padrões de metilação da região diferencialmente metilada do gene *Peg3* (Peg3DMR) em diferentes regiões do cérebro de bovinos da raça Nelore.

### ***3. Material e Métodos***

### 3.1. Amostras

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes do abatedouro-escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), localizada em Pirassununga - SP. A amostra total foi composta por fragmentos de tecido cerebral de 8 animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), sendo 4 machos e 4 fêmeas de aproximadamente 2 e 8 anos de idade, respectivamente.

Foram retiradas amostras das seguintes regiões cerebrais: hipotálamo, hipocampo, córtex occipital, córtex parietal, córtex frontal e córtex temporal. As amostras foram coletadas em tubos de microcentrífuga estéreis (*Eppendorf*) e estocadas a -80°C até a utilização das mesmas. Os cortes foram feitos segundo orientação da Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP de Araçatuba (Figuras 3.1 e 3.2).

Amostras controles de espermatozóides foram provenientes de paletas de sêmen obtidas junto ao Laboratório de Manipulação *in vitro* de Embriões do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. De acordo com o padrão de hipometilação da DMR do gene *Peg3* (MAGALHÃES et al., 2007) e de hipermetilação do gene *H19* (RIOS, 2007) em espermatozóides, amostras de DNA extraídas de sêmen foram usadas como controle para a reação da modificação do DNA por bissulfito (para o gene *Peg3*), onde a conversão total das citosinas foi verificada através da ausência de digestão, assim como para a reação de digestão pela enzima *BstUI* (para o gene *H19*), onde digestão foi completa.

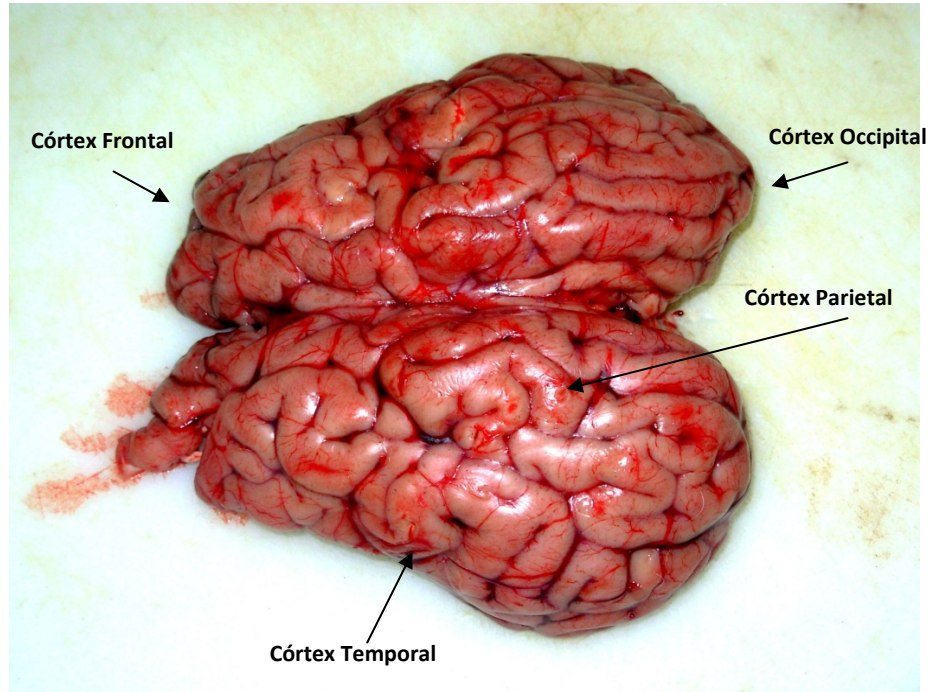


Figura 3.1. Encéfalo do animal 3, antes dos cortes. As setas indicam a localização dos cortes das amostras de córtex frontal, occipital, parietal e temporal.

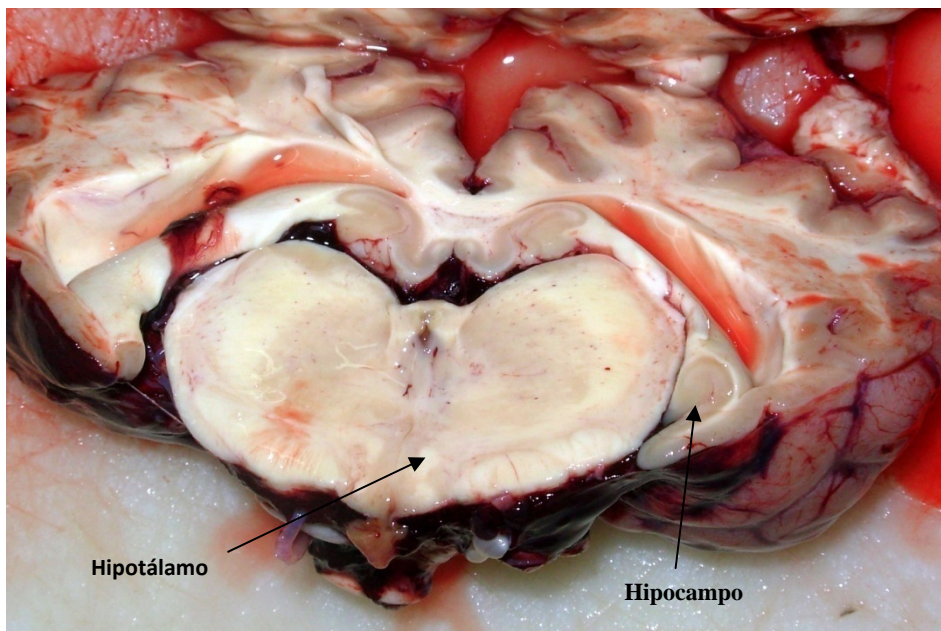


Figura 3.2. Indicação (setas) das regiões do hipotálamo e hipocampo

### 3.2. Extração de DNA Genômico

A extração de DNA genômico das amostras de tecido cerebral e de espermatozoides foi realizada segundo protocolo de Oleurup e Zetterquist (1992) modificado. As amostras foram colocadas em um tubo de microcentrifuga (1,5ml), após serem maceradas em nitrogênio líquido e diluídas em solução PBS. Foi colocado 1ml da amostra, adicionando-se mais 450 $\mu$ l de tampão de lise (0,32M de sucrose; 12mM tris HCl pH 7.5; 5,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 1% Triton 100X) e centrifugado por 20 segundos a 13000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado mais 1ml de solução de lise. O conteúdo do tubo foi homogeneizado utilizando-se micropipetador e centrifugado a 13000 RPM por mais 20 segundos sendo o sobrenadante descartado novamente. Esse procedimento foi repetido cerca de 8 vezes até a obtenção de um *pellet* branco. Após a lise, o tubo com o *pellet* foi vertido para secar o material. Ao *pellet* limpo e seco foram adicionados 380 $\mu$ l de tampão de proteinase K (0,375M de NaCl; 0,12M EDTA; 280 $\mu$ l de água milli-Q; 10 $\mu$ l de SDS 20%; 8 $\mu$ l de proteinase K 25mg/ml) e a mistura homogeneizada usando um micropipetador. O conteúdo do tubo foi aquecido a 55°C *overnight*. Após a digestão com proteinase K os tubos foram colocados na geladeira por  $\pm$  15 minutos para evitar um posterior choque térmico com a adição de NaCl (5M). Posteriormente ao resfriamento foram adicionados a cada tubo 120 $\mu$ l de NaCl (5M) agitando a mistura no vortéx por 8 segundos. Após a passagem pelo vortéx o material foi centrifugado a 13000 RPM para precipitação da proteína desnaturada. 400 $\mu$ l do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de microcentrifuga (1,5ml) e adicionados mais 1ml de etanol absoluto sendo o conteúdo homogeneizado por inversão de 2 a 3 vezes. Os tubos foram colocados em um freezer a -85°C por 20 minutos. Após o

resfriamento a  $-85^{\circ}\text{C}$  o material foi centrifugado a 15000 RPM em uma centrífuga refrigerada ( $0^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante foi descartado após a centrifugação. Foram adicionados 1ml de etanol 70% (gelado) ao material e a mistura foi centrifugada a 14000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado após a centrifugação e o material foi seco em equipamento *Speed Vacum (Eppendorf)* por 15 minutos a  $45^{\circ}\text{C}$ . Foram acrescentados  $30\mu\text{l}$  de água milli-Q e os conteúdos dos tubos foram agitados com um micropipetador. Para a diluição do DNA a solução foi aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora em banho-maria. O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro para análise da concentração e pureza de cada amostra.

