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

**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**

Álvaro Fabrício Lopes Rios

Ribeirão Preto – SP

2007

Álvaro Fabrício Lopes Rios

**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**

**Tese de Doutorado
apresentada ao Departamento de
Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto –
USP para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de
Concentração : Genética.**

**Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos
Coorientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões**

**Ribeirão Preto – SP
2007**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rios, Álvaro Fabrício Lopes

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

Ribeirão Preto, 2007.
p. 116: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

1. H19DMR. 2. KvDMR1. Clonagem. 3. *Imprinting* genômico.
4. Desenvolvimento.

Folha de Aprovação

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Genética

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a) Dr (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A minha ignorância *“ainda é”* a minha maior motivação.

Dedico este trabalho à minha futura esposa **Cecília**, aos meus pais
Eliseu e Iracema e a minha irmã **Inara**,
nesse mundo vocês são a razão da minha existência.
Amo Vocês!

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pelas bênçãos que recebi durante todos esses anos, entre elas desfrutar de um ambiente de trabalho e de amigos tão especiais;

A minha “Chefe” (Orientadora), a Profa. Dra. Ester Silveira Ramos pela amizade, orientação e paciência com a minha pessoa durante os últimos seis anos;

A toda a minha família que me ajudou e torceu por mim em todos os momentos, felizes ou não muito agradáveis, da minha vida;

Com especial carinho para as minhas tias Luiza e Irene, por muitas vezes se portarem como minhas mães;

Em especial a um ente querido, que por uma vontade superior não está fisicamente presente neste momento da minha vida (Juraci de Castro - *in memoriam*), sei que o senhor sempre torceu por mim;

A minha coorientadora Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões pelo apoio e incentivo;

Aos irmãos por parte de orientadora: Marquinho (Marcus Vínicius), Jair (Mané), Lisandra, Daniela, Adriane, Ana Karina, Cris, Milena, Jaqueline, Murilo, Karine, Flávia, Paulinha e Francielle;

Aos colegas de Bloco C Artur, João Cláudio, Vanderli, Ana Rosa, Ricardo, Anália, Cíntia, Maurício (limão), Dante, Jéferson, Hélida, Marcelo, Andrea, Kellen, Fernanda, Fernando, Patrícia, Gildo, Alejandro, Silvina, Athos, Ana Carolina, Juliana Cuzzi, Juliana Meola, Luciana, Daniel, Fábio (Indiana) e Reginaldo;

Ao Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo pela oportunidade e confiança na minha pessoa, sem a sua confiança eu provavelmente não estaria aqui hoje;

As Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli, Maria Armênia Ramalho de Freitas, Vera Lúcia Cardoso e Claudia Cristina Paro de Paz pelo apoio e amizade;

A Prof. Dr. Rodolfo Rumpf pela amizade e colaboração no desenvolvimento do presente trabalho;

Aos amigos da moradia de pós-graduação (Casa 12 e Casa G): Luciana, Ricardo (Pancinha) Gláucio, Gláucia, Juliana (Juzinha); Jaqueline, Eduardo, Roberto, Ricardão; Tonhão, Fabrício, Eric (Paraíba), Camilo, Fabiano, Telma, Humberto, Aline, Rose, Val, Matheus, Christiane, Vânia, Carolina, Cristiane, André, Fabio, Viviane, Flávio, Juliana Mazzaro, Márcia Spies, Ana, Márcia, Luciane, Deise, Advailton, Ademar, João Paulo, Lidervan, Joelma, Bereu, Patrícia, Gina, Menininha e a toda a nova geração pela convivência, companherismo e amizade nessa grande família;

Ao João Pedro (J.P.P.) que tem iluminado a vida de todos os seus tios e tias da moradia de pós-graduação há três anos;

A todos os amigos da galera *Power* de Boa Esperança do Sul: Berta, Cruel, João Bernardo, Vinícius (Pê), Tiago, Ricardo (Lulu) e Shirley, Arlindo, Conrado (Zé), Fabrício, Mário Jr. (Nhonho), Duzão, Miriam, Daniel, Anderson, Carlinhos, Reginaldo, Fernanda, Paula, Luciano, André, Tuim, Tio Lú e Tia Marlene, ... e a todos os demais pela amizade durante mais de uma década de convívio;

Ao Prof. Dr. Fernando Luiz De Lucca e aos membros de seu laboratório pela amizade e incentivo;

Aos professores José Braga Neto e Vilcides José Alves Pedro pela amizade e incentivo à minha formação;

Aos Prof. Dr. Michael J. Higgins e Paul D Sadowski por gentilmente cederem às seqüências de DNA dos elementos regulatórios encontrados na KvDMR1 de *Mus musculus*;

Aos técnicos Marli, Reginaldo e Silvio (Silvão) pela amizade e apoio no decorrer desde trabalho;

A Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiato e sua equipe, cuja amizade e apoio foram fundamentais na minha formação;

A equipe do laboratório de informática Luis Bezerra, Paulo e Marco, que sempre estiverem presente para socorrer não só a mim, mas todos os membros do Bloco C nos momento em que a tecnologia se voltou contra nós;

Ao CNPq, FAPESP, FAEPA e CAPES pelo apoio financeiro

Ao Professor Doutor Silvio José Sarti,

por indicar o caminho que me levou a desfrutar não só de uma casa maravilhosa, como foi o Departamento de Genética dessa faculdade, mas também da possibilidade de conhecer e conviver por todos esses anos com profissionais exemplares e amigos que eu jamais vou esquecer.

Silvio, realmente uma atitude no momento certo pode mudar a vida das pessoas. Muito obrigado pela sua atitude.

(in memoriam)

Resumo

Epigenética é o ramo da biologia que estuda as características herdáveis não associadas a alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Um dos principais processos epigenético estudados é a metilação do DNA, a qual está associada a diversos mecanismos de regulação gênica, entre eles o *imprinting* (marcação) genômico. Esse tipo de regulação caracteriza-se pela expressão parental específica dos *loci* associados e à metilação diferencial em regiões regulatórias conhecidas como centros de *imprinting* (ICs). Alterações desse mecanismo estão relacionadas com síndromes de hipo e hipercrecimento em humanos e animais domésticos, desenvolvimento de tumores, doenças associadas com alterações de comportamento e já foram detectadas em indivíduos concebidos por técnicas de reprodução assistida e em células-tronco embrionárias derivadas de diferentes espécies. Essas duas últimas evidenciam que genes marcados são particularmente lábeis ao estresse induzido por manipulação celular *in vitro*. As possíveis causas dessas epimutações não estão completamente esclarecidas. Os bovinos parecem ser um melhor modelo comparativo no estudo dessas alterações, evitando a utilização de embriões humanos. No entanto, existem poucas sequências descritas de genes marcados nessa espécie. No presente estudo, duas regiões diferencialmente metiladas (H19DMR e KvDMR1) foram caracterizadas em bovinos em termos de elementos conservados (EC), enriquecimento de elementos repetitivos (ERs) e padrões de metilação. A análise de ECs e ERs foi realizada utilizando-se os programas VISTA e *RepeatMasker*, respectivamente. Os padrões de metilação para ambas as DMRs foram analisados utilizando-se o ensaio de

COBRA (do inglês *COmbined Bisulfite Restriction Analysis*) em DNA de sangue periférico e espermatozóides em amostras de animais concebidos *in vivo*. Também foi pesquisada a possível ocorrência de perda de *imprinting* em uma amostra de quatro animais clonados. A análise dos resultados indicou que os padrões de *imprinting* observados nas DMRs bovinas estudadas são semelhantes aos descritos para regiões homólogas em outras espécies de mamíferos. As características genômicas mostraram uma maior similaridade nas regiões analisadas entre bovinos e humanos do que entre humanos e camundongos. Não foram encontradas diferenças entre o padrão de *imprinting* de animais gerados naturalmente ou por transferência nuclear. Os resultados desse trabalho poderão auxiliar em futuras pesquisas de genes marcados em bovinos, além de contribuir para o melhoramento na utilização dessa espécie como modelo de comparação para desenvolvimento humano.

Abstract

Epigenetics is the branch of biology which studies heritable changes in genome function that occur without a change in nucleotide sequence within the DNA. One of the most studied epigenetic process is the DNA methylation, which is associated with several gene regulation mechanisms such as genomic imprinting. This type of regulation is characterized by parental specific gene expression and differential methylation of the associated *loci* in regulatory sequences named imprinting centers (ICs). Alterations of this mechanism has been related to hypo and hypergrowth syndromes in humans and domestic animals, tumor development, behavior disorders, and it has also been associated with epimutations in individuals conceived by assisted reproduction (AR) techniques and stem cells derived from different species. These last two evidences are indicatives of the imprinted genes lability to *in vitro* cell manipulation. The possible causes of these epimutations are not completely clear. Cattle seem to be a better comparative model in the study of this epigenetic alterations, and it can avoid the use of human embryos. However, there is few description of imprinted gene sequences this species. In the present work, two differently methylated regions (H19DMR and KvDMR1) were characterized in terms of conserved elements (CEs), enrichment of repetitive elements (RE) and methylation patterns. The CEs and REs analysis was carried out using the VISTA and RepeatMasker softwares, respectively. The methylation patterns for both DMRs were analyzed by COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis) assay in DNA from peripheral blood and sperm samples of *in vivo* conceived animals. It also was investigated the loss of

imprinting in samples of four cloned animals. The results indicated that the imprinting patterns of the studied bovine DMRs are similar to the other homologue regions in mammals. The genomic features demonstrated a bigger similarity of the analyzed regions between cattle and humans than between humans and mice. Differences between the imprinting patterns of in vivo conceived *versus* cloned animals were not found. The results of this work can help future studies of imprinted genes in cattle, and, in addition, can contribute for the improvements of this animal model as a comparative to the human development.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Epigenética	2
I.2. <i>Imprinting</i> genômico (Marcação genômica)	5
I.3. Regiões diferencialmente metiladas e regiões controladoras de <i>imprinting</i>	9
I.4. Reprogramação genômica em mamíferos	12
I.5. Alterações epigenéticas e a síndrome do bezerro grande	15
 II. OBJETIVOS	 18
 III. MATERIAIS E MÉTODOS	 20
III.1. Identificação das seqüências-alvo e construção dos <i>primers</i>	21
III.2. Análise da abundância e conservação interespecífica de elementos transponíveis na H19DMR e na KvDMR1	22
III.3. Análise de elementos conservados e demais regiões com possíveis funções regulatórias	22
III.4. Extração de DNA e modificação com bissulfito de sódio	23
III.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
III.6. Digestão dos fragmentos gerados por PCR com a enzima <i>BstU I</i>	27
 IV. RESULTADOS	 28
IV.1. Isolamento da H19DMR e KvDMR1 bovinas	29

IV.2. Análise de possíveis elementos conservados na DMRs estudadas e regiões adjacentes.....	34
IV.3. Abundância e conservação interespecífica de elementos transponíveis nas regiões englobando a H19DMR e KvDMR1	44
IV.4. Estudo do padrão de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em animais gerados a partir de transferência nuclear	47
V. DISCUSSÃO.....	50
V.1. Identificação do padrão diferencial de metilação na H19DMR e KvDMR1 bovinas	51
V.2. Busca por elementos conservados ou possíveis “assinaturas de <i>imprinting</i> ”	55
V.3. Abundância e conservação de elementos repetitivos na H19DMR e na KvDMR1	62
V.4. Análise da metilação da H19DMR e na KvDMR1 em animais gerados por transferência nuclear	65
VI. CONCLUSÕES.....	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	98

I. Introdução

I.1. Epigenética

Cunhado em 1942 por Conrad H. Waddington, o termo epigenética pode ter significados distintos para diferentes cientistas. Biologistas moleculares interpretam epigenética como “o estudo das modificações meióticas e mitóticas herdáveis da função gênica que não se explicam por alterações na sequência de DNA”. (RIGGS et al., 1996 citado em HAIG 2004). Morfologistas funcionais definem epigenética como “a série inteira de interações entre células e produtos celulares as quais levam a morfogênese e diferenciação” (HERRING 1993 – citado em HAIG 2004). Independentemente da interpretação, ambas conduzem pelo caminho que leva do potencial genético herdado (genes) à sua manifestação (fenótipo) sendo este último constantemente influenciado pelos fatores ambientais.

Nas últimas duas décadas a versão dos biólogos moleculares vem gerando um número cada vez maior de trabalhos e a cada dia novas descobertas ramificam cada vez mais o antigo dogma fundamental da biologia molecular (DNA → RNA → Proteína). Atualmente, os epigeneticistas centram-se nas modificações ocorridas em nível de nucleossomo, entre elas transferências de grupamentos químicos aos resíduos de aminoácidos em histonas ou ao DNA. Também são estudados os processos de remodelamento da cromatina, os quais podem afetar a interação entre a fita dupla de DNA e o núcleo de histonas reposicionando os nucleossomos em relação às sequências nucleotídicas que os circundam (JENUWEIN & ALLIS, 2001; VARGA-WEISZ & BECKER, 2006).

Em termos históricos, os aspectos epigenéticos atualmente conhecidos como envolvendo modificações na cromatina, têm gerado trabalhos clássicos na literatura científica antes mesmo de uma total consciência dos mesmos. Dentre estes, destacam-se a descoberta dos genes mutadores (McCLINTOCK, 1950), a inativação do cromossomo X (LYON 1961), o *imprinting* genômico em mamíferos (McGRATH & SOLTER, 1984; SURANI et al., 1984) e a indução de modificações epigenéticas na cromatina dirigidas por RNA (WASSENBERGER et al., 1994).

Esta última descoberta tem sido relatada em diversas vias que levam a transições entre os estados de condensação e descondensação da cromatina. Destacando-se processos como o silenciamento das seqüências centroméricas e elementos repetitivos, os processos de compensação de dose em mamíferos e insetos, diferenciação celular e *imprinting* genômico (YODER 1997; VOLPE et al., 2002; HEARD, 2004; KANDURI et al., 2006; SANCHEZ-ELSNER et al., 2006).

Diversos trabalhos têm mostrado que enzimas membros da família de DNA metiltransferases, complexos protéicos com atividade demetilase, proteínas de ligação ao DNA metilado, histona-metiltransferase e acetiltransferase, membros do grupo *Polycomb* de proteínas e proteínas estruturais da cromatina como a HP1 (do inglês *Heterocromatin protein 1*) possuem ou atividade de ligação ou comprovada interação com RNAs (JOST et al., 1999; MUCHARDT et al., 2002; JEFFERY & NAKIELNY, 2004; BERSTEIN et al., 2006). Curiosamente, os membros das famílias de DNA metiltransferase e proteínas de ligação ao DNA metilado possuem forte afinidade por pequenos RNAs fita dupla sugerindo possível envolvimento

desses RNAs no controle epigenético estabelecido por essas proteínas (JEFFERY & NAKIELNY, 2004).

Alguns autores têm sugerido, a partir de estudos com mutantes para componentes da via de RNA de interferência em *Drosophila melanogaster*, que pequenos RNAs possam estar envolvidos na função de insuladores e sua interação e direcionamento às regiões de adesão da matriz nuclear (LEI & CORCES, 2006). Grimaud et al. (2006), também em modelo de *Drosophila melanogaster*, reportaram o envolvimento da maquinaria de RNA de interferência (RNAi) no silenciamento mediado por proteínas do grupo *Polycomb* (PcGs). Ambos os estudos citados direcionam para o envolvimento de um componente de RNA no estabelecimento de estados da cromatina em nível de *locus* e na estruturação de domínios nucleares. Apesar dos estudos referidos serem realizados em *Drosófila*, diversos aspectos da regulação da estrutura da cromatina estudados nesse modelo podem estar conservados entre as espécies. Bernstein et al. (2004) demonstraram que a associação de Cbx7 (uma proteína similar as PcGs) ao cromossomo X inativo depende não só de modificações presentes (trimetilação de histona H3K9 e H3K27) na cromatina mas também de um componente de RNA. Um outro estudo demonstrou que a formação e manutenção da heterocromatina centromérica em mamíferos envolve moléculas de RNA (MAISON et al., 2003). Um exemplo mais clássico de associação de RNAs ao estabelecimento de estado heterocromático e deposição de PcGs, nesse caso em um cromossomo inteiro, é a própria inativação do cromossomo X de mamíferos (HEARD, 2004). Em *Drosófila*, *roX* RNAs participam do estabelecimento de um estado eucromático no processo de compensação de dose em machos (AKHTAR et al., 2000).

