

**MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS REGIÕES
CANDIDATAS A ICRs NO GENOMA BOVINO**

JÉSSICA MACEDO RAFAEL DE ARRUDA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO 2026**

**MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS REGIÕES
CANDIDATAS A ICRs NO GENOMA BOVINO**

JÉSSICA MACEDO RAFAEL DE ARRUDA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios

Campos Dos Goytacazes - RJ

Fevereiro 2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A779

Arruda, Jessica Macedo Rafael de.

MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS REGIÕES CANDIDATAS A ICRs NO GENOMA BOVINO. / Jessica Macedo Rafael de Arruda. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

168 f. : il.

Bibliografia: 132 - 151.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientador: Álvaro Fabrício Lopes Rios.

1. Epigenética. 2. *Imprinting* Genômico. 3. Bioinformática. 4. Tecnologias de Reprodução Assistida. 5. Síndrome do Bezerro Grande. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS REGIÕES CANDIDATAS A ICRs NO GENOMA BOVINO

JÉSSICA MACEDO RAFAEL DE ARRUDA

Dissertação apresentada ao Centro de Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2026.

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
ANGELO JOSE BURLA DIAS
Data: 23/03/2026 08:31:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ângelo José Burla Dias (Doutor em Biotecnologia e Biotecnologia) LRMGA/UENF



Documento assinado digitalmente
DOUGLAS TERRA MACHADO
Data: 24/03/2026 07:08:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Douglas Terra Machado (Doutor em Genética) LABINFO/LNCC



Documento assinado digitalmente
FILIFE BRUM MACHADO
Data: 27/03/2026 11:32:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Filipe Brum Machado (Doutor em Genética) Departamento de Ciências Biológicas/
UEMG



Documento assinado digitalmente
ALVARO FABRICIO LOPES RIOS
Data: 27/03/2026 12:32:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor em Genética) LBT/UENF - Orientador

Dedico esta dissertação ao meu filho, Théo Rafael, que me acompanha desde o ventre em minha caminhada acadêmica. Em muitos dias, desejei estar com você, mas, por compromisso com a pesquisa, precisei fazer escolhas difíceis. Filho, mesmo tão pequeno, você me ensina, todos os dias, sobre resiliência e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por permitir que mais um sonho se tornasse realidade. Enfrentei desafios que me tiraram da zona de conforto, mas aprendi que, quando entregamos o nosso caminho ao Senhor e confiamos Nele, Ele age em nosso favor (Salmo 37:5).

Agradeço ao meu filho, Théo Rafael, por compreender, mesmo tão pequeno, que nem sempre a mamãe poderia estar presente. Obrigada por brincar quietinho ao meu lado para que eu pudesse estudar, pela paciência e pela perseverança ao longo de tantos dias. Você é meu incentivo diário.

Agradeço a Gutierre Arruda, por sempre acreditar em mim e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigada por me apoiar nas minhas decisões, por ser meu ombro amigo e por acolher minhas dores, enxugando tantas lágrimas ao longo desse caminho.

Agradeço à minha família e aos amigos que se tornaram parte dela, pelo carinho, pelo apoio e por vibrarem com cada passo dessa caminhada. Obrigada por compreenderem meus momentos de distância e por seguirem presentes, mesmo assim. Levo vocês sempre comigo.

Agradeço, em especial, ao meu orientador, o Professor Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, pela orientação, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições ao longo deste trabalho. Sua condução, competência e rigor científico foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UNF) por proporcionar a estrutura e o ambiente acadêmico necessários à realização desta dissertação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PGBB) pelo suporte institucional, pela organização e pelo acolhimento ao longo desta trajetória.

Agradeço à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, ainda, ao Estado do Rio de Janeiro pelo incentivo à ciência e à pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio à pós-graduação e ao fortalecimento da pesquisa no Brasil.

É justo que muito custe o que muito vale.

Santa Teresa d'Ávila

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Justificativa	22
1.1. Objetivos	23
1.1.1. Objetivo Geral	23
1.1.2. Objetivos Específicos	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Mecanismos de regulação epigenética	25
2.1.1. Metilação do DNA	25
2.2. Imprinting genômico	28
2.2.1. Regulação epigenética em genes regulados por imprinting genômico	30
2.2.2. DMRs primárias e secundárias	31
2.2.3. Tipos de imprinting genômico: canônico e não canônico	32
2.2.4. Programação epigenética do imprinting durante o desenvolvimento	34
2.2.5. Desmetilação global nas células germinativas primordiais	35
2.2.6. Mecanismos moleculares associados à regulação do imprinting genômico	36
2.2.6.1. Fatores de manutenção do imprinting: ZFP57, NLRP2 e ZFP42	36
2.2.7. Perfis de metilação em tecidos somáticos e embrionários	39
2.2.8. Funções biológicas dos genes regulados por imprinting genômico	40
2.2.9. Perda do imprinting genômico	42
2.3. Biotecnologias reprodutivas	44
2.3.1. Síndromes ligadas ao imprinting em humanos e ruminantes	47
2.4. Avanços recentes na caracterização do imprinting em bovinos	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1. Fluxo do trabalho bioinformático	51
3.2. Coleta de dados e amostras	52
3.2.1. Coleta das coordenadas genômicas	52
3.2.2. Obtenção de dados públicos de metilomas bovinos	53
3.3. Processamento dos dados	54
3.4. Caracterização do perfil de metilação nas ICRs	57
3.5. Visualização dos dados gráficos	58
3.6. Disponibilização dos resultados	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Identificação e mapeamento das ICRs	61
4.2. Caracterização do perfil de metilação em bovinos a partir de ICRs conhecidas	62
4.3. Análise do perfil de metilação em diferentes ICRs e diferentes estruturas e tecidos	63
4.3.1. ICRs conhecidas - perfil de 5mC% em gametas	63
4.3.2. ICRs candidatas - perfil de 5mC% em gametas	66
4.3.3. Estruturas e tecidos Adulto: ICRs conhecidas	68
4.3.4. Estruturas e tecidos adulto: ICRs candidatas	74
4.3.5. Tecido embrionário: ICRs conhecidas	77
4.3.6. Tecido embrionário: ICRs candidatas	80
4.4. Análise do impacto das ARTs nas ICRs	82
4.4.1. Blastocisto: ICRs conhecidas	82

4.4.2. Blastocisto: ICRs candidatas.....	85
4.4.3. Músculo: ICRs conhecidas.....	88
4.4.4. Músculo: ICRs candidatas.....	92
4.4.5. Sangue: ICRs conhecidas.....	97
4.4.6. Sangue: ICRs candidatas.....	101
5. DISCUSSÃO.....	107
5.1. Caracterização do perfil de metilação das ICRs conhecidas e candidatas.....	107
5.2. Impacto das ARTs nas ICRs.....	115
6. CONCLUSÃO.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
8. APÊNDICES.....	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do domínio IGF2/H19.....	39
Figura 2. Fluxograma do pipeline de bioinformática.....	51
Figura 3. Demonstração visual de regiões gênicas classificadas como ICR candidata.....	53
Figura 4. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em grupos gaméticos (oócito e espermatozoide) para ICRs conhecidas.....	64
Figura 5. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em oócitos e espermatozoides de ICRs candidatas.....	67
Figura 6. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no sangue, no cérebro, na glândula mamária e no ovário de ICRs conhecidas.....	69
Figura 7. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no músculo LD e músculo esquelético de ICRs conhecidas.....	72
Figura 8. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no sangue, no cérebro, na glândula mamária e no ovário de ICRs candidatas.....	74
Figura 9. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no músculo LD e músculo esquelético de ICRs candidatas.....	76
Figura 10. Dotplot com padrões de metilação do DNA em tecido embrionário no estágio de blastocisto para ICRs conhecidas.....	78
Figura 11. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em tecido embrionário no estágio de blastocisto de ICRs candidatas.....	80
Figura 12. Volcano plot ($\Delta\beta$) da metilação por ICR na comparação Controle vs grupo de estudo.....	83
Figura 13. ComplexHeatmap dos beta-valores de metilação em blastocisto (controle e FIV/PIV) para ICRs conhecidas.....	84
Figura 14. Volcano plot ($\Delta\beta$) da metilação por ICR na comparação Controle vs grupo de estudo.....	86
Figura 15. ComplexHeatmap dos beta-valores de metilação em blastocistos (controle e FIV/PIV) de ICRs candidatas.....	87
Figura 16. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs IA Saudável.....	89
Figura 17. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs FIV/PIV Saudável.....	90

Figura 18. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs FIV/PIV LOS.....	91
Figura 19. ComplexHeatmap do perfil de metilação do DNA no tecido muscular (ICRs conhecidas), com agrupamento das amostras e anotação por grupo.....	92
Figura 20. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: controle vs FIV/PIV LOS.....	93
Figura 21. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: Controle vs FIV/PIV Saudável.....	94
Figura 22. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: controle vs IA saudável.....	95
Figura 23. ComplexHeatmap do perfil de metilação do DNA das ICRs candidatas no músculo.....	96
Figura 24. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo Controle Saudável vs ART Saudável.....	98
Figura 25. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo controle saudável vs IA saudável.....	99
Figura 26. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo controle saudável e IA SLOS.....	100
Figura 27. ComplexHeatmap de metilação (β) das ICRs conhecidas no sangue...	101
Figura 28. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs ART saudável.....	103
Figura 29. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs IA saudável.....	104
Figura 30. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs IA SLOS.....	105
Figura 31. ComplexHeatmap dos valores de metilação (β) das 15 ICRs candidatas no sangue, com agrupamento hierárquico das amostras e indicação dos grupos...	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do perfil de metilação em bovinos a partir de ICRs conhecidas.....	62
Tabela 2. ICRs com diferença significativa ($p < 0,05$) entre blastocistos controle e a PIV de blastocistos bovinos.....	82
Tabela 3. ICRs candidatas com diferença significativa ($p < 0,05$) entre blastocistos controle e a PIV de blastocistos bovinos.....	85
Tabela 4. ICRs conhecidas significativas no tecido muscular, comparando controle com IA Saudável, PIV Saudável e PIV LOS.....	88
Tabela 5. ICRs candidatas significativas no tecido muscular, comparando controle com IA Saudável, PIV Saudável e PIV LOS.....	93
Tabela 6. ICRs conhecidas significativas no tecido sanguíneo, comparando controle com ART saudável, IA saudável e IA LOS.....	97
Tabela 7. ICRs candidatas significativas no tecido sanguíneo, comparando controle com ART saudável, IA saudável e IA LOS.....	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas em gametas (oócito e espermatozoide).....	65
Quadro 2. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas em gametas (oócito e espermatozoide).....	68
Quadro 3. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas no sangue, cérebro, glândula mamária e ovário.....	70
Quadro 4. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas em músculo <i>longissimus dorsi</i> e músculo esquelético.....	73
Quadro 5. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas no sangue, cérebro, glândula mamária e ovário.....	75
Quadro 6. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas em músculo <i>longissimus dorsi</i> e músculo esquelético.....	77
Quadro 7. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas no tecido embrionário na fase de blastocisto.....	79
Quadro 8. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas no tecido embrionário em fase de blastocisto.....	81

APÊNDICES

Apêndice A. Amostras grupo controle.....	148
Apêndice B. Amostras grupo caso.....	152
Apêndice C. Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata por tecido.....	153
Apêndice D. Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR conhecidas gametas.....	156
Apêndice E. Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata por tecidos somáticos.....	157
Apêndice F. Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata nos gametas.....	158
Apêndice G. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Embrião (Blastocisto) para as ICRs conhecidas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	159
Apêndice H. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Sangue para as ICRs conhecidas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	160
Apêndice I. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Músculo para as ICRs conhecidas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	162
Apêndice J. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Embrião (Blastocisto) para as ICRs candidatas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	163
Apêndice K. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Sangue para as ICRs candidatas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	164
Apêndice L. Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Músculo para as ICRs candidatas: Controle <i>versus</i> estudo de caso.....	164
Apêndice M. Regiões de <i>imprinting</i> analisadas, ICRs conhecidas no genoma bovino.....	165
Apêndice N. Regiões de <i>imprinting</i> analisadas, ICRs candidatas no genoma bovino.....	167

ABREVIATURAS

5mC – 5-Metilcitosina

AOS – Síndrome Do Bezerro Grande (*Abnormal Offspring Syndrome*)

ARTs – Tecnologias De Reprodução Assistida

CTCF – *CCCTC-Binding Factor*

DMRs – Regiões Diferencialmente Metiladas

DMRs Primárias - *Germline Differentially Methylated Regions*

DMRs Secundárias - *Secondary Differentially Methylated Regions*

DNMTs – DNA Metiltransferases

FIV – Fertilização *In Vitro*

gDMRs – Regiões Diferencialmente Metiladas Germinativas

IA – Inseminação Artificial

iDMRs – Regiões Diferencialmente Metiladas De *Imprinting* (*Imprinted Differentially Methylated Regions*)

ICR – Regiões Controladoras De *Imprinting* (*Imprinting Controlling Regions*)

lncRNA – RNA Longo Não Codificante (*Long Non-Coding RNA*)

LOI – Perda De *Imprinting* (*Loss Of Imprinting*)

LOM – Perda De Metilação (*Loss Of Methylation*)

LOS - *Large Offspring Syndrome*

miRNAs – MicroRNAs

MLID – Distúrbio De *Imprinting* Multilocus (*Multi-Locus Imprinting Disturbance*)

MLMD – Defeitos De Metilação Multilocus (*Multi-Locus Methylation Defects*)

mRNA – RNA Mensageiro

MIV – Maturação *In Vitro*

ncRNAs – RNAs Não Codificantes

NGS – Sequenciamento De Nova Geração (*Next Generation Sequencing*)

PIV – Produção *In Vitro*

SCNT – Transferência Nuclear De Células Somáticas

SLOS – LOS Espontânea (*Spontaneously Large Offspring Syndrome*)

TADs – Domínios Topologicamente Associadores (*Topologically Associating Domains*)

TET – *Ten-eleven Translocation*

WGBS – *Whole Genome Bisulfite Sequencing*

RESUMO

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético que resulta na expressão monoalélica de genes de forma parental específica. Em bovinos, a caracterização genômica desses genes regulados por *imprinting* genômico ainda é limitada, em contraste com o que ocorre em humanos. Este estudo teve como objetivo caracterizar novas regiões controladoras de *imprinting* (ICRs – *Imprinting Control Regions*) no genoma bovino, utilizando análises *in silico* de dados públicos de metilação do DNA, gerados por *Whole Genome Bisulfite Sequencing*. Amostras de diferentes estruturas e tecidos, blastocistos *in vivo* (N=3), blastocistos *in vitro* (N=7), sangue controle (N=20), sangue ARTs (N=11), cérebro (N=13), glândula mamária (N=11), músculo *longissimus dorsi* (N=16), músculo (N=11), músculo ARTs (N=14), ovário (N=10), oócitos (N=23) e espermatozoides (N=41), foram analisadas para identificar padrões específicos de metilação e ICRs associadas a genes regulados por *imprinting* genômico. As coordenadas relacionadas às posições físicas cromossômicas do genoma bovino foram comparadas às regiões controladoras de *imprinting* humanas, convertidas com a ferramenta *LiftOver* do UCSC *Genome Browser*. O *pipeline* proposto utilizou ferramentas de bioinformática para garantir uma avaliação precisa dos níveis de metilação do DNA nas ICRs analisadas, como Trim Galore, Bismark, FastQC e WGBStools. A estratégia adotada combinou critérios de validação com coordenadas humanas, perfil binário em gametas, metilação alelo-específica em pelo menos três tecidos (oócito, espermatozoide e sangue) no UCSC e sobreposição aos sítios de ligação de *ZFP57*. A integração dos resultados dessas análises possibilitou a identificação de ICRs conservadas entre bovinos e humanos. A presente dissertação avançou na caracterização de ICRs em bovinos ao integrar evidências epigenéticas, reduzindo uma lacuna decorrente da escassez e da inconsistência de coordenadas descritas na literatura. Essa avaliação permitiu definir 63 regiões no genoma bovino, sendo 48 ICRs já reportadas e 15 novas candidatas. As análises demonstraram que, em geral, o perfil médio de metilação foi de $52,49\% \pm 5,05$. Em tecidos somáticos, a *ICR15* se destacou por apresentar níveis bimodais próximos de 50% e baixa variabilidade. Quanto ao impacto das tecnologias de reprodução assistida - ARTs nas ICRs, os resultados apontam que no embrião produzido por PIV há diferenças significativas em ICRs conhecidas, incluindo hipermetilação em *HERC3/NAP1L5* e hipometilação em

BLCAP/NNAT e *MRPL23/H19*. Em músculo, observou-se instabilidade em domínios bem caracterizados, como *KCNQ1OT1* e *IGF2R/AIRN*, além de um contraste importante entre ARTs saudáveis e casos associados à LOS. No mesmo tecido, foram avaliadas ICRs ainda pouco exploradas na literatura bovina para ART/LOS, como o ganho de metilação em *LINC01267* e a perda consistente em *SMTN*, em amostras de inseminação artificial. No sangue, os resultados apontam ganhos de metilação, por exemplo, em *PLAGL1/HYMAI* e *SNHG14/SNRPN/SNURF*. Também foi detectada a ocorrência de perdas de metilação, por exemplo, para *NPAS3* e *SMTN*. Os resultados obtidos permitirão que novos estudos com um conjunto mais completo de genes regulados por *imprinting* genômico sejam realizados em bovinos, permitindo avanços em estudos comparativos entre humanos e bovinos nas áreas de biotecnologia reprodutiva e de células pluripotentes que apresentam um grande índice de falhas epigenéticas relacionadas a esse grupo específico de genes.

Palavras-chave: Epigenética; *Imprinting* Genômico; Bioinformática; Tecnologias de Reprodução Assistida; Síndrome do Bezerro Grande.

ABSTRACT

Genomic imprinting is an epigenetic mechanism that results in the monoallelic expression of genes in a parent-of-origin-specific manner. In cattle, the genomic characterization of genes regulated by genomic imprinting remains limited, in contrast to what has been described in humans. This study aimed to characterize novel imprinting control regions (ICRs – Imprinting Control Regions) in the bovine genome using *in silico* analyses of publicly available DNA methylation data generated by Whole Genome Bisulfite Sequencing. Samples from different structures and tissues, including *in vivo* blastocysts (N=3), *in vitro* blastocysts (N=7), control blood (N=20), ART blood (N=11), brain (N=13), mammary gland (N=11), longissimus dorsi muscle (N=16), muscle (N=11), ART muscle (N=14), ovary (N=10), oocytes (N=23), and spermatozoa (N=41), were analyzed to identify specific methylation patterns and ICRs associated with genomically imprinted genes. The coordinates corresponding to chromosomal physical positions in the bovine genome were compared with human imprinting control regions, converted using the LiftOver tool from the UCSC Genome Browser. The proposed pipeline employed bioinformatics tools to ensure accurate evaluation of DNA methylation levels in the analyzed ICRs, including Trim Galore, Bismark, FastQC, and WGBStools. The adopted strategy combined validation criteria based on human coordinates, binary methylation profiles in gametes, allele-specific methylation in at least three tissues (oocyte, spermatozoon, and blood) in the UCSC Genome Browser, and overlap with ZFP57 binding sites. The integration of these analyses enabled the identification of ICRs conserved between cattle and humans. This dissertation advanced the characterization of ICRs in cattle by integrating epigenetic evidence, reducing a gap resulting from the scarcity and inconsistency of genomic coordinates described in the literature. This evaluation allowed the definition of 63 regions in the bovine genome, including 48 previously reported ICRs and 15 novel candidate regions. Analyses showed that, overall, the average methylation profile was $52.49\% \pm 5.05$. In somatic tissues, ICR15 stood out for exhibiting bimodal levels close to 50% and low variability. Regarding the impact of assisted reproductive technologies (ARTs) on ICRs, the results indicate that embryos produced by *in vitro* fertilization exhibit significant differences in known ICRs, including hypermethylation at HERC3/NAP1L5 and hypomethylation at BLCAP/NNAT and MRPL23/H19. In muscle tissue, instability

was observed in well-characterized domains such as KCNQ1OT1 and IGF2R/AIRN, as well as an important contrast between healthy ART samples and cases associated with Large Offspring Syndrome (LOS). In the same tissue, ICRs still poorly explored in the bovine ART/LOS literature were evaluated, such as methylation gain at LINC01267 and consistent loss at SMTN in artificial insemination samples. In blood, the results indicate methylation gains, for example, at PLAGL1/HYMAI and SNHG14/SNRPN/SNURF. Methylation losses were also detected, for example, at NPAS3 and SMTN. The results obtained will enable future studies with a more comprehensive set of genomically imprinted genes in cattle, supporting advances in comparative studies between humans and cattle in reproductive biotechnology and pluripotent cell research, areas that present a high rate of epigenetic failures related to this specific group of genes.

Keywords: Epigenetics; Genomic Imprinting; Bioinformatics; Assisted Reproductive Technologies; Large Offspring Syndrome.

1. INTRODUÇÃO

O *imprinting* genômico é um mecanismo de regulação epigenética responsável pela expressão monoalélica de um conjunto específico de genes em mamíferos placentários e marsupiais (Barlow; Bartolomei, 2014). Nesse mecanismo, a expressão gênica ocorre de maneira diferenciada, em que um alelo é expresso e o outro permanece silenciado a depender da origem parental alélica (Bartolomei; Oakey; Wutz, 2020).

A regulação do *imprinting* genômico é controlada por regiões controladoras de *imprinting* (*Imprinting Control Regions* - ICRs) as quais apresentam um *status* epigenético diferencial entre alelos de origem parental diferente. Por exemplo, quando relacionados a metilação do DNA, essas regiões são denominadas regiões diferencialmente metiladas (*Differentially Methylated Region* - DMRs). O conjunto de genes regulados por uma ICR forma domínios com tamanhos variados, entre dezenas de quilobases à megabases. Esses domínios são responsáveis pela regulação da expressão monoalélica de vários genes vizinhos a essa ICR (Rutkowska; Xu; Flisikowski, 2019; Sanli; Feil, 2015).

Diversos genes regulados por esse mecanismo têm sido amplamente estudados na literatura, principalmente em humanos, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*Insulin-like growth factor 2, IGF2*), expresso de forma paterna e que desempenha papel fundamental no crescimento corporal e placentário (Masunaga *et al.*, 2020) e o *H19*, um RNA longo não codificante (*long non-coding RNA, lncRNA*), transcrito de forma materna e associado à supressão do crescimento (Ghafouri-Fard; Esmaeili; Taheri, 2020).

Estudos recentes têm relacionado os genes *IGF2* e *H19* à mutações gênicas e epimutações, que estão entre os principais fatores envolvidos em síndromes associadas ao desenvolvimento humano (Masunaga *et al.*, 2020; Hara *et al.*, 2024). Além disso, *IGF2* e *H19* também têm sido investigados em bovinos, especialmente quando avaliam o impacto de tecnologias de reprodução assistida (*Assisted Reproductive Technology* - ARTs), nos quais observou-se aumento da expressão desses genes em zigotos (Verruma *et al.*, 2024).

Estudos buscam compreender a ligação desses genes à etiologia de síndromes relacionadas a alterações no *imprinting* genômico em humanos e bovinos (Mangiavacchi *et al.*, 2022). Os genes como o *IGF2*, *H19* e o *KCNQ1OT1* possuem

homólogos entre essas espécies, cujas falhas epigenéticas culminam em características fenotípicas aberrantes similares, o que auxilia na utilização do modelo bovino como um comparativo para o entendimento das epimutações em humanos (Robbins *et al.*, 2012). Ademais, outros estudos têm sugerido que o impacto das ARTs, como a Fertilização *in vitro* (FIV), e a Transferência Nuclear de Células Somáticas (*Somatic Cell Nuclear Transfer* - SCNT), por exemplo, podem acarretar no aumento da incidência de síndromes associadas a falhas epigenéticas em genes regulados por *imprinting* genômico (Verruma *et al.*, 2024; Kaneda *et al.*, 2017).

1.1. Justificativa

Considerando o papel dos genes regulados por *imprinting* genômico em mecanismos como o desenvolvimento embrionário e fetal, no desenvolvimento da placenta, em mecanismos de interação materno-infantil, em aspectos comportamentais em mamíferos, na etiologia de diferentes tipos de câncer e na sua aparente instabilidade a manipulação em sistemas *in vitro*, é de fundamental importância a caracterização de modelos comparativos para estudos inter espécies (Masunaga *et al.*, 2020; Hara *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021; O'Doherty *et al.*, 2012). A caracterização do metiloma em diversas estruturas e tecidos bovinos, como cérebro, músculo, sangue, oócito, espermatozoide e glândula mamária, por meio da análise de dados públicos de *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS), representa um avanço significativo para a compreensão dos mecanismos epigenéticos nesses animais.

A identificação de novas ICRs no genoma bovino fornecerá informações valiosas sobre o controle epigenético do desenvolvimento e sua relação com processos normais e patológicos. Além disso, a comparação com regiões reguladas pelo *imprinting* genômico descritas no genoma humano (Jima *et al.*, 2022; Rosenski *et al.*, 2025) permite identificar *loci* conservados entre as espécies, ampliando o conhecimento sobre a regulação epigenética em mamíferos e sua implicação em doenças epigenéticas, como a síndrome de *Beckwith-Wiedemann* (BWS) e a síndrome de *Silver-Russell* (SRS).

A identificação das coordenadas genômicas das ICRs existentes e os mecanismos para encontrá-las são de extrema importância, pois permitem que

novos pesquisadores apliquem esses achados em outros estudos com bovinos e demais espécies de mamíferos. Além disso, a comparação entre animais nascidos por monta natural e animais nascidos por ARTs abre novas discussões sobre o impacto dessas tecnologias na epigenética e sobre como manipular esses indivíduos de forma mais segura possível, a fim de minimizar os impactos no epigenoma.

A identificação das coordenadas genômicas das ICRs é útil para ser aplicada como marcador epigenético, auxiliando na avaliação dos impactos de biotecnologias reprodutivas, como SCNT e PIV, sobre os padrões de metilação do DNA. Os dados gerados poderão servir como base de comparação para estudos com outros mamíferos, fortalecendo o uso de bovinos como modelo para investigações futuras. Os resultados obtidos contribuirão significativamente para estudos sobre regulação gênica, reprodução assistida e biotecnologia animal, abrindo novas perspectivas para futuras pesquisas na área.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

Caracterizar e definir a localização de ICRs conhecidas, e identificar novas regiões candidatas ao *imprinting* no genoma bovino (ARS-UCD1.2/bosTau9), por meio da análise de dados públicos de metilação do DNA obtidos por WGBS, com ênfase em estruturas e tecidos específicos e na avaliação do impacto das ARTs sobre essas regiões.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Realização do *liftOver* das coordenadas genômicas de ICRs conhecidas em humanos para o genoma bovino, a fim de identificar *loci* ortólogos potenciais;
- b) Identificar perfis de DMRs característicos de *imprinting* (um alelo totalmente metilado e outro totalmente não metilado) em ICRs a partir de dados de WGBS gerados de amostras de sangue periférico, oócito e espermatozoide, utilizando dados do UCSC Genome Browser;

- c) Análise de DMRs próximas a genes *imprinted* conhecidos, verificando a consistência do padrão alélico de metilação e sua conservação entre estruturas e tecidos;

- d) Comparação das DMRs conhecidas e novas regiões candidatas ao *imprinting* entre diferentes estruturas e tecidos bovinos (blastocisto, sangue, cérebro, músculos, glândula mamária, ovário, oócito e espermatozoide) para caracterizar o perfil de metilação específico de cada estruturas e tecido;

- e) Avaliação do impacto das ARTs sobre as DMRs conhecidas e novas regiões candidatas ao *imprinting* por meio da comparação entre amostras de animais gerados por ARTs e monta natural, com foco em tecidos de sangue, músculo e oócito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mecanismos de regulação epigenética

O epigenoma reúne diferentes camadas de controle que atuam sobre o genoma, como modificações em histonas, remodelamento da cromatina, RNAs não codificantes, metilação do DNA e a organização tridimensional da estrutura da cromatina (Sindhu *et al.*, 2024). Em conjunto, esses mecanismos ajudam a explicar por que indivíduos da mesma espécie e com genoma semelhante podem apresentar variações fenotípicas e respostas biológicas distintas ao longo do desenvolvimento e diante do ambiente (Zhang *et al.*, 2019).

Os mecanismos epigenéticos, como as modificações de histonas, metilação do DNA e RNAs não codificantes, como os microRNAs, são elementos que podem produzir alterações fenotípicas, pois são responsáveis por alterar padrões de expressão gênica (Zhang; Lu; Chang, 2020). Alterações nesses mecanismos podem afetar padrões de expressão gênica e, quando desreguladas, têm sido associadas a diferentes condições patológicas, incluindo câncer, doenças autoimunes e síndromes de base molecular complexa (Chen *et al.*, 2024).

2.1.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA em mamíferos é reconhecida como um dos principais mecanismos epigenéticos envolvidos no controle de processos biológicos fundamentais. Evidências de estudos genéticos reforçam que essa modificação não se limita a acompanhar a regulação gênica, mas constitui um requisito para o desenvolvimento dos mamíferos e para a capacidade do organismo de responder e se ajustar a sinais ambientais (Liu *et al.*, 2016).

Do ponto de vista molecular, a metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil às bases nitrogenadas e em eucariotos ocorre predominantemente na citosina (Zhao *et al.*, 2020). Em mamíferos, essa modificação corresponde à adição covalente de um grupo metil ao quinto carbono da citosina, formando a 5-metilcitosina (5mC), processo que ocorre majoritariamente em dinucleotídeos CpG (Citosina seguida de uma Guanina) e pode alterar a condensação da cromatina localmente afetando a acessibilidade do DNA por diferentes maquinarias celulares

que utilizam o DNA como substrato, entre elas a transcrição. Mais recentemente, também foi descrita a presença de metilação da adenosina, conhecida como N6-metiladenosina (6mA), embora suas implicações fisiológicas ainda permaneçam pouco esclarecidas (Feng; He, 2024).

Esses dinucleotídeos CpG podem se agrupar formando ilhas CpG, frequentemente localizadas em regiões regulatórias, como promotores e primeiros éxons. De modo geral, quando a metilação está presente em regiões promotoras, ela se associa à repressão transcricional. Em contraste, níveis reduzidos de metilação tendem a favorecer a ativação gênica e o aumento da expressão (Ribeiro *et al.*, 2022).

No contexto de mecanismos regulatórios, a metilação da citosina está envolvida em processos como o *imprinting* genômico, a supressão de transposons, a manutenção de memória epigenética, a inativação do cromossomo X e o desenvolvimento embrionário (Wyss; Song; Bina, 2022). Em uma perspectiva mais ampla, também participa de eventos como a proliferação e a diferenciação celular, a embriogênese e processos associados ao desenvolvimento tumoral, o que ajuda a explicar por que esse tema permanece central na literatura epigenética (Zhang *et al.*, 2023).