### 3.3. Caracterização da Peg3DMR e construção dos *primers*

A identificação da Peg3DMR e a construção dos *primers sense* (5' GTGTGGGGGTATTAGAGTTTG 3') e *antisense* (5' CCCCTACCCAAAATAATCAAC 3') utilizados para a amplificação do DNA modificado por bissulfato de sódio foram realizadas a partir da seqüência do *Peg3* bovino depositada no Genbank (Acesso nº NM001002887.1), utilizando o programa MethPrimer (LI; DAHIYA, 2002).

Para amplificação dos fragmentos do gene *H19* em amostras de espermatozóide, utilizados como controle da digestão pela enzima *Bst*UI, foram utilizados os *primers* descritos anteriormente por Rios (2007).

### **3.4. Análise de metilação do DNA pelo ensaio COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Assay*)**

Para análise do padrão de metilação foi utilizado o ensaio COBRA (XIONG; LAIRD, 1997). Nesta técnica, o bissulfito de sódio é utilizado para converter as citosinas não metiladas em uracila, enquanto as citosinas metiladas são protegidas da conversão. Então, o DNA modificado é amplificado por PCR, e os fragmentos gerados são clivados com a enzima *Bst*UI (New England, Biolabs), que reconhece o sítio CGCG. A combinação do tratamento com bissulfito com a PCR resulta na transformação dos resíduos de citosinas não metiladas em timina, e dos resíduos de metil-citosinas em citosinas. Portanto, a digestão ocorrerá apenas no alelo metilado, que é protegido da conversão do bissulfito de sódio e tem conservado o sítio de clivagem da *Bst*UI. Para cada amostra analisada neste trabalho, foram repetidos os ensaios de COBRA de três a quatro vezes, em DNA modificado em reações diferentes.

#### **3.4.1 Reação de modificação do DNA por bissulfito de sódio**

A modificação do DNA genômico por bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) foi realizada segundo o protocolo descrito por Clark et al. (1994). Cada reação de modificação de DNA foi realizada a partir de 1 $\mu\text{g}$  de DNA genômico, o qual foi desnaturado adicionando-se 8 $\mu\text{l}$  de NaOH (3M) incubando-se cada amostra por 15 minutos a 37°C seguidos por 5 minutos a 94°C. Após a desnaturação cada amostra foi mantida em gelo para evitar a renaturação das fitas de DNA. A solução contendo os componentes da reação de modificação de DNA por bissulfito de sódio



(solução C) foi preparada a partir de 7,5ml de solução A (4,05 g de bissulfito de sódio; 7,5ml água Milli-Q estéril), 500µl de solução B (0,055g de hidroquinona; 12,5ml de água Milli-Q estéril) e 300µl de NaOH (10M). Para cada tubo contendo amostras de 1µg de DNA genômico desnaturado foi acrescentado 1ml de solução C, sendo cada amostra coberta com 100µl de óleo mineral estéril. Cada tubo foi incubado por 4 horas a 55-56°C em banho-maria protegido da incidência de luz, para catálise da reação de modificação por bissulfito de sódio.

Após o término do período de incubação, cada amostra foi purificada utilizando-se o kit DNA Clean-Up (Promega) para remoção de resíduos decorrentes da modificação por bissulfito de sódio. O DNA recuperado após esta fase foi ressuscitado em 50µl de H<sub>2</sub>O *Milli-Q* estéril e novamente desnaturado com adição de 5µl de NaOH (3M) e incubado por 15 minutos a 37°C em banho-maria. O DNA de cada amostra foi então precipitado com adição de 5,5µl de acetato de sódio (3M) e subsequente adição de 100µl de etanol absoluto gelado. Cada amostra foi deixada em repouso a -20°C *overnight*.

Após esse período cada amostra foi centrifugada a 13000 RPM por 20 minutos, sendo seu sobrenadante descartado subsequentemente. O *pellet* formado foi lavado com etanol (70%) gelado e centrifugado a 13000 RPM por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e cada *pellet* foi seco em um *Speed Vacuum (Eppendorf)* por 15 minutos a 45°C. Cada amostra foi ressuscitada em 30 µl de H<sub>2</sub>O *Milli-Q* estéril e utilizado de 2-3µl para cada PCR.

### **3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As condições para as PCRs dos dois genes *Peg3* e *H19* foram as mesmas, e as reações foram realizadas concomitantemente. As reações de PCR foram realizadas em um volume

final de 25µl, contendo 1 a 2µl de DNA modificado de cada amostra; 150mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl; dNTPs (100µM cada); *primers* (0,05mM cada); 25mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems). A ciclagem para cada reação constituiu-se de 95°C por 10 minutos; 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos (num total de 50 ciclos), 72°C por 10 minutos, e finalizando com 10°C contínuos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida 10% e corados com solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) 0,2%.

### **3.4.3. Digestão dos fragmentos gerados por PCR com a enzima *Bst*UI**

Para cada fragmento amplificado foi realizada digestão com a enzima *Bst*UI (New England, BioLabs). Cada reação foi realizada em um volume final de 25µl; utilizando-se 5U de *Bst*UI; 2,5µl de Tampão 2 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH 7,9). A reação foi incubada a 60°C por 16 horas em um termociclador e o produto da digestão foi analisado em gel de poliacrilamida 10%.

## ***4. Resultados e Discussão***

#### 4.1. Caracterização da região da Peg3DMR estudada

As ilhas CpG presentes na seqüência estudada do gene *Peg3* bovino, identificadas pelo programa MethPrimer (LI; DAHIYA, 2002), são mostradas na figura 4.1.

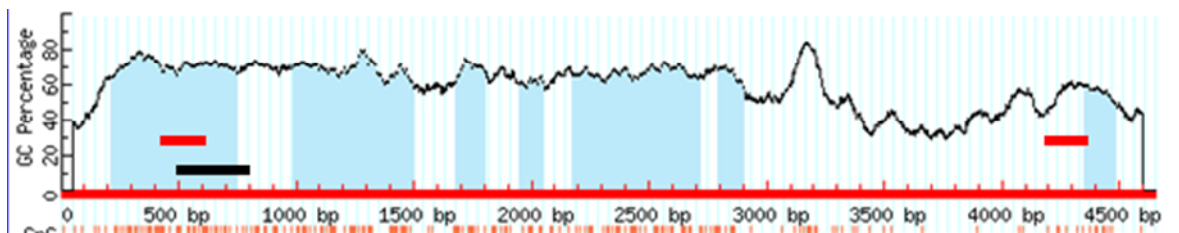


Figura 4.1. Localização das ilhas CpG da região promotora do gene *Peg3*. Em azul, as ilhas CpG. O retângulo preto representa a região amplificada. Os retângulos vermelhos são os éxons 1 e 2.

A região genômica utilizada para análise de metilação neste estudo foi localizada em uma ilha CpG que compreende parte do éxon 1 e parte do íntron 1 do gene *Peg3*, que está presente no cromossomo 18 em bovinos. Esta região foi escolhida para análise do padrão de metilação do *Peg3* em bovinos por ser uma região bem conservada entre as espécies já estudadas (murinos, humanos e bovinos) (KIM et al., 2003) e também por ser uma região descrita como diferencialmente metilada nestas três espécies (LI et al., 2000). A hipermetilação desta região têm sido relacionada à ocorrência de tumores (MAEGAWA et al., 2001), enquanto a ocorrência de hipometilação tem sido observada em clones bovinos abortados (LIU et al., 2008).