Estudos *in vitro* têm reforçado a importância de moléculas de RNA na programação gênica, mostrando que ambos, ativação e silenciamento gênicos podem ser induzidos pelas mesmas (TING et al., 2004; SUZUKI et al., 2005; LI et al., 2006). RNAs modulatórios também têm sido descritos como mediadores da diferenciação de células-tronco neuronais (KUWABARA et al., 2004).

1.2 *Imprinting* genômico (Marcação genômica)

Imprinting genômico é um processo de regulação gênica no qual apenas um dos membros de um par alélico se expressa, dependendo de sua origem parental (REIK & WALTER, 2000). Os primeiros relatos desse fenômeno datam da primeira metade da década de 80, a partir dos trabalhos pioneiros de McGrath & Solter (1984) e Surani et al. (1984), os quais demonstraram que ambos os genomas parentais se fazem necessários para o desenvolvimento de mamíferos. Após aproximadamente duas décadas e meia de seu descobrimento, outros estudos têm demonstrado a ocorrência deste processo é restrito a mamíferos placentários e marsupiais, mas não em monotremados (KILLIAN et al., 2000). Atualmente, cerca de oitenta genes regulados por *imprinting* foram descritos (www.geneimprint.com). Entre as funções biológicas afetadas por estes genes incluem-se crescimento embrionário, controle do ciclo celular, padrões de comportamento e o desenvolvimento placentário (LI et al., 1999; ISLES & WILKINSON, 2000; REIK & WALTER, 2000; FITZPATRICK et al., 2002). Alguns dos genes regulados por *imprinting* são precursores de microRNAs (SEITZ et al., 2003; CAI & CULLEN, 2007; WILLIAMS et al., 2007).

Entres as principais características dessa forma de regulação gênica destacam-se as modificações covalentes na cromatina, expressão parental e tecido-específica dos transcritos além da coexistência dentro de um mesmo núcleo celular de alelos com epigenótipos parentais específicos. Em estudo utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ hybridization – FISH*) demonstrou-se que os diferentes epialelos em genes marcados podem ocupar compartimentos nucleares distintos, com o alelo ativo associado à matriz nuclear (KAGOTONI et al., 2002; GRIBNAU et al., 2003; WEBER et al., 2003). A metilação diferencial do DNA nos *loci* controlados por *imprinting* geralmente ocorre em regiões denominadas Regiões Diferencialmente Metiladas – DMRs (do inglês - *Differentialy Methylated Regions*), sendo esta marca epigenética parental e tecido-específica (LEWIS & REIK, 2006). Outra característica associada à cromatina desses *loci* é o padrão diferencial de modificações covalentes em histonas ocorrendo também de maneira parental e tecido-específicas associadas às DMRs. Tem sido demonstrado que esses *loci* também podem apresentar deposição de proteínas do complexo *Polycomb* e de variantes de histonas, como a macroH2A1, característica do processo de inativação do cromossomo X em mamíferos (UMLAUF et al., 2004; CHOO et al., 2006). Estudos em placentas de camundongos demonstraram que a marcação epigenética diferencial das DMRs pode ocorrer na ausência de metilação do DNA, mas com manutenção do padrão de modificação de histonas (LEWIS et al., 2004; WAGSCHAL & FEIL, 2006).

Uma das características desses *loci* é a alta incidência de elementos transponíveis inter e intra-gênicos, entre os quais se destaca um

enriquecimento de elementos LINE1 (do inglês *long interspersed nuclear elements 1*) (WALTER et al., 2006). Elementos móveis ou transponíveis são prevalentes nos genomas de plantas e animais (KAZAZIAN Jr, 2004). Em humanos, estima-se que eles ocupem quase a metade do genoma (LANDER et al., 2001). Segundo a hipótese formulada por Mary F. Lyon (1998), tais elementos podem servir como agentes difusores da heterocromatinização do cromossomo X inativo. Se esta hipótese é válida para *loci* marcados permanece incerto.

Entre os transcritos produzidos nos diversos *loci* marcados, destaca-se o grande número de RNAs não codificadores de proteínas (do inglês – *Non Coding RNAs* ou ncRNAs) (O'NEILL 2005; PAULER et al., 2007). Diversos autores têm reportado que além dos transcritos principais, tais *loci* apresentam regiões de transcrição de função desconhecida, algumas estando associadas a seqüências regulatórias como *enhancers* (DREWELL et al., 2002; OGAWA & LEE, 2003).

Disrupção do padrão normal de metilação desses genes tem sido associada a diversas síndromes de hipo e hipercrecimento, alterações neurológicas e predisposição tumoral (DEBAUN et al., 2003; BLIEK et al., 2006; LALANDE & CALCIANO, 2007). Alterações epigenéticas nesses *loci* (perda da marcação; do inglês *Loss of Imprinting* ou LOI) levam à conseqüente alteração da expressão dos genes regulados por elas, causando o surgimento dos fenótipos anormais (GLEEN et al., 1993; LEE et al., 1999). Diversos estudos têm proposto o envolvimento de fatores ambientais na LOI, sendo que a labilidade à exposição a fatores como meios de cultura celular em regiões onde essas alterações ocorrem já é conhecida há quase uma década (WRENZYCKI et al., 2001; RIZOS et al., 2003).

Resultados de várias pesquisas demonstraram que a exposição celular ao soro fetal, utilizado em diversos sistemas de cultivo celular, pode afetar genes marcados em nível de alterações na cromatina e quanto ao aumento ou diminuição da expressão de seus transcritos (KHOSLAS *et al*, 2001; RIZOS *et al.*, 2003). A manipulação de células para procedimentos como transferência nuclear também apresenta riscos para o surgimento de alterações epigenéticas (SINCLAIR *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2005). Modificações nos níveis de componentes da dieta alimentar, em especial de doadores de grupos metil, parecem estar envolvidas no surgimento de alterações na metilação do DNA de diversos *loci* (WHITELOW & MARTIN, 2001; WATERLAND & JIRTLE, 2003). Estudos desde o final da década de 90 demonstraram que a labilidade apresentada por *loci* regulados por *imprinting* genômico, pode gerar alterações estocásticas em cultivos celulares (DEAN *et al.*, 1998; HUMPHERYS *et al.*, 2001; HUMPHERYS *et al.* 2002; FUJIMOTO *et al.*, 2005; RUGG-GUNN *et al.*, 2005). Em estudos de reclone, embriões gerados por transferência nuclear foram utilizados para geração de uma nova geração de clones, e esta por sua vez apresentou animais com diferentes alterações em diversos *loci* marcados (DEAN *et al.*, 1998). A labilidade desse tipo de regulação gênica é de considerável importância em termos da biotecnologia contemporânea. Diversos protocolos que utilizam células-tronco para tentativas de terapia fazem uso de cultivos celulares, o que traz a possibilidade de que essas células venham a portar diversas formas de alteração de *imprinting* em diferentes *loci* (FEIL 2001).

Nos últimos anos um número maior do que o esperado de indivíduos gerados por técnicas de reprodução assistida (tanto em humanos como em

animais domésticos) tem apresentado defeitos de regulação de genes marcados e fenótipos relacionados aos mesmos (YOUNG et al., 2001; COX et al., 2002; GICQUEL et al., 2003; ORSTAVIK et al., 2003; GOMES et al., 2007; KAGAMI et al., 2007).

I.3. Regiões diferencialmente metiladas e regiões controladoras de *imprinting*

As regiões controladoras de *imprinting* (ICRs) também conhecidas como centros de *imprinting* (do inglês *Imprinting Centres* ou ICs), podem ser definidas como um ou mais elementos no DNA, os quais regulam a expressão de genes marcados e seu epigenótipo nos *clusters* gênicos onde estes se localizam (LEWIS & REIK, 2006). Essas regiões ancoram inúmeros sítios para fatores de transcrição, diversos transcritos não codificadores de proteínas e apresentam uma baixa taxa de conservação entre as espécies (REIK & WALTER, 2000; LEWIS & REIK, 2006).

Os padrões de metilação diferencial do DNA e de modificações covalentes em histonas destas regiões são estabelecidos durante o desenvolvimento da linhagem germinativa e escapam dos eventos de reprogramação durante o período pré-implantação embrionária nas DMRs germinativas (LOPES et al., 2003; MORGAN et al., 2005). Em adição às germinativas existem também as DMRs pós-zigóticas nas quais o padrão de metilação é estabelecido após a fertilização, durante as ondas de demetilação e metilação *de novo* (LEWIS & REIK, 2006).

Entre as ICRs conhecidas atualmente, talvez a mais estudadas seja a que se encontra entre os genes *IGF2* e *H19* (H19DMR), localizada na região 11p15.5 em humanos e porção distal do cromossomo 7 de camundongos (GABORY et al., 2006). Os genes *IGF2* e *H19* apresentam expressão monoalélica paterna e materna, respectivamente. O *IGF2* codifica um fator de crescimento embrionário envolvido no desenvolvimento placentário e no surgimento de diversos tipos de tumores (CONSTÂNCIA et al., 2002; MAENAKA et al., 2006; RAYENEL et al., 2006; STIER et al., 2006; JELINIC & SHAW, 2007). Já o gene *H19* codifica um transcrito não traduzido, precursor de microRNAs (CAI & CULLEN, 2007). A ICR presente na H19DMR possui metilação diferencial e diversos sítios de ligação para a proteína insuladora CTCF (BELL & FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000; KANDURI et al., 2000). Essa proteína liga-se aos sítios dessa região de maneira sensível à metilação, dessa forma associando-se apenas ao alelo materno (hipometilado). Uma vez interagindo com seus sítios de ligação, esse fator impede que *enhancers downstream* do gene *H19* interajam com o promotor de *IGF2*, permitindo a expressão do alelo materno de *H19* e impedindo a expressão de *IGF2* (BELL & FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000). De maneira oposta, devido a não ligação de CTCF à ICR metilada paterna o promotor de *IGF2* pode ser influenciado pelos *enhancers* permitindo a expressão deste gene e bloqueando a expressão de *H19*.

O segundo centro de *imprinting* encontra-se na mesma região 11p15.5 (porção distal do cromossomo 7 de camundongos) mas localizado dentro do intron 10 do gene *KvLQT1*, e corresponde a um domínio multipartido de elementos regulatórios (FITZPATRICK et al., 2007). Esta ICR controla o

imprinting de pelo menos seis genes maternalmente expressos dessa região (*KvLQT1*, *CDKN1C*, *ASCL2*, *PHLDA2*, *TSSC4* e *SLC22A1L*) (BEATTY et al., 2006). Entre os diversos elementos regulatórios encontram-se um silenciador, um insulador, além do promotor do gene *LIT1* (do inglês *Long Intronic Transcript 1* também conhecido como *KvLQT1-AS*) (KANDURI et al., 2002; MANCINI-DINARDO et al., 2003; BEATTY et al., 2006). O gene *LIT1* expressa um ncRNA (*antisense* ao gene *KvLQT1*) que promove o silenciamento de genes vizinhos a ele (KANDURI et al., 2006; GREEN et al., 2007). Perda de *imprinting* (LOI) na KvDMR1 por hipometilação leva à expressão bialélica de *LIT1*, sendo essa a epimutação com maior incidência (50%) na síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (BEATTY et al., 2006). Segundo o estudo de DeBaun et al. (2002), a hipometilação da KvDMR1 está mais associada às anomalias congênitas como onfalocele, presentes na SBW, enquanto que a LOI na H19DMR está associada à predisposição ao tumor de Wilms nessa mesma síndrome. Epimutações na H19DMR também têm sido associadas à síndrome de Silver-Russell (SSR) (EGGERMANN et al., 2005; BLIEK et al., 2006). Estudos em modelo animal e em crianças concebidas por técnicas de reprodução assistida (RA) têm mostrado uma considerável labilidade das marcas de *imprinting* em ambas as DMRs (DEAN et al., 1998; DOHERTY et al., 2000; DeBAUN et al., 2003). Uma característica importante associada à *loci* marcados é a alta ocorrência de elementos repetitivos nos mesmos (WALTER et al., 2006). Estudos têm demonstrado que a metilação elementos pode ser afetada por fatores ambientais e consequentemente desregular a expressão de genes vizinhos, o que não excluiria afetar também genes marcados (WHITELAW & MARTIN, 2001; WATERLAND & JIRTLE, 2003).

I.4. Reprogramação genômica em mamíferos

O desenvolvimento em mamíferos é um processo ordenado, iniciado no zigoto totipotente e terminando em uma série de tipos celulares diferenciados e específicos no indivíduo adulto (SURANI 2001). Para que o epigenoma do zigoto de mamíferos esteja preparado para iniciar esse processo, diversas modificações ocorrem anteriormente à fertilização em cada linhagem germinativa (SURANI 2001; LI 2002; MORGAN et al., 2005).

Aproximadamente no período de entrada das células germinativas primordiais na crista gonadal, o genoma das mesmas sofre um processo de apagamento das marcas epigenéticas, tais como padrões de *imprinting* e de inativação do cromossomo X (REIK et al., 2001). O restabelecimento das marcas de *imprinting* ocorre aproximadamente no estágio de pró-espermatogônia na linhagem germinativa masculina e durante o crescimento do oócito na feminina (DAVIS et al., 2000; UEDA et al., 2000; LUCIFERO et al., 2004).

Após a fertilização, outro período de reprogramação ocorre no genoma do zigoto pré-formado para o apagamento de marcas epigenéticas gaméticas e estabelecimento de marcas embrionárias (SURANI 2001). Durante essa fase ambos os genomas (paterno e materno) sofrem um processo de demetilação do DNA, além do apagamento de outras marcas como metilação de H3K9 (REIK et al., 2001; MORGAN et al., 2005). A metilação parental específica nas DMRs germinativas de genes marcados, estabelecida durante o desenvolvimento dos gametas masculinos e femininos, é mantida inalterada durante a reprogramação do período pré-implantação enquanto DMRs pós-zigóticas podem adquirir novos padrões de metilação (LEWIS & REIK, 2006).

Tem sido proposto que essa segunda fase do apagamento (reprogramação pós-fertilização) ocorre devido à ação de fatores citoplasmáticos do oócito. Conseqüentemente, danos na estrutura desse citoplasma ou aquisição de fatores estranhos a ele podem comprometer esse processo (SURANI 2001). Em técnicas de reprodução assistida como a transferência nuclear, a enucleação de oócitos e introdução de núcleo somático aos mesmos podem causar perdas citoplasmáticas e introdução de fatores somáticos ao ambiente embrionário, respectivamente (SINCLAIR et al., 2000; SURANI 2001). Esses tipos de danos podem comprometer os processos de reprogramação e conseqüentemente alterar a programação da expressão de diversos genes (HUMPHERYS et al., 2002; YANG et al., 2007). Reprogramação incompleta de núcleos doadores em processos de transferência nuclear pode comprometer a viabilidade embrionária (BOURC'HIS et al., 2001; KANG et al., 2001). Vários relatos têm relacionado alteração na metilação e na expressão de genes regulados por *imprinting* genômico em embriões submetidos ao cultivo *in vitro*, sejam eles produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) ou gerados por transferência nuclear (DOHERTY et al., 2000; KHOSLA et al., 2001; MANN et al., 2003; HAN et al., 2003). O processo de reprogramação genômica também afeta a metilação de várias seqüências repetitivas (elementos transponíveis e outras repetições), elementos estes que estão frequentemente associados ou até mesmo influenciando a expressão de genes marcados (KIM et al., 2004; HOLMES et al., 2006; WALTER et al., 2006).

O processo de reprogramação epigenética, principalmente no período pré-implantação, parece variar entre as espécies (figura 1) (SANTOS & DEAN, 2004;

YANG et al., 2007). Estudos focando as mudanças de metilação ocorridas em mamíferos durante o desenvolvimento embrionário têm demonstrado maiores similaridades entre os modelos humanos e bovinos, quando comparados ao modelo de camundongos (FULKA et al., 2004, SANTOS & DEAN, 2004; YANG et al., 2007). Devido a tais semelhanças, tem sido sugerido que bovinos possam ser um modelo animal melhor do que camundongos para o estudo da reprogramação epigenética, substituindo de forma mais adequada à necessidade imediata de utilização de embriões humanos nas pesquisas (NIEMANN & WRENZICKI, 2000; WRENZICKI et al., 2005).