Nas últimas décadas, há um crescente interesse em caracterizar perfis de metilação em animais de produção. Esses estudos vêm permitindo identificar regiões metiladas diferencialmente e genes cuja regulação por metilação se relaciona a variações fenotípicas e a estágios do desenvolvimento em animais domésticos (Song *et al.*, 2016; Frattini *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2020).

Em bovinos, a metilação do DNA tem relevância direta para a diferenciação tecidual e para características de interesse produtivo, como eficiência alimentar, produção de leite e resistência a doenças (Wang *et al.*, 2020). Apesar do avanço de estudos em humanos e em modelos experimentais, ainda são relativamente escassos os trabalhos que descrevem, de forma integrada, padrões de metilação ao longo do genoma em diferentes tecidos bovinos. Evidências indicam associação entre perfis de metilação no sangue, no fígado e no músculo e processos de crescimento, reprodução e resposta imune (Hu *et al.*, 2025).

A metilação é catalisada por enzimas DNA metiltransferases (*DNMTs*), que transferem grupos metil a partir da S-adenosilmetionina para a citosina do DNA. A

família *DNMT* inclui *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *DNMT3L*. A *DNMT1* está principalmente associada à manutenção do padrão de metilação durante a divisão celular, enquanto *DNMT3A* e *DNMT3B* são fundamentais para a metilação *de novo*, estabelecendo novos padrões epigenéticos em sítios CpG previamente não metilados, sobretudo em contextos de desenvolvimento embrionário. Já a *DNMT2* está relacionada à metilação de RNAs, e a *DNMT3L* atua como moduladora da atividade de *DNMT3A* e *DNMT3B* (Uddin; Fandy, 2021; Schmitz *et al.*, 2019; Veland *et al.*, 2019).

A reversão da metilação pode ocorrer por vias mediadas por enzimas da família TET (*Ten-eleven translocation*) ou de forma passiva, quando há perda da manutenção do padrão durante as replicações celulares. Embora a metilação do DNA seja considerada relativamente estável, a desmetilação é decisiva em processos como a pluripotência e a reprogramação em células germinativas primordiais; quando esses mecanismos se desorganizam, há associação com alterações patológicas, incluindo eventos ligados ao desenvolvimento tumoral (Sindhu *et al.*, 2024; Martin; Fry, 2018; Uddin; Fandy, 2021).

A funcionalidade das metiltransferases pode ser afetada por diversos fatores, no lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo, são descritas aberrações de metilação associadas à expressão de *DNMT1*, com níveis significativamente mais baixos de transcritos de *DNMT1* e *DNMT3A* (Lanata *et al.*, 2018). Em distúrbios que diminuem a expressão ou funcionalidade da *DNMT1*, não ocorre transferência completa do padrão de metilação para a célula recém-gerada após a mitose, o que leva à desmetilação passiva. Além disso, a atividade da *DNMT1* é regulada pela via *MAPK/ERK* (*MAPK* do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases* - Proteína Quinases Ativadas por Mitógenos e *ERK* do inglês *Extracellular signal-Regulated Kinases* - Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares), e exposições ambientais podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo aberrações de metilação ao interromper essa via (Sergeeva *et al.*, 2023).

No nível metabólico, as moléculas de S-adenosilmetionina (SAM) atuam como fonte de grupos metil para a metilação. O SAM é produzido no ciclo de metionina pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT) e após reações de metiltransferases, é convertido em S-adenosil-L-homocisteína (SAH). O processo de ligação do grupo metílico à citosina envolve etapas em que a transferência do grupo metílico culmina na formação de 5mC (Sergeeva *et al.*, 2023). Os níveis de SAM são

influenciados pela ingestão dietética de ácido fólico e vitaminas B6 e B12 (Lanata *et al.*, 2018) e baixos níveis de metionina podem afetar a metilação do DNA, contribuindo para a desregulação da expressão gênica (Zhang *et al.*, 2018).

A metilação do DNA também se relaciona diretamente à estabilidade e integridade genômica. A hipermetilação em promotores ricos em CpG pode silenciar genes supressores tumorais e comprometer processos como o reparo do DNA (Sriraman *et al.*, 2020). Em sentido oposto, a hipometilação global tende a favorecer instabilidade genômica, com associação descrita em diferentes tipos de câncer (Zhang *et al.*, 2023). Alterações extensas em regiões intergênicas e intragênicas foram relacionadas a sítios frágeis e pontos de quebra cromossômica (Li; Wu, 2020). Nesse cenário, é citado como exemplo recorrente o silenciamento epigenético do gene *MLH1*, que pode desencadear eventos subsequentes ligados à instabilidade genômica (Wang *et al.*, 2021).

Diversos fatores podem influenciar os níveis de metilação do DNA, como a interferência por RNAs, metilação de histonas, infecções virais, ambiente, temperatura e nutrição (Zhang *et al.*, 2023). Além disso, a desregulação da metilação pode favorecer mutações, como a desaminação da citosina em timina, afetando regiões críticas, incluindo genes relacionados ao *imprinting* (Li *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2023).

Por fim, os estudos com WGBS em ruminantes indicam que o espermatozoide apresenta níveis de metilação mais elevados do que tecidos somáticos, com impacto descrito sobre o sucesso da inseminação artificial (IA), a saúde da prole e o desenvolvimento embrionário inicial (Chen *et al.*, 2024). Portanto, é observado um papel essencial da metilação do DNA na evolução das espécies, associando características fenotípicas e fertilidade em ruminantes (Vermunt *et al.*, 2016; Rizzardi *et al.*, 2021).

2.2. *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético cuja regulação difere da maioria dos genes do genoma, genes regulados por esse mecanismo possuem apenas um dos alelos ativo enquanto o outro permanece silenciado de maneira parental específica (Thamban; Agarwaal; Khosla, 2020; Tucci *et al.*, 2019; Hubert; Demars, 2022; Wang; Jiang, 2023). Os genes regulados por esse mecanismo

desempenham papéis essenciais no crescimento embrionário, no desenvolvimento neonatal, na função placentária e em comportamentos pós-natais (Gu *et al.*, 2019).

Estudos na década de 80 mostraram que ambos os alelos parentais eram necessários para o desenvolvimento normal, como evidenciado por casos de dissomia uniparental, deleções, complemento parental único ou embriões partenogênicos (Rivera, 2020; McGrath; Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984). Estudos iniciais buscavam explicar porque mamíferos diplóides mantêm uma espécie de haploidia funcional em genes submetidos ao *imprinting*, propondo que esses genes desempenhariam funções importantes no crescimento fetal e atuariam, ao menos em parte, no equilíbrio de conflitos entre interesses maternos e paternos. Com os avanços no campo da epigenética, tornou-se mais evidente que esses genes desempenham funções específicas na placenta e que alguns deles são expressos especificamente em determinado tecido (Barlow; Bartolomei, 2014).

Em mamíferos, essa particularidade é especialmente relevante, pois esses organismos são diplóides e se formam pela fusão de dois gametas, de modo que cada progenitor contribui com um conjunto completo de cromossomos. Assim, o indivíduo resultante apresenta duas cópias de cada cromossomo autossômico, além dos cromossomos sexuais (X e Y, no caso de machos). Por exemplo, os humanos possuem 22 pares de autossomos e bovinos, 29 pares. Em todos esses casos, cada par é composto por um cromossomo herdado do pai e outro da mãe. Em condições gerais, espera-se que as células diplóides contenham cópias parentais de genes autossômicos com possibilidade de transcrição equivalentes. No entanto, para genes regulados por *imprinting*, a expressão torna-se dependente do alelo de origem em *loci* autossômicos ou, em situações específicas, em *loci* do cromossomo X diplóide, sendo neste último caso restritos a tecidos extraembrionários em fêmeas (Zimin *et al.*, 2009; Kobayashi, 2021). Além disso, há consenso de que esse mecanismo é necessário para a reprodução sexual de mamíferos e para o desenvolvimento embrionário, o que o posiciona como um processo central no desenvolvimento desses organismos (Jiang *et al.*, 2021).

Atualmente, sabe-se que os genes submetidos ao *imprinting* representam cerca de 1% do genoma (Miranda-Furtado *et al.*, 2019). Observações de comportamento cromossômico, dependente do sexo parental, já haviam sido descritas em artrópodes e marsupiais há mais de 50 anos (Johnson, 1974). No avanço desse campo, Denise Barlow *et al.* (1991) desempenharam papel central ao

contribuírem para a identificação de genes regulados por esse mecanismo, bem como para a compreensão da expressão e da regulação. Nesse cenário, Barlow et al. (1991) exploraram padrões não mendelianos para propor um modelo de busca de mecanismos regulatórios em um *locus* específico, utilizando linhagens de camundongos como modelo biológico para clonar *IGF2R*, reconhecido como um dos primeiros genes regulados por *imprinting*.

Desde então, centenas de genes foram descritos, muitos deles apresentando padrões de expressão conservados entre mamíferos. Um ponto que motivou fortemente os estudos de Barlow et al. (1991) sobre regulação do *imprinting* foi a constatação de que alelos ativos e inativos de um mesmo gene coexistem no mesmo núcleo e estão expostos aos mesmos fatores de transcrição, mas ainda assim se comportam de maneira distinta. Assim, tornou-se evidente que as informações associadas ao DNA do gene sustentam uma memória da origem parental, conferindo a base para a manutenção desse estado (Bartolomei; Oakey; Wutz, 2020).

Outro aspecto recorrente é que, na organização do *imprinting*, a maioria dos genes encontra-se em aglomerados no genoma e tende a ser regulados de forma coordenada, geralmente por meio de ICRs compartilhadas. A remoção dessas regiões ou a perturbação do padrão alélico de metilação do DNA pode levar à perda de *imprinting* de múltiplos genes em *cis* (Bartolomei; Oakey; Wutz, 2020). Nesse contexto, os lncRNAs desempenham um papel importante em vários *loci* regulados por *imprinting* genômico (Oakey e Wutz, 2020).

2.2.1. Regulação epigenética em genes regulados por *imprinting* genômico

As ICRs são elementos centrais do *imprinting* genômico. Essas regiões atuam como elementos regulatórios genômicos que recebem marcas iniciais que diferenciam os cromossomos materno e paterno em *loci* metilados de forma diferencial (Eggermann *et al.*, 2023). Em termos de perfil epigenético, essas regiões correspondem a DMRs primárias estabelecidas durante a gametogênese e, por isso, apresentam metilação do DNA dependente do progenitor. As ICRs atuam como regiões determinantes para definir quais alelos permanecerão ativos e quais serão silenciados (Hubert; Demars, 2022).

As DMRs podem ser entendidas como trechos do genoma que apresentam padrões de metilação distintos quando comparados entre duas ou mais condições biológicas, como tecidos, fases do desenvolvimento ou grupos com fenótipos distintos. Em muitos estudos, essas regiões são identificadas como áreas que concentram múltiplos sítios CpG com metilação alterada em conjunto (Alhassan; Olbricht; Adekpedjou, 2024; Campagna *et al.*, 2021).

Essas variações surgem porque a metilação do DNA é dinâmica e responde a processos como a diferenciação celular, mudanças de estado celular e a reorganização de elementos regulatórios. Assim, ganhos e perdas de metilação podem ocorrer em regiões promotoras, intragênicas ou em elementos distais, como *enhancers*, refletindo ajustes finos na forma como genes são ativados ou silenciados ao longo do tempo (Gehrs *et al.*, 2025).

As ICRs possuem capacidade de atravessar um período em que grande parte do genoma passa por uma reprogramação epigenética extensa após a fertilização, sem serem afetadas por essa reprogramação (Eggermann *et al.*, 2023). Em genes regulados por *imprinting*, a metilação diferencial específica dos pais se concentra em elementos discretos adicionados na linhagem germinativa e mantidos mesmo quando outras regiões do genoma sofrem remodelamento epigenético. São descritos como críticos para assegurar a expressão do alelo apropriado dos genes adjacentes (Bartolomei; Oakey; Wutz, 2020).

2.2.2. DMRs primárias e secundárias

As DMRs primárias (gDMRs) e DMRs secundárias (sDMRs) diferenciam-se principalmente pelo momento e pelo contexto celular em que a metilação diferencial é estabelecida. As DMRs primárias (*germline differentially methylated regions* - gDMRs), são regiões que já apresentam metilação assimétrica entre os alelos materno e paterno nos gametas. O padrão de metilação diferencial é adquirido ainda na linhagem germinativa, durante a gametogênese, e que precisa ser preservado apesar das amplas ondas de reprogramação epigenética que ocorrem nas fases iniciais do desenvolvimento. Por essa razão, costumam ser descritas como marcas relativamente mais estáveis ao longo das divisões celulares (Sanmiguel; Bartolomei, 2018). Em contraste, as DMRs secundárias (*secondary differentially methylated regions* - sDMRs), não apresentam essa marcação diferencial na linhagem

germinativa e, em geral, adquirem metilação dependente da origem parental após a fecundação, acompanhando processos de diferenciação e organização tecidual, de modo que sua formação e manutenção são mais dependentes do estado celular e do ambiente da cromatina, o que pode resultar em maior variação entre tecidos e estágios (Regmi *et al.*, 2023; Kobayashi, 2021).

Essa distinção tem implicações importantes, pois as gDMRs podem ser compreendidas como uma camada inicial de marcação do *imprinting*, com maior capacidade de persistência ao longo do desenvolvimento, enquanto as sDMRs frequentemente se comportam como uma camada mais dinâmica, associada ao refinamento e à sustentação de programas regulatórios em contextos celulares específicos (Inoue, 2023).

Essa diferença se reflete tanto na própria estabilidade como na dinâmica do *imprinting*. Evidências experimentais indicam que sDMRs podem apresentar padrões compatíveis com manutenção menos eficiente, incluindo níveis elevados de hemimetilação e sinais associados à dinâmica de modificação e remodelamento da citosina, sugerindo maior suscetibilidade à perda parcial de metilação quando comparadas a DMRs primárias (Nechin *et al.*, 2019).

Além disso, análises que investigam a manutenção da metilação em condições de perturbação da maquinaria de manutenção reforçam que DMRs secundárias podem ser mais vulneráveis do que regiões primárias, o que sustenta a ideia de que a estabilidade do *imprinting* depende não apenas da presença de metilação, mas da capacidade de manter essas marcas de forma consistente ao longo do tempo e das divisões celulares (Regmi *et al.*, 2023).

2.2.3. Tipos de *imprinting* genômico: canônico e não canônico

Com o avanço das análises epigenéticas, ficou evidente que o *imprinting* não é sustentado por um único tipo de marca epigenética. Muitos *loci* seguem o modelo clássico, em que a diferença entre os alelos materno e paterno pode ser caracterizadas pela metilação do DNA herdada da linhagem germinativa, frequentemente em regiões regulatórias como gDMRs/ICRs, em conjunto com assinaturas diferenciais de histonas ao longo do *locus* (Kobayashi, 2021). Esse arranjo ajuda a explicar por que, em diversos contextos, a assimetria alélica se mantém de forma consistente ao longo do desenvolvimento e da vida pós-natal,

preservando padrões de expressão dependentes da origem parental. O *imprinting* genômico pode ser dividido em dois tipos: o *imprinting* canônico, que depende de metilação do DNA germinativo, e o *imprinting* não canônico mediado, por exemplo, por marcas como a H3K27me3 (trimetilação da lisina 27 na histona H3) (Hanna; Kelsey, 2021).

Nem toda marca de metilação determinada por gametas persiste por longos períodos após a fecundação. Há evidências de uma forma menos explorada de metilação de DNA determinada por gametas que sobrevive apenas por alguns dias no embrião inicial, contrastando com a estabilidade típica de muitos eventos de *imprinting* dependentes de metilação germinativa (Tucci *et al.*, 2019). Assim, a duração e o momento de atuação das marcas podem variar, reforçando que o *imprinting* é um fenômeno sustentado por camadas regulatórias e se distingue entre os diferentes tecidos (Kobayashi, 2021).

No *imprinting* não canônico mediado, por exemplo, H3K27me3, a manutenção fiel da marca é descrita como majoritariamente transitória nos embriões iniciais, embora alguns genes relevantes para o desenvolvimento placentário preservem expressão monoalélica na linhagem extraembrionária (Inoue *et al.*, 2017a; Inoue *et al.*, 2017b).

Além disso, há necessidade de metilação de DNA *de novo* materno, alelo-específica, na implantação, formando DMRs somáticas posicionadas em promotores. Esse processo ocorre em um contexto em que H3K4me3 se estabelece de modo específico no alelo paterno no período pré-implantacional. Além disso, resultados de manipulação genética indicam que DNMT3A/DNMT3B zigóticos são necessários para a formação dessas DMRs somáticas e para a persistência do *imprinting* não canônico em tecidos extraembrionários (Hanna *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019).

Em conjunto, essas observações sustentam a ideia de que marcas de histonas depositadas no oócito podem desencadear eventos iniciais e, posteriormente, orientar a estabilização do estado alélico por meio da metilação de DNA pós-implantação. Dessa forma, tais marcas conectam mecanismos não canônicos a uma consolidação epigenética mais duradoura (Chen *et al.*, 2019; Kobayashi, 2021).

2.2.4. Programação epigenética do *imprinting* durante o desenvolvimento

O epigenoma do embrião precisa se reorganizar para gerar um zigoto totipotente acompanhando a transição para a pluripotência. A reprogramação epigenética global em mamíferos ocorre em duas grandes janelas: uma no início do desenvolvimento pós-fertilização e outra durante a formação das células germinativas primordiais (Burton; Torres-Padilla, 2025; Xia; Xie, 2020; Du; Zhang; Xie, 2022; Wang *et al.*, 2019; Wilkinson; Zorzan; Rugg-Gunn, 2023; Basu; Tiwari, 2021; Chen *et al.*, 2022). Quando o foco é o *imprinting* genômico, essa dinâmica precisa ser ainda mais precisa, pois genes regulados por esse mecanismo precisam atravessar fases de reprogramação global sem perder sua assinatura parental. Durante o desenvolvimento pré-implantacional, as DMRs associadas ao *imprinting* são descritas como protegidas contra a desmetilação global, mas esse padrão não se mantém na linhagem germinativa, na qual essas marcas são apagadas (Hubert; Demars, 2022; Zeng; Chen, 2019).

A desmetilação global do DNA ocorre logo após a fertilização; o embrião passa por esse processo de forma assimétrica. O genoma paterno é rapidamente desmetilado por mecanismos ativos, enquanto o genoma materno sofre uma desmetilação mais lenta, predominantemente passiva e dependente da replicação do DNA (Breton-Larrivéé; Elder; McGraw, 2019; Bochtler; Kolano; Xu, 2016).

A desmetilação ativa envolve uma via de oxidação complexa, mediada pelas enzimas TET. A TET3 converte a 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e, posteriormente, em formas ainda mais oxidadas (Chan-Wang *et al.*, 2020). Nas primeiras horas após a formação do zigoto, os grupos metílicos do pronúcleo paterno podem ser rapidamente removidos, antes mesmo de qualquer replicação ter ocorrido. Há uma distribuição assimétrica de 5mC e 5hmC entre os pronúcleos materno e paterno (Sergeeva *et al.*, 2023; Onodera *et al.*, 2021).

Ainda nesse período inicial, a metilação do DNA está relacionada a elementos transcricionais, especialmente em regiões regulatórias. As ilhas CpG associadas a promotores são descritas como permissivas à expressão quando hipometiladas. Por outro lado, promotores de genes específicos de tecido ou de estágio do desenvolvimento tendem a estar hipermetilados onde o gene não é expresso, o que contribui para o silenciamento. Cerca de 70% das CpGs no genoma de mamíferos

são metiladas, desempenhando papel relevante na compactação da cromatina e na regulação da expressão gênica (Luo *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Depois da fase de apagamento, o embrião chega a um estado geralmente hipometilado ao final do desenvolvimento pré-implantação, com cerca de 20% de CpG metilados no blastocisto. Desse modo, os perfis somáticos de metilação do DNA são estabelecidos após a implantação e até a gastrulação, sob a ação das metiltransferases de novo *DNMT3A* e *DNMT3B*, alcançando níveis de 60 a 80% de CpG metilados. Após a implantação, a remetilação está associada ao estabelecimento de padrões que são mantidos ao longo das divisões celulares e à atuação de *DNMT3a* e *DNMT3b* nesse processo (Roidor; Chebli; Borensztein, 2024; Sergeeva *et al.*, 2023).

O final desse processo forma um embrião em estágio de blastocisto, no qual os níveis de metilação global estão restabelecidos. Desse modo, as células da massa celular interna (ICM – *Inner Cell Mass*) podem ser diferenciadas em qualquer linhagem celular (Wu; Zhang, 2014; Gopinathan; Diekwisch, 2022).

2.2.5. Desmetilação global nas células germinativas primordiais

Em células germinativas primordiais, a maior parte da memória epigenética herdada de ambos os pais, incluindo genes submetidos à regulação por *imprinting* genômico, é apagada. Em seguida, um novo conjunto de marcas é estabelecido de forma dependente do sexo: no macho, na espermatogônia pré-meiótica durante o período fetal, e na fêmea em oócitos maduros, durante o processo de maturação para ovulação (Stewart; Veselovska; Kelsey, 2016; Kobayashi *et al.*, 2022).

A segunda grande janela de reprogramação epigenética tem como objetivo preparar a formação de gametas. Com isso, garante-se a transmissão adequada de informações epigenéticas para a geração seguinte. As células germinativas primordiais (PGCs - *Primordial germ cells*) passam por uma extensa remodelação da cromatina, incluindo a desmetilação global do DNA e o apagamento das ICRs parentais (Roidor; Chebli; Borensztein, 2024).

Em camundongos, essa desmetilação em PGCs ocorre em duas fases, a primeira corresponde a uma perda quase global de metilação do DNA, atribuída à regulação negativa de *DNMT3A/B* e à regulação e exclusão nuclear de *UHRF1*. Isso compromete o direcionamento da metiltransferase de manutenção, *DNMT1*, para o

garfo de replicação. Como consequência, a metilação é diluída passivamente a cada rodada de divisão celular. A segunda fase ocorre um pouco mais tarde, entre os dias embrionários 11 e 13, e envolve um subconjunto de elementos repetitivos e regiões cis regulatórias, as ICRs (Hajkova *et al.*, 2002; Kurimoto *et al.*, 2008; Seisenberger *et al.*, 2012a).

Essa etapa é particularmente importante para o *imprinting*, pois a reprogramação de ICRs na linhagem germinativa é fundamental para a regulação desses genes. Por volta do dia 13 do embrião de camundongos, as ICRs ficam completamente desmetiladas, o que é necessário para a aquisição de padrões de metilação específicos da origem. Em seguida, as ICRs maternas tornam-se metiladas nos oócitos em desenvolvimento e as ICRs paternas tornam-se metiladas nos espermatozoides em desenvolvimento. É esse padrão assimétrico de metilação em ICRs que garante a expressão monoalélica adequada desses genes no embrião resultante (Stewart; Veselovska; Kelsey, 2016; Canovas; Ross; Kelsey; Coy, 2017).

Há relevância potencial de enzimas TET, capaz de oxidar 5mC e participar na remoção de metilação, em conjunto com a replicação ou o reparo por excisão de base. Também é apontado que, em PGCs, TET1 é o membro mais expresso, TET2 aparece em nível inferior e TET3 é indetectável, o que reforça a ideia de que a reprogramação do *imprinting* na linhagem germinativa depende de uma coordenação temporal e molecular específica (SanMiguel; Bartolomei, 2018).

2.2.6. Mecanismos moleculares associados à regulação do *imprinting* genômico

2.2.6.1. Fatores de manutenção do *imprinting*: ZFP57, NLRP2 e ZFP42

A proteína de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco (*zinc finger*), a ZFP57, é descrita como um regulador central do *imprinting*, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento, uma vez que reconhece motivos específicos em ICRs e ajuda a manter a metilação diferencial nesses *loci* durante o desenvolvimento embrionário inicial. Embora as DNA metiltransferases sejam necessárias para estabelecer e manter a metilação nesses *loci*, elas não possuem domínios de direcionamento específicos para reconhecer ICRs (Jiang *et al.*, 2021).

A especificidade de ZFP57 reconhece motivos presentes em ICRs, com destaque para a ligação de alta afinidade a ICRs metilados e para o reconhecimento

do motivo TGCCGC. Além disso, seu domínio KRAB interage com KAP1/TRIM28, descrito como proteína andaime, que permite o recrutamento de metiltransferases e além de outros fatores associados à cromatina (Jiang *et al.*, 2021).

A relevância funcional desse sistema fica evidente em modelos de perda de função. Em embriões mutantes ZFP57, foi observado que a metilação do DNA se perde na maioria das ICRs conhecidas, com perda da expressão monoalélica dependente da origem parental em genes-alvo, incluindo alterações no padrão alélico coerentes com a perda de metilação diferencial nas ICRs (Xu *et al.*, 2022).

O fator de transcrição ZFP42, também do tipo dedo de zinco, se destaca como possível fator de manutenção do *imprinting*, uma vez que aparece como um gene candidato associado a distúrbios de impressão multilocus (MLID) em pacientes com a síndrome Beckwith-Wiedemann (BWS) e Silver-Russell (SRS), quadros em que alterações epigenéticas não se limitam a um único *locus*, mas atingem diversas iDMRs. Ao analisar a metilação de 12 iDMRs, já foi identificado MLID com frequência alta (50% em BWS e 29% em SRS), principalmente como um padrão de hipometilação materna, e ao buscar variantes em genes ligados ao estabelecimento/manutenção da metilação encontraram uma mutação em ZFP42. Há hipótese de que alterações na ZFP42 podem comprometer a leitura e/ou a preservação de marcas de metilação em múltiplos *loci*, contribuindo para um fenótipo de MLID (Fontana *et al.*, 2018).

A NLRP2 atua como proteína do complexo subcortical materno em oócitos e em embriões pré-implantacionais, um conjunto de componentes codificados por genes de núcleo materno que sustenta a transição materno-zigótica, o início da embriogênese e a reprogramação epigenética. A perda de NLRP2 está associada a mudanças em domínios específicos do metiloma e, principalmente, a uma desregulação expressiva do transcriptoma do oócito e do embrião de duas células quando a deficiência é materna (Anvar *et al.*, 2025).

2.2.6.2. Arquitetura e organização dos domínios de *imprinting*

Nos mamíferos, a maioria dos genes regulados por *imprinting* não aparece isolada no genoma, mas organizada em domínios cromossômicos que podem abranger grandes extensões de DNA e conter múltiplos genes regulados de forma coordenada. Nesses domínios, regiões regulatórias com metilação diferencial entre

os alelos parentais funcionam como pontos de controle capazes de influenciar a expressão de genes a distâncias de dezenas de kilobases, o que coloca a organização tridimensional da cromatina como parte integrante do fenômeno (Monk *et al.*, 2018).

A CTCF (*CCCTC-binding factor*) é um fator multifuncional frequentemente descrita como isoladora, porque sua ligação, em conjunto com o complexo de coesina, contribui para a formação de *loops* e para a delimitação de unidades de organização como subdomínios dentro de TADs (*topologically associating domains*, ou domínios topologicamente associados), blocos de organização 3D (Li *et al.*, 2022).

Já a coesina é relevante como fator de manutenção do *imprinting* porque ajuda a sustentar a arquitetura 3D da cromatina que permite que domínios *imprinting* funcionem de modo estável e alelo-específico. (Pileggi *et al.*, 2021).

A ligação de CTCF pode ocorrer de forma alelo-específica em domínios sob *imprinting*, restrita ao alelo não metilado, pois a metilação em CpGs dentro do motivo de ligação tende a reduzir a afinidade da proteína. Essa assimetria cria padrões parentais distintos de contatos de longa distância, com consequências diretas para os promotores que se ligam a determinados elementos regulatórios no mesmo domínio (Moindrot; Imaizumi; Feil, 2024).

Em diferentes domínios *imprinting*, estudos baseados em captura de conformação indicam que a retenção focal de coesina em sítios de CTCF ligados no alelo não metilado está associada a trajetórias distintas de *looping* entre os cromossomos parentais, o que ajuda a explicar como dois alelos que coexistem no mesmo núcleo podem apresentar estados regulatórios tão diferentes (Moindrot; Imaizumi; Feil, 2024; Moindrot; Imaizumi; Feil, 2021).

Em bovinos, por exemplo, análises em domínios como *IGF2R* e *KvDMR1* indicam que mudanças no estado epigenético se associam a alterações de contatos de longa distância e a padrões anômalos de interação no genoma, compatíveis com a ideia de que parte da desregulação de expressão gênica não se explica apenas por mudanças locais de metilação, mas também por reorganização da arquitetura cromossômica (Li *et al.*, 2022).

Em síntese, a CTCF pode atuar como um componente arquitetônico decisivo em domínios de *imprinting*, organizando contatos de longa distância e atuando como elemento isolador. Ao se ligar de forma alelo-específica em DMRs, a CTCF tende a

impedir que *enhancers* ativem promotores no alelo silenciado, contribuindo para a manutenção do padrão monoalélico de expressão. No *locus IGF2/H19*, esse princípio fica mais evidente, no alelo não metilado, a ligação de CTCF na ICR cria uma barreira que direciona a atividade dos *enhancers* para *H19*. Já no alelo metilado, a ausência de ligação de CTCF permite que os *enhancers* interajam com *IGF2*, favorecendo o padrão parental de expressão (Figura 1) (Verruma *et al.*, 2021).