Foi pesquisada a ocorrência de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) na região estudada. A ocorrência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) na região promotora do gene *Peg3* poderia alterar o *status* de metilação entre os indivíduos portadores destes polimorfismos. A influência de SNPs que

alteram sítios CpGs na expressão alélica do gene *ATP10A* foi observada por Hogart, Patzel e LaSalle (2008) em córtex cerebral humano, sendo que indivíduos com uma frequência maior destes SNPs em regiões promotoras apresentaram expressão monoalélica, embora a frequência total de SNPs tenha sido relativamente igual tanto para as amostras com expressão bialélica quanto monoalélica. Cerca de 30 SNPs descritos para o gene *Peg3* foram encontrados, sendo que alguns deles alteram sítios CpG. Entretanto, até o presente momento, nenhum polimorfismo foi relatado para a seqüência utilizada neste estudo, segundo resultado de análises no banco de dados do NCBI (BLAST, 2008).

#### **4.2. Construção dos *primers***

Os *primers* utilizados para amplificação da Peg3DMR neste trabalho foram construídos com a ajuda do programa *Methprimer* (LI; DAHIYA, 2002). A temperatura ótima de pareamento do *primer* estabelecida foi de 58 °C, para garantir uma amplificação igual entre os dois alelos e uma maior confiabilidade dos resultados. Após a modificação por bissulfito, o DNA metilado tem uma concentração maior de CG em sua seqüência do que o DNA não metilado, o que facilitaria a formação de estruturas secundárias e reduziria a eficiência de amplificação. Assim, o alelo não-metilado seria amplificado com maior eficiência em relação ao alelo metilado, e os resultados poderiam ser “mascarados”. Segundo Shen et al. (2007), temperaturas de pareamento mais altas (cerca de 55 a 60 °C) seriam capazes de desestabilizar essas estruturas secundárias, garantindo que os dois alelos sejam igualmente amplificados.

### 4.3. Resultados do ensaio COBRA

A amplificação do DNA modificado por bissulfito de sódio por PCR resultou em fragmentos de 296 pares de bases (pb), contendo dois sítios de restrição para a enzima *Bst*UI. A digestão deste fragmento pela enzima *Bst*UI produziu três fragmentos, de 181, 88 e 27 pb cada (Figura 4.2).



Figura 4.2. Região amplificada por PCR. Em vermelho, as seqüências dos *primers* utilizados. Em azul, a localização dos sítios de restrição para a enzima *Bst*UI.

A modificação do DNA por bissulfito converteu as citosinas (C) não metiladas em uracilas, e então, após a amplificação, as citosinas foram substituídas por timinas (T) nas seqüências amplificadas. Essa modificação na seqüência mudou os sítios de restrição de CGCG para TGTG, impedindo a digestão. Assim, três tipos diferentes de resultados foram possíveis de serem encontrados. Para amostras hipometiladas (HIPO), era esperada a presença de apenas um fragmento de 296 pb, que indicaria ausência total de digestão. No caso das amostras hipermetiladas (HIPER), a metilação protegeu as citosinas da conversão pelo bissulfito, e os sítios de restrição foram conservados. Ocorreu, então, a digestão total dos fragmentos (foram observadas duas bandas, de 181 e 88 pb, não sendo possível visualizar a

banda de 27 pb nos géis de poliacrilamida). Um terceiro resultado, intermediário aos outros dois, seria observado quando na presença de um alelo metilado e outro não metilado, e a amostra seria considerada diferencialmente metilada (DM). Um gel de poliacrilamida com exemplos destes resultados está representado na figura 4.3. As amostras de 1 a 5, 7 e ESP são hipometiladas, a amostras 6 e controle se encontra hipermetilada, e a amostra 8 diferencialmente metilada.

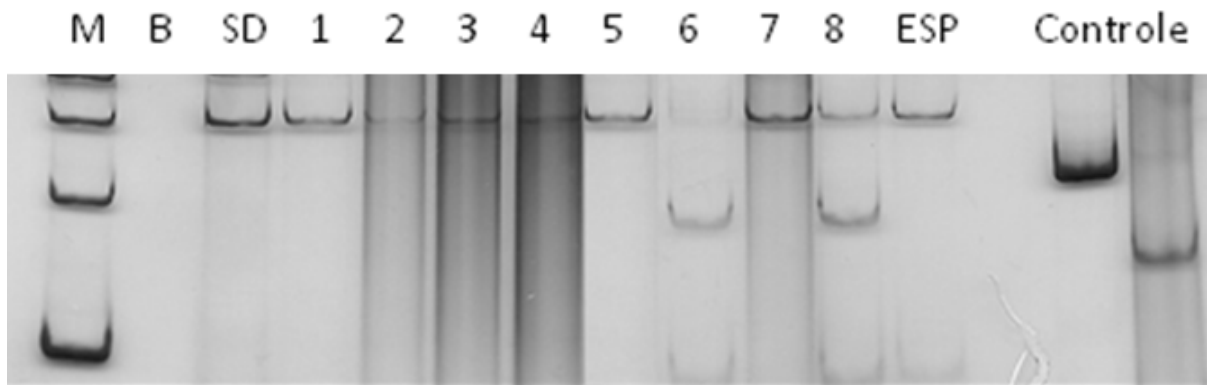


Figura 4.3. Gel de poliacrilamida com os resultados das análises das amostras de hipocampo. Onde M é o marcador molecular; B é o branco da digestão; SD é o fragmento sem digestão; os números correspondem aos números de identificação das amostras; ESP é o espermatóide (controle para a reação de modificação por bissulfito); Controle é a digestão de amplificação do gene *H19* em amostra de espermatóide, que é hipermetilada e foi utilizada como controle da digestão.

Nos resultados encontrados foram identificadas variações nos padrões de metilação da Peg3DMR estudada, tanto entre indivíduos, quanto entre as várias regiões cerebrais de um mesmo animal. Esses resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 4. 1 – Resultados das análises de metilação das diferentes regiões cerebrais pelo ensaio COBRA.

Amostras	Sexo	Idade (anos)	Córtex Frontal	Córtex Occipital	Córtex Parietal	Córtex Temporal	Hipocampo	Hipotálamo
1	M	2	Dm	Hipo	Dm	Hipo	Hipo	Hipo
2	M	2	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo
3	M	2	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo
4	M	2	Dm	Hipo	Dm	Dm	Hipo	Hipo
5	F	8	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo
6	F	8	Hiper	Hiper	Hiper	Hiper	Hiper	Hiper
7	F	8	Hipo	Dm	Hipo	Hipo	Hipo	Hipo
8	F	8	Dm	Dm	Dm	Dm	Dm	Dm

Onde: M = sexo masculino; F= sexo feminino; Hipo= amostra hipometilada; Hiper = amostra hipermetilada; Dm = amostra diferencialmente metilada.

Nos resultados obtidos nesse trabalho foram identificados animais com perfis epigenéticos distintos na Peg3DMR avaliada. Dos oito animais estudados, cinco apresentaram uma uniformidade nos resultados para as diferentes regiões estudadas, sendo três perfis de hipometilação (animais 2, 3 e 5), um perfil hipermetilado (animal 6) e um perfil diferencialmente metilado (animal 8). Os outros três animais apresentaram perfis com predominância de hipometilação (animais 1, 4 e 7), mas com algumas amostras (todas em regiões de córtex) tendendo para metilação diferencial. Essas amostras foram consideradas como diferencialmente metiladas, embora as bandas de digestão presentes apresentassem diferentes intensidades quando coradas com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ).