Figura 1. Dinâmica da metilação ocorrendo durante o desenvolvimento embrionário normal e em clones. (a) Em camundongos a metilação do núcleo da vesícula germinativa aumenta com o tamanho do oócito. Após a fertilização, ocorre demetilação ativa do genoma paterno (linha azul) e demetilação passiva do genoma materno (linha vermelha). Metilação *de novo* ocorre no estágio de blastocisto, sendo diferencial entre a massa celular interna (ICM) e no trofoectoderma (TE). Em embriões clonados (linha roxa) alguma demetilação ocorre após a transferência nuclear até o estágio de blastocisto, mas antes da metilação *de novo* e ocorre também metilação aberrante (hipermetilação) do TE. (b) Em bovinos, ocorre demetilação ativa e passiva e metilação *de novo* no estágio de 8 a 16 células. Em embriões clonados ocorre metilação *de novo* no estágio de quatro células e TE é hipermetilado (YANG et al., 2007).

I.5 Alterações epigenéticas e a síndrome do bezerro grande

A denominação síndrome do bezerro grande (do inglês - *Large Offspring Syndrome* ou LOS) foi utilizada pela primeira vez, na década de 90 para descrever o fenômeno de hipercrecimento intrauterino e anomalias congênitas associadas em espécies de ruminantes gerados por técnicas de reprodução assistida (YOUNG et al., 1998). O primeiro relato dessa síndrome foi publicado anteriormente por Willadsen et al. (1991).

Nas últimas duas décadas um considerável número de bezerros e cordeiros nascidos de procedimentos de reprodução *in vitro* tem apresentado aumentos anormais de tamanho (YOUNG et al., 1998). O elevado peso ao nascer é a característica predominante em média atingindo o dobro do peso normal e já tendo sido relatado o nascimento de um cordeiro com peso aumentado em cinco vezes em relação ao peso médio normal da espécie (WALKER et al., 1996). O aumento de tamanho pode levar ao aumento da severidade e incidência de distócia. Também estão presentes outras características como dificuldades respiratórias e de sucção e morte súbita perinatal. Perdas pré-natais também ocorrem em particular na primeira metade da gestação, as quais estão relacionadas a alterações mais severas no desenvolvimento (SINCLAIR et al., 2000).

Entre as características encontradas em animais acometidos por essa síndrome incluem-se alterações metabólicas tais como hipotermia, hipoglicemia, acidose metabólica e hipóxia (GARRY et al., 1996). Concentrações plasmáticas de insulina ao nascer foram relatadas como aumentadas em até quatro vezes (GARRY et al., 1996). Aumento da

concentração plasmática de insulina também tem sido observado na SBW em humanos (FORNET et al., 1998).

Anomalias em diversos órgãos já foram descritas, nas quais se incluem aumento da massa muscular e alterações da composição das fibras musculares, displasia cerebelar e malformações esqueléticas e faciais (SCHMIDT et al., 1996; MAXFIELD et al., 1997). Alterações de crescimento em órgãos específicos foram relatadas por Sinclair et al. (1997; 1998), incluindo fígado, coração, rins, músculo *plantaris* e anomalias placentárias.

Quanto às causas subjacentes ao aparecimento da LOS, diversas propostas surgiram, dentre as quais: o tipo celular usado como doador do núcleo, micromanipulação associada com enucleação e transferência de carioplasto, eletrofusão, redução do componente citoplasmático, fatores envolvidos na composição do meio, sincronia entre a fase de desenvolvimento do embrião e o ambiente uterino receptor (CAMPBELL et al., 1996; SINCLAIR et al., 2000).

Desde as primeiras observações da LOS, tem sido notada a semelhança dos fenótipos aberrantes, ocorridos em ruminantes, com síndromes humanas de hipercrecimento intrauterinas ocorridas naturalmente e relacionadas a alterações em *loci* marcados na região 11p15.5 (SINCLAIR et al., 2000). Já se passaram 14 anos desde a primeira publicação descrevendo metilação diferencial associada a regiões regulatórias do gene *H19* em camundongos (FERGUSON-SMITH, et al., 1993).

No final da década de 90 foi descrita a KvDMR1 (segunda região controladora de *imprinting* na região 11p15.5), a qual se localiza no décimo íntron do gene maternalmente expresso *KvLQT1* e sobrepõe-se ao promotor do

gene *LIT1* (MITSUYA et al., 1999). No entanto, em bovinos, tornou-se difícil avaliar tal envolvimento de genes homólogos dessa região devido a pouca informação das seqüências gênicas e especialmente de suas DMRs. H19DMR e KvDMR1 não têm sido descritas e caracterizadas em relação a seus padrões de metilação em bovinos.

Recentemente, diversos trabalhos utilizando análises de polimorfismos, *Southern blotting*, quantificação de transcritos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e análise da metilação do DNA por modificação com bissulfito de sódio têm detectado alterações na expressão e *status* epigenético de genes como *H19*, *IGF2* e *IGF2-R* em animais gerados por transferência nuclear em bovinos e ovinos (YOUNG 2001; ZHANG et al., 2004; YANG et al., 2005; LONG & CAI, 2007). Também foram detectadas alterações dos níveis de expressão do gene *IGF2-R* em fetos de ovinos derivados de zigotos recuperados de doadoras submetidas a dietas ricas em uréia, demonstrando a influência da alimentação na expressão do gene estudado (POWELL et al., 2006).

Devido às semelhanças em fenótipos e epimutações observadas em ruminantes gerados a partir de clonagem ou mesmo fertilização *in vitro* com crianças nascidas de reprodução assistida, o modelo animal de ruminantes pode constituir um excelente modelo para o entendimento das vias e alterações que levam à LOI e conseqüentemente aos fenótipos de alteração de crescimento intrauterino (SINCLAIR et al., 2000).

II. OBJETIVOS

- II.1.** Isolar e caracterizar *in silico* as DMRs germinativas de bovinos associadas com à regulação do *imprinting* genômico nos domínios homólogos ICR1 (H19DMR) e ICR2 (KvDMR1) pertencentes à região 11p15.5 de humanos;
- II.2.** Verificar a conservação do padrão de metilação dessas regiões em células somáticas e germinativas em bovinos;
- II.3.** Detectar novos elementos gênicos e possíveis novas assinaturas (características associadas e conservadas em *loci* marcados) conservadas entre as espécies que possam vir a ser relacionadas ao processo de *imprinting* genômico dessas regiões;
- II.4.** Pesquisar possíveis epimutações na H19DMR e KvDMR1 em animais gerados através de transferência nuclear.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Identificação das seqüências-alvo e construção dos *primers*

Utilizando-se seqüências específicas e conservadas entre as espécies para cada uma das DMRs estudadas neste trabalho, foram caracterizadas as DMRs bovinas homólogas às da região 11p15.5 em humanos. Para a H19DMR, foi utilizado o elemento de 42 pb no qual se encontra o sítio de ligação da proteína CTCF (FREVEL et al., 1999), como seqüência conservada de busca contra o banco de dados do genoma bovino, utilizando-se o *software* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/cow).

Para identificação da KvDMR1 bovina e subsequente construção dos *primers* para o estudo da mesma foram utilizadas seqüências do gene *KvLQT1OT (LIT1)* com alta homologia entre humanos e camundongos e que se encontram de 800-1500 pb *upstream* do promotor desse gene. Para identificação das seqüências homólogas entre humanos e camundongos foi utilizado o *software Multalin* (CORPET 1988) e seqüências depositadas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank).

Os *primers* para bovinos flanqueando o promotor do gene *Lit1* e o quinto, sexto e sétimo sítio de ligação para CTCF na H19DMR, utilizados para análise posterior de DNA modificado com bissulfito de sódio, foram preliminarmente construídos a partir do programa *MethPrimer* (LI & DAHIYA, 2002), com ajustes realizados através do programa *GeneRunner* V.3.05 (Hasting Software Inc.) (anexo 2).

III.2. Análise da abundância e conservação interespecífica de elementos transponíveis na H19DMR e na KvDMR1

No intuito de averiguar a incidência e possíveis padrões de conservação de elementos repetitivos nas DMRs estudadas entre as espécies, as seqüências de bovino foram analisadas com o programa *RepeatMasker* (www.repeatmasker.org) e comparadas a bancos de dados de humano e camundongo. A pesquisa incluiu famílias de elementos transponíveis, pequenos RNAs, satélites, seqüências de baixa complexidade e repetições simples, as quais são referidas no restante do texto como elementos repetitivos.

III.3. Análise de elementos conservados e demais regiões com possíveis funções regulatórias

No intuito de se identificar outras seqüências conservadas próximas ou sobrepondo-se às H19DMR e KvDMR1 foram utilizadas seqüências iniciando-se nos respectivos sítios de iniciação da transcrição (genes *Lit1* e *H19*) e cobrindo aproximadamente 6 e 15 kilobases respectivamente. Ambas as seqüências foram analisadas com o *software* VISTA (FRAZER et al., 2004). Em regiões com baixa homologia, mas cuja funcionalidade já foi referida em estudos em humanos e camundongos, foi realizada análise de conservação para sítio de ligação para diversos fatores de transcrição. Foi utilizado um conjunto de sítios de ligação para vertebrados (disponíveis no banco de dados

TRANFAC) de forma aleatória, utilizando-se o aplicativo rVISTA (LOOTS & OVCHARENKO, 2004). A análise com rVISTA procede em quatro passos: (1) detecção de sítios de ligação para fatores de transcrição (TFBSs – do inglês - *transcription factor binding sites*) com base no banco de dados TRANSFAC; (2) identificação de pares de TFBSs alinhados localmente; (3) seleção de TFBSs presentes em regiões alta conservação no DNA; (4) criação de um gráfico mostrando dinamicamente a sobreposição de TFBSs individualmente ou aglomerados com o perfil de conservação do *locus* genômico (LOOTS & OVCHARENKO, 2004).

A busca por ESTs (do inglês *expressed sequence tags*) homólogas as DMRs estudadas foi realizada com o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) utilizando-se o banco de seqüências expressas de bovinos.

III.4. Extração de DNA e modificação com bissulfito de sódio

O DNA genômico utilizado nesse trabalho, para investigação dos padrões de metilação normal em ambas as DMRs estudadas, foi obtido a partir de sangue periférico ou alíquotas de sêmen. A amostra foi composta de oito animais concebidos por reprodução natural e sêmen de touros cadastrados ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN). A amostra de animais clonados constituiu-se de quatro fêmeas bovinas geradas por transferência nuclear pelo Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Brasília.

A extração de DNA de sangue periférico e de espermatozóides bovinos foi realizada segundo protocolo modificado de Olerup e Zetterquist (1992) e Sambrook et al. (1989). Em um tubo de microcentrífuga (1,5ml) foi colocado 1ml de sangue periférico total adicionando-se 450µl de tampão de lise (0,32M de sucrose; 12mM tris HCl pH 7,5; 5,0mM de MgCl₂; 1% Triton 100X) e centrifugado por 20 segundos a 13000 RPM. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 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 realizado de 4 a 7 vezes até a obtenção de um *pellet* branco. Após a lise, o tubo foi vertido para secagem do material. Ao *pellet* limpo e seco foram adicionados 80µl de tampão de proteinase K (0,375M de NaCl; 0,12M EDTA; 280µl de água milli-Q; 10µl de SDS 20%; 8µl de proteinase K 25mg/ml) e a mistura foi homogeneizada com 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 aproximadamente 15 minutos para evitar um posterior choque térmico com a adição de NaCl (5M). Posteriormente ao resfriamento, foram adicionados a cada tubo 120µl de NaCl (5M) agitando a mistura no vórtex por 8 segundos. Após, o material foi centrifugado a 13000 RPM para precipitação da proteína desnaturada. Foram transferidos 400µl do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga (1,5ml) e adicionados 1ml de etanol absoluto sendo o conteúdo homogeneizado por inversão de duas a três vezes. Os tubos foram colocados em um *freezer* a -85°C por 20 minutos. Após o resfriamento o material foi centrifugado a 15000 RPM em uma centrífuga refrigerada (0°C) e o

sobrenadante foi descartado após a centrifugação. Foram adicionados 1ml de etanol 70% (gelado) e a mistura foi centrifugada a 14000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado após a centrifugação e o material foi seco em um *Speed Vacum (Eppendorf)* por 15 minutos a 45°C. Foram acrescentados 50µl de água milli-Q e o conteúdo foi agitado com um micropipetador. Para a diluição do DNA a solução foi aquecida a 37°C por 1 hora em um termociclador. O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro para utilização posterior nos estudos de metilação.

A modificação do DNA genômico por bissulfito de sódio foi realizada segundo o protocolo descrito por Clarck et al. (1994), posteriormente modificado no mesmo laboratório em que foi realizado o presente trabalho por Gomes et al. (2007). Cada reação de modificação de DNA foi realizada a partir de 1µg de DNA genômico, o qual foi desnaturado adicionando-se 8µl 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 16 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 ressuspensionado em 50µl de H₂O 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* ou no mínimo 2 horas.

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 a temperatura ambiente (10-30 minutos). Cada amostra foi ressuspensionada em 30 µl de H₂O Milli-Q estéril e utilizado de 2-3µl para cada PCR.

III.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Cada PCR (para os pares de *primers* da KvDMR1 e da H19DMR) foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 2-3µl de DNA modificado de cada amostra de sangue ou espermatozóide; 150mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl; dNTPs (100µM cada); *primers* (0,05mM cada); 25mM MgCl₂; 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 30 segundos, 58°C por

30 segundos, 72°C por 45 segundos; 72°C por 10 minutos; e finalizando com 10°C contínuo. Os produtos de amplificação dos segmentos das DMRs de ambos os genes foram analisados em gel de poliacrilamida 10% e corados com solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2%.

III.6.Digestão dos fragmentos gerados por PCR com a enzima *Bst*U I

Para avaliação do padrão de metilação, foi realizado o ensaio de COBRA (do inglês *COmbined Bisulfite Restriction Analysis*). Para cada fragmento amplificado foi realizada digestão com a enzima *Bst*U I (New England, BioLabs). Cada reação foi realizada em um volume final de 25µl; utilizando-se 5U de *Bst*U I; 2,5µl de Tampão 2 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM de MgCl_2 , 1mM DTT, pH 7,9). A reação foi incubada a 60°C por 2 horas e o produto da digestão foi analisado em gel de poliacrilamida 10%. Para cada amostra analisada neste trabalho, foram repetidos os ensaios de COBRA de duas a quatro vezes, em DNA modificado em reações diferentes.

Devido às epimutações nas H19DMR e KvDMR1 também serem encontradas em seres humanos nascidos de procedimentos de reprodução assistida (RA), e relacionadas à etiologia das síndromes de Beckwith-Wiedemann (SBW) e Silver-Russell (SSR) (DeBAUN et al., 2003; BLIEK et al., 2006). Foram investigados no presente trabalho o padrão de metilação dessas DMRs em quatro fêmeas bovinas clonadas e aparentemente saudáveis (DeBAUN et al., 2003; GOMES et al., 2007).

IV. RESULTADOS

IV.1. Isolamento da H19DMR e da KvDMR1 bovinas

A busca identificou uma sequência já descrita como *contig* (NW_001494548), a qual compreende toda a região entre os genes *Igf2* e *H19* bovinos. A região possui aproximadamente 90 Kb e sete sítios de ligação para CTCF (CTCF-1 a CTCF-7) semelhantes a humanos (sete sítios) e diferindo de camundongos (quatro sítios) e ovelhas (seis sítios) (YOUNG et al., 2003). Comparação entre os sete sítios analisados (figura 2) revelou a sequência consenso 5'- CnGCGnGGnGGCnG – 3', a qual mostrou homologia à sequência encontrada por Kim et al. (2007), para análise de busca de sítios de ligação de CTCF no genoma humano.

Figura 2. Gráfico mostrando a presença de ilhas CpGs (colunas azuis) em segmento correspondente (6687 pb) à H19DMR de bovinos. C1 a C7 correspondem às localizações dos sítios de ligação de CTCF em relação às ilhas CpGs nesta DMR. Dados gerados pelo programa *MethPrimer* (LI & DAHIYA, 2002).

Figura 3. Comparação das seqüências conservadas na H19DMR bovina contendo os sete sítios de ligação para CTCF (nucleotídeos conservados em vermelho). Seqüências indicadas pela seta correspondem ao consenso do sítio de ligação de CTCF encontrada no presente estudo em comparação à descrita por Kim et al. (2007).

Figura 4. Resultados do ensaio de COBRA nos três sítios de ligação de CTCF avaliados na H19DMR bovina. (A) CTCF-5 mostrando que o alelo metilado difere no padrão de clivagem entre espermatozóide e sangue periférico. (B) e (C) CTCF-6 e CTCF-7 mostrando conservação do padrão de clivagem entre alelo metilado do espermatozóide e sangue periférico. (L) marcador de peso molecular de 100 pb; (Sp) espermatozóide; (Sng) sangue periférico; (Nd) produto de PCR não digerido; (D) produto de PCR digerido com *Bst*U I; (Nm) Alelo não metilado; (M) Produtos de digestão por *Bst*U I correspondentes ao alelo metilado.