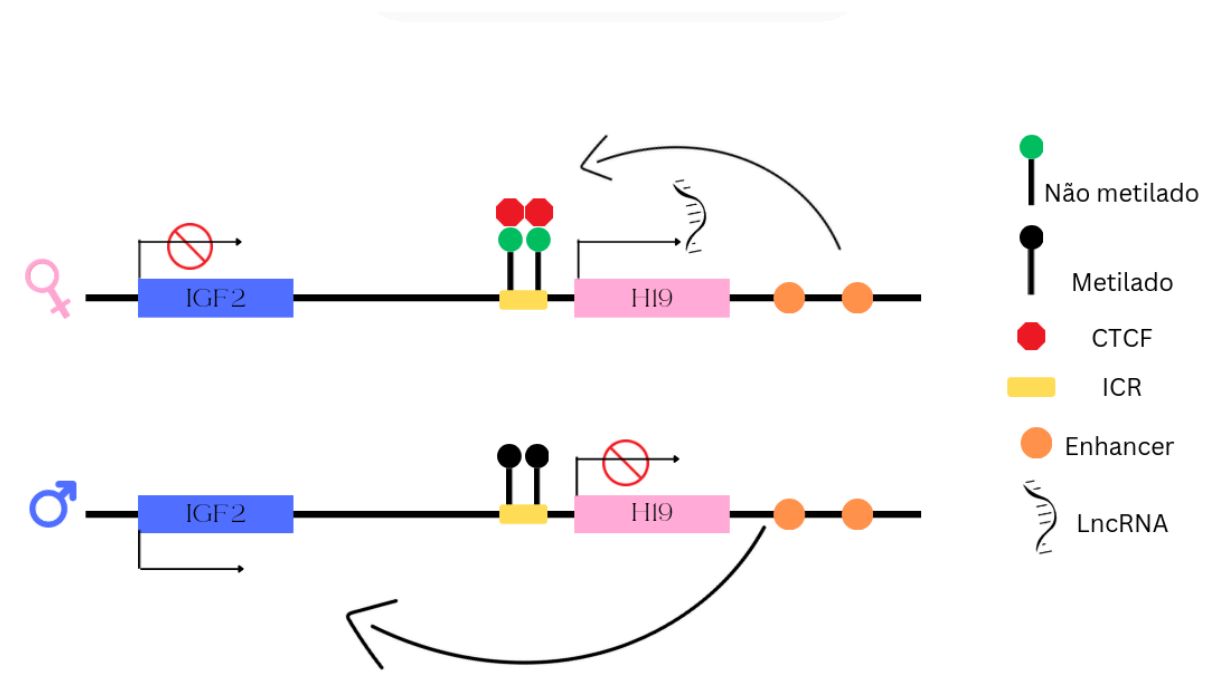


Figura 1. Esquema do domínio *IGF2/H19*. Ilustração da ligação alelo-específica de CTCF na ICR e o efeito de isolamento sobre a comunicação *enhancer*-promotor. Adaptado de Ordoñez *et al.* (2024)

2.2.7. Perfis de metilação em tecidos somáticos e embrionários

Em regiões regulatórias associadas ao *imprinting*, a metilação do DNA costuma apresentar padrões quantitativos celulares específicos quando expressa em porcentagens. Em gametas, a maior parte das ICRs exibe extremos próximos de 0% ou 100% de metilação, o que é compatível com a aquisição parental específica dessas marcas ainda na linhagem germinativa. No estudo de Jima *et al.* (2022), a metilação gamética aproximou-se desses extremos em 332 ICRs, sendo 178 paternalmente metilados e 154 maternalmente metilados.

Já em tecidos somáticos, o que se espera, em termos percentuais, é um valor intermediário, pois a leitura por amostras de DNA mistura as duas cópias parentais

presentes em uma mesma célula. Assim, quando um alelo está metilado e o outro não, a média tende a se aproximar de 50%, sendo compatível com metilação monoalélica. Esse parâmetro foi usado como base para estratégias de varredura genômica de ICRs candidatas, com uma variação de $\pm 15\%$ (Jima *et al.*, 2022).

Dados obtidos em um estudo de pirosequenciamento quantitativo em DMRs humanas associadas a genes regulados pelo *imprinting* genômico indicam um quadro geral de estabilidade, embora com diferenças teciduais específicas. De forma geral, foi descrito que DMRs somáticas paternalmente metiladas tendem a manter médias em uma faixa intermediária em múltiplos tecidos, tipicamente entre 35% e 65%, mesmo quando a expressão gênica varia conforme o tecido. Em contraste, DMRs somáticas maternas apresentam maior tendência a padrões específicos de tecido, com variações mais evidentes entre órgãos e contextos celulares. Além disso, os autores destacam variabilidade intraindividual no sangue periférico, sugerindo que, para inferir estabilidade epigenética em um tecido, é mais informativo observar um conjunto de DMRs do que depender de uma única região (Woodfine; Huddleston; Murrell, 2011).

Essa interpretação, baseada em faixas percentuais, depende, naturalmente, de como se define o que é compatível com uma DMR em termos de leitura quantitativa. No estudo que validou painéis de pirosequenciamento, uma referência prática foi estabelecida a partir de modelos padrão, em que uma DMR considerada normal com 50% de DNA de entrada metilada apresentou leitura média muito próxima de 50,38%. A faixa operacional para classificar uma DMR como reportando metilação compatível com monoalélica foi definida aproximadamente entre 35,73% e 65,03%. No mesmo conjunto de dados, foi descrito que DMRs de linha germinativa apresentaram média global próxima de 47% em tecidos somáticos e baixa variação entre tecidos, com uma exceção biologicamente esperada no testículo, onde ocorre dinâmica própria de apagamento e restabelecimento de marcas germinativas. Por outro lado, DMRs somáticas mostraram maior variação e, em especial, as maternas tendem a ser mais dependentes de tecido (Woodfine; Huddleston; Murrell, 2011).

2.2.8. Funções biológicas dos genes regulados por *imprinting* genômico

Os genes regulados por *imprinting* genômico compõem um conjunto relativamente pequeno do genoma, mas com impacto importante em aspectos fundamentais do desenvolvimento e da fisiologia. Por exemplo, em camundongos, já foram identificados mais de 260 genes, e a maior parte deles é controlada por gDMRs com metilação específica de origem parental. Em humanos, pelo menos 150 genes já foram catalogados, embora esse número provavelmente ainda aumente à medida que novas evidências se acumulam (Kobayashi, 2021).

Na espécie bovina, a identificação desses genes ainda é mais limitada quando comparada a humanos e camundongos, um pequeno conjunto de 66 genes está catalogado no site do Geneimprint (<https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Bos+taurus.imprinted-All>). Essa diferença é relevante porque sugere que ainda há uma lacuna de caracterização em animais de interesse zootécnico, o que afeta tanto a compreensão básica quanto a interpretação de fenótipos complexos ligados ao crescimento e ao desenvolvimento na área da reprodução animal (Eggermann *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015).

Esses genes estão intimamente ligados ao desenvolvimento, sobretudo em etapas em que a dosagem gênica precisa ser finamente controlada, como o crescimento e o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, o desenvolvimento e a função cerebrais, a composição corporal e a homeostase energética (Chao *et al.*, 2022).

A maioria desses genes encontra-se em *clusters* que incluem genes codificadores de proteínas e genes transcritos não codificantes, e a expressão inadequada desses domínios pode repercutir em fenótipos de desenvolvimento e doenças. De maneira geral, destacam-se papéis no desenvolvimento placentário, no crescimento e no desenvolvimento fetais e no desenvolvimento neurológico (Coster *et al.*, 2012).

Alguns genes, como *IGF2R*, *H19*, *KCNQ1OT1* e *MEST*, desempenham funções importantes para a espécie bovina. Por exemplo, o *IGF2* é essencial para o crescimento e a diferenciação celulares e exerce suas funções por meio do receptor *IGF2R*, que atua como um regulador do crescimento e do desenvolvimento, especialmente no contexto fetal e placentário. Ele participa do controle da disponibilidade de fatores de crescimento e, assim, influencia a formação e a

eficiência funcional da placenta. Esse tipo de regulação é essencial para garantir que o crescimento intrauterino ocorra de forma equilibrada, evitando tanto restrição quanto supercrescimento (Zheng *et al.*, 2025; D'Occhio., 2024).

O gene *H19* está associado ao controle do crescimento e do desenvolvimento embrionários e fetais. Embora não codifique uma proteína, seu papel regulatório contribui para ajustar a expressão de genes envolvidos no crescimento, atuando como parte de um sistema que evita desequilíbrios de dosagem gênica em momentos críticos do desenvolvimento (Mangiavacchi *et al.*, 2022; Kaneda *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2023).

O transcrito *KCNQ1OT1* (LIT1) participa da organização regulatória de um domínio genômico importante para o desenvolvimento. Em termos funcionais, ele contribui para estabelecer e manter padrões de expressão gênica coordenados durante o desenvolvimento embrionário e placentário, ajudando a garantir que genes do mesmo domínio sejam ativados ou silenciados no momento certo e no tecido adequado (Aguila *et al.*, 2021; Aguila *et al.*, 2024).

O gene *MEST* está ligado a processos de crescimento e desenvolvimento, com destaque para o período pré-natal e a formação de tecidos. Em bovinos, ele costuma ser discutido como um componente de vias que influenciam o tamanho corporal e o desenvolvimento, sendo relevante porque alterações no seu padrão de regulação se associam a desfechos de desenvolvimento atípico (Hossain *et al.*, 2024; Mangiavacchi *et al.*, 2022; Poirier *et al.*, 2020).

O estudo do *imprinting* genômico em bovinos ainda é pouco explorado, especialmente quando comparado ao que se observa em humanos e murinos. Embora esse tema seja amplamente investigado na espécie humana, na espécie bovina ainda há carência de informações, principalmente no que se refere ao número de genes regulados por *imprinting* genômico e à localização precisa das ICRs. Além dos artigos de referência, o site do geneimprint contém a listagem de genes regulados por esse mecanismo (<https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Bos+taurus>).

2.2.9. Perda do *imprinting* genômico

A perda de *imprinting* (*Loss Of Imprinting* - LOI) descreve situações em que a regulação dependente da origem específica deixa de ser mantida, resultando em

desequilíbrio de dose gênica. Isso pode aparecer como reativação do alelo que deveria estar silenciado, tornando a expressão bialélica, ou, em alguns contextos, como redução ou desorganização da expressão alélica esperada, quase sempre acompanhada por alteração quantitativa na metilação em DMRs/ICRs, com ganho ou perda de metilação. Em tecidos humanos, a LOI é relevante porque transforma um sistema de controle de dose em um sistema instável, favorecendo fenótipos de crescimento anormal, alterações metabólicas e maior vulnerabilidade à desregulação celular (Xie *et al.*, 2024).

A MLID (*Multi-Locus Imprinting Disturbance*) é definida como uma condição molecular em que a alteração de metilação não se restringe a um único *locus*, mas afeta múltiplas regiões de *imprinting* no genoma. A MLID é heterogênea e em alguns indivíduos parecem com um distúrbio de *imprinting* canônico, outros exibem sobreposição parcial entre síndromes, e há casos atípicos em que o fenótipo não aponta de forma clara para um *locus* específico (Mackay *et al.*, 2024).

Estudos com pacientes afetados pelas síndromes de Beckwith-Wiedemann e Silver-Russell, ambas em humanos, mostram que a MLID pode ser relativamente frequente quando o evento primário é perda de metilação (LOM - *Loss of Methylation*) em um *locus* chave, e que variantes em genes envolvidos na regulação epigenética podem contribuir para o fenótipo multi-*locus*. Em epimutações no cromossomo 11p15.5, por exemplo, a investigação de múltiplas iDMRs identificou MLID em uma proporção substancial de casos e apontou variantes candidatas em genes como *NLRP2* e *ZFP42*, reforçando a ideia de que o perfil multilocus pode ter componente genético (Fontana *et al.*, 2018).

Em reprodução assistida e em biotecnologias reprodutivas, a LOI também é tema de grande interesse. Em bovinos, a síndrome do bezerro grande (*Large offspring syndrome/abnormal offspring syndrome* - LOS/AOS) é frequentemente tratada como um modelo fenotípico e molecular da síndrome de Beckwith-Wiedemann em humanos. Tal fato deve-se a ambas compartilharem desregulação de *loci* de *imprinting* e eventos de ganho ou perda de metilação em regiões regulatórias específicas. Estudos destacam que defeitos podem ocorrer em MLMD (*multi-locus methylation defects*), aproximando-se do padrão observado em parte dos casos humanos de MLID e reforçando a utilidade de painéis multilocus para caracterizar a extensão do defeito (Mangiavacchi *et al.*, 2021).

Em clones bovinos, foi descrita variação tecido-específica e indivíduo-específica nos níveis de metilação em DMRs dos genes *H19*, *KCNQ1OT1* (*KvDMR1*) e *MEST*, incluindo combinações de LOM e ganho de metilação (GOM - *Gain of Methylation*) em um mesmo conjunto de *loci*, o que sustenta a ideia de um componente MLID e de mosaico nesses contextos (Mangiavacchi *et al.*, 2022).

2.3. Biotecnologias reprodutivas

Nas últimas décadas, as biociências e a biotecnologia avançaram significativamente com o desenvolvimento das ARTs. Entre as principais técnicas aplicadas à reprodução, destacam-se a inseminação artificial, a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT). Em conjunto, essas abordagens têm ampliado as possibilidades de melhoramento genético em espécies de interesse econômico, especialmente em ruminantes (bovinos, caprinos e ovinos), e contribuído para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (Sheidel, 2022; Zegers-Hochschild *et al.*, 2017; Daly *et al.*, 2020; Li; Donnelly; Rivera, 2019).

Na pecuária, as ARTs oferecem vantagens relevantes, devido à importância econômica na produção de alimentos e insumos para a agricultura, além de aplicações na indústria biomédica, na clonagem terapêutica, na biofarmacêutica e em xenotransplantes (Chen *et al.*, 2024; Foissac *et al.*, 2019; Halstead *et al.*, 2020; Goszczynski *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). No gado leiteiro, essas tecnologias também são estratégicas, pois favorecem o melhoramento genético e podem aumentar a eficiência produtiva nas diferentes raças (Lafontaine *et al.*, 2020).

Entre as biotecnologias reprodutivas, a inseminação artificial é uma das mais aplicáveis, por meio da introdução de sêmen diretamente no trato reprodutivo da fêmea, além de ter sido a primeira tecnologia reprodutiva aplicada em bovinos (Smith *et al.* 2018; Moysis *et al.*, 2025; Ciornei *et al.*, 2024; Benko *et al.*, 2022; Moore; Hasler, 2017; Gerits *et al.*, 2022; Wolf, 2009). A MIV busca simular a maturação ovocitária no organismo materno. Após a coleta, os oócitos são cultivados para promover a maturação nuclear e citoplasmática (DOULTANI *et al.*, 2024; ARIAS *et al.*, 2022).

A PIV envolve a coleta e a fertilização de oócitos em laboratório, seguidas do cultivo embrionário até o estágio de blastocisto (YUSUF, 2024). A técnica amplia a

capacidade reprodutiva de fêmeas em diferentes fases da vida reprodutiva e permite a rápida multiplicação de indivíduos geneticamente superiores. Apesar disso, ainda enfrenta limitações, como as baixas taxas de desenvolvimento embrionário produzidas a partir de oócitos provenientes de animais pré-púberes (CURRIN, *et al.*, 2021). A técnica permite o desenvolvimento inicial do embrião antes da transferência para o útero da receptora (Sunderam *et al.* 2020; Gualtieri *et al.*, 2024).

Por outro lado, a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) envolve a retirada do núcleo de uma célula somática diferenciada e a inserção no oócito enucleado previamente. Em seguida, o oócito é ativado por estímulos químicos ou elétricos, iniciando o desenvolvimento embrionário de forma semelhante ao observado na fertilização natural (Gouveia *et al.*, 2020; De Vos *et al.*, 2021).

A reprogramação nuclear na SCNT exige a redefinição do estado epigenético da célula somática doadora para que o material genético retorne a um estado totipotente, semelhante ao de um zigoto. Contudo, a eficiência desse processo tende a ser baixa e sujeita a imperfeições, o que reflete a complexidade de apagar e restabelecer padrões de expressão gênica e de modificações de histonas (Wang *et al.*, 2020). Ainda assim, a SCNT impactou fortemente a biotecnologia animal por oferecer um método de clonagem e, ao mesmo tempo, um modelo experimental para investigar barreiras epigenéticas (Simmet *et al.*, 2021).

Apesar dos benefícios, a manipulação de gametas e embriões pode alterar o microambiente do desenvolvimento inicial e afetar mecanismos de regulação epigenética. Essas alterações podem modular a expressão gênica sem modificar a sequência nucleotídica, resultando em fenótipos alterados e, potencialmente, comprometendo a saúde e a produtividade a longo prazo dos animais submetidos às ARTs (Mikkola *et al.*, 2024). Aprimoramentos contínuos nos sistemas de cultivo embrionário e no controle das condições ambientais *in vitro* têm sido fundamentais para melhorar o desenvolvimento e a viabilidade de embriões produzidos por ARTs (Ermisch *et al.*, 2020; Sciorio & Rinaudo, 2023).

As ARTs podem desencadear alterações epigenéticas associadas à manipulação de gametas e embriões. Entre os efeitos descritos, destacam-se a perda de metilação do DNA e impactos em genes relacionados ao crescimento embrionário e ao desenvolvimento placentário, com possíveis repercussões patológicas (Salilew-Wondim *et al.*, 2018; Urrego *et al.*, 2017; Sullivan-Pyke *et al.*,

2017; Duranthon e Chavatte-Palmer, 2018; Siqueira *et al.*, 2017; Gennari Verruma *et al.*, 2021). Em função disso, depende do entendimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos, uma vez que eles influenciam diretamente o desempenho e a segurança dessas técnicas (Banta; Richards, 2018; Panzeri; Pospisilik, 2018).

Em especial na PIV, diversos embriões apresentam erros no epigenoma relacionados à manipulação dos gametas, às condições ambientais e à exposição aos procedimentos. Esses desvios têm sido associados a fenótipos anormais, como crescimento fetal excessivo, malformações congênitas e mortalidade neonatal, descritos em diferentes espécies (Deshmukh *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2019; Castillo-Fernandez *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2017; Hattori *et al.*, 2019; Mani *et al.*, 2019). No caso da SCNT, embora a técnica esteja bem estabelecida, a taxa de sucesso ainda é baixa, principalmente devido a anormalidades epigenéticas. Essas alterações podem modificar o perfil de expressão de diversos genes e constituem uma das principais causas de falhas no desenvolvimento embrionário (O'Doherty *et al.*, 2015).

Tecnologias como a MIV, por exemplo, podem induzir estresse oxidativo nos oócitos. Nesse contexto, o ambiente artificial pode interferir na regulação epigenética de gametas e embriões, comprometendo o objetivo de obter animais geneticamente superiores sem marcas epigenéticas negativas (Rivera, 2020; Moore; Hasler, 2017).

Condições artificiais e procedimentos, como a estimulação ovariana e a MIV, podem interferir na aquisição do *imprinting* materno nos oócitos. (Uysal; Ozturk; Akkoyunlu, 2018; Landry *et al.*, 2018). Protocolos hormonais aplicados durante o crescimento do folículo podem dificultar a aquisição de um perfil epigenético adequado ao desenvolvimento embrionário normal, tornando gametas e embriões mais sensíveis às condições impostas pelas ARTs (Marshall; Rivera, 2017).

De forma coerente com esse cenário, as ARTs têm sido associadas à expressão aberrante de genes regulados por *imprinting*, com impactos na produção de embriões, na redução de taxas de prenhez e em possíveis efeitos na saúde na fase adulta (Gennari Verruma *et al.*, 2021). Em embriões produzidos por SCNT, observam-se padrões anormais de desmetilação e remetilação em comparação com embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*. Há redução significativa da metilação durante a desmetilação global e a metilação *de novo* tende a ocorrer tardiamente, após o estágio de oito células, o que difere do padrão natural. Análises por

imunofluorescência também evidenciaram perfis anormais, com marcação intensa e não uniforme ao longo do desenvolvimento (Cao *et al.*, 2014).

A reprogramação nuclear deficiente é apontada como um fator limitante, embora ocorram mudanças rápidas na cromatina após a fusão entre célula somática e oócito enucleado, algumas marcas epigenéticas da célula doadora podem persistir, contribuindo para perda dos padrões normais de *imprinting* genômico e manutenção parcial da memória epigenética do estado original (produção de leite).

Em bovinos, há hipermetilação em regiões de DNA satélite em blastocistos e fetos clonados, bem como diferenças relevantes entre massa celular interna (ICM) e trofotoderma (TE) em comparação com embriões produzidos naturalmente. Nesses casos, a expressão anômala de genes é regulada por *imprinting*, decorrente de ativação ou inativação inadequada. Com efeito, pode-se associar a anomalias do desenvolvimento, defeitos na formação do trofotoderma e prejuízos à placentação e ao desenvolvimento fetal (Malpotra e Hussain, 2020; Balvís *et al.*, 20117).

2.3.1. Síndromes ligadas ao *imprinting* em humanos e ruminantes

As síndromes de supercrescimento (Overgrowth syndromes - OGS) são um conjunto diverso de condições que ocorrem em várias espécies e têm como característica comum o crescimento excessivo. O OGS generalizado é caracterizado por um aumento de crescimento, como o peso corporal, a altura e a circunferência da cabeça. Em contraste, o OGS localizado envolve o crescimento excessivo de poucos órgãos ou regiões específicas do corpo (Li; Donnelly; Rivera, 2019; Parra *et al.*, 2024). Essas síndromes constituem um grupo raro e heterogêneo de condições genéticas que podem se manifestar como hiperplasia global ou segmentar, às vezes acompanhada de aumento do risco de malignidade (Parra *et al.*, 2024).

A espécie bovina tem sido utilizada como modelo de interesse para estudar mecanismos de *imprinting* genômico, especialmente considerando a proximidade fenotípica e epigenética entre as condições de supercrescimento congênito em ruminantes e em humanos. A comparação entre as síndromes BWS e a LOS reforça essa relação, pois ambas envolvem desregulação de regiões controladoras de *imprinting* e alterações de metilação influenciadas por condições de cultivo (GU *et al.*, 2019).

Os genes como *IGF2/IGF2R*, *H19* e *KCNQ1OT1* aparecem entre os mais frequentemente discutidos (O'Doherty *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2018; Lafontaine *et al.*, 2020). Eles são controlados pela *ICR1* e apresentam padrão de ganho de metilação (GOM) em cerca de 10% dos casos de BWS. Já o gene *KCNQ1OT1*, controlado pelo *ICR2*, apresenta perda de metilação (LOM) em aproximadamente 50% a 60% dos casos de BWS, com cerca de 20% dos casos ocorrendo devido à dissomia uniparental (Mangiavacchi *et al.*, 2022).

Uma vez que as espécies apresentam uma correlação mais significativa do que os modelos tradicionais baseados em murinos, é possível analisar, de forma mais segura, as semelhanças na regulação do *imprinting* genômico entre bovinos e humanos (O'Doherty *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2018; Lafontaine *et al.*, 2020).

A síndrome do bezerro grande (LOS) é uma condição caracterizada pelo crescimento excessivo em fetos e neonatos de ruminantes (Li *et al.*, 2019). É descrita como uma condição de supercrescimento congênito associada, com frequência, ao uso de ARTs, incluindo PIV e clonagem, embora já haja descrição de ocorrência espontânea (Baruselli *et al.*, 2023). Com o aumento do uso da PIV em ruminantes, também aumentou a frequência de relatos de LOS (Rivera *et al.*, 2022).

A característica principal da síndrome é o crescimento exagerado, sendo um distúrbio complexo, com outros fenótipos associados, como visceromegalia, macroglossia, aumento da incidência de hidroalantóide, anormalidades nos membros e na medula espinhal, malformações nas orelhas, hipoglicemia e hérnia umbilical (Mangiavacchi *et al.*, 2022).

Análises em escala genômica sugerem que, tanto a LOS associada às técnicas (ART-LOS), quanto à forma espontânea (*Spontaneously* - LOS SLOS), compartilham a natureza epigenética do distúrbio, com distribuição específica de DMRs em diferentes contextos genômicos, como promotores, ilhas CpG e sequências repetitivas. Também foram descritos *loci* vulneráveis recorrentes e padrões de metilação teciduais dependentes, por exemplo, as diferenças entre músculo e sangue, o que é especialmente útil para pensar em biomarcadores e estratégias de monitoramento molecular (Li *et al.*, 2022).

Além das mudanças locais de metilação, existem evidências de que parte da desregulação gênica em LOS pode envolver efeitos à longa distância, incluindo alterações de arquitetura cromossômica em domínios *imprinting*. O fenótipo pode resultar de uma combinação entre epimutação e reorganização tridimensional do

genoma em regiões como *KvDMR1* e *IGF2R*, uma vez que há contatos de longa distância anômalos e uma tendência de reorganização estrutural associada a genes desregulados, (Li *et al.*, 2022).

A Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) é um distúrbio de *imprinting* com fenótipo de supercrescimento e risco aumentado de tumores na infância, frequentemente descrita em oposição clínica à síndrome de Silver-Russell Syndrome (SRS). Ambas tendem a refletir desequilíbrios inversos em regiões de *imprinting*. A BWS pode incluir sinais como macroglossia e organomegalia. Em alguns contextos clínicos, apresenta-se associada a anomalias congênicas, como o onfalocele (Shuman, Kalish; Weksberg, 1993; Ounap, 2016; Zahouani; Mendez, 2025).

A SRS é classificada como um distúrbio congênito de *imprinting*, caracterizado por restrição de crescimento pré-natal e pós-natal e por um conjunto de achados clínicos que podem incluir macrocefalia relativa, assimetria corporal e dificuldades alimentares. Em termos moleculares, destacam-se causas como a dissomia materna uniparental do cromossomo 7 e a perda de metilação em 11p15 no *locus* de *imprinting IGF2/H19* (Saal; Harbison; Netchine, 1993; Giabicani; Perriere; Netchine, 2025; Kurup; Lim; Palau, 2024; Khalid *et al.*, 2020).

2.4. Avanços recentes na caracterização do *imprinting* em bovinos

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), a análise de metilação do DNA tornou-se essencial para compreender os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação gênica e no desenvolvimento de mamíferos, incluindo os bovinos. Ferramentas de bioinformática desempenham um papel importante ao processar, integrar e analisar grandes volumes de dados (Big data), como os gerados por WGBS.

Recentemente, abordagens com *softwares*, como o *wgbstools*, têm contribuído significativamente para a análise de dados de metilação, permitindo acesso rápido e representações compactas de metilomas, além de oferecer algoritmos avançados para a integração de dados genéticos e epigenéticos, a segmentação genômica e a identificação de biomarcadores. Esses avanços possibilitam análises em níveis mais detalhados, incluindo a resolução em fragmentos de moléculas únicos, muitas vezes negligenciada em estudos tradicionais (Loyfer; Rosenski; Kaplan, 2024).

A análise de padrões de metilação do DNA, aliada à identificação de regiões de *imprinting* e à comparação com dados humanos, continua sendo uma abordagem com grande potencial para desvendar os mecanismos de regulação epigenética. Isso é especialmente relevante em áreas como reprodução e saúde animal, já que alterações epigenéticas podem estar associadas a condições como a LOS, frequentemente observada em protocolos de biotecnologia reprodutiva (Chen *et al.*, 2024).

Além de dados gerados por WGBS, abordagens direcionadas e análises alelo-específicas têm ganhado espaço na caracterização do *imprinting* em bovinos, pois permitem distinguir metilação e expressão conforme a origem parental do alelo. Essa estratégia, baseada em SNPs informativos e integração de dados de metilação com RNA-seq, tem aumentado a precisão na identificação de genes *imprinting* e de regiões regulatórias como DMRs e ICRs, muitas vezes dependentes do tecido e do estágio de desenvolvimento, especialmente em placenta e tecidos embrionários (Ivanova *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022; Huo *et al.*, 2024; Gao *et al.*, 2024).

Paralelamente, a integração multi-ômica com perfis de acessibilidade da cromatina e marcas de histonas vem fortalecendo a interpretação funcional dessas regiões, conectando padrões epigenéticos à regulação transcricional. No contexto aplicado, esses avanços são relevantes para a reprodução assistida, já que procedimentos como PIV, clonagem e cultivo embrionário podem interferir na manutenção do *imprinting*, tornando *loci* específicos potenciais biomarcadores de qualidade embrionária e de risco para alterações de crescimento, como a LOS (Li *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023; Michelle *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2023).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fluxo do trabalho bioinformático

Este estudo foi conduzido com base em análises realizadas exclusivamente em ambiente computacional, utilizando ferramentas de bioinformática específicas para o processamento, a conversão e a análise de dados de metilação (Figura 2). O estudo envolveu as etapas de (1) Conversão das coordenadas genômicas da espécie humana para a bovina (*LiftOver*); aquisição de dados em bancos de dados públicos, e o download das amostras (*SRADownloader*); (2) pré-processamento e alinhamento das leituras, utilizando ferramentas como Trim Galore!, FastQC, Bismark e Samtools; e (3) análise e visualização dos dados de metilação, realizadas com WGBStools, Python e RStúdio (Figura 2).

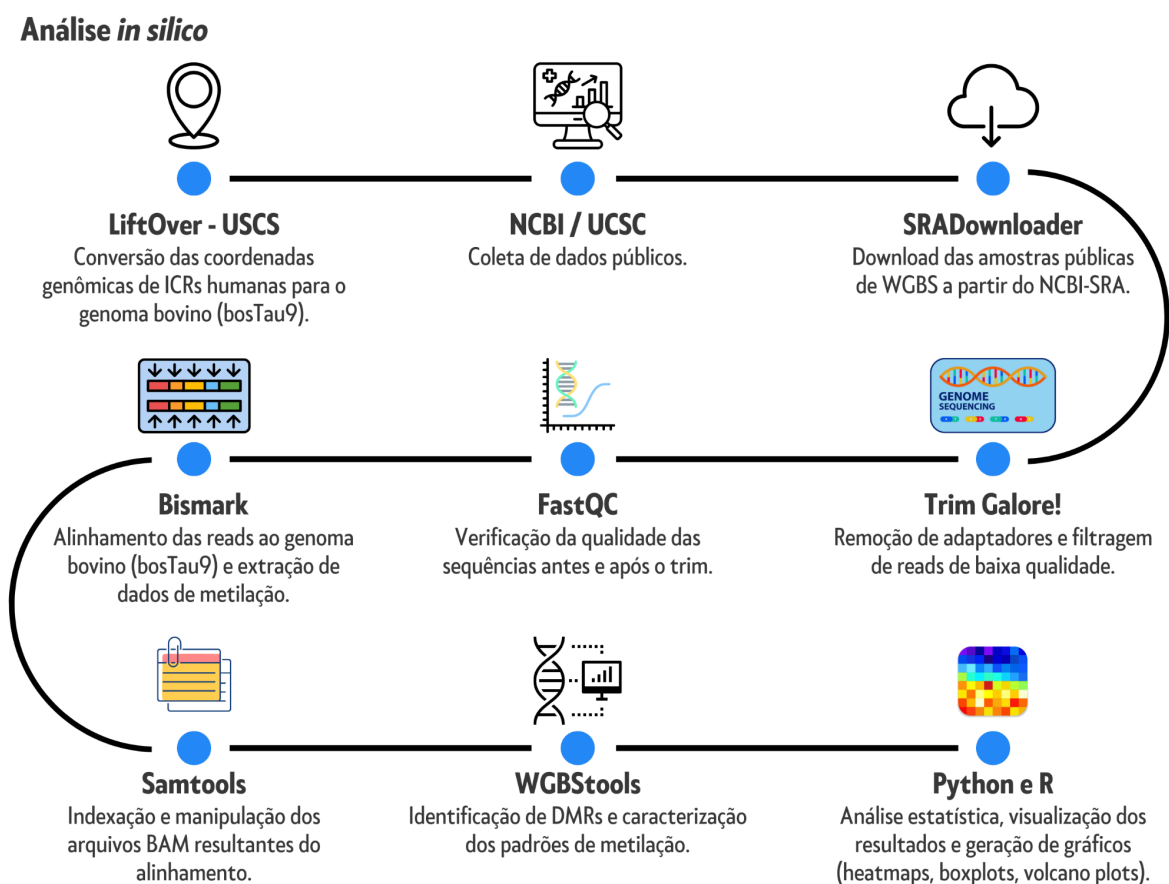


Figura 2. Fluxograma da pipeline de bioinformática.