#### 4.4. Diferenças entre as regiões de um mesmo indivíduo

Apesar de diferencialmente metilada em amostras de sangue periférico em um estudo anterior do mesmo laboratório (MAGALHÃES et al., 2007), a Peg3DMR bovina apresentou



um padrão predominante de hipometilação no cérebro de bovinos. No entanto, entre os oito animais estudados, três apresentaram variação nos padrões de metilação entre as amostras de regiões de córtex cerebral. Algumas hipóteses que poderiam explicar essas variações foram consideradas.

Na primeira dessas hipóteses, foi considerada a possibilidade de falhas nas técnicas utilizadas, sendo que uma conversão parcial das citosinas não metiladas poderia justificar um resultado falso-positivo para a digestão. O ensaio COBRA foi repetido de 3 a 4 vezes para cada amostra, afim de garantir uma maior confiabilidade dos resultados. Ainda, como controle da eficiência de modificação do DNA pelo bissulfito de sódio, foram feitas modificações de amostras de espermatozóide juntamente com as amostras de tecido cerebral. Em espermatozoides bovinos, a Peg3DMR possui um padrão de hipometilação, sendo estas células utilizadas para confirmar a modificação total das citosinas não metiladas (MAGALHÃES et al, 2007).

Devido ao sucesso da modificação de citosinas nas amostras controles de espermatozóide e das várias repetições que confirmaram os resultados, consideramos menos provável a possibilidade do aparecimento das bandas de digestão devido à conversão parcial do DNA pelo bissulfito de sódio.

Uma segunda hipótese considerada foi a possibilidade de que as diferenças encontradas nestes casos tenham sido consequência de contaminação das amostras por células sanguíneas. Em um trabalho anterior, foi constatado que o sangue periférico em bovinos apresentou padrão diferencialmente metilado (MAGALHÃES et al., 2007), e a presença de células sanguíneas nas amostras explicaria a presença de metilação identificada através das bandas de digestão. As amostras que apresentaram diferenças eram de regiões do córtex, e muitos vasos sanguíneos estão presentes nestas regiões (Figura 4.4). Outro fato considerável é que os animais receberam golpes de marreta na região frontal, no momento do abate, e alguns

encéfalos apresentavam regiões escurecidas, possivelmente hematomas, no momento da coleta (Figura 4.4). Outra possibilidade é a contaminação das amostras por outros tipos celulares do próprio cérebro do indivíduo. O córtex cerebral é mais heterogêneo em sua composição celular, se comparado com outras estruturas no cérebro (KHAITOVICH et al., 2004), e existem relatos na literatura de *imprinting* célula-específico em tecido cerebral, como no caso do gene *Ube3a*, que tem expressão monoalélica em neurônios, mas bialélica em células da glia (DAVIES; ISLES; WILKINSON, 2004).

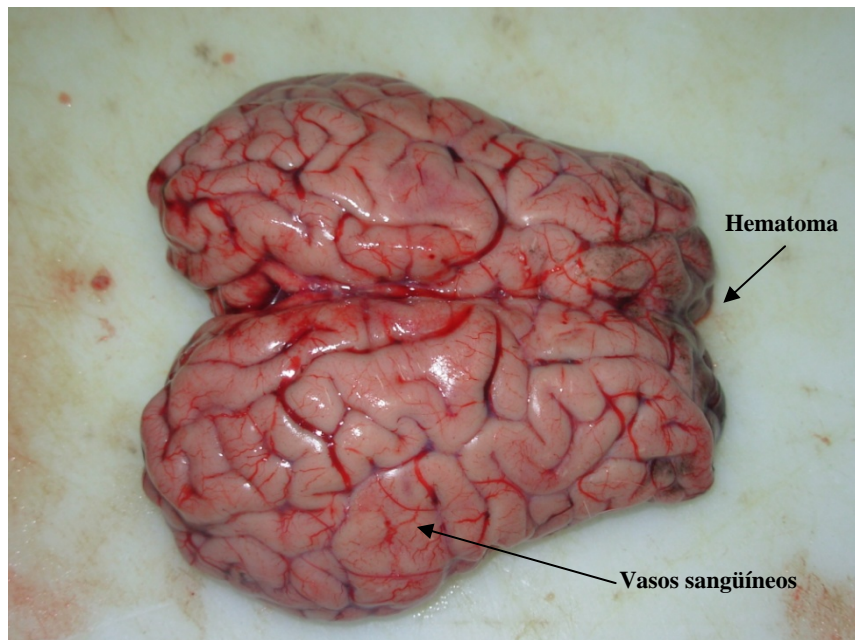


Figura 4.4. Encéfalo do animal 4, antes dos cortes.

Em uma terceira hipótese, poderia ser considerada a possibilidade de que estas diferenças encontradas sejam verdadeiras. Existem alguns trabalhos na literatura ressaltando diferenças de expressão entre diferentes tecidos, principalmente em humanos e camundongos.

Khaitovich et al. (2004), comparando os níveis de expressão entre regiões de córtex cerebral (córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior, córtex visual primário e área de Broca), cerebelo e núcleo caudado em humanos e chimpanzés, verificaram que o

cerebelo foi a região que apresentou níveis mais diferenciados de expressão (1400 e 1200 genes em humanos e chimpanzés, respectivamente), em comparação com as outras regiões. O núcleo caudado também diferiu significativamente das demais amostras, enquanto que entre as várias regiões de córtex a diferença foi mínima. Dos dez mil genes estudados, apenas 193 e 227 genes em humanos e chimpanzés, respectivamente, apresentaram alguma diferença de expressão entre o córtex visual primário e o córtex cingulado anterior. Entre as outras regiões de córtex, as diferenças encontradas foram muito pequenas.

Roth et al (2006), analisando a relação entre perfis de expressão de vários genes entre 20 regiões diferentes do sistema nervoso central humano, além de 65 tecidos não nervosos, verificaram no dendograma uma semelhança maior de resultados entre as amostras de tecido cerebral, quando comparado com outros tecidos. Quando a comparação foi feita considerando apenas as regiões cerebrais, o cerebelo apresentou o perfil mais distinto e não se agrupou com nenhuma das outras 19 amostras. Um agrupamento ocorreu para cinco regiões de córtex (córtex cerebral, lobo frontal, lobo occipital, lobo parietal e lobo temporal) e outro para putâmen e acumbens, que são componentes do gânglio basal. Resultados semelhantes também foram encontrados em outros estudos (LEIN et al., 2007; LETWIN et al., 2006; SANDBERG et al., 2000), comparando perfis de expressão gênica em amostras de tecidos cerebrais de camundongos em diferentes linhagens. O cerebelo também foi identificado com tendo o padrão de expressão mais diferenciado entre as regiões analisadas, e a análise do dendograma resultante também revelou o agrupamento das várias regiões corticais estudadas, como verificado em humanos por Roth et al (2006).

Estes estudos indicam que há diferenças nos perfis de expressão gênica em diferentes regiões do cérebro, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre regiões do córtex. Entretanto, nenhum destes estudos relacionou o perfil de expressão com

variações no *status* de *imprinting* dos genes analisados, e também não especificaram se o gene *Peg3* estava incluído nestas análises.

Recentemente têm surgido relatos na literatura de diferenças de metilação entre diferentes regiões do cérebro humano. Nos experimentos de Ladd-Acosta et al. (2007), amostras de cérebro humano apresentaram diferenças de metilação entre as regiões estudadas (córtex cerebral, cerebelo e ponte), tendo sido estudados cerca de 1500 ilhas CpG, representando 807 genes. Os padrões de metilação tiveram uma correlação melhor entre amostras da mesma região de vários indivíduos, do que entre as três regiões em um mesmo indivíduo. Ainda neste mesmo estudo, foi confirmada a relação do *status* de metilação com o de expressão dos genes estudados, sendo que em casos onde a região metilada estudada estava dentro de regiões promotoras, a metilação inibiu a expressão, e o contrário ocorreu quando as regiões metiladas estavam fora da região promotora dos genes.