Em humanos a metilação diferencial na H19DMR encontra-se no sexto sítio de ligação de CTCF (TAKAI et al., 2001). Em camundongos a metilação diferencial encontra-se no quarto e último sítio de ligação (PANT et al., 2004). Devido à diferença entre as espécies para os sítios de CTCF que possuem metilação diferencial, no presente estudo foram escolhidos os sítios cinco, seis e sete da H19DMR bovina, dessa forma abrangendo os últimos sítios e a posição estruturalmente homóloga em humanos.

A análise do DNA, extraído a partir de sangue periférico e espermatozóides de animais concebidos naturalmente, mostrou padrão diferencialmente metilado em DNA modificado por bissulfito de sódio proveniente de sangue periférico e hipermetilado em espermatozóide em todas as regiões testadas na H19DMR bovina (figura 4). Esse resultado pode ser observado pela manutenção de um fragmento não clivado (alelo não metilado) e um ou mais fragmentos gerados pela restrição enzimática (alelo metilado). Algumas variações nos resultados dos padrões de clivagem no ensaio de COBRA foram observadas entre as regiões testadas, quando comparadas amostras de DNA de espermatozóide e sangue periférico (figura 4A).

As seqüências identificadas pelo programa *Multalin* foram utilizadas na busca da região homóloga desse gene em bovinos, o qual identificou uma seqüência já descrita como *contig* (NW_930795) que compreende toda a KvDMR1 bovina e o intron 10 do gene *KvLQT1* nessa espécie. Próximo à região identificada pela busca com a seqüência homóloga de humanos e de camundongos, foi caracterizada a seqüência do promotor do gene *Lit1* bovino (*bLit1*). O promotor possui quatro seqüências CAAT (*CAAT box*) e uma seqüência remanescente TATA (*TATA box*). O esquema contendo os CCAAT

box no promotor bovino e o possível ponto de iniciação da transcrição de *Lit1*, é mostrado na figura 5.

Figura 5. Predição da presença de ilha CpG em uma sequência do *contig* NW_930795 correspondente ao intron 10 do gene *KvLQT1* de bovinos. O esquema mostra a disposição de quatro motivos CCAAT (*CCAAT boxes*; retângulos em branco) e do suposto sítios de iniciação da transcrição do gene *Lit1* bovino (+1).

Figura 6. Comparação da homologia entre os sítios de CTCF humanos e os sítios candidatos na KvDMR1 bovina. **(A)** Sequência FBi (Bta x Hsa) correspondente ao primeiro sítio de ligação de CTCF no promotor do gene *LIT1*. **(B)** Sequência HBi (Bta x Hsa) correspondente ao segundo sítio de ligação de CTCF sobreposto ao elemento R1. **(C)** Sequência GBi (Bta x Hsa) correspondente à região que apresenta ligação de CTCF em humanos. FBi e HBi – sequências correspondentes aos sítios de ligação de CTCF em humanos na região do promotor de *LIT1*; Bta – *Bos taurus*; Hsa – *Homo sapiens*; GBi segmento ancorando sítio de ligação de CTCF em humanos (sequência fornecida pelo Dr. Paul D. Sadowski – Universidade de Toronto, CA).

Figura 7. Resultado do ensaio de COBRA mostrando o padrão de metilação na região segmento correspondente ao promotor do gene *Lit1* bovino. (Nm) Alelo não metilado; (M) Produtos da digestão com *Bst*U I representando o alelo metilado (Sp) espermatozóide; (Sng) sangue periférico; (Nd) produto de PCR não digerido; (D) produto de PCR digerido com *Bst*U I.

Na análise do amplicom correspondente ao segmento da KvDMR1 bovina em DNA proveniente de sangue periférico, foi demonstrada a presença de um alelo completamente desprovido de metilação (alelo paterno) (figura 7) e um alelo com metilação polimórfica (alelo materno) (figura 7). Análise dos resultados do ensaio de COBRA mostraram que a região estudada da KvDMR1 bovina apresenta-se hipometilada em espermatozóides, também nessa espécie.

IV.2. Análise de possíveis elementos conservados nas DMRs estudadas e regiões adjacentes

Utilizando-se o software VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista>), foram analisadas as seqüências centrais (onde se encontra a metilação diferencial) e

adjacentes à H19DMR e KvDMR1, no intuito de se encontrar novos elementos conservados (EC). Análise da H19DMR bovina demonstra que os sítios de ligação de CTCF, apesar de apresentarem um núcleo conservado (figura 8), encontram-se em uma regiões de baixa conservação entre as espécies. Dos quatro elementos conservados encontrados pela análise, dois (EC2 e EC4) estão preservados em bovinos, humanos e murinos. EC2 correspondem à região homóloga descrita por Drewell et al. (2002) como *enhancers* mesodérmicos.

Dados gerados a partir da comparação da KvDMR1 de bovino *versus* humano e bovino *versus* murino demonstram que a região central da sequência analisada (onde se localizam o promotor de *bLit1*) apresenta uma baixa homologia quando comparada às regiões circundantes. Com base nessa baixa homologia encontrada, foi utilizada outra ferramenta do *software* VISTA (rVISTA) para identificação de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição conservados entre as espécies. Os resultados dessa abordagem permitiram a identificação de pontos de conservação para diversos fatores de transcrição sobrepondo-se às regiões correspondentes a domínios funcionais dessa DMR. Os gráficos gerados e a posição dos elementos regulatórios de cada DMR são mostrados nas figuras 9 e 10.

A)

B)

Figura 8. Resultados gerados através do *software* VISTA, para procura por elementos conservados na H19DMR e KvDMR1. **(A)** Elementos conservados na H19DMR (EC 1-4) e sítios de ligação para CTCF (C 1-7). **(B)** Regiões conservadas na KvDMR1 bovina e murina comparadas à mesma região em humanos. R1 e R2 correspondem às seqüências descritas por Thakur et al. (2002) como sendo elementos silenciadores. R1 também compreende o promotor de *Lit1* e um dos sítios de ligação de CTCF dessa região (FITZPATRICK et al., 2007). O elemento conservado descrito como IMTP (do inglês *Imprinting Methylation Transition Point*) correspondem a região descrita caracterizada por Beatty et al. (2006) onde ocorre a inversão do padrão normal de metilação da KvDMR1 em humanos. R2 e IMTP representam os limites entre da região com baixa incidência (onde se encontra R1) de em elementos repetitivos em relação às regiões ricas nesses elementos.

Figura 9. Gráficos gerados pelo rVISTA demonstrando a posição TFBSs (barras verdes) conservados na região da H19DMR bovina (bovinos x humanos) e sobreposição e elementos regulatórios descritos na literatura ou no presente trabalho, sobre cada ponto de conservação (letras em negrito). **(A)** Posição do promotor do gene *H19* bovino. **(B)** Posição de CTCF-7 (C7); **(C)** Posição de CTCF-6 (C6) e CTCF5 (C5); **(D)** Posição de EC1; **(E)** Posição de EC2 (Homólogo à HUC2); **(F)** Posição de EC3; **(G)** Posição de EC4 (Homólogo à HUC1). HUC 1 e 2 (do inglês *H19 upstream conserved regions 1 and 2*)

Figura 10. Gráfico gerado pelo rVISTA no qual são mostrados os TFBSs conservados na região da KvDMR1 (bovinos x humanos) e sobreposição de alguns aglomerados de TFBSs com elementos regulatórios ou conservados descritos nesse trabalho ou na literatura citada (letras em negrito). **(A)** Posição de R1; **(B)** Posição de R1; **(C)** Posição de IMTP.

O mesmo procedimento de análise de regiões conservadas foi realizado para uma região de 15 kb na região da H19DMR, começando a partir do sítio de iniciação da transcrição do gene *H19* (nucleotídeo +1). As regiões que abrigam sítios de ligação para CTCF e são responsáveis pelo padrão de metilação diferencial encontram-se em uma região de baixa homologia. Foram detectados quatro elementos conservados (EC1-EC4) à aproximadamente 10 kb *upstream* do sítio de iniciação de *H19* comparando-se à sequência de bovinos com a de humanos (figura 11). Quando a mesma abordagem foi realizada comparando-se bovinos com camundongos, dois destes sítios

Figura 12. Elementos conservados na KvDMR1 entre bovinos e humanos. **(A)** Homologia do IMTP entre humanos e bovinos. **(B)** Homologia dos promotores do gene *Lit1* entre bovinos e humanos com CCAAT sublinhado (traço negro). Dados gerados pelo software *Multalin* (COPERT 1988).

IV.3. Abundância e conservação interespecífica de elementos transponíveis nas regiões onde se encontram a H19DMR e a KvDMR1

Os dados gerados pelo programa *RepeatMasker* para o íntron 10 do gene do gene *KvLQT1* bovino e para a região entre os genes *Igf2* e *H19* na mesma espécie, demonstraram uma alta contribuição de elementos do tipo LINE1 (L1) na constituição das regiões analisadas (figura 13).

Para os dados gerados para a H19DMR, um padrão similar foi observado, destacando a alta ocorrência de L1 em relação à contribuição de outros elementos à composição da DMR. No entanto, nessa região elementos do tipo SINE apresentaram uma contribuição ligeiramente maior do que LINE1 (0,89% maior).

A)

B)

Figura 13. Contribuição (em %) de elementos repetitivos (ERs) na constituição genômica das regiões correspondentes e circundantes das DMRs estudadas no presente trabalho. **(A)** Porcentagem da contribuição de ERs em relação a sequência total da região intergênica *Igf2-H19* bovina. **(B)** Porcentagem da contribuição de ERs em relação à sequência total do íntron 10 do gene *KvLQT1* bovino. Dados gerados pelo programa *RepeatMasker* (www.repeatmasker.org).

A)

B)

Figura 14. (A) Gráfico representando a contribuição e a conservação entre espécies dos elementos repetitivos LINE1 (L1) e SINEs na região entre os genes *Igf2* e *H19* bovinos. **(B)** Gráfico representando a contribuição e conservação entre espécies dos elementos repetitivos LINE1 (L1) e SINEs no intron 10 do gene *KvLQT1* bovino. (5'L1 e 3'L1) Elementos do tipo LINE1 identificados nas porções 5' e 3' do promotor do gene *Lit1* bovino, respectivamente. (5'SINE e 3'SINE) Elementos do tipo SINE identificados nas porções 5'e 3'do promotor do gene *Lit1* bovino. As espécies cujos bancos de dados foram utilizados para a comparação com regiões descritas em bovinos foram *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

IV.4. Estudo do padrão de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em animais gerados a partir de transferência nuclear

Não foram, na amostra de clones estudada, identificados animais com epimutações na H19DMR para CTCF-7, nem variações no padrão de clivagem do fragmento amplificado que pudessem indicar ocorrência de hipo ou hipermetilação. Resultado de CTCF-6 demonstraram que um dos animais clonados (clone 3) apresentou uma variação no padrão de clivagem do ensaio de COBRA. Nos demais clones o sexto sítio de ligação de CTCF apresentou padrão de clivagem semelhante ao encontrado na amostra controle. Análise de CTCF-5 demonstrou variação da metilação nos motivos CGCG do amplicon estudado para este sítio. O padrão encontrado demonstra uma possível hipometilação de alguns motivos CpGs (figura 15).

Já na KvDMR1 os padrões de clivagem pelo ensaio de COBRA demonstraram variação na metilação de dinucleotídeos CpGs na região promotora do gene *Lit1* bovino. O padrão encontrado, semelhante ao encontrado no CTCF-5 na H19DMR, também sugere uma possível hipometilação de alguns motivos CpGs (figuras 4A e 16).

Figura 15. Resultados do ensaio de COBRA na H19DMR em DNA de sangue periférico de animais gerados por transferência nuclear. **(A)** Corresponde à análise do amplicon contendo o CTCF-5; **(B)** corresponde ao padrão de metilação de CTCF-6; **(C)** Corresponde ao padrão de metilação de CTCF-7. (Nd) Fragmento não digerido; (D) Fragmento digerido; (Nm) Alelo não metilado; (M) Alelo metilado.

Figura 16. Ensaio de COBRA em DNA de sangue periférico de animais gerados por transferência nuclear. Análise da metilação do DNA na bKvDMR1 (segmento amplificado sobrepondo-se ao promotor de *bLit1*). (L) Marcador de peso molecular; (Nd) Fragmento não digerido; (D) Fragmento digerido; (Nm) Alelo não metilado; (M) Alelo metilado.

V. DISCUSSÃO

V.1. Identificação do padrão de metilação diferencial na H19DMR e na KvDMR1 bovinas

Relatos recentes sobre a labilidade epigenética das regiões KvDMR1 e H19DMR mediante o estresse produzido por protocolos de manipulação *in vitro* e a presença de diversos elementos regulatórios abrigados nas mesmas, tornam necessárias investigações apuradas sobre características genômicas dessas DMRs em um modelo animal mais parecido ao humano (DEAN et al., 1998; DOHERTY et al., 2000; HARK et al., 2000; DeBAUN et al., 2003; LEI & CORCES; 2006 FITZPATRICK et al., 2007). No entanto, até o presente trabalho essas DMRs e seus padrões de metilação não haviam sido descritos e/ou caracterizados em bovinos.

Neste estudo foram identificadas e caracterizadas as DMRs germinativas correspondentes aos centros de *imprinting* 1 (ICR1 – H19DMR) e 2 (ICR2 - KvDMR1), ambos localizados no cromossomo 29 de bovinos (em região homóloga à 11p15.5 em humanos). Segundo Gaston et al. (2001), a utilização de DNA de sangue periférico tem se mostrado útil para identificação de epimutações da região 11p15.5 em pacientes com SBW. Por esse motivo, foram utilizadas amostras de sangue periférico para se avaliar os padrões de metilação da H19DMR e KvDMR1 em animais nascidos *in vivo* ou gerados por transferência nuclear.

Devido à metilação diferencial na H19DMR ocorrer em sítios de ligação para CTCF específicos em humanos (sexto sítio) e camundongos (quarto sítio) (TAKAI et al., 2001; PANT et al., 2004), foram investigados três segmentos dentro da região isolada quanto aos possíveis padrões de metilação em

bovinos gerados *in vivo*. Comparando-se a distribuição dos sítios de ligação de CTCF na H19DMR bovina, fica claro sua maior semelhança à estrutura encontrada na região homóloga humana (figura 2). No entanto, diferentemente de humanos o CTCF-6 não se encontra dentro de uma ilha CpG. Devido a essa diferença, a uma maior semelhança estrutural da H19DMR entre bovinos e humanos e devido a resultados obtidos pela análise com rVISTA (figura 9), no presente estudo foi optado por se investigar a metilação de CTCF-5, CTCF-6 e CTCF-7.

Na H19DMR, o sexto e sétimo sítios de ligação de CTCF apresentaram um padrão de restrição do alelo metilado semelhantes entre espermatozóide e sangue periférico (figura 4B e 4C). Embora o padrão de metilação da H19DMR em oócitos bovinos não tenha sido investigado, os resultados no presente trabalho são indicativos de que a metilação desses sítios possa estar sendo mantida de forma mais estável desde seu estabelecimento no desenvolvimento da linhagem germinativa paterna, preservando-se de forma inauterada após a fertilização e durante todo o desenvolvimento.

Os sítios de restrição avaliados, CTCF-6 e CTCF-7, também se sobrepõe a TFBSs de outros fatores tais como Sp1 e YY1, os quais têm sido relacionados a processos como manutenção de hipometilação de DNA genômico e regulação de genes marcados (SIEGFRIED et al., 1999; KIM et al., 2007). Devido à presença de três sítios para clivagem com *Bst*U I no segmento amplificado de CTCF-6 e o padrão de clivagem obtido por restrição enzimática (figura 4B), este representa um segmento na H19DMR em que a metilação parece mais estável.

Um ponto importante da utilização de CTCF-7 é a presença do sítio de restrição sobrepondo-se exatamente ao sítio de ligação de CTCF e à sequência consenso relatada neste trabalho e por outras pesquisas da literatura (YOUNG et al., 2003; KIM et al., 2007). O motivo CGCG (sítio de restrição de *Bst*U I) na posição avaliada no sétimo sítio de ligação de CTCF encontra-se conservado em seis dos sete sítios encontrados na H19DMR bovina (figura 3). Somadas às características obtidas com os resultados da análise de metilação de CTCF-6 e CTCF-7, é sugerida a utilização desses sítios de forma conjunta, para estudos de investigação de padrões de *imprinting* na H19DMR bovina.