3.2. Coleta de dados e amostras

3.2.1. Coleta das coordenadas genômicas

As coordenadas das regiões controladoras de *imprinting* (ICRs) previamente identificadas no genoma humano foram obtidas a partir do estudo de Jima et al. (2022) e Rosenski et al. (2025), que apresentou um mapeamento detalhado do imprintoma humano. Para a conversão dessas coordenadas do genoma humano (GRCh38/hg38) para o genoma bovino (Bostau9), utilizou-se a ferramenta *LiftOver* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>), disponível no site da Universidade da Califórnia, Santa Cruz (*UCSC Genome Browser*). Essa ferramenta realiza a conversão de coordenadas genômicas entre espécies, permitindo a identificação de regiões conservadas ou correspondentes entre elas.

Para definir as ICRs candidatas e caracterizar com maior precisão as ICRs bovinas já conhecidas, foi estabelecido um conjunto de parâmetros: 1) utilização de coordenadas genômicas validadas em humanos; 2) perfil de metilação do DNA em formato binário (0 ou 1) em gametas bovinos; 3) sobreposição com regiões de metilação alélica específica no genoma bovino depositadas no *UCSC Genome Browser* em pelo menos um tecido; e 4) sobreposição com sítios de ligação da proteína ZFP57.

Utilizando o *UCSC Genome Browser* com o genoma de referência bovino (ARS-UCD1.2/bosTau9) para uma inspeção visual das regiões genômicas. Para uma região ser classificada como uma ICR candidata, ela deveria satisfazer a dois critérios, visualizados como *tracks* (faixas de dados) no navegador: (1) presença de Metilação Alelo-Específica (ASM, *allele specific methylation*), no qual a região deveria exibir um sinal contínuo e consistente na track de ASM, com valores próximos a 0.5 (0,4 - 0,5), indicando que um alelo é metilado enquanto o outro não, e; (2) o padrão de metilação de origem parental em gametas deveria apresentar um padrão binário e oposto entre os gametas, manifestando-se como uma ausência quase completa de metilação em oócitos (indicando o alelo materno não metilado) e uma metilação quase total em espermatozoides (indicando o alelo paterno metilado), ou o padrão inverso (Figura 3).

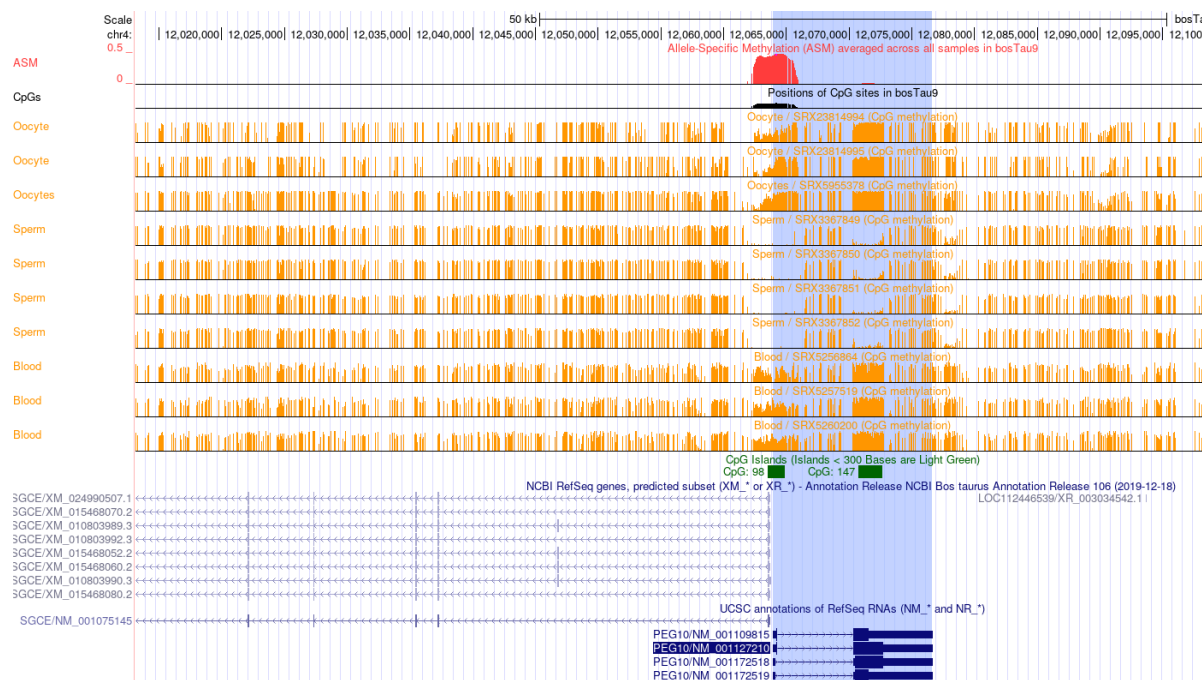


Figura 3. Demonstração visual de regiões gênicas classificadas como ICR candidata. **Link:** <https://genome.ucsc.edu/>. **Nota:** Em azul é a marcação do gene e o pico vermelho é a região onde há a região diferencialmente metilada. A imagem exibe a região do gene *PEG10* no genoma bovino (ARS-UCD1.2/bosTau9), uma das regiões filtradas pelos parâmetros utilizados neste estudo. As faixas superiores mostram a Metilação Alelo-Específica (ASM), pico em vermelho, e os padrões de metilação de CpG em gametas (oócitos e espermatozoides) e tecido somático (sangue). O padrão de metilação oposto nos gametas e o forte sinal de ASM, que serviram como um dos critérios utilizados para definir as coordenadas desta ICR. **Fonte:** UCSC Genome Browser.

3.2.2. Obtenção de dados públicos de metilomas bovinos

A obtenção dos dados foi realizada com base em dados públicos de metilação do DNA obtidos por WGBS de amostras bovinas disponíveis em bancos de dados internacionais, como o *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) e o UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

As amostras foram organizadas em duas categorias conforme a concepção animal. As amostras controle são provenientes de animais que nasceram por monta natural, e as amostras de estudo de caso são provenientes de animais que nasceram por meio de tecnologias de reprodução assistida (ARTs). Os tecidos analisados incluíram blastocistos *in vivo* (N=3), blastocistos *in vitro* (N=7), sangue controle (N=20), sangue ARTs (N=11), cérebro (N=13), glândula mamária (N=11), músculo *longissimus dorsi* (N=16), músculo (N=11), músculo ARTs (N=14), ovário (N=10), oócitos (N=23) e espermatozoides (N=41). Além disso, também foram

consideradas amostras de estudo de caso, animais provenientes de inseminação artificial, que foram incluídas na categoria ARTs. Nos apêndices A e B há descrição dos grupos controle e ART, respectivamente, destacando as características mais importantes para as análises do estudo.

Os filtros utilizados para pesquisar as amostras nos bancos de dados públicos foram: *Bos*, *Bisulfite-seq ou WGBS*, *clone*, *cloning*, *Somatic cell nuclear transfer*, *Assisted reproductive technology*, *Artificial Insemination*, *in vitro production*, *in vitro fertilization*, *blood*, *brain*, *embryos* e *longissimus dorsi*.

3.3. Processamento dos dados

As análises de bioinformática foram realizadas em um servidor com o sistema operacional Ubuntu 24.04.3 LTS (Canonical Ltd.). As amostras selecionadas na coleta de dados foram recuperadas diretamente pelo terminal do Linux, utilizando ferramentas como "prefetch" e "fasterq-dump" do SRA Toolkit (e o SRA downloader), garantindo eficiência na obtenção e organização dos arquivos para análise subsequente (*default parameters*).

Os dados brutos das sequências de WGBS foram submetidos a rigorosos controles de qualidade e a processamento para garantir a precisão das análises subsequentes. Inicialmente, a qualidade das leituras foi avaliada com o software *FastQC* v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que verifica parâmetros como a qualidade de bases (*Phred score*), conteúdo de adaptadores, e a presença de sequências duplicadas. Após o controle de qualidade inicial, as leituras foram processadas com o *Trim Galore!* Versão 0.6.10 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) para a remoção de adaptadores e o corte de bases de baixa qualidade, utilizando parâmetros modificados em relação aos parâmetros padrão (--q 20, --length 50, --fastqc, --illumina, --phred33, --gzip, --cores 4). Adicionalmente, bases com *Phred score* inferior a 20 foram aparadas das extremidades das leituras, e as sequências resultantes com comprimento inferior a 20 pares de base (pb) foram descartadas. Todos os relatórios gerados nesta etapa de processamento foram analisados cuidadosamente.

Para validar a eficácia da etapa de pré-processamento descrita acima, as leituras tratadas pelo *Trim Galore!* foram submetidas a uma segunda rodada de

controle de qualidade utilizando novamente o FastQC. A inspeção manual dos relatórios *HTML* gerados para cada amostra teve como objetivo confirmar a remoção completa dos adaptadores. A análise focou em múltiplos parâmetros críticos, incluindo "*Per base sequence quality*" para avaliar a qualidade ao longo das leituras, "*Sequence Duplication Levels*" para verificar a complexidade da biblioteca, e "*Adapter Content*" para detectar contaminação por adaptadores. Módulos como "*Per base sequence content*" e "*Per sequence GC content*" foram cuidadosamente avaliados, pois seus alertas ou falhas são frequentemente esperados em bibliotecas de bissulfito de sódio devido à conversão química de citosinas não metiladas, que altera a composição de bases e o conteúdo de GC das sequências. Esta inspeção inicial foi de fundamental importância para diagnosticar a condição dos dados brutos e orientar a etapa subsequente ao pré-processamento.

Em seguida, as leituras foram alinhadas ao genoma de referência da espécie *Bos taurus* (versão ARS-UCD1.2/*bosTau9*) utilizando *Bismark* v0.24.1 (Krueger & Andrews, 2011), utilizando parâmetros modificados em relação aos parâmetros padrão (-q, --multicore 12, --bam, --gzip). Esta ferramenta é especificamente projetada para dados de sequenciamento de bissulfito, realizando um alinhamento que considera a conversão de citosinas para timinas e, assim, garante a correta atribuição das leituras ao genoma. Ao final do processo, os relatórios de alinhamento gerados pelo *Bismark* para cada amostra foram inspecionados. A principal métrica avaliada foi a eficiência de alinhamento (*mapping efficiency com 60%*), que indica a porcentagem de leituras que foram mapeadas com sucesso.

Após a etapa de alinhamento, foi realizado um procedimento de deduplicação para remover os artefatos de amplificação por PCR, que podem introduzir um viés quantitativo nas análises de metilação. Para esta tarefa, foi utilizado o comando *deduplicate_bismark*, uma ferramenta integrada ao pacote *Bismark* (Krueger & Andrews, 2011), utilizando parâmetros modificados em relação aos parâmetros padrão (-s ou -p, e --bam), de acordo com o tipo de biblioteca (single-end ou paired-end). Este passo garante que cada fragmento de DNA inicial seja contado apenas uma vez, aumentando a precisão da quantificação dos níveis de metilação (Krueger & Andrews, 2011). Ao final do processo, os relatórios de deduplicação gerados pelo *Bismark* para cada amostra foram inspecionados.

Após a remoção das duplicatas de PCR, os arquivos BAM resultantes foram ordenados de acordo com suas coordenadas cromossômicas. Para esta tarefa, foi

utilizado o comando *sort* do pacote *SAMtools* v1.10 (Li *et al.*, 2009; Danecek *et al.*, 2021), utilizando parâmetros padrão (*default parameters*). Este procedimento garantiu que os arquivos de alinhamento estivessem em formato padronizado e estivessem prontos para as próximas etapas da análise.

Com os arquivos de alinhamento devidamente ordenados por coordenadas genômicas, o passo seguinte foi a criação de um arquivo de índice para cada amostra. Foi empregado o comando *index* do pacote *SAMtools* v1.10 (Li *et al.*, 2009; Danecek *et al.*, 2021), utilizando parâmetros padrão (*default parameters*). Este processo gera um arquivo auxiliar (.bai), que funciona como um índice, permitindo o acesso rápido e aleatório a qualquer região genômica do arquivo BAM correspondente, sem a necessidade de ler o arquivo sequencialmente. A criação deste índice é um pré-requisito obrigatório para o funcionamento otimizado de diversas ferramentas de análise *downstream*, incluindo o pacote *wgbstools* utilizado neste estudo.

A quantificação dos níveis de metilação para as regiões de interesse foi realizada com o pacote *wgbstools* (Loyfer *et al.*, 2023), um conjunto de ferramentas otimizadas para dados de sequenciamento de bissulfito. Primeiramente, o estado de metilação de cada citosina no contexto CpG foi extraído dos arquivos BAM alinhados e deduplicados. Este processo, executado pelo comando *bam2pat*, gerou arquivos de padrão de metilação por leitura (.pat.gz) e de níveis de metilação por sítio (.beta), utilizando parâmetros padrão (*default parameters*). Paralelamente, foi preparado um arquivo em formato BED com as coordenadas genômicas das regiões de interesse investigadas (N=63). Por fim, utilizando os arquivos *beta* de todas as amostras e o arquivo BED das regiões, a ferramenta foi empregada para calcular o nível médio de metilação global e o nível de cada coordenada em cada amostra. O resultado deste *pipeline* foi uma tabela abrangente (.csv), que consolida os perfis de metilação e serve como base para as análises estatísticas de metilação diferencial.

Para dados de WGBS provenientes de amostras com baixo número de células (como em oócitos), uma etapa adicional foi necessária para as amostras biológicas que foram sequenciadas em múltiplas corridas (réplicas técnicas), foi necessário consolidar os dados para aumentar a cobertura de sequenciamento e o poder estatístico da análise. Os arquivos BAM deduplicados correspondentes a cada réplica foram concatenados em um único arquivo por amostra utilizando o comando *cat* do pacote *SAMtools* v1.10, utilizando parâmetros padrão (*default parameters*).

Após a concatenação, cada novo arquivo BAM agregado foi submetido novamente às etapas de processamento subsequentes: foi ordenado por coordenadas genômicas com *samtools sort* e, em seguida, indexado com *samtools index*. Finalmente, o comando *wgbstools bam2pat* foi executado sobre estes arquivos para gerar um perfil de metilação único, representativo de cada amostra, garantindo que toda a informação de sequenciamento fosse aproveitada nas análises *downstream*.

3.4. Caracterização do perfil de metilação nas ICRs

Para a caracterização quantitativa das ICRs e das candidatas a ICRs, foram geradas tabelas que consolidam os níveis de metilação (5mC %) de cada região em todas as amostras analisadas. A partir desses dados, foram calculados a média e o desvio padrão (DP) da metilação para cada coordenada genômica, em seus respectivos grupos teciduais (Apêndices C-F). Esta análise descritiva permitiu uma avaliação inicial dos perfis de metilação e da variabilidade em cada grupo (controle *versus* ARTs) (Apêndices G-L).

Com base nos perfis de 5mC% obtidos, as ICRs foram classificadas para identificar padrões normais ou aberrantes de metilação, como perda de metilação (LOM) ou ganho de metilação (GOM). Foram adotados critérios específicos para os diferentes tipos celulares: (1) para gametas (oócitos e espermatozoides), foi esperado um perfil de metilação binário, onde as ICRs deveriam estar ou completamente metiladas (definido como um nível de metilação entre 90-100%) ou não metiladas (0-10%), refletindo seu estado de *imprinting* de origem parental; (2) para estruturas e tecidos somáticos, foi esperado um padrão de metilação intermediário conforme os critérios estabelecidos por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011). Considerou-se um perfil normal de metilação valores entre 35% e 65%. Desvios significativos desses intervalos foram considerados indicativos de instabilidade do *imprinting*.

Os níveis de metilação do DNA foram avaliados para as ICRs conhecidas na literatura e para as candidatas a ICRs, abrangendo estruturas e tecidos bovinos, embrionários e somáticos.

Foram analisadas ICRs descritas na literatura, utilizando valores de metilação obtidos para diferentes amostras de tecidos. Somente foram incluídos tecidos com cobertura média de sequenciamento superior a 10x. Sendo elas, sangue ($N=20$),

cérebro ($N=13$), fígado adulto ($N=4$), músculo *longissimus dorsi* ($N=16$) e músculo esquelético ($N=11$). Para cada ICR em cada tecido, os valores de metilação das amostras foram organizados, calculados a média e o desvio padrão entre amostras, resultando em uma estimativa de metilação média e de variabilidade por tecido. Em seguida, foi calculada para cada ICR, a média entre tecidos e o desvio associado entre tecidos.

3.5. Visualização dos dados gráficos

A visualização gráfica dos dados foi conduzida de forma complementar entre os ambientes R (versão 4.5.2) e Python (versão 3.12.3).

No ambiente R, a biblioteca *readxl* (<https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/index.html>) foi utilizada para a importação dos dados brutos. As etapas de manipulação, filtragem e sumarização estatística (médias, DP e agrupamentos) foram conduzidas com o pacote *dplyr* (<https://dplyr.tidyverse.org/articles/dplyr.html>) e a organização estrutural dos dados com o pacote *tidyr* (<https://tidyr.tidyverse.org/>). O *ComplexHeatmap* foram gerados utilizando o pacote *ggplot2* (<https://r-graph-gallery.com/ggplot2-package.html>) e *ggpubr* (www.r-graph-gallery.com/) (Staples, 2023).

Para a análise visual do perfil de metilação das ICRs com o *ComplexHeatmap*, as amostras e as ICRs foram organizadas com padrões de similaridade entre os grupos experimentais e as regiões genômicas. A intensidade da metilação foi representada por uma escala colorimétrica divergente, variando de 0 (Hipometilado - 0% de metilação, representado na cor verde) a 1 (Hipermetilado - 100% de metilação, representado na cor vermelha), com valores intermediários (50%) representados em preto. Os resultados foram visualizados contendo uma barra de anotação superior para identificar e distinguir os grupos experimentais (Controle vs. diferentes técnicas de ARTs).

Na linguagem Python, a representação da dispersão dos dados com a utilização de Dotplot (matriz de pontos) e Volcano Plot, utilizando as bibliotecas *Pandas* (<https://pandas.pydata.org/>) para manipulação e análise de dados tabulares, como planilhas de excel, *NumPy* (<https://numpy.org/pt/>) com função de computação numérica e matemática avançada, *Seaborn*

(<https://seaborn.pydata.org/tutorial/introduction.html>) e *Matplotlib* (<https://matplotlib.org/stable/index.html>) para visualização gráfica.

Para a avaliação dos padrões de metilação através do gráfico *Dotplot*, a metilação de cada ICR (eixo Y) por amostra (eixo X) foi codificada por cores baseadas em limiares biológicos específicos. Para estruturas e tecidos somáticos, a cor azul indicou metilação esperada (35-65%) e a vermelha indicou desvios, de acordo com o padrão de Woodfine, Huddleston e Murrell (2011). Para os grupos gaméticos, a cor azul foi atribuída aos extremos esperados (0-10% ou 90-100%) e a vermelha aos valores intermediários, com linhas verticais delimitando visualmente os diferentes subgrupos teciduais.

Para a geração dos gráficos de Volcano Plot ($\Delta\beta$), foi desenvolvido um *script* para executar as etapas estatísticas e analisar a significância entre as amostras de controle e as de ARTs. Para cada ICR, foram utilizados os valores de metilação (β) das amostras de cada grupo, excluindo os valores ausentes (NA). A comparação foi realizada apenas quando havia pelo menos duas amostras com valores válidos em cada grupo, as ICRs ausentes em ambos os grupos não foram testadas. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk ($p \leq 0,05$), quando o número de amostras era ≥ 3 e quando a variância era diferente de zero. Quando o número de amostra era < 3 ou a variância era zero, a normalidade não foi testada por Shapiro e o grupo foi tratado como normal.

Para a comparação entre dois grupos independentes, foi aplicado o teste t de Welch (t-test com variâncias possivelmente diferentes; `equal_var = False`) quando ambos os grupos foram considerados normais. Caso contrário, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann–Whitney (bicaudal). O tamanho de efeito foi calculado como $\Delta\beta = \text{média do grupo caso} - \text{média do grupo controle}$. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Para destacar alterações com maior relevância biológica, foi adotado também um limiar de efeito $|\Delta\beta| \geq 0,09$ (Arner *et al.*, 2015).

O volcano plot foi construído com $\Delta\beta$ no eixo x e $-\log_{10}(p)$ no eixo y. No gráfico, a linha horizontal indica o ponto de corte de $p < 0,05$ e as linhas verticais indicam os pontos de corte de $\Delta\beta = \pm 0,09$. Os pontos foram classificados como hipermetilados ($\Delta\beta \geq 0,09$ e significativo), hipometilados ($\Delta\beta \leq -0,09$ e significativo) e não significativos (demais casos).

Os volcano plot foram gerados no ambiente Python, utilizando as bibliotecas *numpy*, *pandas*, *scipy* e *matplotlib*, a partir das tabelas resumo de cada comparação.

Para visualizar de forma conjunta o tamanho da diferença de metilação e a evidência estatística entre os grupos, foi utilizado o volcano plot baseado em $\Delta\beta$. Para cada ICR avaliada, calculou-se o $\Delta\beta$ como a diferença entre as médias dos valores de β dos grupos, seguindo a direção do grupo caso para grupo controle ($\Delta\beta = \text{média}(\beta)\text{caso} - \text{média}(\beta)\text{controle}$). Assim, valores positivos de $\Delta\beta$ indicam maior metilação no grupo caso em relação ao controle, ou seja, hipermetilação no grupo caso. Enquanto valores negativos indicam menor metilação no grupo caso, ou seja, hipometilação. O volcano plot foi construído com base no p-valor ajustado (FDR), aplicando correção para múltiplos testes via método de *Benjamini-Hochberg*.

O limiar (*threshold*) aproximado de 10% é relatado na literatura por Littlejohn et al. (2018) para a análise de metilação diferencial. Portanto, adotou-se um ponto de corte de 0,09 para o valor delta beta ($|\Delta\beta|$). Esta escolha baseia-se no fato de que pequenas mudanças na magnitude da metilação em tecidos metabolicamente ativos podem refletir alterações biológicas significativas. Em estudos de tecidos similares em mamíferos, como o de Arner et al. (2015), demonstrou-se que sítios diferencialmente metilados, com uma diferença mediana de 0,09, foram funcionalmente associados a mudanças críticas na expressão gênica e nas vias metabólicas. Tal limiar permite capturar assinaturas epigenéticas sutis, porém consistentes, que seriam excluídas por critérios mais rígidos.

3.6. Disponibilização dos resultados

Para garantir a total transparência e reprodutibilidade deste estudo, o *pipeline* computacional completo, detalhando todos os comandos utilizados desde o *download* até o processamento final dos dados, está integralmente documentado. Os *scripts* e fluxos de trabalho estão disponíveis em um repositório público na plataforma GitHub (https://github.com/jessicamacedorafael/WGBS_Workflow.git), permitindo que a metodologia seja replicada pela comunidade científica.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e mapeamento das ICRs

A partir da conversão das coordenadas do genoma humano (GRCh38/hg38) para o genoma bovino de referência (Bostau9) via ferramenta *LiftOver*, seguida pela aplicação de quatro critérios de filtragem estabelecidos na metodologia: (1) validação de coordenadas humanas, (2) perfil de metilação binária em gametas, (3) metilação alélica específica em tecidos e (4) sobreposição com sítios de ligação de ZFP57, foi possível definir o conjunto final de regiões de estudo.

No total, foram identificadas e caracterizadas 63 regiões que atendiam aos critérios para o genoma bovino. A análise permitiu ainda separar essas regiões em dois grupos distintos, baseados nos achados da literatura: (1) as ICRs conhecidas correspondem a um total de 48 regiões já descritas previamente na literatura e (2) as ICRs candidatas correspondem a 15 regiões que foram identificadas como novas candidatas a ICRs, pois apresentaram conservação de sequência e características epigenéticas compatíveis com o *imprinting* genômico, mas ainda não descritas como tal para bovinos.

A nomenclatura das ICRs conhecidas foi estabelecida com base na proximidade gênica. Nas situações em que a região estava próxima a dois ou mais genes, adotou-se ambos os nomes. O conjunto analisado compreende: *BNIP3P12*, *SMOC2*, *MRPL23/H19*, *TLL2*, *IGF2R/AIRN*, *PLAGL1/HYMAI*, *NFIC*, *CACNB2*, *GNAS** (primeira ICR próxima ao *GNAS* encontrada), *GNAS*** (segunda ICR próxima ao *GNAS* encontrada), *TMEM161A*, *BLCAP/INNAT*, *KLB*, *PLEC*, *FAM83H*, *SPON1*, *B3GNT6*, *SMTN*, *HERC3/NAP1L5*, *SCUBE1*, *RPS9P4*, *ZNF837*, *ZIM2/PEG3/MIMT1*, *CYGB/PRCD*, *TRIM51FP*, *KCNH3*, *DPP6*, *ACTR3C*, *MESTIMESTIT1*, *GRB10*, *SNHG14/SNRPN/SNURF*, *LINC02244*, *IGF1R*, *NPAS3*, *LINC01267*, *ZNF890P*, *CARD11*, *NEURL1*, *INPP5F*, *EBF3*, *CLDN23*, *ZNF703*, *CTNNA3/LRRTM3*, *ACKR3*, *EPHA10*, *KCNQ1OT1*, *DIRAS3* e *PKP3* (Apêndice M).

Devido a heterogeneidade nas nomenclaturas e coordenadas na literatura, e visando facilitar a visualização gráfica e a análise dos dados, adotou-se neste estudo uma nomenclatura numérica e sequencial provisória das 15 novas candidatas a ICRs, as mesmas foram nomeadas de *ICR1* a *ICR15* (Apêndice N).

4.2. Caracterização do perfil de metilação em bovinos a partir de ICRs conhecidas

Com o objetivo de caracterizar o perfil médio de metilação de ICRs clássicas associadas ao *imprinting* em bovinos, foram avaliadas 13 regiões utilizando a base de dados de WGBS, considerando múltiplos tecidos por região. São elas: *MRPL23/H19*, *IGF2R/AIRN*, *PLAGL1/HYMAI*, *GNAS**, *GNAS***, *BLCAP/NNAT*, *ZIM2/PEG3/MIMT1*, *MEST/MESTIT1*, *GRB10*, *SNHG14/SNRPN/SNURF*, *IGF1R*, *KCNQ1OT1* e *DIRAS3*.

Em humanos, Woodfine, Huddleston e Murrell (2011) realizaram análises com pirosequenciamento e definiram como compatível com o padrão esperado de ICRs um intervalo de metilação médio de 50% \pm 15%. No conjunto bovino analisado, a média geral das ICRs foi de 52,49% \pm 5,05%, considerando como aceitável o intervalo de 41,9% a 62,1%, indicando um perfil predominantemente intermediário, consistente com o comportamento esperado para regiões de *imprinting* (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização do perfil de metilação em bovinos a partir de ICRs conhecidas.

ICRs	Sangue	Cérebro	Fígado Adulto	Músculo LD	Músculo	Média Geral
	Média/DP	Média/DP	Média/DP	Média/DP	Média/DP	
<i>BLCAP/NNAT</i>	68 \pm 0,04	67 \pm 0,08	51 \pm 0,03	58 \pm 0,05	59 \pm 0,04	60,6%
<i>GRB10</i>	90 \pm 0,03	60 \pm 0,07	35 \pm 0,09	56 \pm 0,05	50 \pm 0,04	58,2%
<i>DIRAS3</i>	58 \pm 0,04	65 \pm 0,09	53 \pm 0,05	58 \pm 0,06	52 \pm 0,02	57,2%
<i>MRPL23/H19</i>	62 \pm 0,03	61 \pm 0,04	56 \pm 0,02	59 \pm 0,03	48 \pm 0,07	57,0%
<i>IGF2R/AIRN</i>	61 \pm 0,09	58 \pm 0,1	51 \pm 0,12	57 \pm 0,1	48 \pm 0,09	55,0%
<i>PLAGL1/HYMAI</i>	54 \pm 0,1	60 \pm 0,05	47 \pm 0,07	58 \pm 0,1	46 \pm 0,1	53,0%
<i>MEST/MESTIT1</i>	57 \pm 0,05	54 \pm 0,09	63 \pm 0,07	51 \pm 0,07	42 \pm 0,1	53,4%
<i>GNAS*</i>	48 \pm 0,05	49 \pm 0,09	49 \pm 0,03	58 \pm 0,04	51 \pm 0,04	51,0%
<i>GNAS**</i>	48 \pm 0,07	52 \pm 0,09	48 \pm 0,07	54 \pm 0,06	45 \pm 0,05	49,4%
<i>ZIM2/PEG3/MIMT1</i>	51 \pm 0,07	49 \pm 0,08	50 \pm 0,05	51 \pm 0,07	40 \pm 0,06	48,2%
<i>IGF1R</i>	46 \pm 0,06	54 \pm 0,06	45 \pm 0,08	50 \pm 0,08	40 \pm 0,09	47,0%
<i>KCNQ1OT1</i>	45 \pm 0,11	50 \pm 0,13	46 \pm 0,26	57 \pm 0,12	32 \pm 0,08	46,0%
<i>SNHG14/SNRPN/SNURF</i>	43 \pm 0,07	49 \pm 0,06	47 \pm 0,09	51 \pm 0,09	36 \pm 0,08	45,2%
					Média	52,4%
					DP	5,05%

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** DP: desvio padrão. *: Primeira ICR próxima ao gene *GNAS*. **: segunda ICR próxima ao gene *GNAS*.

Ao observar as médias por ICR, a maioria das regiões permaneceu dentro do intervalo de 35–65%, reforçando que essas ICRs, em bovinos, tendem a manter um nível intermediário de metilação quando analisadas em diferentes tecidos.

As ICRs com maiores médias foram *BLCAP/INNAT* (60,6% ± 7,02), *GRB10* (58,2% ± 20,15), *DIRAS3* (57,2% ± 5,17), *MRPL23/H19* (57,0% ± 5,63) e *IGF2R/AIRN* (55,0% ± 5,34). Em seguida, valores intermediários foram observados para *PLAGL1/HYMAI* (53,0% ± 6,32), *MEST/MESTIT1* (53,4% ± 7,8), *GNAS** (51,0% ± 4,06), *GNAS*** (49,4% ± 3,58) e *ZIM2/PEG3/MIMT1* (48,2% ± 4,66). As menores médias foram registradas em *IGF1R* (47,0% ± 5,29), *KCNQ1OT1* (46,0% ± 9,14) e *SNHG14/SNRPN/SNURF* (45,2% ± 5,93).

Mesmo nos *loci* menos metilados, os valores médios de metilação do DNA por ICR ainda se mantiveram próximos da faixa intermediária, apresentando um perfil compatível com o descrito para *imprinting* genômico em outros mamíferos.

Esses resultados sustentam a definição de um perfil médio de metilação para ICRs bovinas em torno de 50% (± 5,05) com variação moderada entre *loci*, o que contribui para estabelecer uma referência para estudos de *imprinting* em bovinos baseados em WGBS.