Existem também exemplos de genes que tem *status* de *imprinting* variando entre tecidos e entre regiões do cérebro. O gene *Ube3a* é materno expresso em populações específicas de células neuronais do bulbo olfatório, do hipocampo e cerebelo, mas é expresso bialelicamente em todas as outras estruturas cerebrais e também em todos os outros tecidos do indivíduo (WILKINSON; DAVIES; ISLES, 2007).

Muitos estudos têm sido publicados relatando perfis de expressão e metilação do gene *Peg3* (KUROIWA et al., 1996; LI et al., 1999, 2000; MURPHY et al., 2001) em cérebro de diferentes espécies, no entanto, nenhum estudo foi feito de maneira setorial em cérebros bovinos.

#### 4.5. Diferenças entre indivíduos

Dois dos oito animais apresentaram diferenças nos padrões de *imprinting* para todas as regiões analisadas, com padrões claros de hipermetilação e metilação diferencial no cérebro.

A variabilidade nos padrões de *imprinting* em nível populacional tem sido descrita na literatura como sendo um fenômeno estatisticamente significativo (JIRTLE; SANDER; BARRETT, 2000). O *imprinting* polimórfico tem sido descrito para genes como *IGF2* (GIANNOUKAKIS et al., 1996), onde cerca de 10% dos indivíduos investigados mostraram expressão monoalélica, e o restante apresentou expressão bialélica em amostras de sangue periférico. Expressão bialélica também foi encontrada em estudos com o gene *IGF2R* em placentas e tecidos fetais humanos (XU et al., 1993). Tecidos placentários humanos apresentaram expressão bialélica deste gene, enquanto que em dez amostras de tecidos fetais, duas amostras apresentaram expressão apenas do alelo materno. Neste mesmo estudo, em um dos casos, a expressão do alelo paterno se mostrou fraca, sugerindo uma repressão parcial deste alelo (XU et al., 1993).

O polimorfismo dos padrões de *imprinting* parece ocorrer também em tecidos cerebrais. Como mostrado em alguns trabalhos recentes, os níveis de expressão gênica entre as diferentes regiões do córtex cerebral, apresentaram uma variação maior entre indivíduos do que entre as regiões em um mesmo indivíduo. Segundo Khaitovich et al. (2004), estas diferenças podem ser consequência de perfis epigenéticos que diferem entre os indivíduos e interferem na formação do córtex durante o período fetal, ou mesma na vida adulta como uma resposta diferenciada de cada indivíduo ao ambiente.

#### 4.5.1. Diferenças de sexo e idade

Além das diferenças de polimorfismos encontradas em seus resultados, Hogart, Patzel e LaSalle (2008) também encontraram uma associação entre o *status* de expressão alélica e o sexo dos indivíduos. As mulheres tiveram uma tendência maior a exibir expressão monoalélica do que os homens, que apresentaram expressão bialélica na maioria das amostras.

Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, onde uma predominância de hipometilação foi encontrada nas amostras de machos (animais de 1 a 4). Essa hipometilação poderia estar relacionada à expressão bialélica do gene *Peg3*. Maiores variações de metilação do DNA foram encontradas entre as amostras dos animais de 5 a 8, que eram fêmeas e mais idosas. Estas variações de metilação parecem ter a influência dos fatores sexo e idade, embora esses resultados não sejam conclusivos devido ao número reduzido da amostra. Como as amostras são provenientes de animais “machos jovens” e “fêmeas idosas”, não foi possível identificar o grau de influência de cada um dos fatores nos resultados, pois os fatores sexo e idade podem estar confundidos.

Segundo Xiao et al. (2008), a expressão das enzimas metiltransferases DNMT3a e DNMT3b (responsáveis por metilação *de novo*) foi mais elevada em indivíduos mais idosos, enquanto a expressão de DNMT3b foi mais elevada em mulheres e a expressão de DNMT3a foi similar em homens e mulheres. Para a enzima DNMT1 (responsável pela manutenção da metilação), Hammons et al. (1999) não encontraram influências de idade em sua expressão, mas a expressão foi maior em mulheres, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significantes. Casillas et al. (2003), em estudos com fibroblastos de pulmão fetal humano, encontraram resultados semelhantes, e sugeriram que a repressão da expressão

da enzima DNMT1 com a idade pode ser responsável pela demetilação global que ocorre no genoma senescente, enquanto que a hipermetilação de alguns sítios, como observado em alguns casos de câncer, é devida ao aumento da expressão de DNMT3b. Portanto, a expressão mais elevada das enzimas metiltransferases em indivíduos do sexo feminino e em indivíduos mais idosos poderia explicar a maior incidência de metilação nas amostras do sexo feminino encontrada neste trabalho. No entanto, faltam estudos sobre os padrões de expressão das enzimas DNA metiltransferases em bovinos.

Berchtold et al. (2008) também relataram que as mudanças na expressão gênica variam em consequência da idade em humanos, e essa variação ocorre em regiões e períodos diferentes, de acordo com o sexo dos indivíduos. Nos homens, as principais mudanças ocorrem na faixa etária de 60 a 79 anos, e tendem a estabilizar. Em mulheres, as mudanças ocorrem progressivamente a partir de 80 anos. Uma tendência maior para repressão dos genes ocorreu em homens, onde 66% dos genes que tiveram mudanças de expressão sofreram repressão, enquanto que em mulheres a repressão representou 50% das mudanças. Os autores deste trabalho discutem que estas diferenças são determinadas não só pelas diferenças nos níveis de hormônios esteróides, mas também pelas características celulares específicas de cada gênero que são responsáveis pelas respostas variadas a diferentes estímulos.

Rath e Kanungo (1989) verificaram que sítios CpG se tornaram hipermetilados em função da idade, em seqüências repetitivas do DNA de ratos. Em comparação com as seqüências homólogas de camundongos e humanos, a seqüência do *Peg3* bovino contém uma expansão com cerca de 80 cópias de um motivo de 9 aminoácidos, que resulta num transcrito de 11 Kb, enquanto os transcritos de humanos e camundongos têm 9 Kb de comprimento. A seqüência amplificada analisada neste estudo está localizada dentro de uma ilha CpG, e contém seqüências repetitivas passíveis de sofrerem hipermetilação.

Finkielstain et al. (2008) encontraram que genes envolvidos na regulação do crescimento, entre eles *Peg3*, *Igf2* e *Mest*, apresentam expressão reduzida em rim, pulmão, fígado e coração. Neste experimento, foram encontradas evidências de que esta redução de expressão não está relacionada à idade por si só, mas que é devida a um *feedback* negativo do crescimento que leva um desligamento destes genes, limitando o crescimento de órgãos na idade adulta. Também concluíram que a redução na expressão é devida a uma diminuição por célula, e não no número de células que expressam esses genes. O *Peg3* parece estar envolvido na diferenciação dos neurônios da região hipotalâmica durante o desenvolvimento, e no crescimento pré e pós-natal da cria (LI et al., 1999), e pode, portanto, estar envolvido neste tipo de regulação. Como a metilação da *Peg3*DMR está diretamente relacionada ao controle da expressão do gene *Peg3*, a variação de metilação encontrada no presente estudo poderia ser decorrente dessa forma temporal de regulação de alguns genes marcados. Os machos de 2 anos poderiam estar ainda em fase de desenvolvimento, e estariam expressando o *Peg3* em maior quantidade. Já nas fêmeas de aproximadamente 8 anos, o crescimento já se encontraria estabilizado.