O quinto sítio de ligação de CTCF na H19DMR bovina apresentou um padrão de clivagem no ensaio de COBRA que sugere um padrão de metilação polimórfico no alelo paterno. Os resultados da análise do padrão de metilação nos três sítios estudados na H19DMR sugerem que a região abrangendo CTCF-6 e CTCF-7 possam delimitar de forma mais precisa a região controladora de *imprinting* dessa DMR em bovinos. O padrão de restrição observado no sexto e sétimo sítios mostraram-se invariáveis na amostra controle (animais gerados *in vivo*), o que pode indicar que os possíveis polimorfismos de metilação desses segmentos não sejam tão tolerados em indivíduos normais (figura 4A e 4B).

Já para KvDMR1, a sequência analisada sobrepõe-se ao promotor do gene *LIT1* bovino e cujo segmento homólogo tem sido estudado em humanos e camundongos, mostrou um padrão hipometilação paterna de suposta hipermetilação materna (figura 7). O promotor do gene *LIT1* é circundado por três sítios de ligação de CTCF em humanos e dois sítios em murinos (THAKUR et al., 2003; FITZPATRICK et al., 2007). Foram identificados neste

trabalho dois sítios candidados à ligação de CTCF e homologia parcial na região abrangendo a localização do terceiro sítios bovinos (figura 6). Tem sido demonstrado que a região promotora de *Lit1* também possui atividade de silenciamento na KvDMR1 correspondendo ao fragmento R1 (figura 8B) descrito por Thakur et al. (2003).

Análise dos resultados do ensaio de COBRA na KvDMR1 bovina, demonstrou um padrão polimórfico de metilação no suposto alelo materno (figura 7). No entanto, em camundongos e humanos essa tem sido a região estudada para se determinar os padrões de *imprinting* normais ou alterados (GOMES et al., 2007). Essas variações pontuais na metilação alelo-específica da KvDMR1 em humanos e bovinos demonstram que as mesmas podem ser representativas de padrão de *imprinting* normal dessa DMR nessas espécies.

O padrão de metilação encontrado, baseado no plano de clivagem aponta para um padrão de metilação constitutivo do primeiro sítio de *BstU I* e polimórfico para o segundo e terceiro sítios. Devido ao padrão de restrição encontrado no DNA proveniente de espermatozóides e sangue periférico, pode-se sugerir que esses sítios sofram demetilação durante o processo de reprogramação ocorrido no período pré-implantação ou em estágios tardios do desenvolvimento. O padrão diferencialmente metilado presente de forma constitutiva no primeiro sítio de restrição para *BstU I* pode apontar para uma menor labilidade desse sítio durante os processos de demetilação no período pré-implantação além de sugerir sua importância funcional como marca epigenética. Variações no padrão de metilação ao longo de DMRs desta região têm sido detectadas nas regiões homólogas humanas, nos quais sugerem que metilação diferencial em determinados pontos das DMRs ocorra de forma

homogênea. A presença de mais de um epialelo nessa região pode ser considerada uma característica normal segundo o resultado de diversos trabalhos da literatura (CERRATO et al., 2004). Estudos têm demonstrado que em indivíduos onde epimutações foram associadas com o surgimento de fenótipos anormais, os padrões de metilação apresentaram uma variação mais acentuada (GOMES et al., 2007). Esses dados sugerem que exista um limiar entre intensidade de alteração epigenética e comprometimento da função gênica associada.

V.2. Busca por elementos conservados ou possíveis “assinaturas de *imprinting*”

Buscas por possíveis seqüências ou características genômicas evolucionariamente conservadas em *loci* submetidos à regulação por *imprinting* genômico (“assinaturas” de *imprinting*) são uma constante para epigeneticistas que estudam esse fenômeno. Após a identificação das DMRs, a análise das mesmas com o *software* VISTA mostrou que as regiões homólogas (Figuras 8A e 8B), consideradas funcionais por estudos em modelos humanos e de camundongos (KANDURI et al., 2003; HAGEGE et al., 2007), encontram-se em segmentos de baixa conservação e baixa densidade de elementos repetitivos também em bovinos.

Em ambas as DMRs, esses pequenos segmentos não conservados em termos de seqüência, mas conservados em relação ao controle de diversas funções regulatórias entre as espécies, tornam ainda mais intrigante a busca

por motivos que possam ser característicos da regulação de genes marcados. Apesar das pesquisas realizadas no presente trabalho mostrarem que as regiões supostamente funcionais na KvDMR1 e H19DMR geralmente não apresentam elementos conservados (ECs), a busca por assinaturas de *imprinting* genômico revelou diversos pontos conservados para sítios de ligação para fatores de transcrição (figura 9 e 10), alguns dos quais possuem já conhecida associação a processos de metilação e demetilação do DNA e modificações de histonas. O intuito dessa abordagem foi identificar sítios conservados entre as espécies, que possam estar ligados às modificações epigenéticas dessas regiões. Foi demonstrado que muitos dos pontos conservados circundam ou sobrepõe-se a elementos conhecidamente funcionais nessas duas DMRs.

Na ICR1, a análise com rVISTA demonstrou que os sítios de ligação de CTCF-5, CTCF-6 e CTCF-7 correspondem a trechos com conservação para vários TFBSs entre bovinos e humanos (figura 9). O mesmo resultado não se repetiu para os outros sítios (CTCF-1, CTCF-2, CTCF-3, CTCF-4), o que sugere que os sítios analisados possam ser melhores representantes do *status* de *imprinting* da H19DMR bovina.

Essa sobreposição delimita pequenos motivos, os quais podem refinar o mapa funcional dessas regiões e identificar novos fatores envolvidos na regulação de genes marcados. Entre os TFBSs encontrados nessa região destacam-se Sp1 e YY1. Sp1 (*Specific protein 1*) é um fator de transcrição tipo C2H2, cuja função em manter seqüências regulatórias hipometiladas já foi descrita para outros *loci* (FRANK et al., 1991; SIEGFRIED et al., 1999). Outro sítio de ligação encontrado foi o do fator YY1 (Ying Yang 1), o qual liga-se de

maneira metilação-sensível a elementos insuladores do gene *Peg3* e a DMRs de outros genes marcados (KIM et al., 2003; KIM et al., 2007). Esses resultados reforçam a utilização de CTCF-6 e CTCF-7 como seqüências de análise do *status* de *imprinting* da H19DMR bovina. Em relação à CTCF-7 deve-se levar em conta que o sítio de restrição (*Bst*U I) utilizado no ensaio de COBRA sobrepõem-se aos sítios de ligação de CTCF, Sp1 e YY1.

Comparando-se os resultados do presente estudo com os dados da literatura, torna-se difícil em um primeiro momento da análise, associar elementos conservados vizinhos aos sítios de ligação de CTCF à regulação do *imprinting* genômico dessas regiões. A identificação de quatro elementos conservados (ECs) fora da área (aproximadamente 4,4 Kb de distância) onde se situam os sítios de ligação de CTCF sugere a existência de mais elementos regulatórios nessa região. Quando analisados os resultados do rVISTA, esses ECs apresentam-se como aglomerados de sítios de ligação para fatores de transcrição (Figura 9).

Deve ser lembrado que ao tentar se encontrar pistas genômicas associadas ao estabelecimento desse processo de regulação gênica, estas basearam-se até aqui em sítios de ligação para fatores protéicos. Questionamentos propostos por nomes como Sean Eddy (2001) e John Mattick (2003), remetem ao seguinte questionamento: fatores protéicos como os fatores de transcrição ligam-se a um limitado número de seqüências-alvo. Tem sido proposto que a discriminação adequada entre os inúmeros *loci* genômicos por essas proteínas envolva a interação das mesmas com ncRNAs (MATTICK 2003).

Comparando os dados do presente trabalho com os resultados de Drewell et al. (2002), foi demonstrado que EC4 e EC2 correspondem aos elementos HUC1 e HUC2 (do inglês *H19 upstream conserved regions 1 and 2*) de camundongos, os quais têm sido descritos como transcritos de ncRNA intergênicos que funcionam como *enhancers* mesodérmicos. Apesar da busca por ESTs homólogas a HUC1 (EC4) e HUC2 (EC2) bovinos não identificar nenhum registro no *GenBank*, investigações futuras da presença desses transcritos em bovinos podem reforçar essa hipótese. A interação de ncRNAs (alguns com características de pequenos RNAs) a fatores de transcrição e proteínas com motivos de ligação ao DNA tem sido demonstrada em vários estudos (FINERTY & BASS, 1997; FINERTY & BASS, 1999; YANG et al., 1999; VIDAL et al., 2006).

Esses ECs, EC2 e EC4 (homólogos a HUC2 e HUC1, respectivamente) também chamam a atenção devido à extensão ocupada por sítios de conservação para TFBSs e a conservação destas regiões entre bovinos, humanos e murinos. Essa sobreposição da conservação TFBSs e ncRNAs, somado função de HUC1 e HUC2 como *enhancers* mesodérmicos, sugerem que a interação entre fatores de transcrição e ncRNAs possa estar envolvida na regulação tecido-específica na ICR1.

Diversos trabalhos da literatura científica sustentam a hipótese sugerida no parágrafo anterior, relacionando a interação entre ncRNAs e fatores protéicos à processos de regulação gênica (FINERTY & BASS, 1997; FINERTY & BASS, 1999; YANG et al., 1999; MAISON et al., 2003; VOLPE et al., 2002; LEI & CORCES, 2006; VIDAL et al., 2006). No entanto, apesar das evidências relatadas no presente estudo sobre conservação desses elementos e sua

transcrição em outras espécies, não existem trabalho relacionando esses ECs a possíveis alterações em síndromes humanas (como SBW e SSR) ou na LOS.

Na KvDMR1 bovina também foram descritos vários elementos conservados. O presente estudo focou em dois desses elementos e em uma sequência conservada de sítios de ligação para fatores de transcrição. Um dos elementos conservados (IMTP) localiza-se no limite das regiões de alta e baixa ocorrência de elementos repetitivo *upstream* do promotor de *Lit1* (figura 8B). Comparando os dados deste trabalho com os resultados de Beatty et al. (2006), os quais mostram que existe uma zona de transição e inversão da metilação na KvDMR1, fica claro que esse elemento corresponde ao mesmo segmento. Esse sítio mostrou-se como conservado quanto à sequência (bovino x humano x murino) e para TFBSs (bovino x humano; Figura 8B e figura 10C), o que pode sugerir uma possível função de delimitador do padrão de metilação dessa região. Sendo esse o primeiro trabalho a identificar tais padrões de conservação entre as espécies, não há dados para comparar esses resultados, a não ser os já descritos por Beatty et al. (2006). Uma investigação mais detalhada sobre os padrões de metilação dessa região em bovinos poderá reforçar essa hipótese.

Os outros dois pontos importantes na KvDMR1 correspondem a R1 e R2 (THAKUR et al., 2002; FITZPATRICK et al., 2007). R1 engloba o promotor de *Lit1* em todas as espécies onde este elemento foi descrito, além de um dos três sítios de ligação de CTCF na KvDMR1. Esse elemento apresenta conservação em homologia da sequência de bases e conservação para TFBSs (bovino x humanos) (figuras 8B e 10B). Já R2 mostrou apenas conservação para TFBSs (figura 10A). Essa coincidência entre posição de elementos funcionais,

ocorrência de homologia elevada e conservação de sítios para ligação de fatores regulatórios, reforçam a importância de R1, R2 e IMTP nos processos de regulação gênica da ICR2. A conservação de R1 também justifica a utilização dessa região para avaliação dos padrões de *imprinting* da KvDMR1 avaliados nos animais desse trabalho.

Os demais ECs encontrados próximos à KvDMR1 localizam-se em regiões conservadas em humanos onde os padrões de metilação diferem da mesma em outras espécies (BEATTY et al., 2006) ou fazem parte da sequência transcrita de *Lit1*. Assumir possíveis interpretações sobre os papéis funcionais desses elementos, sem realização de mais estudos *in vitro* na espécie analisada ou em outros modelos de estudo, seria precipitado no presente momento. Comparando os dados de incidência de elementos repetitivos entre humanos e bovinos na KvDMR1 fica claro que muitos ECs localizam-se na região onde esses elementos são abundantes, podendo sugerir uma possível participação na manutenção de um ambiente genômico propício para o estabelecimento e manutenção do *status* de *imprinting* a ICR2.

Apesar de se assumir que elementos gênicos com importância funcional se mantêm conservados durante a evolução, algo mais extrínseco parece acontecer em *loci* marcados. A pressão de seleção parece manter apenas o estritamente necessário para a funcionalidade dessas regiões e se isso aumenta a vulnerabilidade da sobrevivência desses processos durante a evolução das espécies permanece indeterminado.

Devido às DMRs analisadas possuírem características que possam indicar o envolvimento de ncRNAs no estabelecimento de seus estados epigenéticos e da conservação de sítios de ligação para fatores transcrição

entre as espécies, no presente trabalho ambas foram comparadas ao banco de ESTs de bovinos do *GenBank*.

Fora das regiões apontadas pelo programa VISTA como elementos conservados ou aglomerados de TFBSs, uma sequência encontrada na H19DMR mostrou homologia com mais de uma centena de registros do banco de ESTs bovinas do *GenBank* (anexo 1). A sequência encontrada na H19DMR possui 200 pb, com homologia variando em torno de 86-96% em 108 registros recuperados. Os registros constam de amostras de RNA de diversos tecidos além de abrangerem amostras de oócitos e todo o período pré-implantação embrionário. Análise semelhante, realizada para a KvDMR1 não identificou seqüências homólogas aos registros dos bancos de ESTs.

O envolvimento de ncRNAs na regulação da expressão gênica e consequentemente ao estabelecimento de possíveis fenótipos, representa um tipo de pensamento de certa forma “profanador” do dogma central da biologia molecular. Esse mesmo raciocínio remeteria à buscas pelos fatores de programação epigenético de cada *loci* analisado. Moléculas de RNAs não codificadores têm sido postuladas como possíveis candidatos a esses fatores de programação, sendo diretamente associados à maquinaria de modificação enzimática da cromatina ou indiretamente através de sua associação com fatores de transcrição (FINERTY & BASS, 1997; FINERTY & BASS, 1999; JOST et al., 1999; YANG et al., 1999; JEFFERY & NAKIELNY, 2004; VIDAL et al., 2006). Apesar da presença de outros transcritos não codificadores nessa região, não se pode concluir primariamente se a sequência encontrada com homologias com diversos registros de ESTs e a um segmento da H19DMR bovina possa ser um RNA que alveje, ou seja, transcrita nessa região. Apesar

da presença de *enhancers* (cujas seqüências são transcritas) próximos a essa região, não se pode esquecer que transcrição intergênica também tem sido associada à interferência transcricional (MARTENS et al., 2004; PETRUK et al., 2006). As análises dos resultados de bioinformática sugerem que o segmento homólogo as ESTs bovinas deva ser investigado o intuito de se verificar novos componentes do complexo fenômeno denominado *imprinting* genômico. Investigações futuras dessa e mesmos de outras regiões conservadas poderão trazer novos componentes regulatórios para uma região que possui complexos padrões de modificação da cromatina e de interações intercromossômicas (KURUKUTI et al., 2006).

V.3. Abundância e conservação de elementos repetitivos na H19DMR e na KvDMR1

Trabalhos recentes têm mostrado a contribuição elementos repetitivos na evolução de seqüências codantes e regulatórias (JORDAN et al., 2003; MEDSTRAND et al., 2005; THOURNBURG et al., 2006). Estudos preliminares na literatura têm associado uma maior incidência de tais elementos a *loci* marcados (GREALLY, 2002; KE et al., 2002; ALLEN et al., 2003). O alto conteúdo de elementos LINE1 no cromossomo X de humanos e camundongos tem sido à base da hipótese de Mary Lyon, a qual sugere que esses elementos possam servir como fatores de difusão na formação da heterocromatina do cromossomo X inativo (Lyon, 1998). Ambos, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X compartilham semelhanças como a presença de epialelos

diferentes em um mesmo núcleo celular, padrões de modificação da cromatina parental-específicos e semelhanças no processo de reprogramação genômica (SURANI 2001)

Analisando a seqüência do intron 10 do gene *KvLQT1* bovino, uma alta incidência de elementos transponíveis (alguns com conservação entre camundongos, humanos e bovinos) foi encontrada (figuras 13B e 14B). Resultados semelhantes foram verificados para a região intergênicas *Igf2-H19* bovina, apesar de que nessa região elementos do tipo SINE foram mais abundantes em relação aos demais elementos presentes (figura 13A e 14A). A maior incidência de SINEs nessa região é discordante com dados da literatura para regiões abrigando genes marcados (GREALLY 2002). Este relato pode sugerir diferenças espécie-específicas da região analisada.