Os tecidos utilizados nesta análise foram selecionados com base na cobertura de sequenciamento, adotando como critério mínimo uma profundidade de 10x. A cobertura média observada foi de 17,73x no tecido sanguíneo, 14,04x no cérebro, 12,90x no fígado adulto, 19,45x no músculo LD e 12,94x no músculo esquelético.

As médias e os desvios padrão foram calculados por tecido a partir das amostras disponíveis em cada grupo (sangue, N=20; cérebro, N=13; fígado adulto, N=4; músculo *longissimus dorsi*, N=16; músculo esquelético, N=11).

4.3. Análise do perfil de metilação em diferentes ICRs e diferentes estruturas e tecidos

4.3.1. ICRs conhecidas - perfil de 5mC% em gametas

A análise do perfil de metilação foi estendida às células germinativas, oócitos e espermatozoides, as quais carregam perfis de metilação parental específicos em ICRs. A avaliação buscou verificar o padrão das ICRs para os níveis de metilação

esperados para cada gameta (hipermetilado ou hipometilado, dependendo da origem parental da ICR). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.

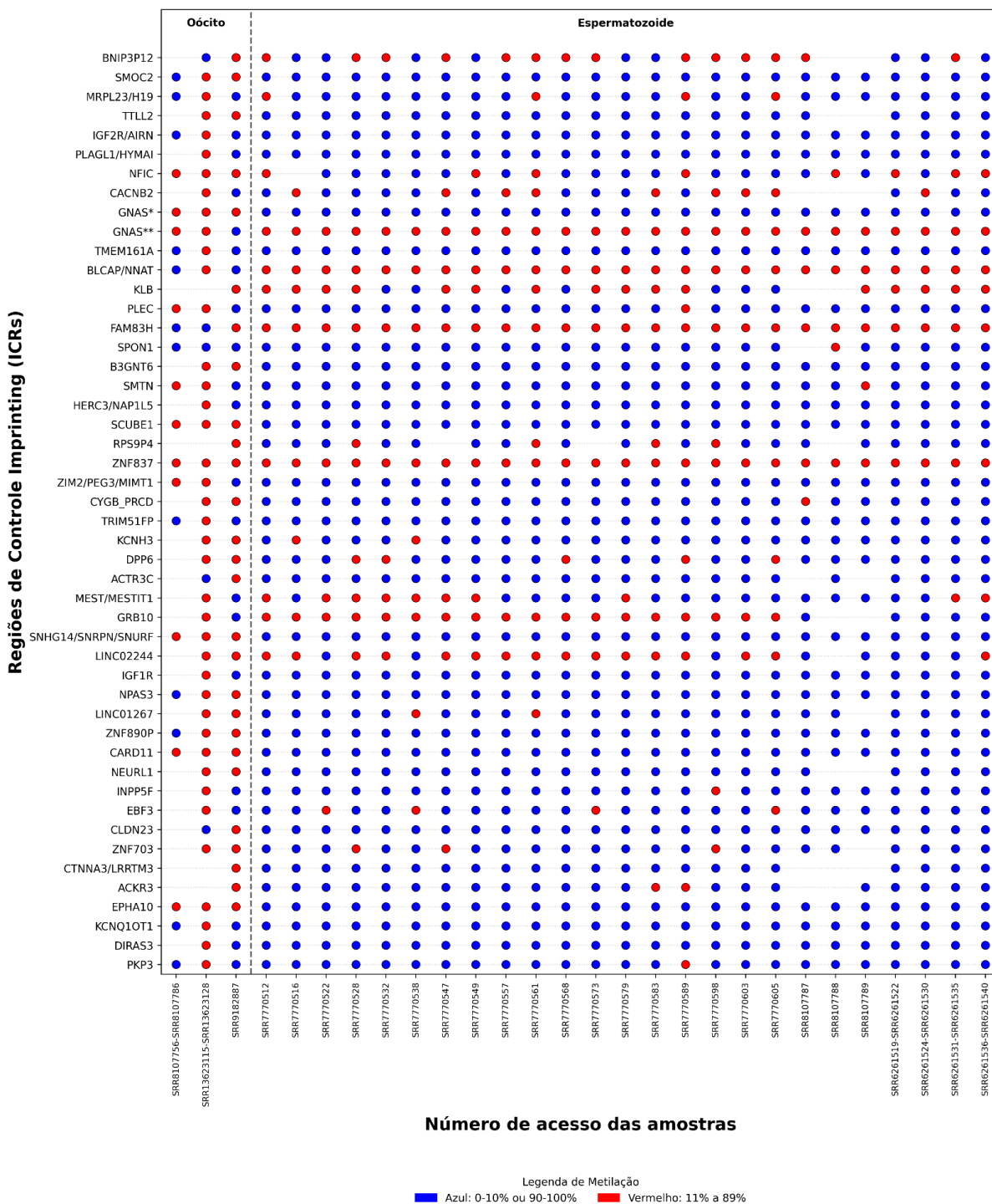


Figura 4. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em grupos gaméticos (oócito e espermatozoide) para ICRs conhecidas em mamíferos. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do perfil de metilação do DNA esperado (0%-10% e 90%-100%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (11%-89%).

Os resultados revelaram uma discrepância na estabilidade epigenética entre os gametas feminino e masculino. No oócito, observou-se uma alta taxa de instabilidade na marca de metilação. Apenas a região *SPON1* apresentou-se integralmente dentro do padrão esperado em todas as amostras analisadas. Um grupo de 20 ICRs, incluindo *TTLL2*, *NFIC*, *GNAS** e *SNHG14/SNRPN/SNURF*, exibiu perfis de metilação fora do esperado em todas as réplicas. Adicionalmente, a maior parte das regiões analisadas apresentou perfil heterogêneo, com variação entre as amostras, afetando genes essenciais para o desenvolvimento, como *MRPL23/H19*, *IGF2R/AIRN*, *PLAGL1/HYMAI* e *KCNQ1OT1*.

Em contrapartida, nas amostras de espermatozoide demonstrou resultados dentro do esperado, sendo significativamente maior na manutenção das marcas de *imprinting*. Um total de 23 regiões apresentou estabilidade plena, conforme o padrão esperado em todas as amostras. Este grupo inclui ICRs já caracterizadas como as *IGF2R/AIRN*, *PLAGL1/HYMAI*, *SNHG14/SNRPN/SNURF*, *KCNQ1OT1* e *DIRAS3*. O número de regiões consistentemente fora do padrão de metilação esperado foi reduzido a apenas quatro: *GNAS***, *BLCAP/NNAT*, *FAM83H* e *ZNF837*. A heterogeneidade, embora presente em 21 regiões, como *MRPL23/H19* e *MEST/MESTIT1*, foi menos predominante do que no gameta feminino.

Não houve registro de dados ausentes para nenhuma das ICRs em ambos os grupos gaméticos, permitindo uma análise completa do painel de genes selecionados. Há dados inconclusivos em determinadas amostras. A distribuição dos níveis de metilação e a dispersão dos dados para oócitos e espermatozoides podem ser visualizadas detalhadamente no Quadro 1.

Quadro 1. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas em gametas (oócito e espermatozoide).

Categoria de Metilação	Oócito	Espermatozoide
Padrão Esperado Bimodal (Associado a perfil Monoalélico)	<i>SPON1</i>	<i>SMOC2</i> , <i>TTLL2</i> , <i>IGF2R/AIRN</i> , <i>PLAGL1/HYMAI</i> , <i>GNAS*</i> , <i>TMEM161A</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>HERC3/NAP1L5</i> , <i>SCUBE1</i> , <i>ZIM2/PEG3/MIMT1</i> , <i>TRIM51FP</i> , <i>ACTR3C</i> , <i>SNHG14/SNRPN/SNURF</i> , <i>IGF1R</i> , <i>NPAS3</i> , <i>ZNF890P</i> , <i>CARD11</i> , <i>NEURL1</i> , <i>CLDN23</i> , <i>CTNNA3/LRRTM3</i> , <i>EPHA10</i> , <i>KCNQ1OT1</i> , <i>DIRAS3</i>

Fora do padrão em todas as amostras	<p><i>TLL2, NFIC, GNAS*, KLB, B3GNT6, SCUBE1, RPS9P4, ZNF837, CYGB/PRCD, KCNH3, DPP6, SNHG14/SNRPN/SNURF, LINC02244, LINC01267, CARD11, NEURL1, ZNF703, CTNNA3/LRRTM3, ACKR3, EPHA10</i></p>	<p><i>GNAS**, BLCAP/NNAT, FAM83H, ZNF837</i></p>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais com desvio)	<p><i>BNIP3P12, SMOC2, MRPL23/H19, IGF2R/AIRN, PLAGL1/HYMAI, CACNB2, GNAS**, TMEM161A, BLCAP/NNAT, PLEC, FAM83H, SMTN, HERC3/NAP1L5, ZIM2/PEG3/MIMT1, TRIM51FP, ACTR3C, MEST/MESTIT1, GRB10, IGF1R, NPAS3, ZNF890P, INPP5F, EBF3, CLDN23, KCNQ1OT1, DIRAS3, PKP3</i></p>	<p><i>BNIP3P12, MRPL23/H19, NFIC, CACNB2, KLB, PLEC, SPON1, SMTN, RPS9P4, CYGB/PRCD, KCNH3, DPP6, MEST/MESTIT1, GRB10, LINC02244, LINC01267, INPP5F, EBF3, ZNF703, ACKR3, PKP3</i></p>

4.3.2. ICRs candidatas - perfil de 5mC% em gametas

A análise do perfil de metilação foi estendida às ICRs candidatas nos gametas, oócito e espermatozoide, com o objetivo de verificar o estabelecimento das marcas epigenéticas diferenciais nestas células germinativas. A classificação dos resultados obtidos encontra-se na Figura 5.

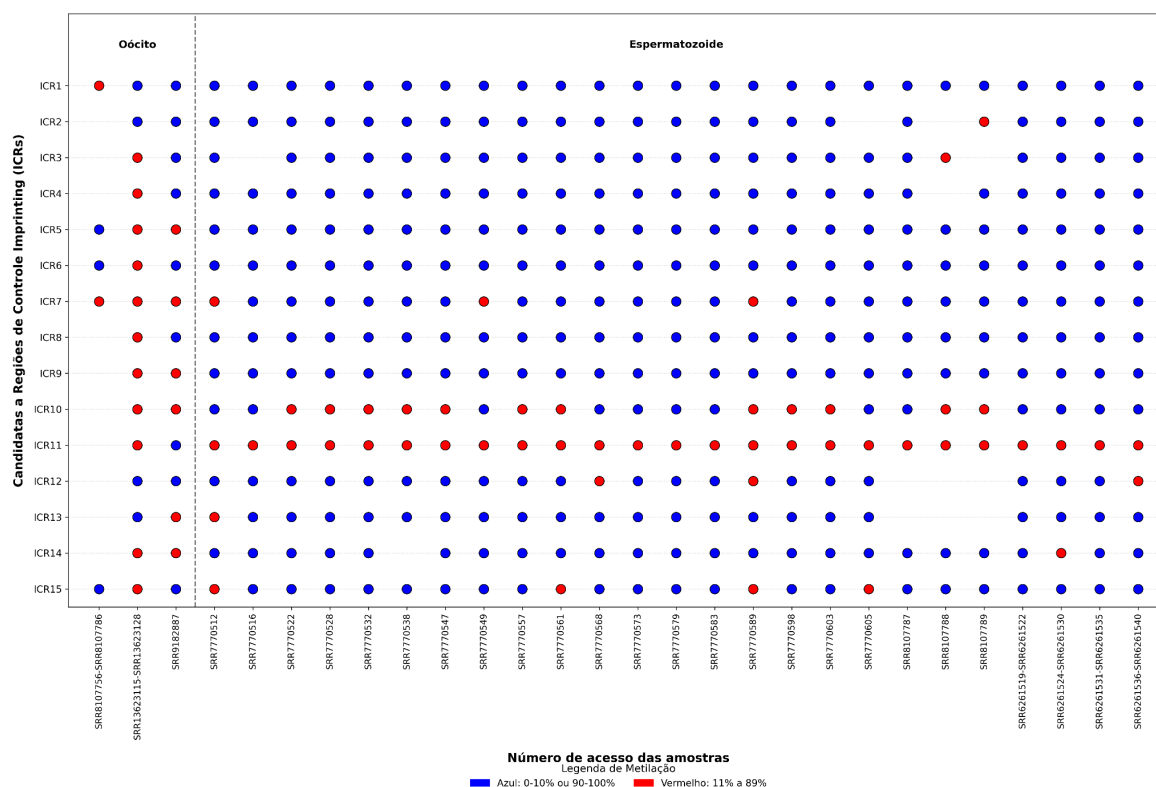


Figura 5. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em oócitos e espermatozoides de ICRs candidatas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (0%-10% e 90%-100%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (11%-89%).

A comparação entre os gametas feminino e masculino revelou diferenças importantes na consolidação das marcas epigenéticas nas regiões candidatas. O oócito apresentou um número reduzido de regiões integralmente dentro do padrão esperado, restringindo-se às ICR2 e ICR12. Um grupo significativo de candidatas, composto por ICR7, ICR9, ICR10 e ICR14, apresentou desvios do padrão esperado em todas as amostras analisadas. A maior parte das regiões no oócito (9 candidatas, incluindo ICR1, ICR4 e ICR15) apresentou comportamento heterogêneo, alternando entre conformidade e desvio entre as réplicas biológicas.

O espermatozoide, por sua vez, demonstrou uma maior estabilidade epigenética para as ICRs candidatas. Seis regiões (ICR1, ICR4, ICR5, ICR6, ICR8 e ICR9) mantiveram-se consistentemente dentro do padrão de metilação esperado para este gameta em todas as amostras. Apenas a região ICR11 falhou em atingir o padrão esperado em todas as réplicas. O grupo heterogêneo no espermatozoide englobou oito regiões, incluindo ICR2, ICR3 e ICR15, indicando variabilidade individual na marcação destas sequências.

Foi observado um contraste nas regiões que foram estáveis no espermatozoide (*ICR1*, *ICR4*, *ICR5*, *ICR6*, *ICR8* e *ICR9*) e que, no oócito, apresentaram comportamento heterogêneo ou diferente do esperado, sugerindo que a marcação destas candidatas pode ser predominantemente de origem paterna ou estabelecida mais tardiamente na linhagem materna. Inversamente, a *ICR2* e *ICR12*, estáveis no oócito, mostraram-se variáveis no gameta masculino. Não houve ausência de dados para nenhuma região, conforme ilustrado no Quadro 2.

Quadro 2. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas em gametas (oócito e espermatozoide).

Categoria de Metilação	Oócito	Espermatozoide
Padrão Esperado Bimodal (possivelmente associado a perfil Monoalélico)	<i>ICR2, ICR12</i>	<i>ICR1, ICR4, ICR5, ICR6, ICR8, ICR9</i>
Fora do padrão em todas as amostras (Desvios)	<i>ICR7, ICR9, ICR10, ICR14</i>	<i>ICR11</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais com desvio)	<i>ICR1, ICR3, ICR4, ICR5, ICR6, ICR8, ICR11, ICR13, ICR15</i>	<i>ICR2, ICR3, ICR7, ICR10, ICR12, ICR13, ICR14, ICR15</i>
Dados Ausentes / Inconclusivos	Nenhuma	Nenhuma

4.3.3. Estruturas e tecidos Adulto: ICRs conhecidas

A avaliação do perfil de metilação das ICRs conhecidas foi estendida a um grupo heterogêneo de estruturas e tecidos somáticos adultos (sangue, cérebro, glândula mamária, músculos e ovário) para verificar a manutenção da marca epigenética em diferentes contextos celulares. Os resultados foram categorizados conforme o padrão bimodal, associado a perfis monoalélicos esperados (Figura 6).

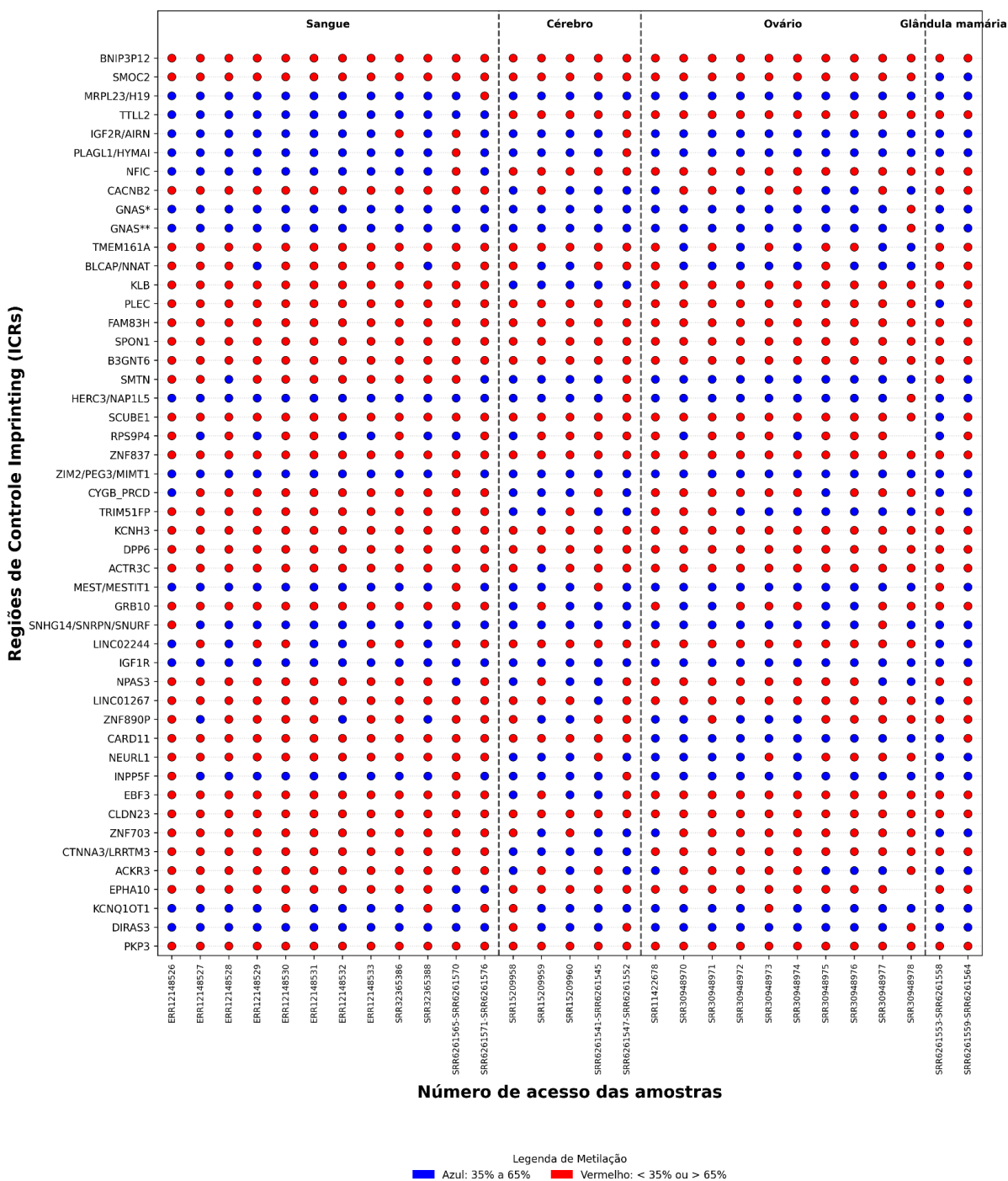


Figura 6. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no sangue, no cérebro, na glândula mamária e no ovário de ICRs conhecidas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

A análise revelou que a glândula mamária foi o tecido que apresentou a maior estabilidade epigenética, com 18 ICRs mantendo o padrão esperado em todas as amostras, incluindo *SMOC2*, *MRPL23/H19* e *IGF2R/AIRN*. Em contraste, no sangue, regiões classicamente estáveis, como *MRPL23/H19*, apresentaram variação para

ganho de metilação em algumas amostras, embora outras ICRs, como *TLL2* e *GNAS*, tenham se mantido estáveis. O tecido cerebral destacou-se pela estabilidade das ICRs *GNAS** e *GNAS***, enquanto o ovário apresentou um perfil distinto, em que estas mesmas regiões demonstraram hipermetilação nas amostras divergentes.

Um conjunto de ICRs mostrou-se consistentemente instável, fora do padrão esperado, na maioria dos tecidos deste grupo, com destaque para *BNIP3P12*, *SPON1*, *B3GNT6*, *ZNF837* e *PKP3*.

A variabilidade entre amostras também foi notável: no cérebro e no ovário, houve uma predominância de ICRs tendendo à hipermetilação nas amostras divergentes (como *IGF2R/AIRN* e *PLAGL1/HYMAI* no cérebro), enquanto a oscilação mista (hipo/hiper) foi menos frequente, sendo observada principalmente no sangue (*RPS9P4*, *INPP5F*, *KCNQ1OT1*) e no ovário (*ZNF890P*, *NEURL1*, *ACKR3*), conforme mostrado no Quadro 3.

Quadro 3. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas no sangue, cérebro, glândula mamária e ovário

Categoria de Metilação	Sangue	Cérebro	Glândula Mamária	Ovário
Padrão Esperado Bimodal (Associado a perfil Monoalélico)	<i>TLL2</i> , <i>GNAS*</i> , <i>GNAS**</i> , <i>HERC3</i> , <i>NAP1L5</i> , <i>IGF1R</i> , <i>DIRAS3</i>	<i>MRPL23</i> , <i>H19</i> , <i>GNAS*</i> , <i>GNAS**</i> , <i>KLB</i> , <i>ZIM2</i> , <i>PEG3</i> , <i>MIMT1</i> , <i>SNHG14</i> , <i>SNRPN</i> , <i>SNURF</i> , <i>IGF1R</i> , <i>CTNNA3</i> , <i>LRRTM3</i>	<i>SMOC2</i> , <i>MRPL23</i> , <i>H19</i> , <i>IGF2R</i> , <i>AIRN</i> , <i>PLAGL1</i> , <i>HYMAI</i> , <i>GNAS*</i> , <i>GNAS**</i> , <i>HERC3</i> , <i>NAP1L5</i> , <i>ZIM2</i> , <i>PEG3</i> , <i>MIMT1</i> , <i>CYGB</i> , <i>PRCD</i> , <i>SNHG14</i> , <i>SNRPN</i> , <i>SNURF</i> , <i>LINC02244</i> , <i>IGF1R</i> , <i>NEURL1</i> , <i>INPP5F</i> , <i>ZNF703</i> , <i>ACKR3</i> , <i>KCNQ1OT1</i> , <i>DIRAS3</i>	<i>MRPL23</i> , <i>H19</i> , <i>IGF2R</i> , <i>AIRN</i> , <i>PLAGL1</i> , <i>HYMAI</i> , <i>SMTN</i> , <i>ZIM2</i> , <i>PEG3</i> , <i>MIMT1</i> , <i>MEST</i> , <i>MESTIT1</i> , <i>IGF1R</i> , <i>CARD11</i> , <i>INPP5F</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>BNIP3P12</i> , <i>SMOC2</i> , <i>CACNB2</i> , <i>TMEM161A</i> , <i>KLB</i> , <i>PLEC</i> , <i>FAM83H</i> , <i>SPON1</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>SCUBE1</i> , <i>ZNF837</i> , <i>TRIM51FP</i> , <i>KCNH3</i> , <i>DPP6</i> , <i>ACTR3C</i> , <i>GRB10</i> , <i>LINC01267</i> , <i>CARD11</i> , <i>NEURL1</i> , <i>EBF3</i> , <i>CLDN23</i> ,	<i>BNIP3P12</i> , <i>SMOC2</i> , <i>TLL2</i> , <i>NFIC</i> , <i>TMEM161A</i> , <i>PLEC</i> , <i>FAM83H</i> , <i>SPON1</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>SCUBE1</i> , <i>ZNF837</i> , <i>KCNH3</i> , <i>DPP6</i> , <i>LINC02244</i> , <i>CARD11</i> , <i>CLDN23</i> , <i>EPHA10</i> , <i>PKP3</i>	<i>BNIP3P12</i> , <i>TLL2</i> , <i>NFIC</i> , <i>CACNB2</i> , <i>TMEM161A</i> , <i>BLCAP</i> , <i>NNAT</i> , <i>KLB</i> , <i>FAM83H</i> , <i>SPON1</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>ZNF837</i> , <i>KCNH3</i> , <i>DPP6</i> , <i>ACTR3C</i> , <i>GRB10</i> , <i>NPAS3</i> , <i>ZNF890P</i> , <i>EBF3</i> , <i>CLDN23</i> , <i>CTNNA3</i> , <i>LRRTM3</i> , <i>EPHA10</i> , <i>PKP3</i>	<i>BNIP3P12</i> , <i>SMOC2</i> , <i>TLL2</i> , <i>NFIC</i> , <i>KLB</i> , <i>PLEC</i> , <i>FAM83H</i> , <i>SPON1</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>SCUBE1</i> , <i>ZNF837</i> , <i>KCNH3</i> , <i>DPP6</i> , <i>ACTR3C</i> , <i>LINC02244</i> , <i>LINC01267</i> , <i>EBF3</i> , <i>CLDN23</i> ,

	ZNF703, CTNNA3/LRRTM3, ACKR3, PKP3			CTNNA3/LRRTM3 , EPHA10, PKP3
Heterogêneo (≥1 dentro; demais hipometiladas)	SMTN, SNHG14/SNRPN/S NURF, NPAS3, EPHA10	CACNB2, TRIM51FP, ZNF703, KCNQ1OT1	TRIM51FP	CACNB2, TRIM51FP, NPAS3, ZNF703
Heterogêneo (≥1 dentro; demais hipermetiladas)	MRPL23/H19, IGF2R/AIRN, PLAGL1/HYMAI, NFIC, BLCAP/NNAT, ZIM2/PEG3/MIMT1, CYGB/PRCD, MEST/MESTIT1, LINC02244, ZNF890P	IGF2R/AIRN, PLAGL1/HYMAI, BLCAP/NNAT, SMTN, HERC3/NAP1L5, CYGB/PRCD, ACTR3C, MEST/MESTIT1, GRB10, NPAS3, LINC01267, ZNF890P, NEURL1, INPP5F, EBF3, ACKR3, DIRAS3	PLEC, SMTN, SCUBE1, RPS9P4, MEST/MESTIT1, LINC01267, CARD11	GNAS*, GNAS**, TMEM161A, BLCAP/NNAT, HERC3/NAP1L5, RPS9P4, CYGB/PRCD, GRB10, SNHG14/SNRPN/ SNURF, KCNQ1OT1, DIRAS3
Heterogêneo (≥1 dentro; demais nos oscilantes)	RPS9P4, INPP5F, KCNQ1OT1	RPS9P4	Nenhuma	ZNF890P, NEURL1, ACKR3

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** * é a primeira ICR mais próxima encontrada ao gene e ** é a segunda ICR mais próxima encontrada do gene. Nenhuma ICR apresentou dados ausentes nos diferentes tecidos.

A análise comparativa entre o músculo *Longissimus dorsi* (LD) e o músculo esquelético geral permitiu avaliar a consistência da metilação em tecidos de mesma origem, mas com especificidades funcionais distintas (Figura 7).

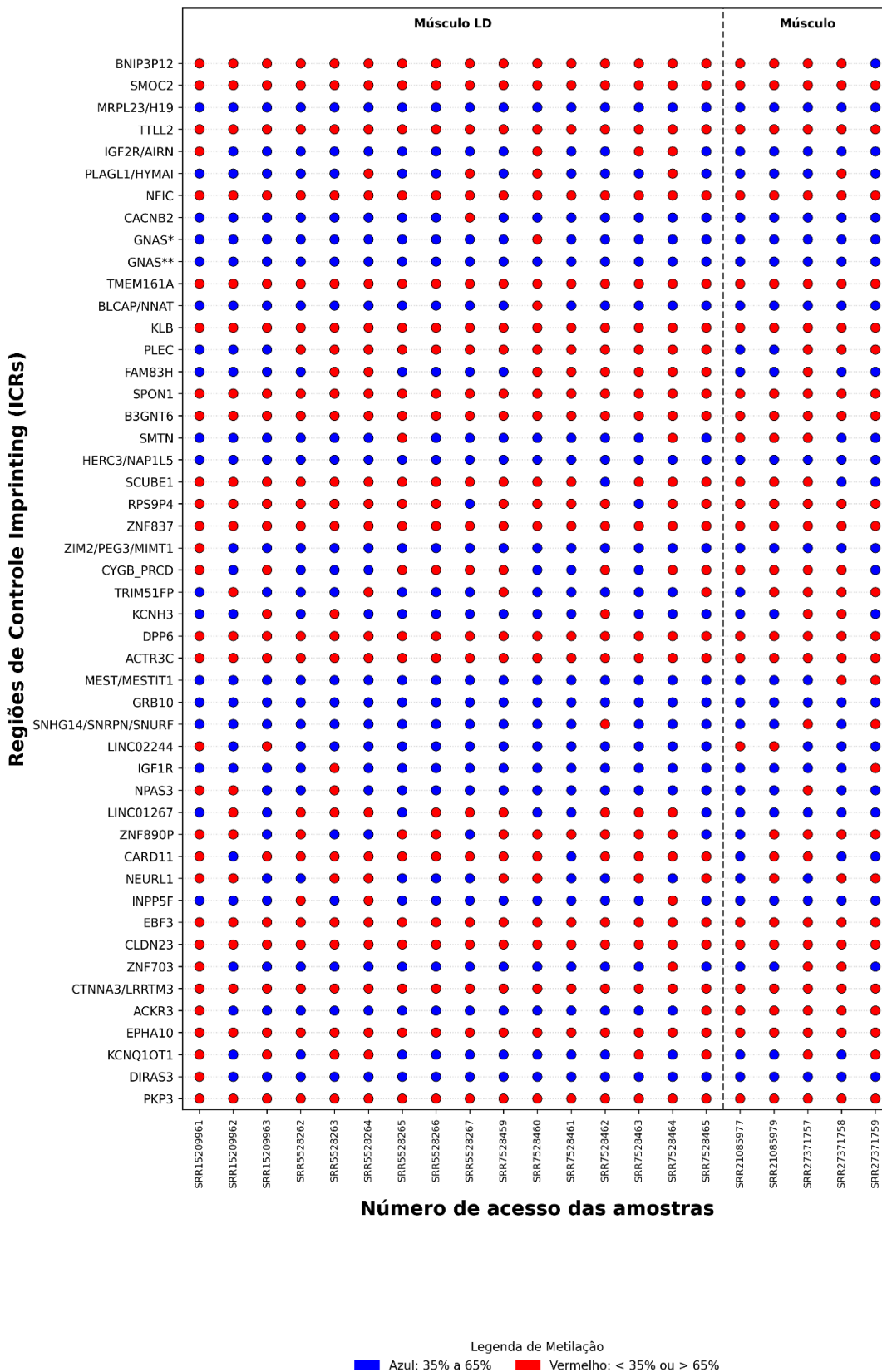


Figura 7. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no músculo LD e músculo esquelético de ICRs conhecidas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

Observou-se que o músculo esquelético geral apresentou um perfil de metilação mais estável do que o do músculo *longissimus dorsi* (LD). Enquanto o músculo esquelético exibiu 12 ICRs integralmente dentro do padrão esperado (incluindo *IGF2R/AIRN*, *CACNB2* e *DIRAS3*), o músculo LD apresentou apenas 5 regiões (*MRPL23/H19*, *GNAS***, *HERC3/NAP1L5*, *MEST/MESTIT1* e *GRB10*).