#### **4.5.2. Hipermetilação do animal 6**

Um resultado interessante encontrado foi a hipermetilação das regiões estudadas no animal 6. Em estudos com camundongos, a principal característica identificada em fêmeas que perderam a expressão do alelo do gene *Peg3* paterno é a redução de neurônios produtores de oxitocina no hipotálamo, que pode estar relacionada aos defeitos no comportamento materno e na ejeção de leite observadas em camundongos, resultando em um aumento na taxa



de mortalidade da cria (CURLEY et al., 2004; LI et al., 1999). Além disso, a hipermetilação do *Peg3* também tem sido relacionada à ocorrência de tumores, como gliomas (MAEGAWA et al., 2001) e cânceres ginecológicos (ovariano, endometrial e cervical) (DOWDY et al., 2005). Entretanto, não há relatos na literatura de fenótipos semelhantes em bovinos. Devido à falta de conhecimento do histórico deste animal, não foi possível verificar as conseqüências fenotípicas da hipermetilação do *Peg3* no seu cérebro.

#### **4.6. Diferenças estruturais do *Peg3* entre espécies**

Diferenças estruturais ocorridas durante a evolução das três principais espécies estudadas no domínio de *imprinting* do gene *Peg3* podem ser a causa das diferenças de metilação e expressão observadas, não apenas no gene *Peg3*, como também em alguns genes adjacentes, como o *Zim2*, *Zim1* e *Ast1*.

Essas diferenças estruturais encontradas no domínio de *imprinting* do *Peg3*, entre humanos, camundongos e bovinos, poderiam ser responsáveis por alterações nos mecanismos de regulação do *imprinting* do *Peg3* (como os padrões de metilação do DNA), que levariam a uma diferença nos padrões de expressão do *Peg3* nestas espécies (Figura 1.2). Os níveis mais altos de expressão do *Peg3* em humanos foram encontrados em ovários, testículos e placenta, enquanto cérebro, coração, próstata, pâncreas e intestino apresentaram um nível modesto de expressão do gene *PEG3*. A análise de diferentes regiões do cérebro em humanos mostrou que a expressão do *PEG3* foi uniforme por todo o cérebro (KIM et al., 1997).

Em camundongos, a expressão ocorre em níveis mais altos no cérebro, principalmente no hipotálamo, amígdala, bed nucleus, estria terminal e hipocampo (LI et al., 1999). Em bovinos, a expressão principal do *Peg3* também foi detectada no cérebro, e níveis muito baixos em ovário e testículo. Porém, existem poucos estudos em bovinos, sendo que em tecido cerebral, apenas o padrão de *imprinting* do cerebelo foi testado até o presente (KIM et al., 2004).

Apesar das diferenças nos níveis de expressão, foi encontrada expressão monoalélica do *Peg3* em todos os tecidos pesquisados de humanos e camundongos. Murphy et al. (2001), estudando a mesma região promotora homóloga humana à estudada neste trabalho, encontrou que todos os dinucleotídeos CpG nesta região estavam diferencialmente metilados em cérebro, rim, fígado e pâncreas fetais e cérebro adulto.

No presente trabalho, foram encontrados padrões variados de metilação para esta região nos cérebros estudados. No entanto, ainda é incerto que estas diferenças sejam decorrentes das diferenças estruturais do domínio do *imprinting* do *Peg3* entre as espécies.

Comparando genes marcados de bovinos com genes controles, Khatib, Zaitoun e Kim, (2007) encontraram diferenças significativas. Os genes marcados bovinos apresentaram uma quantidade maior de C e G em sua seqüência, em relação aos genes não marcados desta mesma espécie. Em um estudo similar, Hutter, Helms e Paulsen (2006) não encontraram diferenças entre genes marcados e controles em humanos e camundongos. Esta poderia ser mais uma evidência de que os padrões de metilação dos genes marcados, além da expressão, também diferem entre as espécies.

A princípio, ao menos do que é conhecido sobre o fenômeno do *imprinting* genômico, as DMRs de genes marcados em tecido de origem embrionária apresentam padrão diferencial de metilação. No entanto, exceções têm surgido repetitivamente durante os últimos anos. Especialmente em tecido extra-embriônico (placenta), tem sido descrito que vários genes marcados apresentam expressão monoalélica sem a presença de metilação diferencial do DNA. Nesses genes, o mecanismo de regulação da expressão parece ser influenciado apenas por modificações covalentes de histonas (WAGSCHAL; FEIL, 2006). A presença de hipometilação em várias regiões cerebrais estudadas poderia refletir um mecanismo de regulação de *imprinting* independente da metilação do DNA. No entanto, em nenhum dos trabalhos que analisaram o *status* de *imprinting* da Peg3DMR bovina, foram realizados ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP).

Os padrões de metilação inter-individual encontrados entre os animais remetem a hipótese de que a variação de *imprinting* em indivíduos de uma mesma população seja um evento mais comum do que se esperava. Esses resultados deixam em aberto questões importantes, de por que, quando e de que forma essa variação acontece. Poderia ser um processo decorrente de estresse durante o desenvolvimento ou simplesmente uma fonte natural de variabilidade epigenética.

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, abrem-se novas perspectivas de estudos da influência do gene *Peg3* em bovinos. Somadas, as consequências da alteração dos padrões de expressão de *Peg3* e a forte relação da metilação de sua DMR com a regulação desse gene, podem ser indicativos de que a variabilidade encontrada nos resultados apresentados nesse trabalho possa estar relacionada a fenótipos ainda não identificados ou não correlacionados com este processo.

## ***5. Conclusões***

Após realização dos experimentos do presente trabalho conclui-se que:

- Existe heterogeneidade no padrão de metilação da Peg3DMR bovina nas amostras analisadas, com uma predominância de hipometilação.
- Estas diferenças podem ocorrer entre indivíduos em uma mesma região, como também entre diferentes regiões cerebrais de um mesmo indivíduo.
- Entre os machos, mais jovens, houve mais homogeneidade de resultados do que no grupo de fêmeas mais velhas.

## ***6. Referências***

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, p. 84-87, 1991.

BARTOLOMEI, M. S.; ZEMEL, S.; TILGHMAN, S. M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. **Nature**, v. 351, p. 153-155, 1991.

BARTON, S. C.; SURANI, M. A. H.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, v. 311, p. 374-376, 1984.

BERCHTOLD, N. C.; CRIBBS, D. H.; COLEMAN, P. D.; ROGERS, J.; HEAD, E.; KIM, R.; BEACH, T.; MILLER, C.; TRONCOSO, J.; TROJANOWSKI, J. Q.; ZIELKE, H. R.; COTMAN, C. W. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, nº 40, p. 15605-15610, 2008.

BLAST. Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 18 nov. 2008.

BROWN, R. E. Hormônios e comportamento parental. In: PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. **Comportamento materno em mamíferos (Bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos)**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Etologia. Capítulo 5, p. 53-99, 1998.

CASILLAS, M. A.; LOPATINA, N.; ANDREWS, L. G.; TOLLEFSBOL, T. O. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 252, p. 33-43, 2003.

CHOO, J. H.; KIM, J. D.; KIM, J. Imprinting of an evolutionarily conserved antisense transcript gene *APeg3*. **Gene**, v. 409, p. 28-33, 2008.

CLARK S. J., HARRISON J., PAUL C. L. & FROMMER M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res**, v.11, p. 2990-2997, 1994.

CROWELL-DAVIS, S. L.; HOUP, K. A. Maternal behavior. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.2(3), p. 557-571, 1986.

CURLEY, J. P.; BARTON, S.; SURANI, A.; KEVERNE, E. B. Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 271, p. 1303-1309, 2004.

CURLEY, J. P.; PINNOCK, S. B.; DICKSON, S. L.; THRESHER, R.; MIYOSHI, N.; SURANI, M. A.; KEVERNE, E. B. Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene *Peg3*. **The FASEB Journal**. Publicado online em 31 de maio de 2005.

DAVIES, W.; ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. Imprinted gene expression in the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, xx, p. 1-10, 2004.

DeCHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v. 64, p. 849-859, 1991.

DINDOT, S. V.; KENT, K. C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J. A. Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, p. 966-974, 2004.

DOWDY, S. C.; GOSTOUT, B. S.; SHRIDHAR, V.; WU, X.; SMITH, D. I.; PODRATZ, K. C.; JIANG, S. Biallelic methylation and silencing of paternally expressed gene 3 (*PEG3*) in gynecologic cancer cell lines. **Gynecologic Oncology**, v. 99, p. 126-134, 2005.