Somados, os resultados das duas regiões são concordantes com dados da literatura que demonstram um enriquecimento de LINE1 em genes marcados, especialmente na região correspondente às ICR1 e ICR2 (WALTER et al., 2006).

Comparando-se os achados do presente estudo com as descrições e delimitações de elementos funcionais dentro da H19DMR e KvDMR1, nota-se que ambas residem fora das áreas ricas em elementos repetitivos, em regiões praticamente desprovidas dos mesmos. Esta observação reforça a hipótese de que tais elementos participem da formação de ambientes cromossômicos favoráveis para o estabelecimento e manutenção do *imprinting* genômico (WALTER et al., 2006). Curiosamente o ponto limite entre o início das áreas em ERs e o início da H19DMR associada aos sítios de ligação de CTCF coincidem com a seqüências de 200 pb, homóloga a mais de 100 registros do banco de

ESTs bovinas do *GenBank*. Essa “coincidência genômica” torna ainda maior as chances de que investigações futuras revelem novos dados em termos do entendimento da regulação de genes mediada por essa região e da natureza dos processos moleculares associados.

Quando observadas a contribuição e a conservação de LINE1 na região que correspondem à porção transcrita do íntron 10 do gene *KvLQT1* (*LIT1*) em bovinos e humanos, a análise dos resultados sugere que esses elementos possam estar envolvidos na funcionalidade desse ncRNA. Apesar de quase ausentes nos núcleos onde se encontram os elementos funcionais em ambas as DMRs, a grande densidade desses elementos (em especial de LINE1) circundando essas regiões não elimina a hipótese que os mesmos participem da manutenção e dispersão dos estados epigenéticos diferenciais desses *loci*, como sugerido por Mary F. Lyon (1998) para o estado heterocromático do cromossomo X inativo de mamíferos.

Outro fato interessante, o qual aponta para a possível funcionalidade de pelo menos um tipo de elemento específico, pode ser notado quando comparado os dois elementos mais abundantes em ambas as regiões investigadas em relação à contribuição de cada elemento na constituição das regiões analisadas e sua conservação nas regiões homólogas de outras espécies. Elementos do tipo LINE1 e SINE foram os mais abundantes nas regiões analisadas, como uma distribuição homogênea (excluindo os centros onde residem os núcleos funcionais da H19DMR e KvDMR1) (figura 13). No entanto, quando avaliada a conservação desses elementos entre as espécies uma diferença clara pode ser demonstrada, LINE1 apresentou uma taxa de

conservação de 93,3% para região intergênica de *Igf2* e *H19* enquanto elementos do tipo SINE apresentaram apenas 9,5% (figura 14A).

Devido à região analisada no íntron 10 de *KvLQT1* abranger parte da porção transcrita do gene *Lit1* bovino, os resultados dessa análise foram divididos por setores, os quais constituíram as porções 5' e 3' do promotor do mesmo. Para essas porções, LINE1 apresentou uma taxa de conservação de 92,3 e 95%, para 5'e 3', respectivamente. Elementos do tipo SINE apresentaram 35,3% e 37,5% respectivamente para as porções 5'e 3' do mesmo intron (figura 14B).

A conservação claramente desproporcional, observada neste trabalho, para os elementos investigados pode sugerir que elementos LINE1 participem na formação de um ambiente genômico que favoreça o estabelecimento e manutenção das marcas epigenéticas presentes nessas regiões. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que esses elementos sofrem demetilação durante o período pré-implantação, isso poderia recrutar fatores envolvidos nessa modificação epigética impedindo que os mesmos apagassem os padrões de metilação estabelecidos nas linhagens germinativas (LANE et al., 2003).

V.4. Análise da metilação da H19DMR e na KvDMR1 em animais gerados por transferência nuclear

Alteração dos níveis de expressão e epimutações em genes associados à região 11p15.5 em humanos têm sido encontradas em regiões homólogas de diversas espécies, quando analisadas em contextos como o cultivo *in vitro* de

embriões, clonagem reprodutiva ou derivação de células-tronco embrionárias (DEAN et al., 1998; DOHERTY et al. 2000; KHOSLA et al. 2001; FUJIMOTO et al., 2005; RUGG-GUNN et al., 2005). Relatos de epimutações nas H19DMR e KvDMR1 também serem encontradas em seres humanos nascidos de procedimentos de reprodução assistida (RA), podendo estar relacionadas à etiologia das síndromes de Beckwith-Wiedemann (SBW) e Silver-Russell (SSR) (DeBAUN et al., 2003; BLIEK et al., 2006).

Devido às evidências citadas no parágrafo anterior foram investigados no presente trabalho o padrão de metilação dessas DMRs em quatro fêmeas bovinas clonadas e aparentemente saudáveis. Quando observados os padrões de clivagem enzimática dos fragmentos gerados por PCR para o DNA modificado por bissulfito, não foram encontradas diferenças entre os animais clonados e os controles gerados *in vivo*. A análise do ensaio de COBRA sugere que o padrão de metilação detectado neste trabalho para KvDMR1 em animais clonados não diferiu do encontrado em animais nascidos *in vivo* e assumidos como referências de padrão normal de metilação para bovinos (figura 7 e 16). Estes resultados podem ser explicados, pois a amostra de animais utilizados representa os melhores resultados (em termos de animais gerados por transferência nuclear) do grupo de pesquisa que os criou. As análises dos resultados da investigação dos padrões de metilação da KvDMR1 sugerem que os sítios polimórficos sejam uma característica da região estudada e não resultado de fatores associados à transferência nuclear. Esse possível padrão polimórfico de metilação da região estudada no promotor do gene *Lit1* bovino, indicando supostas hipometilações em alguns motivos CpGs na KvDMR1, não podem ser comparadas à epimutações características ocorridas na SBW, onde

hipometilações parecem ocorrer em homogênea e não pontual (GOMES et al., 2007).

Apesar das análises dos resultados no ensaio de COBRA detectarem variações em pontos de metilação do quinto sítio de ligação de CTCF na H19DMR dos animais clonados, essas variações também foram vistas nos animais controles (figuras 4 e 15A). Devido às possíveis hipometilações ocorrerem em ambos os grupos de animais estudados, não se pode compará-las aos achados de metilação descritos na SSR (BLIEK et al., 2006). Futuros estudos baseados em padrões de modificação de histona através de imunoprecipitação de cromatina (do inglês *Chromatin Immunoprecipitation* – ChIP) poderão ajudar a interpretar com mais exatidão os resultados encontrados para esses clones. A análise dos resultados para CTCF-6 e CTCF-7, confirma que os padrões de *imprinting* na H19DMR nos clones analisados são praticamente iguais aos de animais gerados por reprodução natural, sendo considerados como padrões de *imprinting* normais. Como pode ser notado pelos resultados ensaio de COBRA para CTCF-6 na H19DMR, a amostra correspondente ao clone 3 apresentou uma pequena variação no padrão de clivagem do alelo metilado (figura 15). Devido a não detecção de variação semelhante na metilação de CTCF-7 no mesmo animal e que possíveis variações pontuais também ocorrem na H19DMR em outras espécies, o padrão de *imprinting* de CTCF-6 nesse animal foi considerado normal (TAKAI et al., 2001; SANDOVICI et al., 2003; MARQUES et al., 2004).

Apesar de não detectadas nesse trabalho, estudos têm demonstrado que fatores associados às técnicas de reprodução assistida podem aumentar a ocorrência de epimutações em embriões gerados a partir das mesmas (DEAN

et al., 1998; DOHERTY et al., 2001; LONG & CAI, 2007). No caso da clonagem, a incapacidade do citoplasma da oócito receptor em reprogramar o núcleo da célula doadora para um estado similar em termos de epigenéticos globais, ao do zigoto poderia acarretar o surgimento de epimutações especialmente em *loci* marcados (SURANI 2001). Outra hipótese seria que devido a fatores presentes no cultivo e a procedimentos envolvidos na manipulação desses embriões, a manutenção dos padrões de marcação epigenética corretos nas ICRs germinativas não suportaria a segunda onda de metilação *de novo* a qual no período pré-implantação de mamíferos placentários (REIK et al., 2001; SURANI 2001).

Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares associados ao surgimento de epimutações em células cultivadas *in vitro*. Alguns experimentos baseados em privação *in vivo* de suplementos doadores de grupo metil em animais durante a gestação sugerem que o equilíbrio de componentes na célula pode estar envolvido no aparecimento de tais aberrações epigenéticas (WATERLAND & JIRTLE, 2003).

Considerando os achados de vários autores para diferentes modelos animais, nota-se que a expressão de genes e o *status* de *imprinting* da região estudada nesse trabalho apresentam uma considerável labilidade ao estresse decorrente da manipulação celular *in vitro*. Curiosamente, há relatos de LOI para genes cuja expressão é regulada pela H19DMR (por exemplo, *Igf2* e *H19*) em experimentos que utilizam espécies como *Mus musculus*, *Ovis aries*, *Macaca reshus* e *Homo sapiens* para cloagem ou derivação de células-tronco embrionárias (DEAN et al., 1998; HUMPHERYS et al., 2001; HUMPHERYS et al., 2002; FUGIMOTO et al., 2005; RUGG-GUNN et al., 2005).

Todos os estudos referidos no parágrafo anterior detectaram LOI em células derivadas da ICM, contrariando a hipótese de que alterações em *loci* marcados ocorreriam preferencialmente em linhagens extra-embrionárias (YANG et al., 2007). Juntos esses relatos sugerem que a análise do padrão de metilação na H19DMR possa ser utilizada como um “biosensor epigenético” (não de forma isolada, mas obviamente somada a outras regiões) das injúrias decorrentes do estresse celular sofrido *in vitro*.

Relatos de LOI na KvDMR1 têm sido encontrados preferencialmente em indivíduos nascidos a partir de procedimentos de reprodução assistida em humanos (DeBAUN et al., 2003; GICQUEL et al., 2003; MAHER et al., 2003; ROSSIGNOL et al., 2006; GOMES et al., 2007). Um único relato da possível relação envolvendo essa DMR e clonagem vem do estudo realizado por Humpherys et al. (2002), os quais demonstraram que o gene maternalmente expresso *Cdkn1c* (*P57^{Kip21}*) apresentava alterações de expressão significativas em tecido hepático de camundongos clonados. Perturbações na expressão de *P57^{Kip21}* já foram associadas à epimutações na KvDMR1 (DIAZ-MEYER et al., 2003). Somadas essas evidências podem apontar para uma possível vulnerabilidade dessa DMR ao procedimento de transfência nuclear.

Quanto aos alvos moleculares, dos quais fatores presentes em protocolos de manipulação *in vitro* possam afetar a conservação de diversos TFBSs entre as espécies sugere que vários fatores de transcrição envolvidos na regulação desses *loci* marcados possam ser alterados pelo ambiente de cultura, favorecendo dessa forma o surgimento epimutações. Apesar de tantos pontos a serem investigados no estudo do surgimento de tais epimutações, o modelo mais estudado (murino) não tem sido considerado como o mais

adequado para extrapolações para humanos. Vários autores têm proposto que o modelo bovino representa um modelo mais fidedigno para o estudo de tais processos epigenético no desenvolvimento embrionário (WRENYCKI et al., 2006).

Os resultados do isolamento e caracterização da H19DMR e KvDMR1 no presente estudo, em um modelo animal sugerido como mais adequado como comparativo humano, podem ser de grande utilidade para os avanços de áreas como fertilização *in vitro* e clonagem. Estudos sobre a natureza molecular ou fatores envolvidos no surgimento da epimutações em células submetidas ao ambiente *in vitro* poderão ajudar na melhoria dos protocolos de produção *in vitro* de embriões para fins reprodutivos ou terapêuticos. A utilização do modelo animal bovino também poderia evitar que um grande número de embriões humanos venha a ser utilizados para o avanço de pesquisas envolvidas em áreas como a engenharia de tecidos. Modelos alternativos de estudo poderão evitar que alguns “possíveis genocídios” em prol dos avanços da ciência venham a acontecer.

O padrão de *imprinting* normal encontrado em todos os animais da amostra de clones analisados e a labilidade epigenética relatada em diversas espécies em pelo menos uma das DMRs investigadas reforçam o sucesso nos procedimentos de transferência nuclear que geraram estes clones. Estes resultados são um incentivo às pesquisas de transferência nuclear no Brasil, indicando que as mesmas até presente momento têm obtido sucesso pelo grupo que as realizou.

No entanto, devido à falta de amostras de animais clonados nascidos com anomalias mais severas ou mesmo abortados não foi possível uma

investigação mais ampla do suposto envolvimento de epimutações nas regiões analisadas com o surgimento da LOS no presente estudo. Futuras pesquisas em animais alterados poderão esclarecer o envolvimento das regiões estudadas na LOS e comparar possíveis semelhanças dessa síndrome com SBW.

CONCLUSÕES

No presente estudo, foram isoladas e caracterizadas as H19DMR e KvDMR1 germinativas bovinas. Os resultados mostraram que ambas apresentam padrão diferencial de metilação em DNA proveniente de sangue periférico, semelhante ao observado em humanos e camundongos. Os padrões encontrados em DNA extraído de espermatozóides mostraram hipermetilação dos segmentos investigados na H19DMR e hipometilação do segmento investigado na KvDMR1 bovinas.

Os resultados da análise da metilação do DNA em sangue periférico e espermatozóides confirmam que os padrões de *imprinting* dessas DMRs em bovinos são iguais aos encontrados em humanos e camundongos.

Os padrões de metilação observados no ensaio de COBRA para CTCF5, CTCF-6 e CTCF-7 e demais características genômicas associadas a eles são indicativos de que os dois últimos sítios podem ser utilizados como regiões que caracterizem o padrão de *imprinting* normal na H19DMR.

Os resultados encontrados pelo ensaio de COBRA para CTCF-6 e CTCF-7 na amostra de animais clonados demonstram que esses animais não apresentaram LOI na H19DMR. Os padrões de metilação observados na KvDMR1, apesar de exibirem supostos polimorfismos, são indicativos de um padrão de *imprinting* normal entre os animais concebidos naturalmente e por transferência nuclear.

Apesar da LOS ter sido observada em animais clonados e esta síndrome ter sido comparada com a SBW em humanos, alterações epigenéticas típicas dessa doença não foram encontradas nos animais clonados estudados.

Os resultados das análises de bioinformática detectaram elementos conservados entre bovinos, humanos e camundongos em ambas as DMRs.

Alguns dos elementos encontrados são homólogos às seqüências funcionais já estudadas em outras espécies. Os H19DMR EC2 e EC4 em bovinos são correspondentes a HUC1 e HUC2, descritos como *enhancers* em humanos e camundongos. A seqüência encontrada na H19DMR, com homologia a diversas ESTs bovinas, é uma forte candidata a novo elemento regulatório dessa região.

A sobreposição de elementos funcionais em regiões com baixa homologia com os aglomerados de TFBSs conservados entre as espécies, pela análise com rVISTA, é indicativa de que este programa pode se constituir em ferramenta útil para o estudo de *loci* marcados.

Os resultados obtidos com o programa *RepeatMasker* indicam que o enriquecimento de elementos do tipo LINE1 em ambas as DMRs pode ser considerado como uma “assinatura de *imprinting*” desses *loci*. A conservação e distribuição dos elementos repetitivos é sugestiva de que esses elementos possam constituir um ambiente genômico propício para a regulação mediada por *imprinting*.

VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR A., ZINK D. & BECKER P. B. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. **Nature**, v. 21, p. 405-409, 2000.
- BEATTY L., WEKSBERG R. & SADOWSKI P. D. Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. **Genomics**, v. 87, p. 46-56, 2006.
- BELL A. C. & FELSENFELD G. Methylation of CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. **Nature**, v. 405, p. 482-485, 2000.
- BERNSTEIN E., DUNCAN E. M., MASUI O., GIL J., HEARD E. & ALLIS C. D. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. **Mol Cell Biol**, v. 26, p. 2560-2569, 2006.
- BOURC'HIS D., LE BOURHIS D., PATIN D., NIVELEAU A, COMIZZOLI P., RENARD J. P. & VIEGAS-PEQUIGNOT E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Curr Biol**, v. 2, p. 1542-1546, 2001.
- CAI X. & CULLEN B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. **RNA**, V. 13, p. 313-316, 2007.
- CAMPBELL K. H., MCWHIR J., RITCHIE W. A. & WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v.7, p. 64-66, 1996.
- CERRATO F., VERNUCCI M., PEDONE P. V., CHIARIOTTI L., SEBASTIO G., BRUNI C.B. & RICCIO A. The 5' end of the KCNQ1OT1 gene is hypomethylated in the Beckwith-Wiedemann syndrome. **Hum Genet**, v.111, p. 105-107, 2002.