Ambos os tecidos compartilharam um conjunto de ICRs consistentemente fora do padrão, como *SMOC2*, *TLL2*, *NFIC*, *KLB* e *SPON1*. No músculo LD, houve uma forte tendência à hipermetilação em 18 regiões, incluindo *IGF2R/AIRN*, *PLAGL1/HYMAI* e *GNAS**, que, em outros tecidos, costumam ser mais estáveis. Já no músculo esquelético, a variabilidade foi mais equilibrada entre hipo e hipermetilação, e não foi detectada nenhuma região com oscilação mista, fenômeno presente no LD em *TRIM51FP* e *KCNQ1OT1*, por exemplo (Quadro 4).

Quadro 4. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs conhecidas em músculo *longissimus dorsi* e músculo esquelético.

Categoria de Metilação	Músculo LD	Músculo
Padrão Esperado Bimodal (Associado a perfil Monoalélico)	<i>MRPL23/ H19, GNAS**, HERC3/ NAP1L5, MEST/ MESTIT1, GRB10</i>	<i>MRPL23/ H19, IGF2R/ AIRN, CACNB2, GNAS*, GNAS**, BLCAP/ NNAT, HERC3/ NAP1L5, ZIM2/ PEG3/ MIMT1, GRB10, LINC01267, INPP5F, DIRAS3</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>BNIP3P12, SMOC2, TLL2, NFIC, TMEM161A, KLB, SPON1, B3GNT6, ZNF837, DPP6, ACTR3C, EBF3, CLDN23, CTNNA3/LRRTM3, EPA10, PKP3</i>	<i>SMOC2, TLL2, NFIC, TMEM161A, KLB, SPON1, B3GNT6, RPS9P4, ZNF837, DPP6, ACTR3C, EBF3, CLDN23, CTNNA3/LRRTM3, ACKR3, EPA10, PKP3</i>
Heterogêneo (≥1 dentro; demais hipometiladas)	<i>ZIM2/PEG3/MIMT1, CYGB/PRCD, SNHG14/SNRPN/SNURF, LINC02244, ACKR3</i>	<i>PLAGL1/HYMAI, CYGB/PRCD, TRIM51FP, MEST/MESTIT1, SNHG14/SNRPN/SNURF, LINC02244, IGF1R, NPAS3, KCNQ1OT1</i>
Heterogêneo (≥1 dentro; demais hipermetiladas)	<i>IGF2R/AIRN, PLAGL1/HYMAI, CACNB2, GNAS*, BLCAP/NNAT, PLEC, FAM83H, SMTN, SCUBE1, RPS9P4, KCNH3, IGF1R, LINC01267, ZNF890P, CARD11, NEURL1, INPP5F, DIRAS3</i>	<i>BNIP3P12, PLEC, FAM83H, SMTN, SCUBE1, KCNH3, ZNF890P, CARD11, NEURL1, ZNF703</i>
Heterogêneo (≥1 dentro; demais oscilantes)	<i>TRIM51FP, NPAS3, ZNF703, KCNQ1OT1</i>	-

4.3.4. Estruturas e tecidos adulto: ICRs candidatas

Adicionalmente, a investigação do perfil de metilação das regiões candidatas ao *imprinting* também conduzida no grupo de estruturas e tecidos somáticos para avaliar o potencial destas regiões em manter a marca epigenética monoalélica em diferentes contextos fisiológicos (Figura 8).

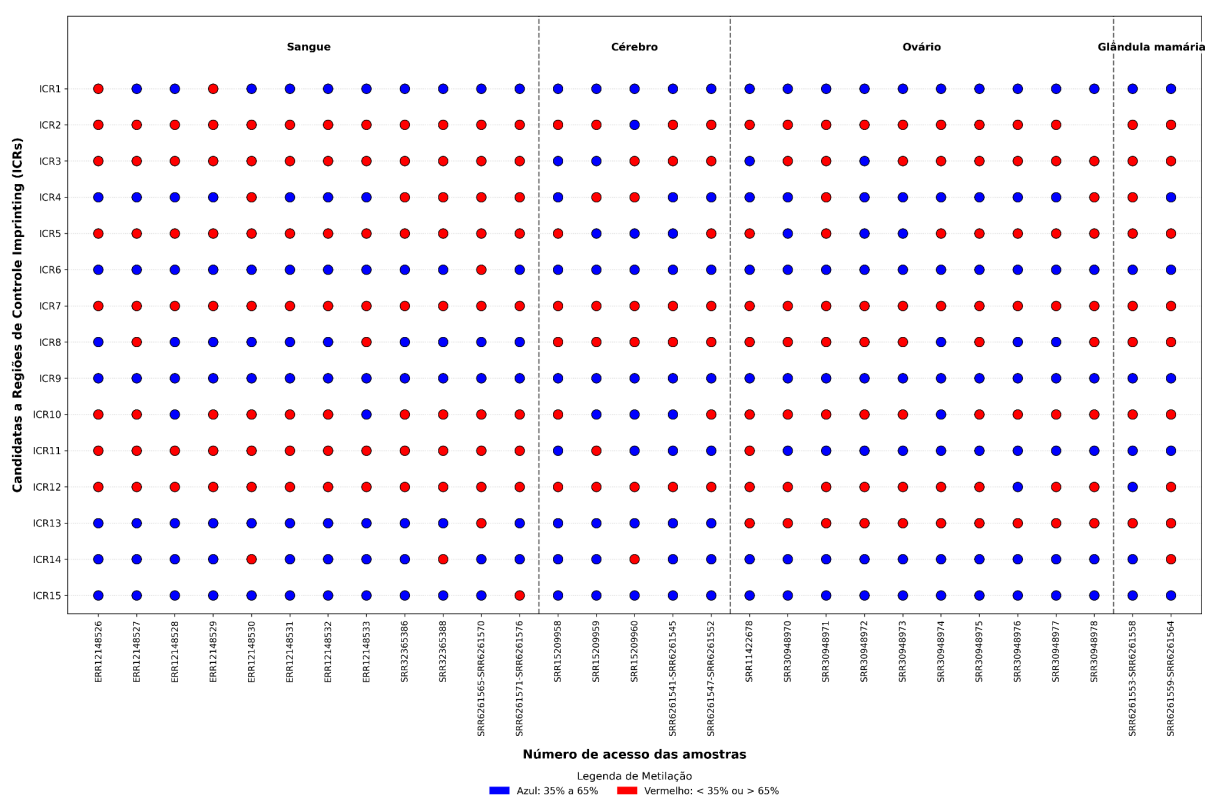


Figura 8. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no sangue, no cérebro, na glândula mamária e no ovário de ICRs candidatas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

O tecido sanguíneo apresentou o menor número de regiões estáveis, com apenas a *ICR9* mantendo o padrão esperado em todas as amostras, enquanto um grupo significativo (incluindo *ICR6*, *ICR13* e *ICR15*) demonstrou perfis de hipermetilação nas amostras divergentes. Em contrapartida, os tecidos de cérebro, glândula mamária e ovário demonstraram maior consistência, compartilhando a estabilidade das regiões *ICR1*, *ICR6*, *ICR9* e *ICR15* (esta última variando apenas no sangue e no cérebro).

A região *ICR7* destacou-se negativamente, apresentando-se fora do padrão esperado em todas as amostras de todos os quatro tecidos analisados. Quanto à variabilidade, observou-se uma tendência predominante à hipermetilação nas amostras heterogêneas, especialmente no ovário (*ICR3*, *ICR5*, *ICR8*, *ICR10*, *ICR11*) e no sangue. A oscilação mista foi um evento raro, restrito à *ICR4* nas amostras de sangue e cérebro. Não houve ausência de dados (NA) para nenhuma região neste grupo (Tabela 6).

Quadro 5. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas no sangue, cérebro, glândula mamária e ovário.

Categoria de Metilação	Sangue	Cérebro	Glândula Mamária	Ovário
Padrão Esperado Bimodal (possivelmente associado a perfil monoalélico)	<i>ICR9</i>	<i>ICR1, ICR6, ICR9, ICR13, ICR15</i>	<i>ICR1, ICR6, ICR9, ICR11, ICR15</i>	<i>ICR1, ICR6, ICR9, ICR14, ICR15</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>ICR2, ICR3, ICR5, ICR7, ICR11, ICR12</i>	<i>ICR7, ICR8, ICR12</i>	<i>ICR2, ICR3, ICR5, ICR7, ICR8, ICR10, ICR13</i>	<i>ICR2, ICR7, ICR13</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipometiladas)	<i>ICR1</i>	<i>ICR2, ICR14</i>	<i>ICR12</i>	<i>ICR4, ICR12</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipermetiladas)	<i>ICR6, ICR8, ICR10, ICR13, ICR14, ICR15</i>	<i>ICR3, ICR5, ICR10, ICR11</i>	<i>ICR4, ICR14</i>	<i>ICR3, ICR5, ICR8, ICR10, ICR11</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais oscilantes)	<i>ICR4</i>	<i>ICR4</i>	Nenhuma	Nenhuma

A comparação do perfil de metilação das ICRs candidatas entre o músculo LD e o músculo esquelético geral buscou identificar padrões de conservação ou divergência epigenética em tecidos de mesma origem embrionária (Figura 9).

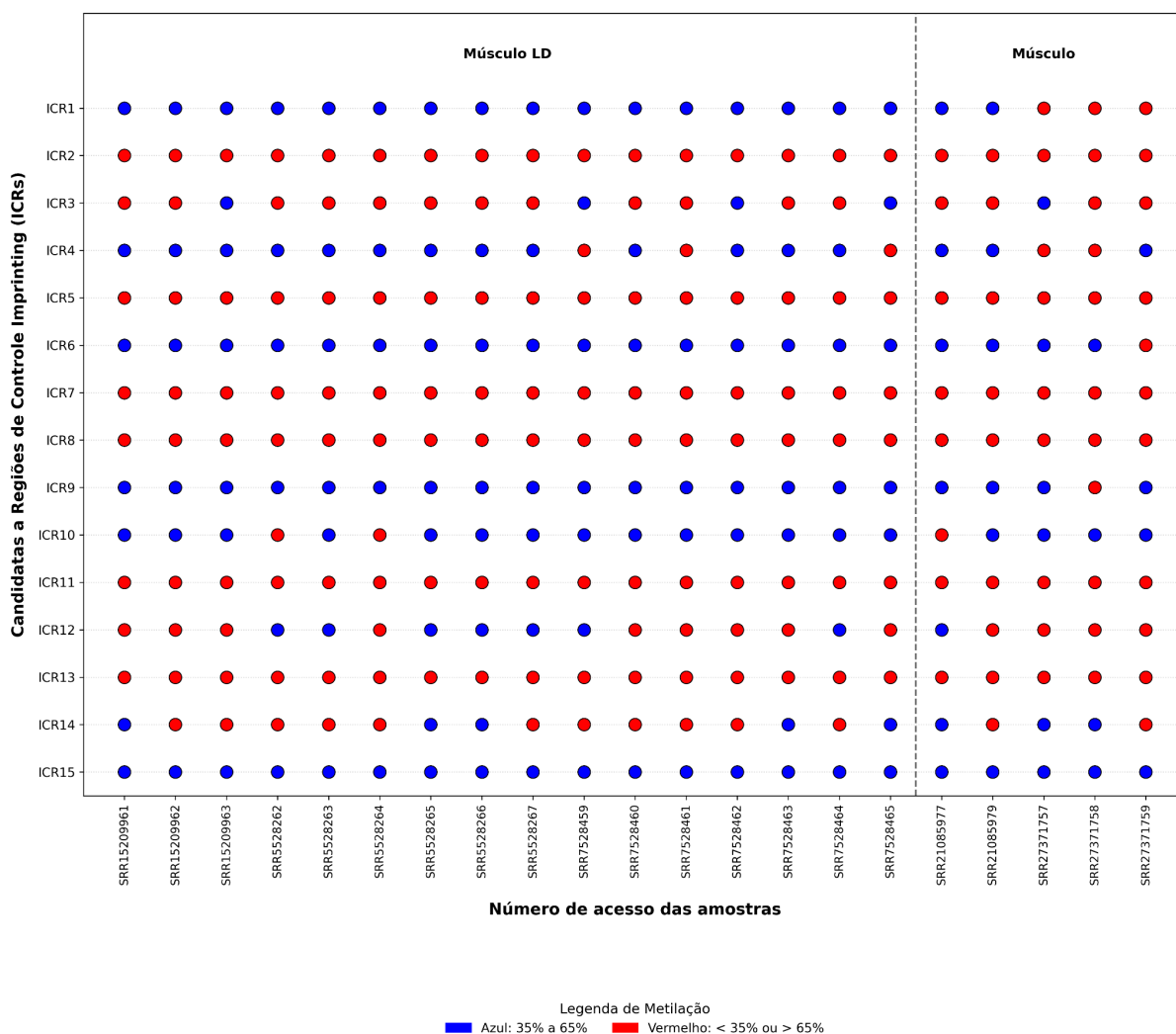


Figura 9. Dotplot dos padrões de metilação do DNA no músculo LD e músculo esquelético de ICRs candidatas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

Diferentemente do observado para as ICRs conhecidas, onde o músculo esquelético geral apresentou maior estabilidade, para as regiões candidatas o Músculo LD demonstrou um perfil mais conservado. O músculo LD apresentou quatro regiões (*ICR1*, *ICR6*, *ICR9* e *ICR15*) integralmente dentro do padrão bimodal (possivelmente monoalélico), enquanto no músculo esquelético apenas a *ICR15* manteve essa estabilidade, com as regiões *ICR1*, *ICR6* e *ICR9* apresentando variação para hipometilação.

Ambos os tecidos compartilharam um perfil idêntico de regiões consistentemente fora do padrão (*ICR2*, *ICR5*, *ICR7*, *ICR8*, *ICR11* e *ICR13*) e de regiões com tendência à hipermetilação (*ICR3*, *ICR10*, *ICR12* e *ICR14*). A principal

diferença foi reportada, portanto, na capacidade do músculo LD em manter a metilação da *ICR1*, *ICR6* e *ICR9*, que no músculo esquelético apresentaram níveis mais baixos de metilação. Não foram observadas oscilações mistas nem ausência de dados em nenhum dos tecidos musculares, como demonstrado no Quadro 6.

Quadro 6. Caracterização do perfil de metilação do DNA em ICRs candidatas em músculo longissimus dorsi e músculo esquelético.

Categoria de Metilação	Músculo LD	Músculo Esquelético
Padrão Esperado Bimodal (possivelmente associado a perfil monoalélico)	<i>ICR1, ICR6, ICR9, ICR15</i>	<i>ICR15</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>ICR2, ICR5, ICR7, ICR8, ICR11, ICR13</i>	<i>ICR2, ICR5, ICR7, ICR8, ICR11, ICR13</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipometiladas)	<i>ICR4</i>	<i>ICR1, ICR4, ICR6, ICR9</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipermetiladas)	<i>ICR3, ICR10, ICR12, ICR14</i>	<i>ICR3, ICR10, ICR12, ICR14</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais oscilantes)	Nenhuma	Nenhuma

4.3.5. Tecido embrionário: ICRs conhecidas

A análise das ICRs conhecidas no tecido embrionário em fase de blastocisto revelou um padrão heterogêneo de metilação, apresentando uma cobertura de sequenciamento com média de profundidade de 6,2x (Figura 10).

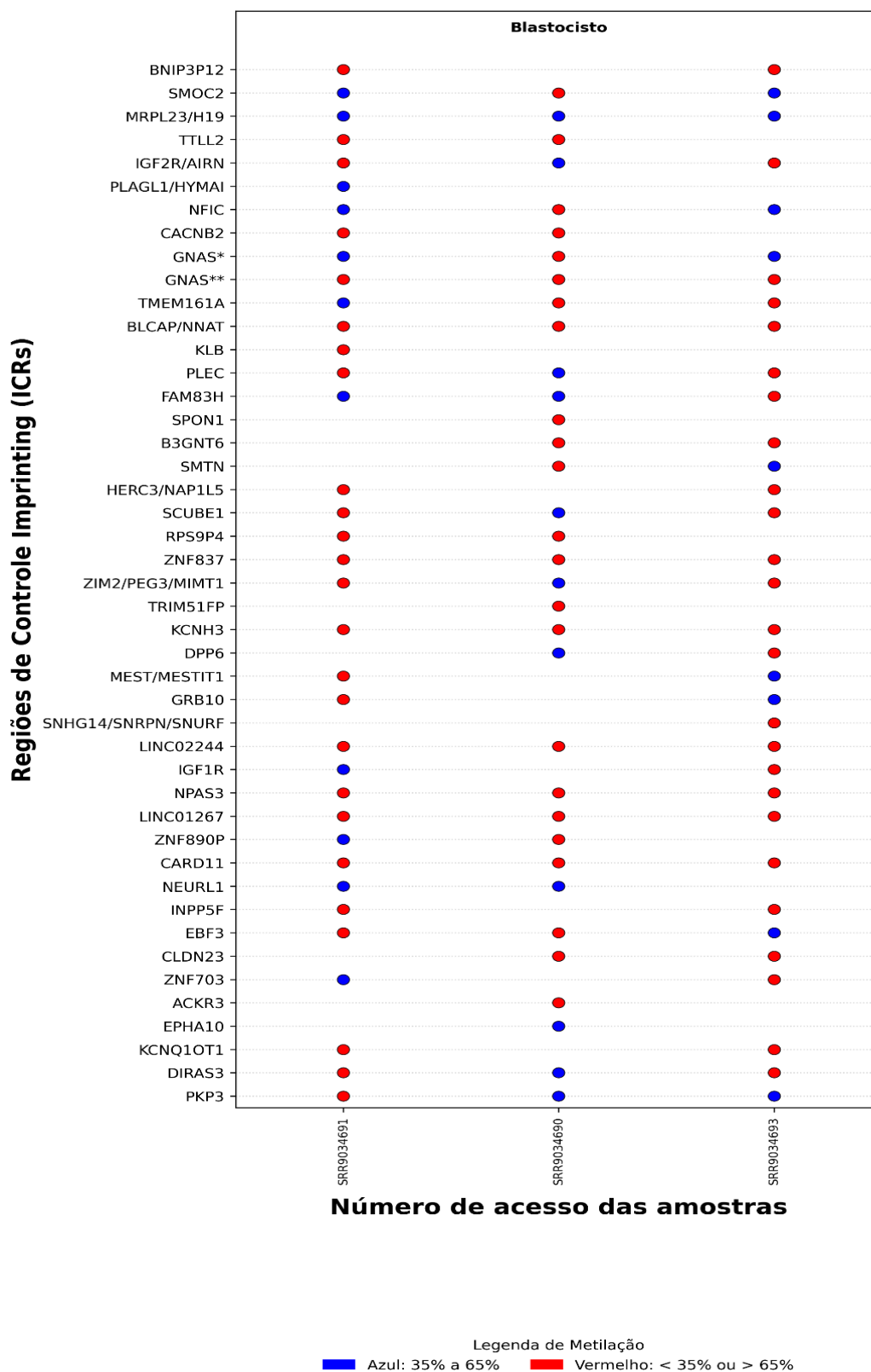


Figura 10. Dotplot com padrões de metilação do DNA em tecido embrionário no estágio de blastocisto para ICRs conhecidas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

As ICRs *MRPL23/H19*, *PLAGL1/HYMAI*, *NEURL1* e *EPHA10* demonstraram maior estabilidade, apresentando valores de metilação compatíveis com o padrão monoalélico em todas as amostras analisadas (Quadro 7). Em contrapartida, um grupo extenso de ICRs exibiu perfis fora dos níveis de metilação esperados em todas as amostras, incluindo as regiões *BNIP3P12*, *TLL2*, *CACNB2*, *GNAS***, *BLCAP/NNAT*, *KLB*, *SPON1*, *B3GNT6*, *HERC3/NAP1L5*, *RPS9P4*, *ZNF837*, *TRIM51FP*, *KCNH3*, *SNHG14/SNRPN/SNURF*, *LINC02244*, *NPAS3*, *LINC01267*, *CARD11*, *INPP5F*, *CLDN23*, *ACKR3* e *KCNQ1OT1*.

Quanto à variabilidade entre amostras de um mesmo tecido, observou-se que ICRs apresentaram conformidade com o padrão esperado em ao menos uma amostra, divergindo nas demais. Nesse grupo, as ICRs *SMOC2*, *IGF2R/AIRN*, *GNAS**, *TMEM161A*, *SMTN*, *ZIM2/PEG3/MIMT1*, *DPP6*, *MEST/MESTIT1*, *GRB10*, *IGF1R* e *ZNF703* apresentaram perfil de hipometilação em amostras divergentes. O comportamento oposto, com tendência à hipermetilação, foi identificado nas regiões *NFIC*, *FAM83H*, *ZNF890P*, *EBF3* e *PKP3*. Adicionalmente, as ICRs *PLEC*, *SCUBE1* e *DIRAS3* demonstraram um perfil de oscilação, alternando entre estados de hipo e hipermetilação entre as diferentes amostras de blastocisto.

Não foi possível determinar o perfil de metilação das regiões *CYGB/PRCD*, *ACTR3C* e *CTNNA3/LRRTM3* devido à ausência de dados experimentais em todas as réplicas analisadas.

Quadro 7. Caracterização do padrão de metilação do DNA em ICRs conhecidas no tecido embrionário na fase de blastocisto.

Categoria de Metilação	ICRs Identificadas
Padrão Esperado Bimodal (Associado a perfil Monoalélico)	<i>MRPL23/H19</i> , <i>PLAGL1/HYMAI</i> , <i>NEURL1</i> , <i>EPHA10</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>BNIP3P12</i> , <i>TLL2</i> , <i>CACNB2</i> , <i>GNAS**</i> , <i>BLCAP/NNAT</i> , <i>KLB</i> , <i>SPON1</i> , <i>B3GNT6</i> , <i>HERC3/NAP1L5</i> , <i>RPS9P4</i> , <i>ZNF837</i> , <i>TRIM51FP</i> , <i>KCNH3</i> , <i>SNHG14/SNRPN/SNURF</i> , <i>LINC02244</i> , <i>NPAS3</i> , <i>LINC01267</i> , <i>CARD11</i> , <i>INPP5F</i> , <i>CLDN23</i> , <i>ACKR3</i> , <i>KCNQ1OT1</i>
Heterogêneo (≥1 dentro do padrão; demais hipometiladas)	<i>SMOC2</i> , <i>IGF2R/AIRN</i> , <i>GNAS*</i> , <i>TMEM161A</i> , <i>SMTN</i> , <i>ZIM2/PEG3/MIMT1</i> , <i>DPP6</i> , <i>MEST/MESTIT1</i> , <i>GRB10</i> , <i>IGF1R</i> , <i>ZNF703</i>
Heterogêneo (≥1 dentro do padrão; demais hipermetiladas)	<i>NFIC</i> , <i>FAM83H</i> , <i>ZNF890P</i> , <i>EBF3</i> , <i>PKP3</i>
Heterogêneo (≥1 dentro do padrão; demais oscilantes)	<i>PLEC</i> , <i>SCUBE1</i> , <i>DIRAS3</i>

4.3.6. Tecido embrionário: ICRs candidatas

Em complemento à análise das regiões conhecidas, o perfil de metilação de novas ICRs candidatas ao *imprinting* genômico foi avaliado no tecido embrionário em fase de blastocisto. Seguindo a mesma classificação anterior, os resultados revelaram que a maioria das regiões candidatas apresenta desvios fora do padrão de metilação do DNA esperado para uma ICR neste estágio do desenvolvimento (Figura 11).

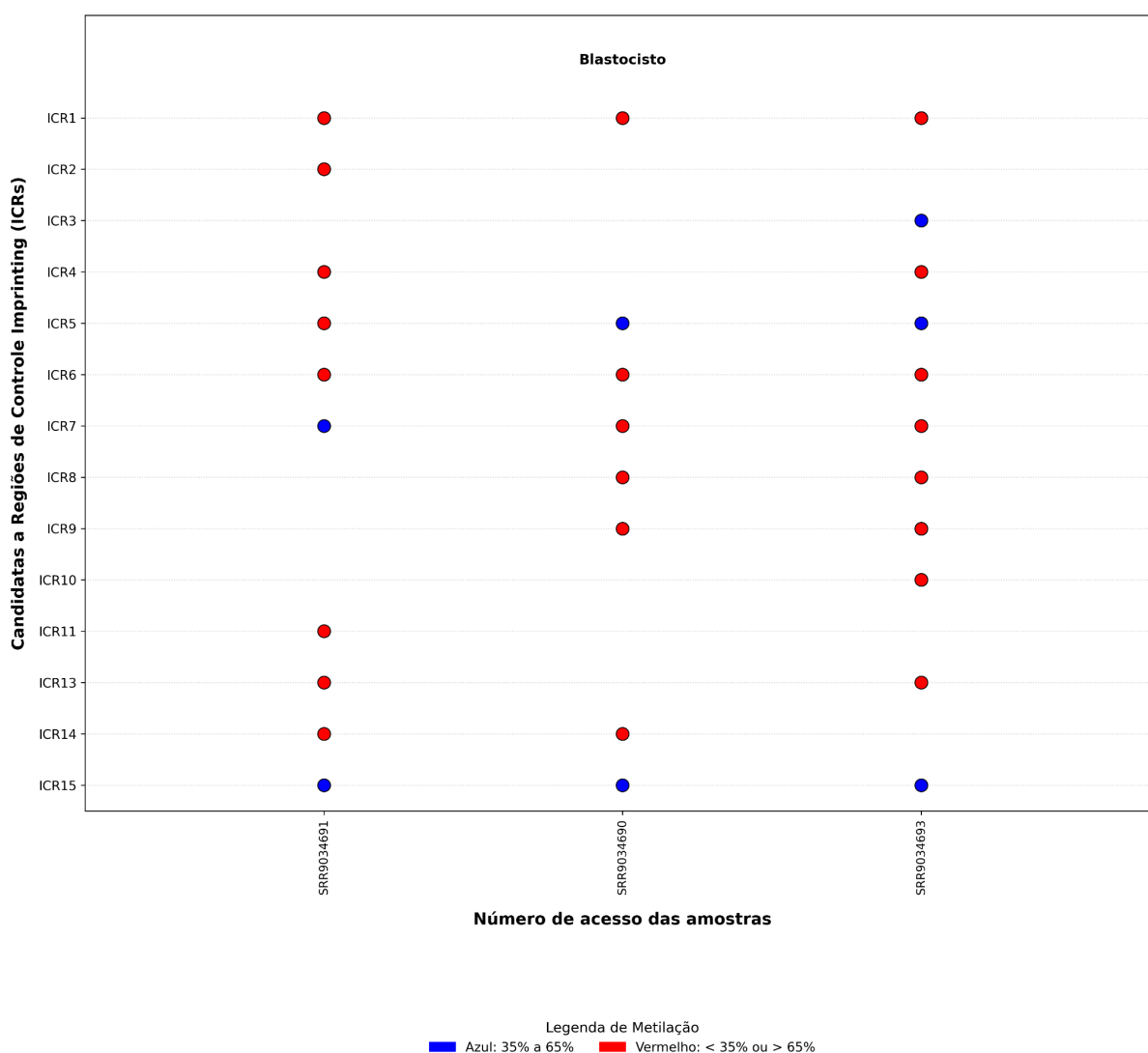


Figura 11. Dotplot dos padrões de metilação do DNA em tecido embrionário no estágio de blastocisto de ICRs candidatas. **Nota:** Em azul estão representadas as regiões que estão dentro do padrão de

metilação do DNA esperado (35%-65%) e em vermelho as regiões que estão fora do perfil esperado (0%-35% e 65%-100%).

Nesse grupo, as regiões *ICR3* e *ICR15* demonstraram estabilidade epigenética, com valores de metilação compatíveis com o padrão esperado em todas as amostras analisadas. Em contrapartida, a maior parte das ICRs candidatas exibiu perfis integralmente fora do padrão esperado em todas as réplicas, abrangendo as regiões *ICR1*, *ICR2*, *ICR4*, *ICR6*, *ICR8*, *ICR9*, *ICR10*, *ICR11*, *ICR13* e *ICR14*.

Observou-se que algumas ICRs candidatas apresentaram conformidade com o padrão em ao menos uma amostra, divergindo nas demais. A região *ICR7* apresentou tendência à hipometilação nas amostras divergentes, enquanto o comportamento oposto, com tendência à hipermetilação, foi observado na *ICR5*. Diferentemente do observado entre as ICRs conhecidas, nenhuma região candidata apresentou um perfil de oscilação mista (alternância entre hipometilação e hipermetilação no mesmo *locus*).

Não foi possível inferir o perfil de metilação da região *ICR12*, uma vez que esta apresentou ausência total de dados experimentais em todas as réplicas analisadas (Quadro 8).

Quadro 8. Caracterização do padrão de metilação do DNA em ICRs candidatas no tecido embrionário em fase de blastocisto.

Categoria de Metilação	ICRs Identificadas
Padrão Esperado Bimodal (Associado a perfil Monoalélico)	<i>ICR3</i> , <i>ICR15</i>
Fora do padrão em todas as amostras	<i>ICR1</i> , <i>ICR2</i> , <i>ICR4</i> , <i>ICR6</i> , <i>ICR8</i> , <i>ICR9</i> , <i>ICR10</i> , <i>ICR11</i> , <i>ICR13</i> , <i>ICR14</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipometiladas)	<i>ICR7</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais hipermetiladas)	<i>ICR5</i>
Heterogêneo (≥ 1 dentro do padrão; demais oscilantes)	-
Dados Ausentes / Inconclusivos	<i>ICR12</i>

4.4. Análise do impacto das ARTs nas ICRs

4.4.1. Blastocisto: ICRs conhecidas

No tecido de blastocisto, a comparação entre controle e PIV revelou alterações pontuais nos níveis de metilação em ICRs conhecidas. A Tabela 2 apresenta apenas os resultados com diferença significativa ($p < 0,05$). Com base nos testes estatísticos aplicados, três ICRs apresentaram diferença entre os grupos ($p < 0,05$). A ICR *HERC3/NAP1L5* apresentou aumento de metilação na PIV, com $\Delta\beta = 0,406$. Em sentido oposto, a ICR *BLCAP/NNAT* apresentou redução na PIV, com $\Delta\beta = -0,360$. A ICR *MRPL23/H19* também mostrou redução na PIV, com $\Delta\beta = -0,100$.

Tabela 2. ICRs com diferença significativa ($p < 0,05$) entre blastocistos controle e a PIV de blastocistos bovinos.