FINKIELSTAIN, G. P.; FORCINITO, P.; LUI, J. C. K.; BARNES, K. M.; MARINO, R.; MAKAROUN, S.; NGUYEN, V.; LAZARUS, J. E.; NILSSON, O.; BARON, J. An extensive genetic program occurring during postnatal growth in multiple tissues. **Endocrinology**, [Epub. ahead of print] November 26, 2008.

GIANNOUKAKIS, N.; DEAL, C.; PAQUETTE, J.; KUKUVITIS, A.; POLYCHRONAKOS, C. Polymorphic functional imprinting of the human *IGF2* gene among individuals, in blood cells, is associated with *H19* expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, n° 3, p. 1014-1019, 1996.

GLASLOW, E.; RYU, S. L.; YAMASHITA, M.; ZHANG, B. J.; MUTSUGA, N.; GAINER, H. A *Peg3*, a novel paternally expressed gene 3 antisense RNA transcript specifically expressed in vasopressinergic magnocellular neurons in the rat supraoptic nucleus. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v. 137, p. 143-151, 2005.

GODFRAY, H. C. J. Evolutionary theory of parent-offspring conflict. **Nature**, v. 376, p. 133-138, 1995.



HAIG, D. The kinship theory of genomic imprinting. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 31, p. 9-32, 2000.

HAMMONS, G. J.; YAN, Y.; LOPATINA, N. G.; JIN, B.; WISE, C.; BLANN, E. B.; POIRIER, L. A.; KADLUBAR, F. F.; LYN-COOK, B. D. Increased expression of hepatic DNA methyltransferase in smokers. **Cellular Biology and Toxicology**, v. 15, n° 6, p. 389-394, 1999.

HITCHINS, M. P.; MOORE, G. E. Genomic imprinting in fetal growth and development. **Exp. Rev. Mol. Med.** 9 May, <http://www.expertreviews.org/0200457Kh.htm>, 2002.

HOGART, A.; PATZEL, K. A.; LaSALLE, J. M. Gender influences monoallelic expression of *ATP10A* in human brain. **Hum. Genet.**, v. 124, p. 235-242, 2008.

HUTTER, B.; HELMS, V.; PAULSEN, M. Tandem repeats in the CpG islands of imprinted genes. **Genomics**, v. 88, p. 323-332, 2006.

JIRTLE, R. L.; SANDER, M.; BARRETT, J. C. Genomic imprinting and environmental disease susceptibility. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n° 3, p. 271-278, 2000.

KAJII, T.; OHAMA, K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. **Nature**, v. 268, p. 633-634, 1977.

KANEKO-ISHINO, T.; KOHDA, T.; ISHINO, F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. **J. Biochem.**, v. 133, p. 699-711, 2003.

KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; KIM, E. Comparative analysis of sequence characteristics of imprinted genes in human, mouse and cattle. **Mammalian Genome**, v. 18, p. 538-547, 2007.

KEVERNE, E. B.; FUNDELE, R.; NARASIMHA, M.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. **Developmental Brain Research**, v. 92, p. 91-100, 1996.

KHAI TOVICH, P.; MUETZEL, B.; SHE, X.; LACHMANN, M.; HELLMANN, I.; DIETZSCH, J.; STEIGELE, S.; DO, H.; WEISS, G.; ENARD, W.; HEISSIG, F.; ARENDT, T.; NIESELT-STRUWE, K.; EICHLER, E. E.; PÄÄBO, S. Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. **Genome Research**, v. 14, p. 1462-1473, 2004.

KIM, J.; ASHWORTH, L.; BRANSCOMB, E.; STUBBS, L. The human homolog of a mouse-imprinted gene, *Peg3*, maps to a zinc-finger gene-rich region of human chromosome 19q13.4. **Genome Research**, v. 7, p. 532-540, 1997.

KIM, J.; KOLLHOFF, A.; BERGMANN, A.; STUBBS, L. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, *Peg3*. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 233-245, 2003.

KIM, J.; BERGMANN, A.; LUCAS, S.; STONES, R.; STUBBS, L. Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2. **Genomics**, v. 84, p. 47-58, 2004.

KUROIWA, Y.; KANEKO-ISHINO, T.; KAGITANI, F.; KOHDA, T.; LI, L.; TADA, M.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; SHIROISHI, T.; WAKANA, S.; BARTON, S. C.; ISHINO, F.; SURANI, M. A. *Peg3* imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein. **Nature Genetics**, v. 12, p. 186-190, 1996.

LADD-ACOSTA, C.; PEVSNER, J.; SABUNCIYAN, S.; YOLKEN, R. H.; WEBSTER, M. J.; DINKINS, T.; CALLINAN, P. A.; FAN, J.; POTASH, J. B.; FEINBERG, A. P. DNA methylation signatures within the human brain. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 1304-1315, 2007.

LEE, J. T. Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? **Current Biology**, v. 13, p. R242-R254, 2003.

LEIN, E. S.; HAWRYLYCZ, M. J.; AO, N.; AYRES, M.; BENSINGER, A.; BERNARD, A.; BOE, A. F.; BOGUSKI, M. S.; BROCKWAY, K. S.; BYRNES, E. J.; CHEN, L.; CHEN, L.; CHEN, T.; CHIN, M. C.; CHONG, J.; CROOK, B. E.; CZAPLINSKA, A.; DANG, C. N.; DATTA, S.; DEE, N. R.; DESAKI, A. L.; DESTA, T.; DIEP, E.; DOLBEARE, T. A.; DONELAN, M. J.; DONG, H.; DOUGHERTY, J. G.; DUNCAN, B. J.; EBBERT, A. J.; EICHELE, G.; ESTIN, L. K.; FABER, C.; FACER, B. A.; FIELDS, R.; FISCHER, S. R.; FLISS, T. P.; FRENSLEY, C.; GATES, S. N.; GLATTFELDER, K. J.; HALVERSON, K. R.; HART, M. R.; HOHMANN, J. G.; HOWELL, M. P.; JEUNG, D. P.; JOHNSON, R. A.; KARR, P. T.; KAWAL, R.; KIDNEY, J. M.; KNAPIK, R. H.; KUAN, C. L.; LAKE, J. H.; LARAMEE, A. R.; LARSEN, K. D.; LAU, C.; LEMON, T. A.; LIANG, A. J.; LIU, Y.; LUONG, L. T.; MICHAELS, J.; MORGAN, J. J.; MORGAN, R. J.; MORTRUD, M. T.; MOSQUEDA, N. F.; NG, L. L.; NG, R.; ORTA, G. J.; OVERLY, C. C.; PAK, T. H.; PARRY, S. E.; PATHAK, S. D.; PEARSON, O. C.; PUCHALSKI, R. B.; RILEY, Z. L.; ROCKETT, H. R.; ROWLAND, S. A.; ROYALL, J. J.; RUIZ, M. J.; SARNO, N. R.; SCHAFFNIT, K.; SHAPOVALOVA, N. V.; SIVISAY, T.; SLAUGHTERBECK, C. R.; SMITH, S. C.; SMITH, K. A.; SMITH, B. I.; SODT, A. J.; STEWART, N. N.; STUMPF, K.; SUNKIN, S. M.; SUTRAM, M.; TAM, A.; TEEMER, C. D.; THALLER, C.; THOMPSON, C. L.; VARNAM, L. R.; VISEL, A.; WHITLOCK, R. M.; WOHNOUTKA, P. E.; WOLKEY,

C. K.; WONG, V. Y.; WOOD, M.; YAYLAOGLU, M. B.; YOUNG, R. C.; YOUNGSTROM, B. L.; YUAN, X. F.; ZHANG, B.; ZWINGMAN, T. A.; JONES, A. R. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature**, v. 445, p. 168-176, 11 Jan. 2007.