- 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.
- CONSTÂNCIA M., HEMBERGER M., HUGHES J., DEAN W., FERGUSON-SMITH A., FUNDELE R., STEWART F., KELSEY G., FOWDEN A., SIBLEY C. & REIK W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945-948, 2002.
- CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering., **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 10881-10890, 1988.
- COX G. F., B"RGER J., LIP V., MAU U. A., SPERLING K., WU B. & HORSTHEMKE B. Intracytoplasmatic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. **Am J Hum Genet**, v. 71, p. 162-164, 2002.
- DAVIS T. L., YANG G. J., McCARREY JR. & BARTOLOMEI M. S. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. **Hum Mol Genet**, v. 22, p. 2885-2894, 2000.
- DEAN W., BOWDEN L., AITCHISON A., KLOSE J., MOORE T., MENESES J. J., REIK W. & FEIL R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. **Development**, v. 125, p. 2273-2282, 1998.
- DEAN W., SANTOS F., STOJKOVIC M., ZAKHARTTHENKO V., WALTER J., WOLF E. & REIK W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p. 13734-13738, 2001.

- DEBAUN M. R., NIEMITZ E. L., MCNEIL D. E., BRANDENBURG S. A., LEE MP. & FEINBERG A. P. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. **Am J Hum Genet**, v. 70, p. 604-611, 2002.
- DEBAUN M. R.; NIEMITZ E. L. & FEINBERG A. P. Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetics alterations of *LIT1* and *H19*. **Am J Hum Genet**, v. 72: p. 156-160, 2003.
- DOHERTY A. S.; MANN M. R. W.; TREMBLAY K. D.; BARTOLOMEI M. S.; SCHULTZ R. M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biol Reprod**, v. 62, p. 1526-1535, 2000.
- DU M., BEATTY L. G., ZHOU W., LEW J., SCHOENHERR C., WEKSBERG R. & SADOWSKI P. D. Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 1927-1939, 2003.
- DU M., ZHOU W., BEATTY L. G., WEKSBERG R. & SADOWSKI P. D. The KCNQ1OT1 promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5. **Genomics**, v. 84, p. 288-300, 2004.
- EDDY S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nat Rev Genet**, v. 2, p. 919-929, 2001.
- EGGERMANN T., SCHONHERR N., MEYER E., OBERMANN C., MAVANY M., EGGERMANN K., RANKE M. B. & WOLLMANN H. A. Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. **J Med Genet**, v. 43, p. 615-616, 2006.

- FEDORIW A. M., STEIN P., SVOBODA P., SCHULTZ R. M. & BARTOLOMEI MS. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. **Science**, v. 9, p. 238-240. 2004.
- FEIL R. Early-embryonic culture and manipulation could affect genomic imprinting. **Trends Mol Med**, v. 7, p. 245-246, 2001.
- FERGUSON-SMITH A. C., SASAKI H., CATTANACH B. M. & SURANI M. A. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. **Nature**, v. 22, p. 751-755, 1993.
- FRANK D., KESHET I., SHANI M., LEVINE A., RAZIN A. & CEDAR H. Demethylation of CpG islands in embryonic cells. **Nature**, v. 16, p. 239-241, 1991.
- FRAZER K. A., PACHTER L., POLIAKOV A., RUBIN E. M. & DUBCHAK I. VISTA: computational tools for comparative genomics. **Nucleic Acids Res**, v. 1, p. 273-279, 2004.
- FREVEL M. A., HORNBERG J. J. & REEVE A. E. A potential imprint control element: identification of a conserved 42 bp sequence upstream of H19. **Trends Genet**, v. 15, p. 216-218, 1999.
- FITZPATRICK G. V., PUGACHEVA E. M., SHIN J. Y., ABDULLAEV Z., YANG Y., KHATOD K., LOBANENKOV V.V. & HIGGINS M. J. Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. **Mol Cell Biol**, v. 27, p. 2636-2647, 2007.
- FOURNET J. C., VERKARRE V., DE LONLAY P., RAHIER J., BRUNELLE F., ROBERT J. J., NIHOUL-FEKETE C., SAUDUBRAY J. M. & JUNIEN C. Loss of imprinted genes and paternal SUR1 mutations lead to hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. **Ann Endocrinol**, v. 59, p. 485-491, 1998.

- FUJIMOTO A., MITALPOV S. M., KUO H. C. & WOLF D. P. Aberrant genomic imprinting in rhesus monkey embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 595-603, 2006.
- FULKA H., MRAZEK M., TEPLA O. & FULKA J. JR. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. **Reproduction**, v. 128, p. 703-708, 2004.
- GABORY A., RIPOCHE M. A., YOSHIMIZU T. & DANDOLO L. The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, p.188-193. 2006.
- GARRY F. B., ADAMS R., McCANN J. P. & ODDE K. G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfers cloning. **Theriogenology**, v. 45: p. 141-152, 1996.
- GASTON V., LE BOUC Y., SOUPRE V., BURGLIN L., DONADIEU J., ORO H., AUDRY G., VAZQUEZ M. P. & GICQUEL C. Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. **Eur J Hum Genet**, v. 9, p. 409-418, 2001.
- GICQUEL C, ROSSIGNOL S, CABROL S, HOUANG M, STEUNOU V, BARBU V, DANTON F, THIBAUD N, LE MERRER M, BURGLIN L, BERTRAND AM, NETCHINE I, LE BOUC Y. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. **Nat Genet**. v. 37; p. 1003-1007. 2005.
- GLENN C. C., NICHOLLS R. D., ROBINSON W. P., SAITOH S., NIIKAWA N., SCHINZEL A., HORSTHEMKE B. & DRISCOLL D. J. Modification of

- 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. **Hum Mol Genet**, v. 2, p. 1377-1382, 1993.
- GOMES M. V. , GOMES C. C. , PINTO W. JR. & RAMOS E. S. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. **Am J Med Genet A**, v. 15, p. 625-629, 2007.
- GREALLY J. M. Short interspersed transposable elements (SINEs) are excluded from imprinted regions in the human genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 8, p. 327-332, 2002.
- GRIBNAU J., HOCHEDLINGER K., HATA K., LI E. & JAENISCH R. Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization. **Genes Dev**, v. 15, p. 759-773, 2003.
- GRIMAUD C., BANTIGNIES F., PAL-BHADRA M., GHANA P., BHADRA U. & CAVALLI G. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. **Cell**, v.10, p. 957-971, 2006.
- HAGEGE H., NASSER R., WEBER M., MILLIGAN L., APTEL N., JACQUET C., DREWELL R. A., DANDOLO L., SURANI M. A., CATHALA G. & FORNE T. The 3' portion of the mouse H19 Imprinting-Control Region is required for proper tissue-specific expression of the Igf2 gene. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, p. 230-237, 2006.
- HAIG D. The (dual) origin of epigenetics. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 69, p. 67-70, 2004.
- HAN D. W., SONG S. J., UHUM S. J., DO J. T., KIM N. H., CHUNG K. S. & LEE H. T. Expression of IGF2 and IGF receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. **Zygote**, v. 11, p. 245-252, 2003.

- HARK, A. T., SCHOENHERR, C. J., KATZ, D. J., INGRAN, R. S., LEVORSE, J. M. & TILGHMAN, S. M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/IGF2 locus. **Nature**, v. 405, p. 486-489, 2000.
- HEARD E. Recent advances in X-chromosome inactivation. **Curr Opin Cell Biol**. v. 16, p. 247-255, 2004.
- HOLMES R., CHANG Y. & SOLOWAY P. D. Timing and sequence requirements defined for embryonic maintenance of imprinted DNA methylation at Rasgrf1. **Mol Cell Biol**, v. 26, p. 9564-9570, 2006.
- HUMPHERYS D., EGGAN K., AKUTSU H., FRIEDMAN A., HOCHEDLINGER K., YANAGIMACHI R., LANDER E. S., GOLUB T. R. & JAENISCH R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 12889-12894, 2002.
- HUMPHERYS D.; EGGAN K.; AKUTSU H.; HOCHEDLINGER K.; RIDEOUT III W. M.; BINISZKIEWICZ D.; YANAGIMACHI R.; JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cell and cloned mice. **Science**, v. 293, p. 95-97, 2001.
- ISLES A. R. & WILKINSON L. S. Imprinted genes, cognition and behaviour. **Trends Cogn Sci**, v. 4, p. 309-318, 2000.
- JEFFERY L. & NAKIELNY S. Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins. **J Biol Chem**, v. 19, p. 49479-49487, 2004.
- JELINIC P. & SHAW P. Loss of imprinting and cancer. **J Pathol**, v. 211, p. 261-268. 2007.
- JENUWEIN T. & ALLIS C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293: p. 1074-1080, 2001.

- JORDAN I. K., ROGOZIN I. B., GLAZKO G. V. & KOONIN E. V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. **Trends Genet**, v. 19, p. 68-72, 2003.
- KAGAMI M., NAGAI T., FUKAMI M., YAMAZAWA K. & OGATA T. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. **J Assist Reprod Genet**, v. 24, 131-136, 2007.
- KAGOTANI K, NABESHIMA H, KOHDA A, NAKAO M, TAGUCHI H, OKUMURA K. Visualization of transcription-dependent association of imprinted genes with the nuclear matrix. **Exp Cell Res**, v. 274, p.189-196, 2002.
- KANDURI C., FITZPATRICK G., MUKHOPADHYAY R., KANDURI M., LOBANENKOV V., HIGGINS M. & OHLSSON R. A differentially methylated imprinting control region within the Kcnq1 locus harbors a methylation-sensitive chromatin insulator. **J Biol Chem**, v. 277, p. 18106-18110, 2002.
- KANDURI, C., PANT, V., LOUKINOV, D., PUGACHEVA, E., QI, C-F, WOLFFE, A. OHLSSON, R. & LOBANENKOV. V. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. **Curr Biol**, v. 10, p. 853-856, 2000.
- KANG Y. K., KOO D. B., PARK J. S., CHOI Y. H., CHUNG A.S., LEE K.K. & HAN Y.M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nat Genet**, v. 28, p. 173-177, 2001.
- KAZAZIAN H. H. JR. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v. 304, p. 1626-1632, 2004.

- KE X., THOMAS N. S., ROBINSON D. O. & COLLINS A. The distinguishing sequence characteristics of mouse imprinted genes. **Mamm Genome**, v. 13, p. 639-645, 2002.
- KHOSLA, S., DEAN, W., BROWN, D., REIK, W. & FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and expression of imprinted genes. **Biol Reprod**, v. 64, p. 918-926, 2001.
- KILLIAN J. K.; NOLAN C. M.; STEWART N.; MUNDAY B. L.; ANDERSEN N. A.; NICOL S. & JIRTLE R. L. Monotreme IGF2 expression and ancestral origin of genomic imprinting. **J Exp Zool**, v. 291, p. 205-212, 2001.
- 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. **Hum Mol Genet**. v. 1, p. 233-245, 2003.
- KIM T.H., ABDULLAEV Z. K., SMITH A. D., CHING K. A., LOUKINOV D. I., GREEN R. D., ZHANG M. Q., LOBANENKOV V. V. & REN B. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. **Cell**, v. 23, p. 1231-1245, 2007.
- KRUIP T. A. M. & den DAAS J. H. G. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, v. 47, p. 43-52, 1997.
- KUWABARA T., HSIEH J., NAKASHIMA K., TAIRA K. & GAGE F. H. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. **Cell**, v. 19, p. 779-793, 2004.
- LALANDE M. & CALCIANO M. A. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. **Cell Mol Life Sci**. v. 64: p. 9479-60, 2007.

LANDER E. S., LINTON L. M., BIRREN B., NUSBAUM C., ZODY M. C.,
BALDWIN J., DEVON K., DEWAR K., DOYLE M., FITZHUGH W., FUNKE
R., GAGE D., HARRIS K., HEAFORD A., HOWLAND J., KANN L.,
LEHOCZKY J., LEVINE R., MCEWAN P., MCKERNAN K., MELDRIM J.,
MESIROV J. P., MIRANDA C., MORRIS W., NAYLOR J., RAYMOND C.,
ROSETTI M., SANTOS R., SHERIDAN A., SOUGNEZ C., STANGE-
THOMANN N., STOJANOVIC N., SUBRAMANIAN A., WYMAN D.,
ROGERS J., SULSTON J., AINSCOUGH R., BECK S., BENTLEY D.,
BURTON J., CLEE C., CARTER N., COULSON A., DEADMAN R.,
DELOUKAS P., DUNHAM A., DUNHAM I., DURBIN R., FRENCH L.,
GRAFHAM D., GREGORY S., HUBBARD T., HUMPHRAY S., HUNT A.,
JONES M., LLOYD C., MCMURRAY A., MATTHEWS L., MERCER S.,
MILNE S., MULLIKIN J. C., MUNGALL A., PLUMB R., ROSS M.,
SHOWNKEEN R., SIMS S., WATERSTON R. H., WILSON R. K., HILLIER
L. W., MCPHERSON J. D., MARRA M. A., MARDIS E. R., FULTON L. A.,
CHINWALLA A. T., PEPIN K. H., GISH W. R., CHISSOE S. L., WENDL M.
C., DELEHAUNTY K. D., MINER T. L., DELEHAUNTY A., KRAMER J. B.,
COOK L. L., FULTON R. S., JOHNSON D. L., MINX P. J., CLIFTON S.
W., HAWKINS T., BRANSCOMB E., PREDKI P., RICHARDSON P.,
WENNING S., SLEZAK T., DOGETT N., CHENG J. F., OLSEN A.,
LUCAS S., ELKIN C., UBERBACHER E., FRAZIER M., GIBBS R. A.,
MUZNY D. M., SCHERER S. E., BOUCK J. B., SODERGREN E. J.,
WORLEY K. C., RIVES C. M., GORRELL J. H., METZKER M. L.,
NAYLOR S. L., KUCHERLAPATI R. S., NELSON D. L., WEINSTOCK G.
M., SAKAKI Y., FUJIYAMA A., HATTORI M., YADA T., TOYODA A., ITOH

T., KAWAGOE C., WATANABE H., TOTOKI Y., TAYLOR T.,
WEISSENBAACH J., HEILIG R., SAURIN W., ARTIGUENAVE F.,
BROTTIER P., BRULS T., PELLETIER E., ROBERT C., WINCKER P.,
SMITH D. R., DOUCETTE-STAMM L., RUBENFIELD M., WEINSTOCK K.,
LEE H. M., DUBOIS J., ROSENTHAL A., PLATZER M., NYAKATURA G.,
TAUDIEN S., RUMP A., YANG H., YU J., WANG J., HUANG G., GU J.,
HOOD L., ROWEN L., MADAN A., QIN S., DAVIS R. W., FEDERSPIEL N.
A., ABOLA A. P., PROCTOR M. J., MYERS R. M., SCHMUTZ J.,
DICKSON M., GRIMWOOD J., COX D. R., OLSON M. V., KAUL R.,
RAYMOND C., SHIMIZU N., KAWASAKI K., MINOSHIMA S., EVANS G.
A., ATHANASIOU M., SCHULTZ R., ROE B. A., CHEN F., PAN H.,
RAMSER J., LEHRACH H., REINHARDT R., MCCOMBIE W. R., DE LA
BASTIDE M., DEDHIA N., BLOCKER H., HORNISCHER K., NORDSIEK
G., AGARWALA R., ARAVIND L., BAILEY J. A., BATEMAN A.,
BATZOGLOU S., BIRNEY E., BORK P., BROWN D. G., BURGE C. B.,
CERUTTI L., CHEN H. C., CHURCH D., CLAMP M., COPLEY R. R.,
DOERKS T., EDDY S. R., EICHLER E. E., FUREY T. S., GALAGAN J.,
GILBERT J. G., HARMON C., HAYASHIZAKI Y., HAUSSLER D.,
HERMJAKOB H., HOKAMP K., JANG W., JOHNSON L. S., JONES T. A.,
KASIF S., KASPRYZK A., KENNEDY S., KENT W. J., KITTS P., KOONIN
E. V., KORF I., KULP D., LANCET D., LOWE T. M., MCLYSAGHT A.,
MIKKELSEN T., MORAN J. V., MULDER N., POLLARA V. J., PONTING
C. P., SCHULER G., SCHULTZ J., SLATER G., SMIT A. F., STUPKA E.,
SZUSTAKOWSKI J., THIERRY-MIEG D., THIERRY-MIEG J., WAGNER
L., WALLIS J., WHEELER R., WILLIAMS A., WOLF Y. I., WOLFE K. H.,

- YANG S. P., YE H. R. F., COLLINS F., GUYER M. S., PETERSON J., FELSENFIELD A., WETTERSTRAND K. A., PATRINOS A., MORGAN M. J., DE JONG P., CATANESE J. J., OSOEGAWA K., SHIZUYA H., CHOI S., CHEN Y. J. (International Human Genome Sequencing Consortium). Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 15, p. 860-921, 2001.
- LANE N., DEAN W., ERHARDT S., HAJKOVA P., SURANI A., WALTER J. & REIK W. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. **Genesis**, v. 35, p. 88-93, 2003.
- LEE M. P., DEBAUN M. R., MITSUYA K., GALONEK H. L., BRANDENBURG S., OSHIMURA M. & FEINBERG A. P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 27: p. 5203-5208. 1999.
- LEI E. P. & CORCES V. G. RNA interference machinery influences the nuclear organization of a chromatin insulator. **Nat Genet**, v. 38, p. 936-941, 2006.
- LEWIS A., MITSUYA K., UMLAUF D., SMITH P., DEAN W., WALTER J., HIGGINS M., FEIL R. & REIK W. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. **Nat Genet**, v. 36, p. 1291-1295, 2004.
- LI E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews**, v. 3, p. 662-673, 2002.