ICR	Tipo de alteração	$\Delta\beta$ (controle-PIV)	p-valor	Controle (n)	PIV (n)
<i>HERC3/NAP1L5</i>	hipermetilação	0,406	0,0143	2	7
<i>BLCAP/NNAT</i>	hipometilação	-0,360	0,0339	3	6
<i>MRPL23/H19</i>	hipometilação	-0,100	0,0218	3	7

Nota: Tipo da alteração indica o sentido da alteração de metilação em PIV em relação ao controle; $\Delta\beta$ = média dos valores de beta em PIV menos a média dos valores de beta no controle (valores positivos indicam hipermetilação e valores negativos indicam hipometilação); **p-valor** = valor de significância do teste estatístico aplicado para comparar os grupos; **N** controle e **N** PIV. Os grupos apresentaram amostras com valores indisponíveis (NA).

Para a visualização global, foi utilizado um volcano plot ($\Delta\beta$), com o eixo x representando $\Delta\beta$ (média dos beta-valores em PIV – média dos beta-valores no controle) e o eixo y representando $-\log_{10}(p)$. O destaque visual gráfico considerou $p < 0,05$ e um limiar mínimo de efeito, com $|\Delta\beta| \geq 0,09$, conforme a Figura 12.

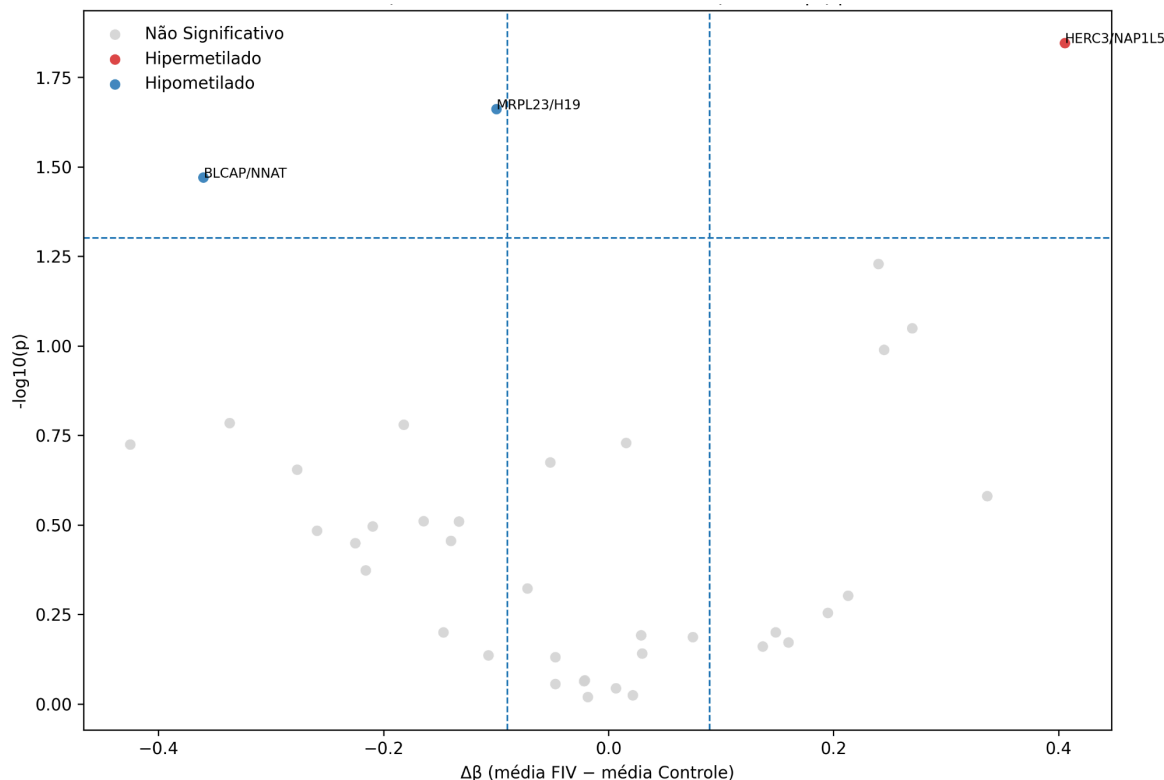


Figura 12. Volcano plot ($\Delta\beta$) da metilação por ICR na comparação Controle vs grupo de estudo. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso – média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann–Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul perfil hipometilado e vermelho perfil hipermetilado.

O *heatmap* foi criado para reforçar esses padrões ao mostrar, por amostra, a distribuição dos valores no blastocisto e a separação entre os grupos (Figura 13). Observa-se que *MRPL23/H19* tende a apresentar hipometilação no conjunto PIV em relação ao controle, enquanto *HERC3/NAP1L5* apresenta aumento consistente no conjunto PIV. Além disso, algumas ICRs exibiram maior variação entre amostras, o que ajuda a explicar por que nem todas as diferenças numéricas se manifestam como alterações quando se consideram simultaneamente a significância estatística e o tamanho de efeito.

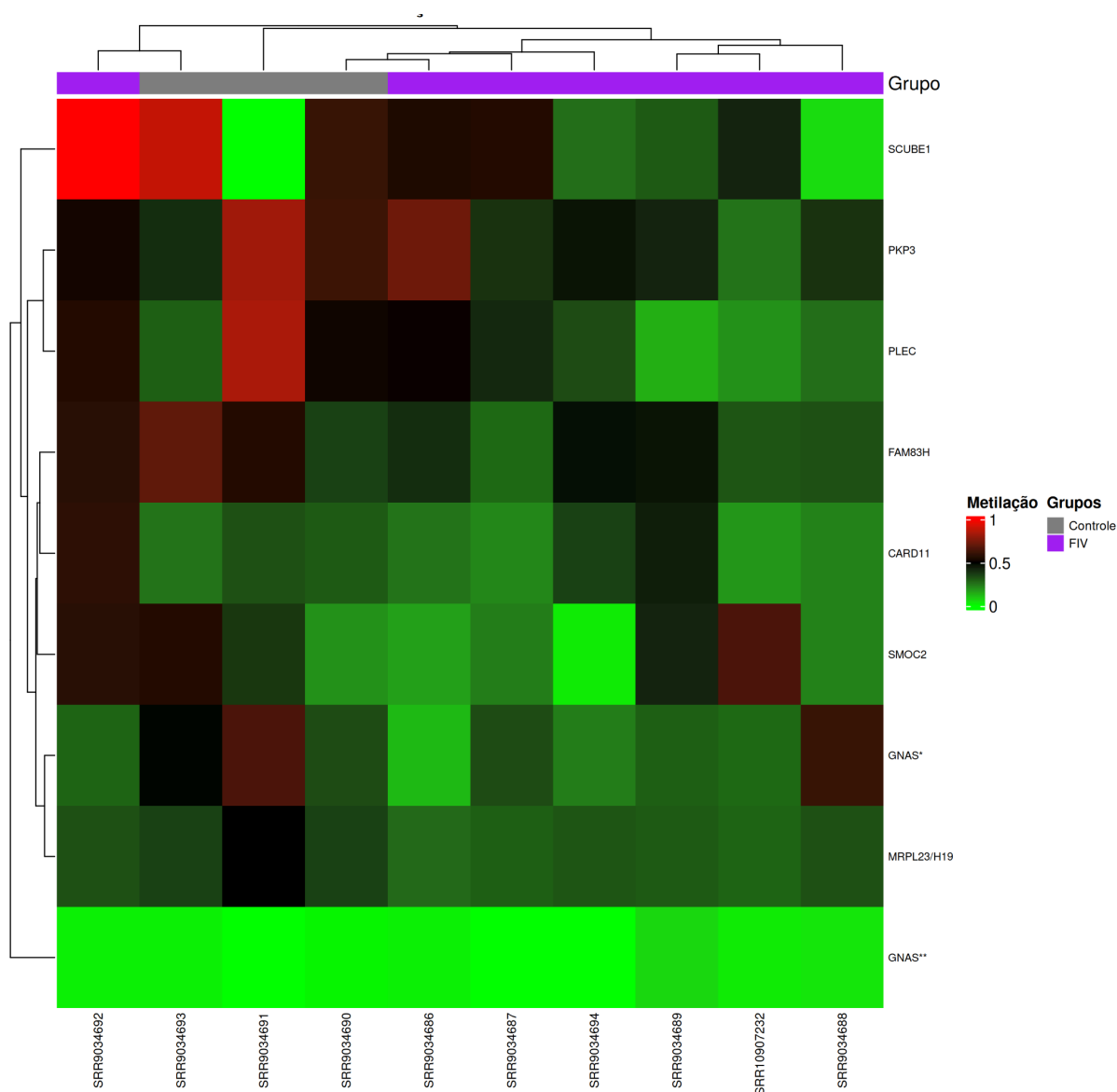


Figura 13. ComplexHeatmap dos valores de beta de metilação em blastocisto (controle e FIV/PIV) para ICRs conhecidas. **Nota:** valores de beta variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maiores médias de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

Na análise do *heatmaps* (Figura 13) podemos observar que algumas ICRs apresentaram tendências de hipermetilação ou hipometilação, em alguns casos essa tendência variou entre a perda e o ganho de metilação no grupo caso. As principais tendências observadas foram em *SCUBE1*, *PKP3*, *PLEC*, *FAM83H*, *CARD11*, *SMOC2*, *GNAS**, *MRPL23/H19*. A ICR *GNAS*** apresentou consistência no padrão de metilação.

4.4.2. Blastocisto: ICRs candidatas

A comparação entre o grupo controle e o grupo submetido à PIV em embriões no estágio de blastocisto, considerando as ICRs candidatas, evidenciou alterações pontuais nos níveis de metilação do DNA. A Tabela 3 reúne apenas as ICRs candidatas com diferenças significativas conforme o critério adotado.

Tabela 3. ICRs candidatas com diferença significativa ($p < 0,05$) entre blastocistos controle e a PIV de blastocistos bovinos.

ICR	Tipo de alteração	$\Delta\beta$ (PIV – controle)	p-valor
ICR15	hipometilação	-0,100	0,0218
ICR9	hipermetilação	0,282	0,0447

Nota: Tipo de alteração indica o sentido da alteração em PIV em relação ao controle; $\Delta\beta$ = média dos valores de beta em PIV – média dos valores de beta no controle ($\Delta\beta > 0$ indica hipermetilação; $\Delta\beta < 0$ indica hipometilação); p-valor = significância do teste estatístico aplicado para comparar os grupos.

No volcano plot (Figura 14), foram consideradas alterações relevantes àquelas que atenderam simultaneamente aos critérios $p < 0,05$ e $|\Delta\beta| \geq 0,09$. Nesse contexto, duas ICRs candidatas apresentaram diferença e significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, a ICR15, com perda de metilação no grupo PIV ($\Delta\beta = -0,100$), e ICR9, com ganho de metilação no grupo PIV ($\Delta\beta = 0,282$).

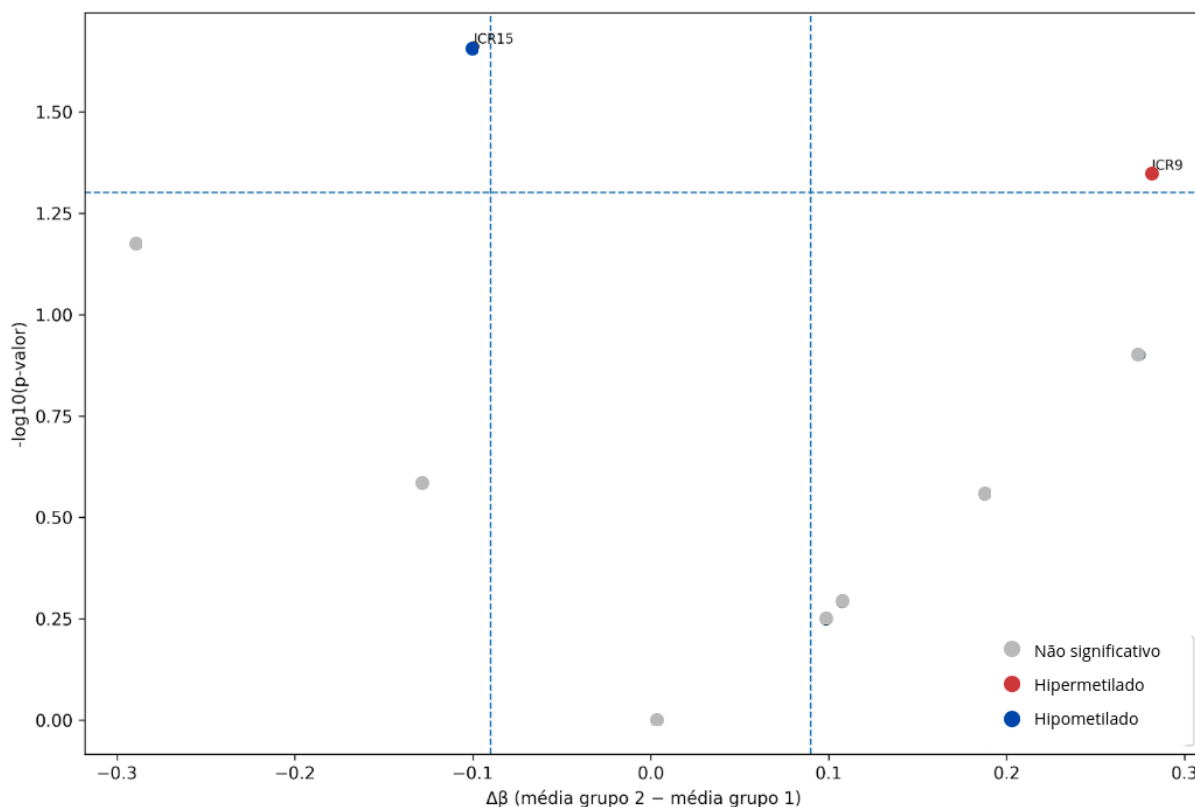


Figura 14. Volcano plot ($\Delta\beta$) dos padrões de do DNA metilação por ICR na comparação Controle vs grupo de estudo. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann–Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Embora apenas *ICR15* e *ICR9* tenham alcançado significância estatística nos critérios estabelecidos, observou-se que outras candidatas apresentaram tendências numéricas em direção à hipometilação ou à hipermetilação, sem suporte estatístico. A visualização do *heatmap* (Figura 15) reforça essa interpretação ao permitir observar a distribuição dos valores por amostra e a consistência do padrão entre os grupos.

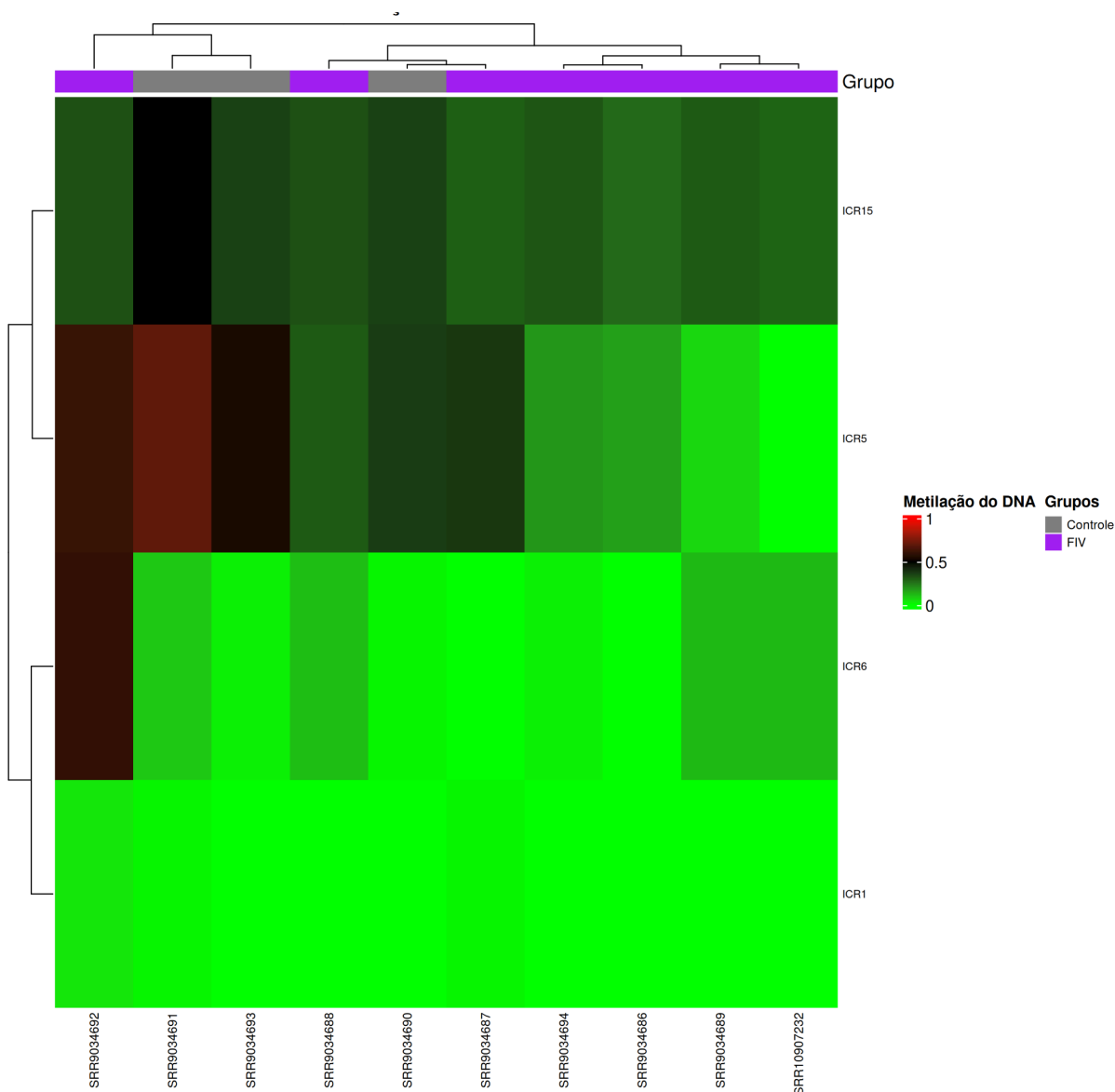


Figura 15. *ComplexHeatmap* dos beta-valores de metilação em blastocistos (controle e FIV/PIV) de ICRs candidatas. **Nota:** os valores de beta variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maior média de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

Na análise do *heatmaps* (Figura 15) podemos observar que algumas ICRs apresentaram tendências de hipermetilação ou hipometilação, em alguns casos essa tendência variou entre a perda e o ganho de metilação no grupo caso. As principais tendências observadas foram observadas em *ICR5* e *ICR6*. Já a *ICR1* apresentou consistência no padrão de metilação entre os grupos analisados.

4.4.3. Músculo: ICRs conhecidas

No tecido muscular, as ICRs conhecidas foram avaliadas comparando o grupo controle com IA saudável, PIV saudável e PIV LOS, conforme Tabela 4. As diferenças foram avaliadas pelo $\Delta\beta$ (média do grupo comparado – média do controle) e pelo p-valor do teste estatístico. Para padronização, consideraram-se diferenças relevantes aquelas com $p < 0,05$ e $|\Delta\beta| \geq 0,10$.

Tabela 4. ICRs conhecidas significativas no tecido muscular, comparando controle com IA Saudável, PIV Saudável e PIV LOS.

Comparação	ICR	Tipo de alteração	$\Delta\beta$	p-valor
Controle vs IA Saudável	<i>LINC01267</i>	hipermetilação	+0,27	3,60e-05
Controle vs IA Saudável	<i>ACKR3</i>	hipermetilação	+0,13	0,023
Controle vs IA Saudável	<i>KCNQ1OT1</i>	hipermetilação	+0,12	0,031
Controle vs IA Saudável	<i>MEST/MESTIT1</i>	hipermetilação	+0,13	0,041
Controle vs IA Saudável	<i>SMTN</i>	hipometilação	-0,16	0,004
Controle vs PIV Saudável	<i>CARD11</i>	hipermetilação	+0,11	0,004
Controle vs PIV Saudável	<i>EBF3</i>	hipermetilação	+0,10	0,004
Controle vs PIV Saudável	<i>CACNB2</i>	hipermetilação	+0,12	0,004
Controle vs PIV Saudável	<i>PLAGL1/HYMAI</i>	hipermetilação	+0,21	0,007
Controle vs PIV Saudável	<i>KCNQ1OT1</i>	hipermetilação	+0,19	0,008
Controle vs PIV Saudável	<i>INPP5F</i>	hipermetilação	+0,16	0,014
Controle vs PIV Saudável	<i>HERC3/NAP1L5</i>	hipermetilação	+0,13	0,019
Controle vs PIV Saudável	<i>SMTN</i>	hipometilação	-0,12	0,015
Controle vs PIV LOS	<i>CYGB/PRCD</i>	hipermetilação	+0,27	0,008
Controle vs PIV LOS	<i>LINC01267</i>	hipermetilação	+0,33	2,94e-04
Controle vs PIV LOS	<i>BNIP3P12</i>	hipermetilação	+0,11	0,008
Controle vs PIV LOS	<i>BLCAP/NNAT</i>	hipometilação	-0,15	0,002
Controle vs PIV LOS	<i>HERC3/NAP1L5</i>	hipometilação	-0,16	0,007
Controle vs PIV LOS	<i>GRB10</i>	hipometilação	-0,13	0,017
Controle vs PIV LOS	<i>IGF2R/AIRN</i>	hipometilação	-0,31	4,21e-04
Controle vs PIV LOS	<i>SMTN</i>	hipometilação	-0,32	0,004

Nota: $\Delta\beta$ = média do grupo 2 – média do grupo 1; p-valor = significância estatística (teste t de Welch ou Mann-Whitney, conforme aplicável); n = número de amostras com valores disponíveis (não NA) por grupo.

Na comparação controle vs IA saudável, foram observadas cinco ICRs com diferença significativa, sendo quatro com ganho de metilação e uma com perda de metilação. O maior ganho ocorreu em *LINC01267* ($\Delta\beta = +0,27$; $p = 0,000036$), com

aumento do valor β médio em relação ao controle. Em contraste, *SMTN* apresentou redução de metilação ($\Delta\beta = -0,16$; $p = 0,004043$). Também foram detectados ganhos em *ACKR3*, *KCNQ1OT1* e *MEST/MESTIT1*, conforme a Figura 16.

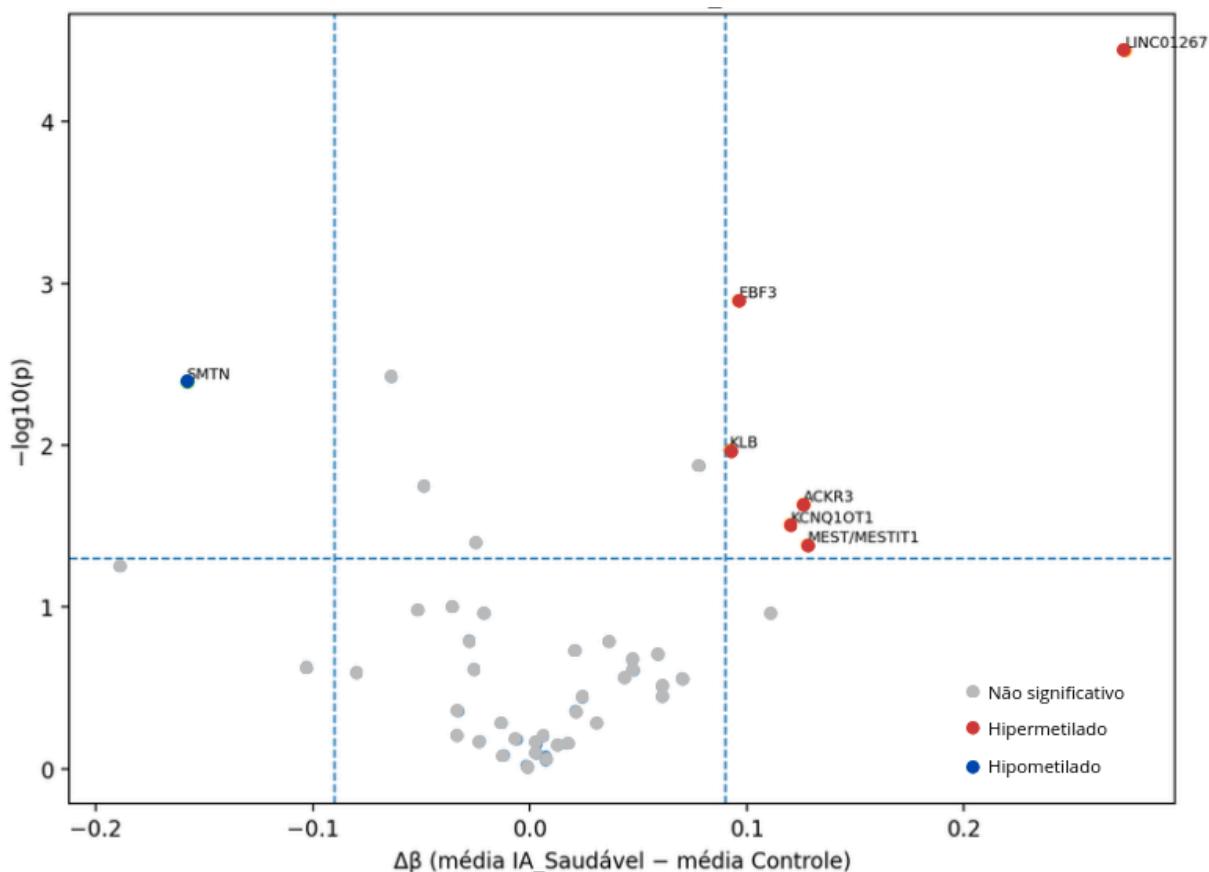


Figura 16. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs IA Saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul perfil hipometilado e vermelho perfil hipermetilado.

Na comparação controle vs PIV saudável, 8 ICRs apresentaram diferença significativa, com predomínio de ganho de metilação (em 7 das 8 ICRs). Entre os principais destaques, *CARD11* ($\Delta\beta = +0,11$; $p = 0,003690$), *EBF3* ($\Delta\beta = +0,10$; $p = 0,003833$) e *CACNB2* ($\Delta\beta = +0,12$; $p = 0,004329$) apresentaram aumento consistente de metilação no grupo PIV saudável. Além disso, *PLAGL1/HYMAI* e *KCNQ1OT1* também apresentaram ganho de metilação com $\Delta\beta$ acima de +0,19. A única ICR com perda de metilação nessa comparação foi *SMTN* ($\Delta\beta = -0,12$; $p = 0,014793$), conforme Figura 17.

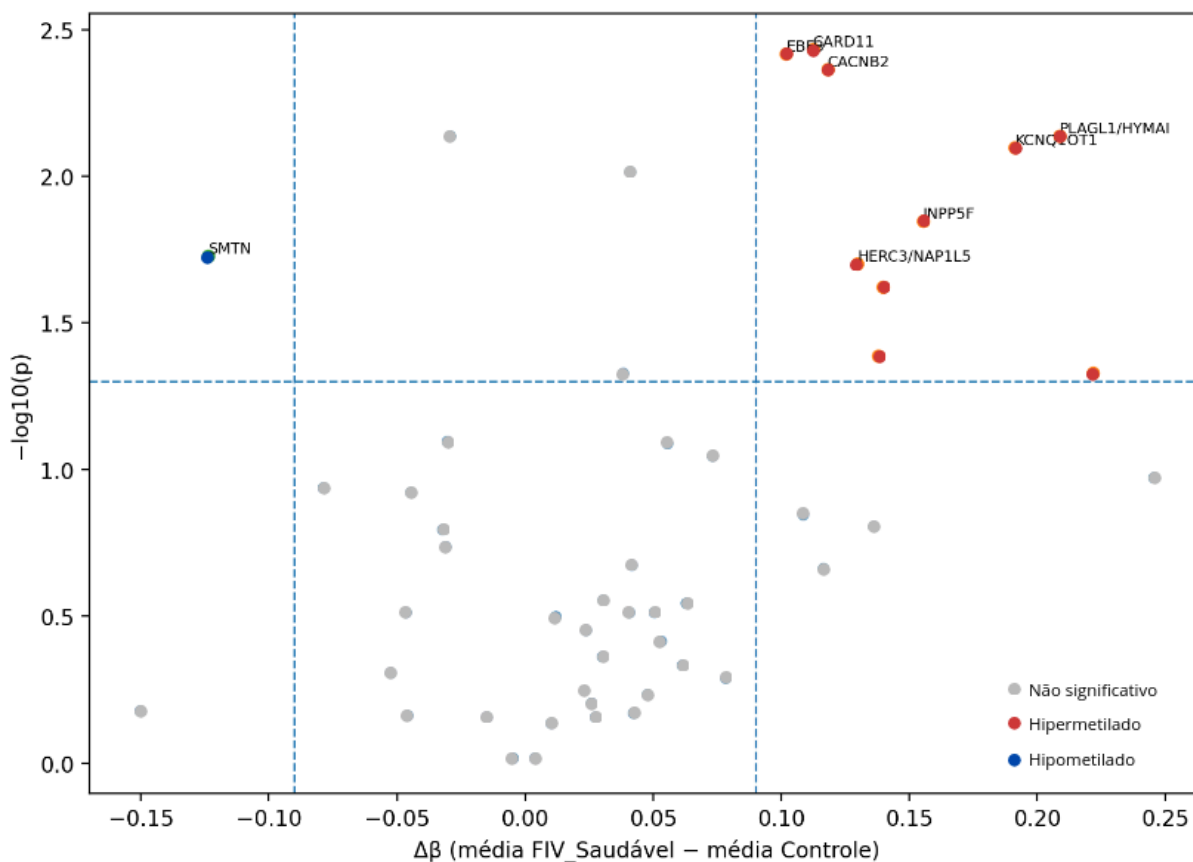


Figura 17. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs FIV/PIV Saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul perfil hipometilado e vermelho perfil hipermetilado.

Na comparação controle vs PIV LOS, 8 ICRs foram significativas, porém com padrões distintos, houve predominância de perda de metilação (em 5 das 8 ICRs). As maiores reduções ocorreram em *IGF2R/AIRN* ($\Delta\beta = -0,31$; $p = 0,000421$) e *SMTN* ($\Delta\beta = -0,32$; $p = 0,003770$), indicando uma queda marcada do β médio no grupo PIV LOS. Também foram observadas perdas em *BLCAP/NNAT* e em *HERC3/NAP1L5*. Por outro lado, algumas ICRs mostraram ganho de metilação neste grupo, com destaque para *LINC01267* ($\Delta\beta = +0,33$; $p = 0,000294$), além de *BNIP3P12* e *CYGB/PRCD*, conforme a Figura 18.