LETWIN, N. E.; KAFKAFI, N.; BENJAMINI, Y.; MAYO, C.; FRANK, B. C.; LUU, T.; LEE, N. H.; ELMER, G. I. Combined application of behavior genetics and microarray analysis to identify regional expression themes and gene-behavior associations. **The Journal of Neuroscience**, v. 26(20), p. 5277-5287, 2006.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, p. 1427-1431, 2002.

LI, L. -L.; KEVERNE, E. B.; APARICIO, S. A.; ISHINO, F.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. **Science**, v. 284, p. 330-333, 1999.

LI, L. -L.; SZETO, I. Y.; CATTANACH, B. M.; ISHINO, F.; SURANI, M. A. Organization and parent-of-origin specific methylation of imprinted *Peg3* gene on mouse proximal chromosome 7. **Genomics**, v. 63, p. 333-340, 2000.

LINDER, D.; POWER, J. Further evidence for post-meiotic origin of teratomas in the human female. **Ann. Human. Genet.**, v. 34, p. 21-30, 1970.

LIU, J., YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.; SUN, Q. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 598-607, 2008.

LUCIFERO, D.; CHAILLET, J. R.; TRASLER, J. M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 1, p. 3-18, 2004.

MAEGAWA, S.; YOSHIOKA, H.; ITABA, N.; KUBOTA, N.; NISHIHARA, S.; SHIRAYOSHI, Y.; NANBA, E.; OSHIMURA, M. Epigenetic silencing of *PEG3* gene expression in human glioma cell lines. **Molecular Carcinogenesis**, v. 31, p. 1-9, 2001.

MAGALHÃES, H. R.; RIOS, A. F. L.; CARDOSO, V. L.; RAMOS, E. S. Caracterização do padrão de metilação do gene *Peg3* em bovinos. In: Congresso Brasileiro de Genética, 53, 2007, Águas de Lindóia. **Anais do congresso**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2007.

MAHER, E. R. Imprinting and assisted reproductive technology. **Human Molecular Genetics**, v. 14, Review issue 1, p. R133-R138, 2005.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v.37, p. 179-183, May 1984.

MONK, M.; BOUBELIK, M.; LEHNERT, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during embryo development. **Development**, v. 99, issue 3, p. 371-382, 1987.

MOORE, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. **Reproduction**, v. 122, p. 185-193, 2001.

MORISON, I. M.; PATON, C. J.; CLEVERLEY, S. D. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. **Nucleic Acids Research**, v. 29(1), p. 275-276, 2001.

MURPHY, S. K.; WYLIE, A. A.; JIRTLE, R. L. Imprinting of *PEG3*, the human homologue of a mouse gene involved in nurturing behavior. **Genomics**, v. 110, p. 110-117, 2001.

NEUMANN, I. D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. **Depression and anxiety**, v. 17, p. 111-121, 2003.

NEWMAN, S. Quantitative- and molecular-genetic effects on animal well-being: adaptive mechanisms. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1641-1653, 1994.

NICHOLLS, R. D. The impact of genomic imprinting for neurobehavioral and developmental disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 413-418, 2000.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1992.

PARANHOS da COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U.; ARDESH, J. H. Diferenças na latência da primeira mamada em quatro raças de bovinos de corte. In: VI Congresso de Zootecnia, 6, 1996, Evora. **Actas do Congresso**. Evora: Associação Portuguesa do Engenheiros Zootecnicos, v. 2, p. 343-348, 1996.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. Relações materno-filiais em bovinos de corte nas primeiras horas após o parto. In: PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. **Comportamento materno em mamíferos (Bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos)**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Etologia. Capítulo 10, p. 215-235, 1998.

RATH, P. C.; KANUNGO, M. S. Methylation of repetitive DNA sequences in the brain during aging of the rat. **FEBS Letters**, v. 244, nº 1, p. 193-198, 1989.

REIK, W.; COLLICK, A.; NORRIS, M. L.; BARTON, S.C.; SURANI, M. A. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. **Nature**, v. 328, p. 248-251, 1987.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 21-32, 2001.

REIK, W.; CONSTANCIA, M.; FOWDEN, A.; ANDERSON, N.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; TYCKO, B.; SIBLEY, C. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. **J. Physiol.**, v. 547.1, p. 35-44, 2003.

RIOS, A. F. L. Caracterização *in silico* e análise epigenética em bovinos produzidos *in vivo* e por transferência nuclear da região homóloga à 11p15.5 envolvida com a síndrome de Beckwith-Wiedemann em humanos. 2007. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

ROTH, R. B.; HEVEZI, P.; LEE, J.; WILLHITE, D.; LECHNER, S. M.; FOSTER, A. C.; ZLOTNIK, A. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. **Neurogenetics**, v. 7, p. 67-80, 2006.

SANDBERG, R.; YASUDA, R.; PANKRATZ, D. G.; CARTER, T. A.; DEL RIO, J. A.; WODICKA, L.; MAYFORD, M.; LOCKHART, D. J.; BARLOW, C. Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, nº 20, p. 11038-11043, 2000.

SANFORD, J. P.; CLARK, H. J.; CHAPMAN, V. M.; ROSSANT, J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. **Genes & Development**, v. 1, p. 1039-1046, 1987.

SAPIENZA, C.; PETERSON, A. C.; ROSSANT, J.; BALLING, R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. **Nature**, v. 328, p. 251-254, 1987.

SAVORY, T. H. The mule. **Scientific American**, v. 223(6), p. 102-109, 1970.

SELMAN, I. E.; McEWAN, A. D.; FISHER, E. W. Studies on natural suckling in cattle during the first eight hours post-partum. II. Behavioural studies (calves). **Animal Behaviour**, v. 18, p. 284-289, 1970.

SHEN, L.; GUO, Y.; CHEN, X.; AHMED, S.; ISSA, J. J. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. **Biotechniques**, v. 42, p. 48-58, 2007.

SHI, W. Growth and Behaviour: Epigenetic and genetic factors involved in hybrid dysgenesis. **Acta Universitatis Upsaliensis**. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala, p. 11-51, 2005.

SLEUTELS, F.; BARLOW, D. P. The origins of genomic imprinting in mammals. **Advances in Genetics**, v. 46, p. 119-163, 2002.

SONG, J.; LU, Y.; GIANG, A.; PANG, S.; CHIU, R. Promoter analysis of the mouse *Peg3* gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1779, p. 134-138, 2008.

SURANI, M. A. H.; BARTON, S. C.; NORRIS, M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, v. 308, p. 548-550, 1984.

SWALES, A. K. E.; SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. **Reproduction**, v.130, p. 389-399, 2005.

VENTORP, M.; MICHANEK, P. Cow-calf behaviour in relation to first suckling. **Research in Veterinary Science**, v. 51, p. 6-10, 1991.

WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 113, p. 90-98, 2006.

WILKINSON, L. S.; DAVIES, W.; ISLES, A. R. Genomic imprinting effects on brain development and function. **Nature Review Neuroscience**, v. 8, p. 832-842, 2007.

XIAO, Y.; WORD, B.; STARLARD-DAVENPORT, A.; HAEFELE, A.; LYN-COOK, B. D.; HAMMONS, G. Age and gender affect DNMT3a and DNMT3b expression in human liver. **Cellular Biology and Toxicology**, v. 24, p. 265-272, 2008.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 12, p. 2532-2534, 1997.

XU, Y.; GOODYER, C. G.; DEAL, C.; POLYCHRONAKOS, C. Functional polymorphism in the parental imprinting of the human *IGF2R* gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 197, n° 2, p. 747-754, 1993.

YAMAGUCHI, A.; TANIGUCHI, M.; HORI, O.; OGAWA, S.; TOJO, N.; MATSUOKA, N.; MIYAKE, S.; KASAI, K.; SUGIMOTO, H.; TAMATANI, M.; YAMASHITA, T.; TOHYAMA, M. Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n 1, p. 623-629, 2002.