- LI L. C. & DAHIYA R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, p. 1427-1431, 2002.
- LI L. C., OKINO S. T., ZHAO H., POOKOT D., PLACE R. F., URAKAMI S., ENOKIDA H. & DAHIYA R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 14, p. 17337-17342, 2006.
- LONG J. E. & CAI X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, v. 15, p.125-134, 2007.
- LOOTS G. G. & OVCHARENKO I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 217-221, 2004.
- LOPES S., LEWIS A., HAJKOVA P., DEAN W., OSWALD J., FORNE T., MURRELL A., CONSTANCIA M., BARTOLOMEI M., WALTER J. & REIK W. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 295-305, 2003.
- LUCIFERO D., MANN M.R., BARTOLOMEI M. S. & TRASLER J. M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Hum Mol Genet**, v. 15, p. 839-849, 2004.
- LYON M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 22, p. 372-373, 1961.
- LYON M. F. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. **Cytogenet Cell Genet**, v. 80, p. 133-137, 1998.

- MAENAKA S., HIKICHI T., IMAI M. A., MINAMOTO T. & KAWAHARA E. Loss of imprinting in IGF2 in colorectal carcinoma assessed by microdissection. **Oncol Rep**, v. 15, p. 791-795. 2006.
- MAISON C., BAILLY D., PETERS A H., QUIVY J. P., ROCHE D., TADDEI A., LACHNER M., JENUWEIN T. & ALMOUZNI G. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. **Nat Genet**, v. 30, p. 329-334, 2002.
- MANCINI-DINARDO D., STEELE S..J., INGRAM R. S. & TILGHMAN S. M. A differentially methylated region within the gene Kcnq1 functions as an imprinted promoter and silencer. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 283-294. 2003.
- MANN M. R., CHUNG Y. G., NOLEN L. D., VERONA R. I., LATHAM K. E. & BARTOLOMEI M. S. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. **Biol Reprod**, v. 69: p. 902-914, 2003.
- MARQUES C. J., CARVALHO F., SOUSA M. & BARROS A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. **Lancet**, v. 22, p. 1700-1702, 2004.
- MATTICK J. S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **Bioessays**, v. 25, p. 930-939, 2003.
- MAXFIELD E. K., SINCLAIR K. D., DOLMAN D. F., STAINES M. E. & MALTIN C. A. In vitro culture of sheep embryos increases weight, primary fibre size and secondary to primary fibre ratio in fetal muscle at day 61 of gestation. **Theriogenology**, v. 47, p 376, 1997.
- McCLINTOCK B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 36, p. 344-355, 1950.

- McGRATH J. & SOLTER D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, p. 179-183, 1984.
- MEDSTRAND P., VAN DE LAGEMAAT L. N., DUNN C. A., LANDRY JR., SVENBACK D. & MAGER D. L. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. **Cytogenet Genome Res**, v.110, p. 342-352. 2005.
- MITSUYA K., MEGURO M., LEE M. P., KATOH M., SCHULZ T. C., KUGOH H., YOSHIDA M. A., NIIKAWA N., FEINBERG A. P. & OSHIMURA M. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. **Hum Mol Genet**, v. 8, p. 1209-1217, 1999.
- MORGAN H. D., SANTOS F., GREEN K., DEAN W. & REIK W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet**, v. 15, p. 47-58, 2005.
- MUCHARDT C., GUILLEME M., SEELER J. S., TROUCHE D., DEJEAN A. & YANIV M. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. **EMBO Rep**. v. 3, p. 975-981. 2002.
- OGAWA Y, & LEE J. T. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. **Mol Cell**. v.11, p. 731-743. 2003.
- 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.
- O'NEILL M. J. The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. **Hum Mol Genet**, v. 15, p. 113-120, 2005.

- ØRSTAVIK K. H.; EIKLID K.; VAN DER HAGEN C. B., SPETALEN S.; KIERULF K.; SKJELDAL O.; BUITING K. Another Case of Imprinting Defect in a girl with Angelman Syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection. **Am J Hum Genet**, v. 72, p. 218-219, 2003.
- PANT V, KURUKUTI S, PUGACHEVA E, SHAMSUDDIN S, MARIANO P, RENKAWITZ R, KLENOVA E, LOBANENKOV V, OHLSSON R. Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. **Mol Cell Biol**, v. 24, v. 3497-3504, 2004.
- PAULER F.M., KOERNER M. V. & BARLOW D. P. Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? **Trends Genet**, v. 23, p. 284-292, 2007.
- PETRUK S., SEDKOV Y., RILEY K. M., HODGSON J., SCHWEISGUTH F., HIROSE S., JAYNES J. B., BROCK H. W. & MAZO A. Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. **Cell**, v. 15, p. 1209-1221, 2006.
- RAVENEL J. D., BROMAN K. W., PERLMAN E. J., NIEMITZ E. L., JAYAWARDENA T. M., BELL D. W., HABER D. A., UEJIMA H. & FEINBERG A. P. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. **J Natl Cancer Inst**, v. 21; p. 1698-1703, 2001.
- REIK W. & WALTER J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews**, v. 2, p. 21-32. 2001.

- REIK W.; DEAN W.; WALTER J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.
- RIZOS D., LONERGAN P., BOLAND M. P., ARROYO-GARCIA R., PINTADO B., DE LA FUENTE J., GUTIÉRREZ-ADÁN A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for Blastocyst Quality. **Biol Reprod**, v. 66, p. 589-595, 2002.
- RUGG-GUNN P. J., FERGUSON-SMITH A. C., PEDERSEN R. A. Epigenetic status of human embryonic stem cells. **Nat Genet** v. 37, p. 585-587, 2005.
- SANCHEZ-ELSNER T., GOU D., KREMMER E. & SAUER F. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax. **Science**, v. 24, p. 1118-1123, 2006.
- SANDOVICI I., LEPPERT M., HAWK P. R., SUAREZ A., LINARES Y. & SAPIENZA C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 1569-1578, 2003.
- SANTOS F. & DEAN W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, p. 643-651, 2004.
- SCHMIDT M., GREVE T., AVERY B., BECKERS J. F., SULON J. & HANSEN H. B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 527-539, 1996.
- SCHONHERR N., MEYER E., ROOS A., SCHMIDT A., WOLLMANN H. A. & EGGERMANN T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. **J Med Genet**, v. 44, p. 59-63, 2007.

- SEITZ H., YOUNGSON N., LIN S. P., DALBERT S., PAULSEN M., BACHELLERIE J. P., FERGUSON-SMITH A. C. & CAVAILLE J. Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. **Nat Genet**, v. 34, p. 261-262, 2003.
- SIEGFRIED Z., EDEN S., MENDELSON M., FENG X., TSUBERI B. Z. & CEDAR H. DNA methylation represses transcription in vivo. **Nat Genet**, v. 22, p. 203-206, 1999.
- SINCLAIR K. D., MAXFIELD E. K., ROBINSON J. J., MALTIN C. A., MC EVOY T. G., DUNNE L. D., YOUNG L. E. & BROADBENT P. J. Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. **Theriogenology**, v. 47, p. 380, 1997.
- SINCLAIR K. D., MCEVOY T. G., CAROLAN C., MAXFIELD E. K., MALTIN C. A., YOUNG L. E., WILMUT I., ROBINSON J. J. & BROADBENT P. J. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in medium supplemented with bovine sera. **Theriogenology**, v. 49, p. 218, 1998.
- SINCLAIR K. D., YOUNG L. E., WILMUT I. & McEVOY T. G. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. **Hum Reprod**, v. 15, p. 68-86, 2000
- SMILINICH N. J., DAY C. D., FITZPATRICK G. V., CALDWELL G. M., LOSSIE A. C., COOPER P. .R., SMALLWOOD A. C., JOYCE J. A., SCHOFIELD P. N., REIK W., NICHOLLS R. D., WEKSBERG R., DRISCOLL D. J., MAHER E. R., SHOWS T. B. & HIGGINS M. J. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of

- imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 6, p, 8064-8069, 1999.
- STIER S., NEUHAUS T., ALBERS P., WERNERT N., GRUNEWALD E., FORKERT R., VETTER H. & KO Y. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor 2 and the H19 gene in testicular seminomas detected by real-time PCR approach. **Arch Toxicol**, v. 80, p. 713-718, 2006.
- SURANI M. A. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. **Nature**, v. 414, p. 122-128, 2001.
- SURANI M. A., BARTON S. C. & NORRIS M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, v. 5, p. 548-550, 1984.
- SUZUKI K., SHIJUUKU T., FUKAMACHI T., ZAUNDERS J., GUILLEMIN G., COOPER D. & KELLEHER A. Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region. **Journal of RNAi and Gene Silencing**, v. 1, p. 66-78, 2005.
- TAKAI D., GONZALES F. A., TSAI Y. C., THAYER M. J. & JONES P. A. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 2619-2626, 2001.
- THAKUR N., KANDURI M., HOLMGREN C., MUKHOPADHYAY R. & KANDURI C. Bidirectional silencing and DNA methylation-sensitive methylation-spreading properties of the Kcnq1 imprinting control region map to the same regions. **J Biol Chem**, v. 14, p. 9514-9519, 2003.

- TING A. H., SCHUEBEL K. E., HERMAN J. G. & BAYLIN S. B. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. **Nat Genet**, v. 37, p. 906-910. 2005.
- UEDA T., ABE K., MIURA A., YUZURIHA M., ZUBAIR M., NOGUCHI M., NIWA K., KAWASE Y., KONO T., MATSUDA Y., FUJIMOTO H., SHIBATA H., HAYASHIZAKI Y. & SASAKI H. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. **Genes Cells**, v. 5, p. 649-59, 2000.
- VOLPE T. A., KIDNER C., HALL I. M., TENG G., GREWAL S. I. & MARTIENSSEN R. A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v. 13, p. 1833-1837. 2002.
- WAGSCHAL A. & FEIL R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, p. 90-98, 2006.
- WALKER S. K., HARTWICH K. M. & SEAMARK R. F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology**, v. 45, p. 111-120, 1996.
- WASSENEGGER M., HEIMES S., RIEDEL L. & SANGER H. L. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. **Cell**, v. 11; p. 567-576, 1994
- WATERLAND R. A. & JIRTLE R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, v. 20, p. 63-68, 2004.
- WATERLAND R. A. & JIRTLE R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 5293-5300. 2003.

- WEBER M, HAGEGE H, MURRELL A, BRUNEL C, REIK W, CATHALA G, FORNE T. Genomic imprinting controls matrix attachment regions in the Igf2 gene. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 8953-8959, 2003.
- WHITELAW E. & MARTIN D. I. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. **Nat Genet**, v. 27, p. 361-365, 2001.
- WILLADSEN S. M., JANZEN R. E., Mc ALLISTER R. J., SHEA B. F., HAMILTON G. & Mc DERMAND. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplatatio in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 161-170, 1991.
- WILLIAMS A. E.; MOSCHOS S. A.; PERRY M. M.; BARNES P. J.; LINDSAY M. A. Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. **Dev Dyn**, 236: 572-580. 2007
- WRENZYCKI C., HERRMANN D., KESKINTEPE L., MARTINS JR. A., SIRISATHIEN S., BRACKETT B., NIEMANN H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod**, v. 16, p. 893-901, 2001.
- WRENZYCKI C., HERRMANN D., LUCAS-HAHN A., GEBERT C., KORSawe K., LEMME E., CARNWATH J. W. & NIEMANN H. Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. **Birth Defects Res C Embryo Today**. v. 75: p. 1-9. 2005.
- XIONG Z. & LAIRD P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res**, v. 15, p. 2532-2534, 1997.

- YANG X, SMITH SL, TIAN XC, LEWIN HA, RENARD JP, WAKAYAMA T.
Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for
therapeutic cloning. *Nat Genet.* 2007 Mar;39(3):295-302.
- YODER J. A., WALSH C. P. & BESTOR T. H. Cytosine methylation and the
ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet**, v. 13, p. 335-340, 1997.
- YOUNG L. E., SCHNIEKE A. E., MCCREATH K. J., WIECKOWSKI S.,
KONFORTOVA G., FERNANDES K., PTAK G., KIND A. J., WILMUT I.,
LOI P. & FEIL R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in
sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mech Dev**, v. 120: p. 1433-
1442. 2003.
- YOUNG L. E., SINCLAIR K. D. & WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle
and sheep. **Rev Reprod.** v.3:p. 155-163, 1998.
- YOUNG L.E., FERNANDES K., MCEVOY T. G., BUTTERWITH S. C.,
GUTIERREZ C. G., CAROLAN C., BROADBENT P. J., ROBINSON J. J.,
WILMUT I. & SINCLAIR K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated
with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nat Genet**, v. 27, p. 153-
154, 2001.

ANEXOS

Anexo 1.

A) Fragmento da H19DMR com homologia a ESTs do banco de dados bovinos do *GenBank*.

```
5'CTCACTCAGTCATGTCCAACCTCTGCAACCCCATGGACCATAGCTCGCCA
GGCTTCCCTGTCCATCATTATCTCCTGGAACCTTGTTCAAACCTCATGTCTATT
GAGTCGGTGATGCCATCCAACCATCTCATCCTCTGTGTCGTCCCCTTCTCCTC
CTGCCCTCAATCTTTCCCAGCATCAGGGTCTTTTCCAATGAGTCAGTT 3'
```

B) Resultado representativo da busca por ESTs no *GenBank* (banco de ESTs bovinas).

Anexo 2

Sequências dos *primers* para análise da metilação na KvDMR1 bovina (bKvDMR1) e para os sítios de ligação de CTCF na H19DMR (CTCF-5, CTCF-6, CTCF-7). (S) *primer sense*; (AS) *primer antisense*.

bKvDMR1 (S)	5' - TAGTTTTTTTAGTTAATGGTAGAG – 3'
bKvDMR1 (AS)	5'- CTACAAAATAACTACAATAACCC -3'

CTCF-5 (S)	5' - ATTTTATAGATAGGGTTGAGAGG – 3'
CTCF-5 (AS)	5' - TAACTTAAACAAATATCCCATCC – 3'

CTCF-6 (S)	5'- TGTTTTGGGTTGATTAAATAGATT – 3'
CTCF-6 (AS)	5'- TCTAACCTATACAAACCAACAAA – 3'

CTCF-7 (S)	5' - TTAGTTTTTTTGGTGGTATAGGG -3'
CTCF-7 (AS)	5' - CCACTTTTAACTATAATCAAACC – 3'

Anexo 3

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fone: 55 16 39114130 Fax: 55 16 36213552
E-mail: editor@gmb.org.br

Ribeirão Preto, May 10, 2007.

**Ref.: MS 2006/179R2 - EXPRESSION OF *CTCF* GENE IN BOVINE
OOCYTES AND PREIMPLANTATION EMBRYOS**

Dear Mr. Rios,

Thank you for sending the revised version of your manuscript. I am pleased to inform you that it is now accepted for publication as Short Communication.

Before typesetting the manuscript will be copy-edited for technical style and language and you will receive the copy-edited version of your manuscript for final approval.

Thank you for submitting your interesting results to *Genetics and Molecular Biology*.

Yours sincerely

Klaus Hartfelder
Assistant Editor
Genetics and Molecular Biology
editor@gmb.org.br