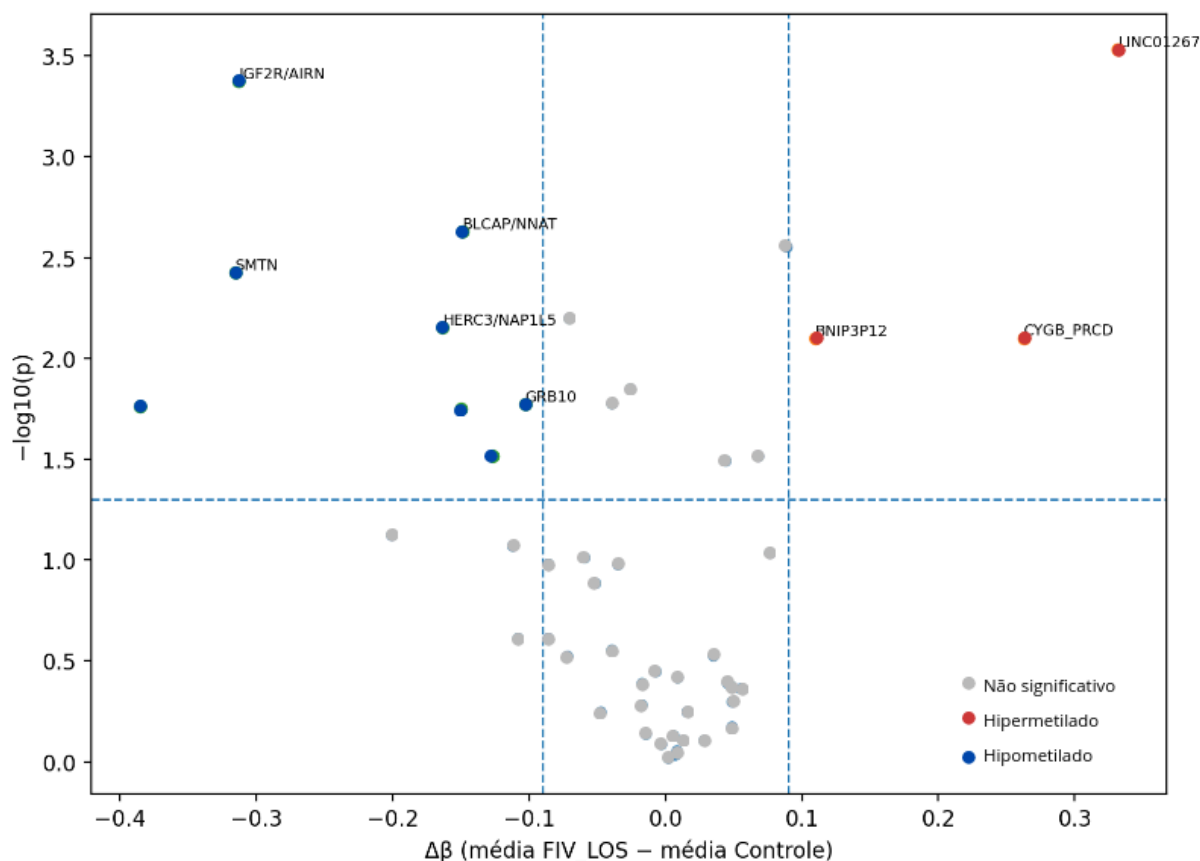


Figura 18. Volcano plot ($\Delta\beta$) do tecido muscular (ICRs conhecidas): Controle vs FIV/PIV LOS. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso – média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann–Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul perfil hipometilado e vermelho perfil hipermetilado.

De forma complementar, o *Heatmap* (Figura 19) permite observar a distribuição dos valores por amostra e a consistência dos padrões entre os três grupos. Visualmente, várias ICRs destacadas como significativas nos volcano plot acompanham mudanças de intensidade de cor entre os grupos, o que ajuda a confirmar que as diferenças não se concentram em uma única amostra isolada, mas tendem a aparecer de maneira mais ampla dentro do grupo comparado

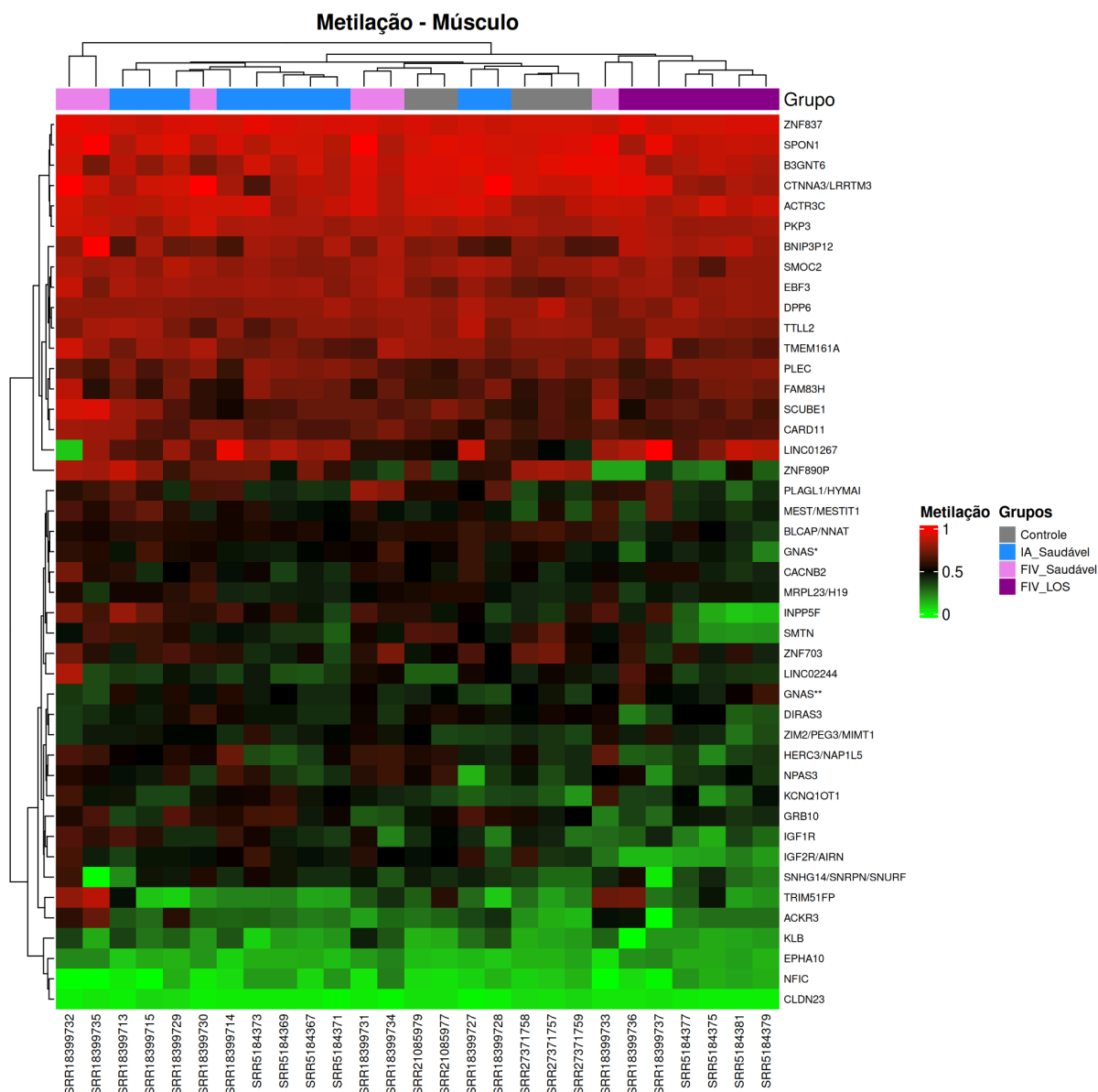


Figura 19. ComplexHeatmap do padrão de metilação do DNA no tecido muscular (ICRs conhecidas), com agrupamento das amostras e anotação por grupo. **Nota:** Os valores de beta variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maior média de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

4.4.4. Músculo: ICRs candidatas

A metilação do DNA nas ICRs candidatas foi comparada no tecido muscular entre o grupo controle e três grupos experimentais (IA saudável, PIV saudável e PIV LOS), com base no $\Delta\beta$ (média do grupo 2 – média do grupo 1) e no teste estatístico

aplicado em cada ICR de forma independente, conforme Tabela 5 para ICRs com diferenças estatísticas.

Tabela 5. ICRs candidatas significativas no tecido muscular, comparando controle com IA Saudável, PIV Saudável e PIV LOS.

Comparação	ICR	Tipo de alteração	$\Delta\beta$	p-valor
Controle vs PIV LOS	ICR4	Hipometilado	-0,195	0,0253
Controle vs PIV Saudável	ICR1	Hipermetilado	0,239	0,0070
Controle vs PIV Saudável	ICR6	Hipermetilado	0,111	0,0075
Controle vs PIV Saudável	ICR9	Hipermetilado	0,150	4,67e-04
Controle vs IA Saudável	ICR1	Hipermetilado	0,133	0,0356

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** $\Delta\beta$ = média do grupo 2 - média do grupo 1; p-valor = significância estatística (teste t de Welch ou Mann-Whitney, conforme aplicável).

Na comparação entre controle e PIV LOS, foi observada diferença significativa apenas para a *ICR4*, com redução da metilação no grupo PIV LOS (hipometilação). A média de β no controle foi 0,840 ($n = 10$; faixa 0,570–0,930), enquanto no PIV LOS foi 0,644 ($n = 4$; faixa 0,390–0,750), resultando em $\Delta\beta = -0,195$ e $p = 0,0253$. As demais ICRs não ultrapassaram simultaneamente os critérios de p e $\Delta\beta$ no Volcano Plot, sendo interpretadas como sem diferença estatística nesse contraste. Os dados podem ser visualizados na Figura 20.

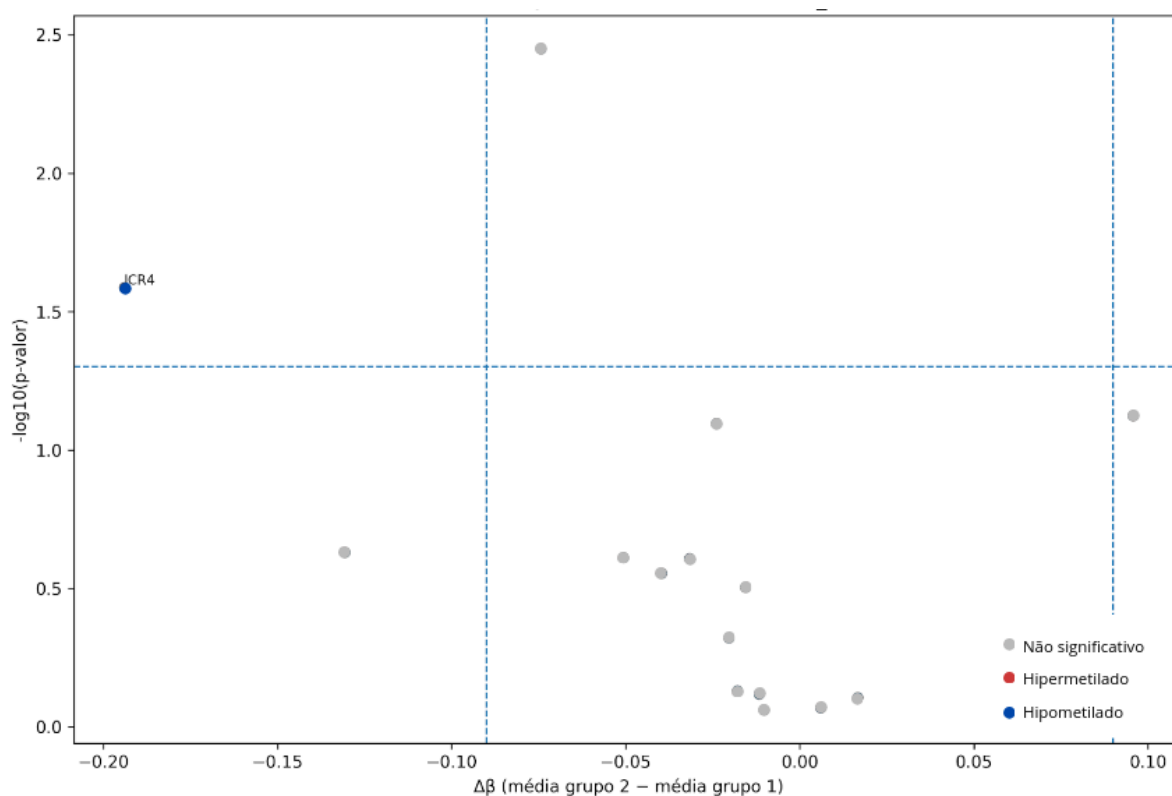


Figura 20. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: controle vs FIV/PIV LOS. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Na comparação controle vs PIV saudável, três ICRs apresentaram ganho de metilação (hipermetilação) com significância estatística: *ICR1*, *ICR6* e *ICR9*. A *ICR9* mostrou aumento de β no PIV saudável em relação ao controle (β Controle = 0,370; $n = 5$; faixa 0,320–0,410; β PIV saudável = 0,520; $n = 6$; faixa 0,450–0,590), com $\Delta\beta = 0,150$ e $p = 4,67e-04$. A *ICR1* também apresentou aumento no PIV saudável (β controle = 0,328; $n = 5$; faixa 0,170–0,420; β PIV saudável = 0,567; $n = 6$; faixa 0,350–0,710), com $\Delta\beta = 0,239$ e $p = 0,0070$. De forma semelhante, a *ICR6* mostrou aumento (β controle = 0,394; $n = 5$; faixa 0,300–0,460; β PIV saudável = 0,505; $n = 6$; faixa 0,480–0,560), com $\Delta\beta = 0,111$ e $p = 0,0075$. Esses resultados indicam que, no músculo, o grupo PIV saudável concentra as alterações mais consistentes de ganho de metilação entre as comparações realizadas, conforme Figura 21.

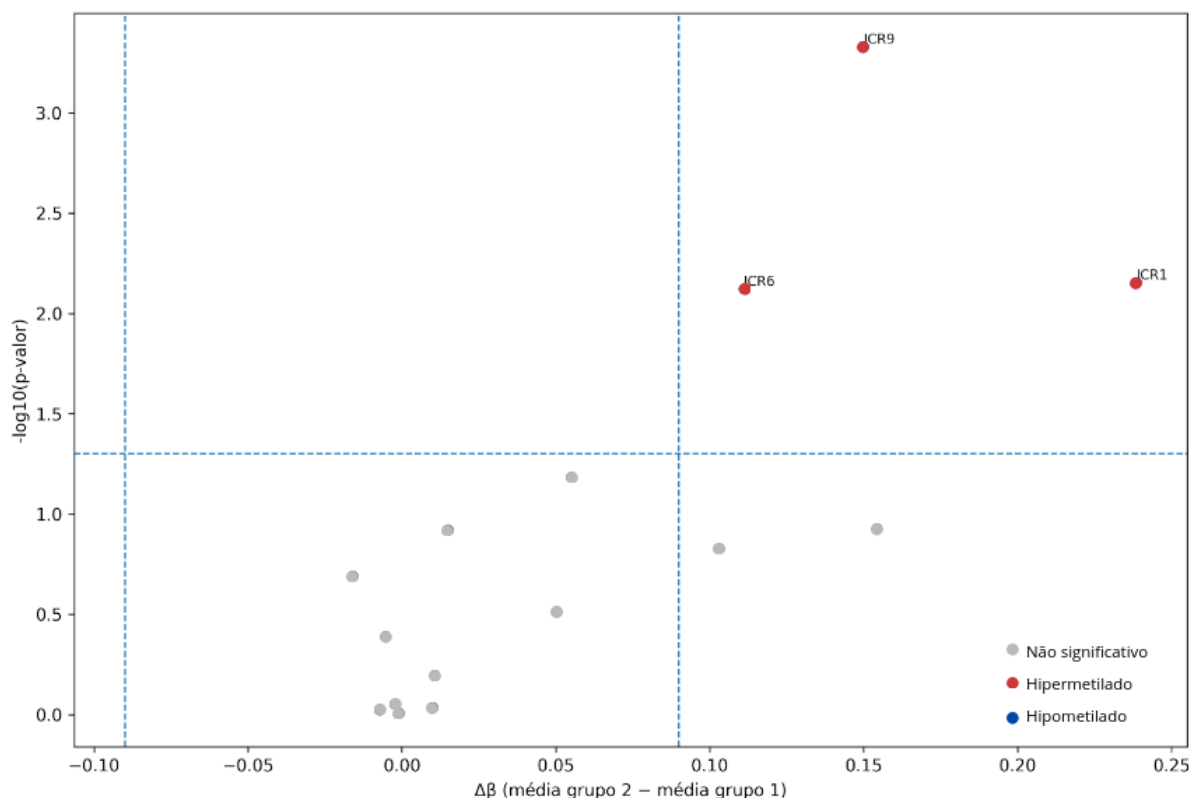


Figura 21. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: Controle vs FIV/PIV Saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Na comparação controle vs IA saudável, foi detectada diferença significativa apenas para a *ICR1*, com ganho de metilação no grupo IA saudável (hipermetilação). A média de β foi 0,328 no controle ($n = 5$; faixa 0,170–0,420) e 0,461 no IA saudável ($n = 6$; faixa 0,310–0,580), com $\Delta\beta = 0,133$ e $p = 0,0356$, conforme a Figura 22.

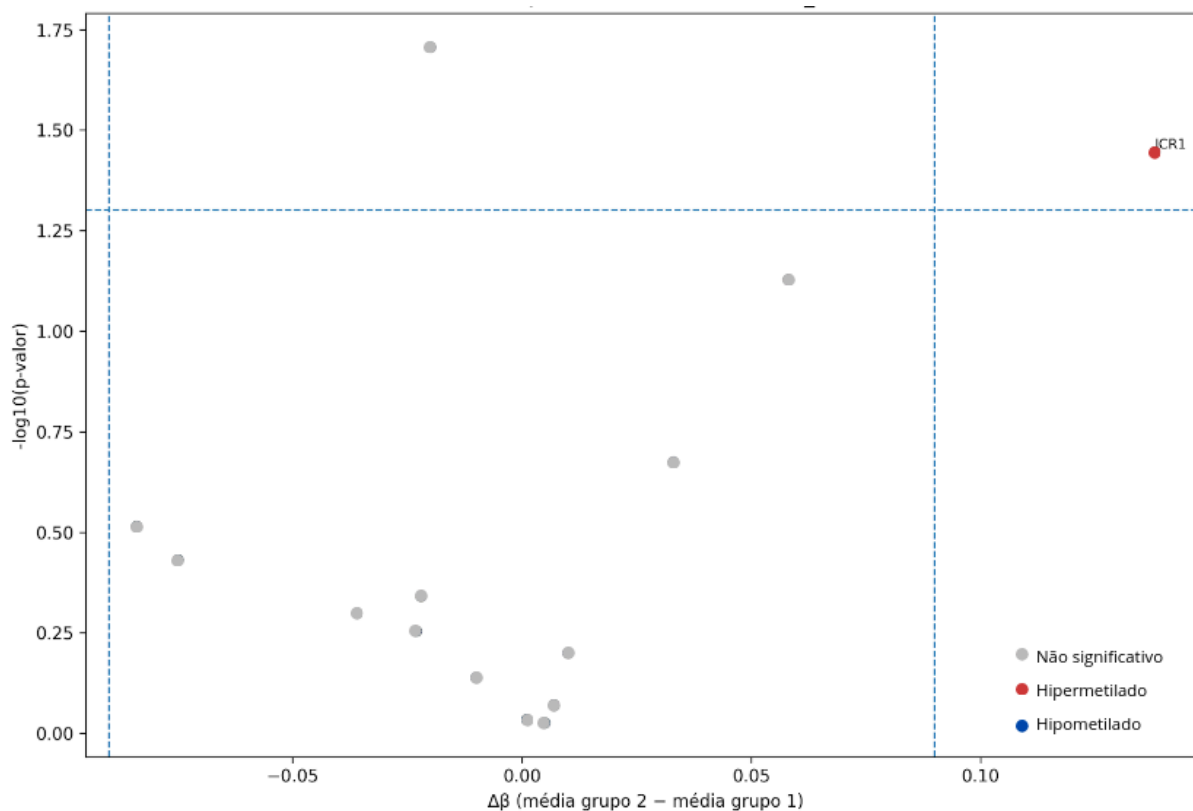


Figura 22. Volcano Plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no músculo: controle vs IA saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul perfil hipometilado e vermelho perfil hipermetilado.

De forma geral, as diferenças significativas nas ICRs candidatas em músculo foram pontuais e dependentes do grupo comparado. O ganho de metilação na *ICR1* apareceu em dois cenários (controle vs PIV saudável e controle vs IA saudável), sugerindo que esta região é a mais sensível nas condições avaliadas. Além disso, o grupo PIV saudável apresentou alterações adicionais (*ICR6* e *ICR9*), enquanto o grupo PIV LOS mostrou um padrão distinto, com perda de metilação detectável na *ICR4*. Nas demais ICRs a maioria permaneceu sem diferenças estatísticas pelos critérios adotados.

No *Heatmap* (Figura 23), observa-se a organização conjunta das amostras e das ICRs candidatas, permitindo visualizar o padrão global de metilação por grupo.

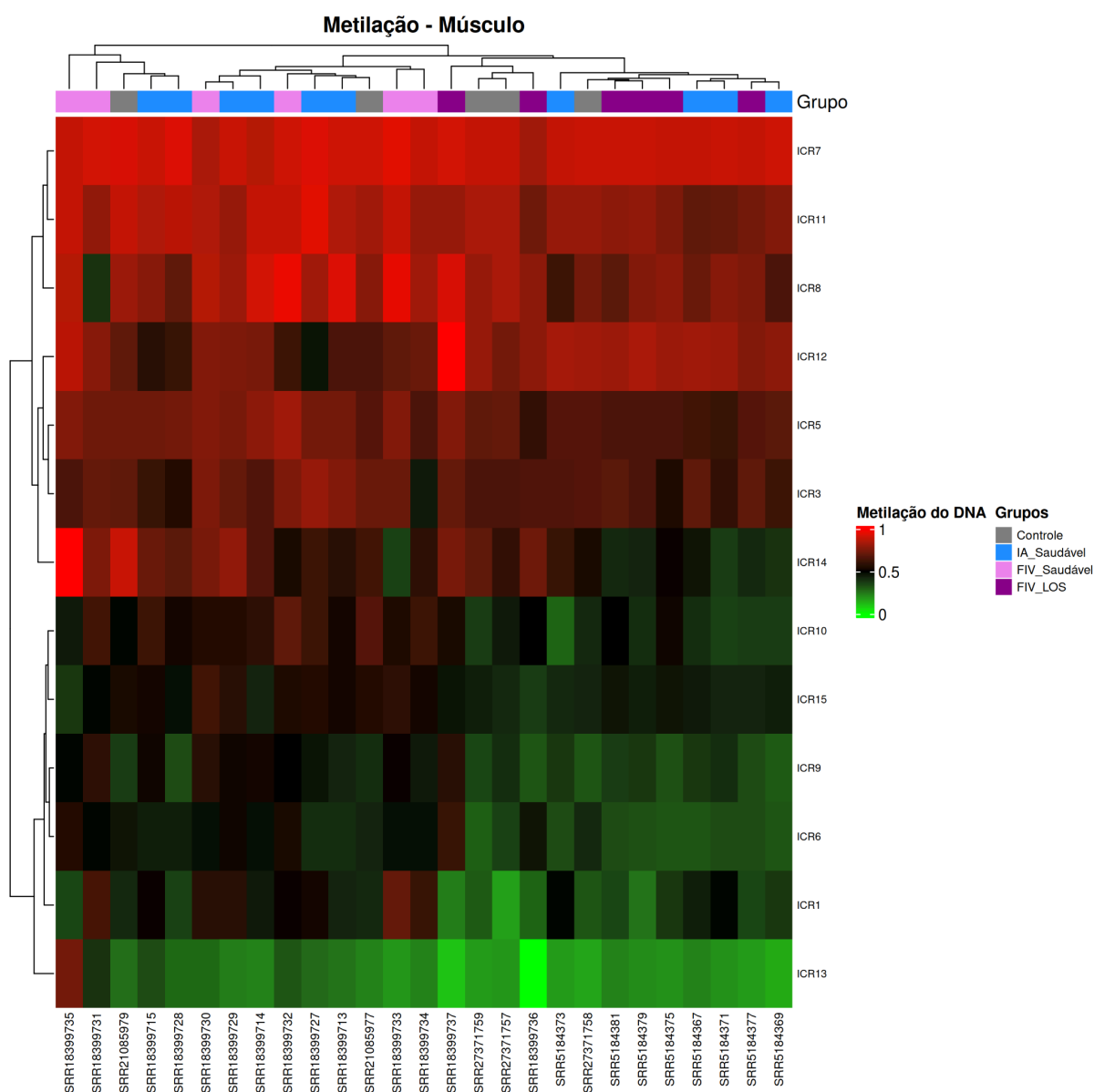


Figura 23. ComplexHeatmap do perfil de metilação do DNA das ICRs candidatas no músculo. **Nota:** Os valores de beta variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maior média de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

4.4.5. Sangue: ICRs conhecidas

No sangue, a comparação foi feita comparando o grupo controle saudável como referência e os grupos caso: ART saudável, IA saudável e IA SLOS. Foram avaliados a diferença de metilação ($\Delta\beta$) nas ICRs conhecidas através do volcano plot e os dados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. ICRs conhecidas significativas no tecido sanguíneo, comparando controle com ART saudável, IA saudável e IA LOS.

Comparação	ICR	Direção	$\Delta\beta$	p-valor
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>LINC02244</i>	hipermetilado	0,1925	3,11e-05
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>PLAGL1/HYMAI</i>	hipermetilado	0,1825	5,24e-05
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>TLL2</i>	hipermetilado	0,2033	0,03576
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>SNHG14/SNRPN/SNURF</i>	hipermetilado	0,1408	0,03379
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>NPAS3</i>	hipometilado	-0,1433	0,01117
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>SMTN</i>	hipometilado	-0,1625	0,03619
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>DIRAS3</i>	hipometilado	-0,1533	0,04928
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>HERC3/NAP1L5</i>	hipermetilado	0,2117	4,55e-06
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>LINC02244</i>	hipermetilado	0,1483	0,00176
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>PLAGL1/HYMAI</i>	hipermetilado	0,1217	0,01296
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>TLL2</i>	hipermetilado	0,1617	0,04968
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>NPAS3</i>	hipometilado	-0,1267	0,00426
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>PLAGL1/HYMAI</i>	hipermetilado	0,1592	0,00399
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>BNIP3P12</i>	hipermetilado	0,1058	0,03247
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>RPS9P4</i>	hipometilado	-0,3300	0,02058

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** $\Delta\beta$ = média do grupo 2 – média do grupo 1; p-valor = significância estatística (teste t de Welch ou Mann–Whitney, conforme aplicável).

Na comparação controle saudável vs ART LOS, havia apenas uma amostra no grupo ART LOS, por esse motivo, não foi possível calcular o valor de p (não havendo base para teste estatístico com $n = 1$) e, na prática, essa comparação fica descritiva, sem evidência estatística de diferença. Já nas comparações com mais amostras, apareceram ICRs com alterações consistentes para os demais grupos.

Ao comparar controle saudável e ART saudável foram observadas ocorrência de ganho de metilação em *LINC02244*, *PLAGL1/HYMAI*, *SNHG14/SNRPN/SNURF* e *TLL2*, enquanto *NPAS3*, *SMTN* e *DIRAS3* apresentaram hipometilação, conforme Figura 24.

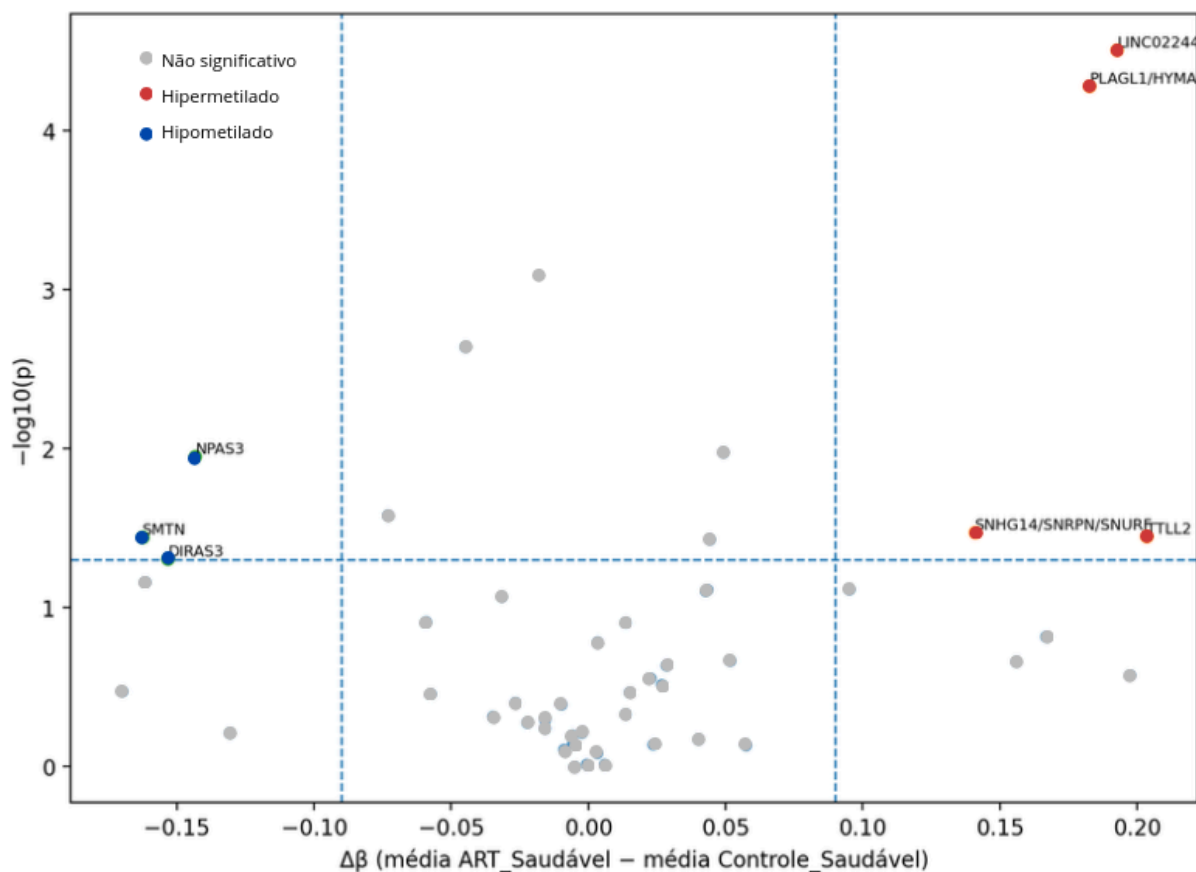


Figura 24. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo Controle Saudável vs ART Saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

A comparação entre controle saudável e IA saudável destacou-se devido ao padrão de hipermetilação de *HERC3/NAP1L5*, *LINC02244*, *PLAGL1/HYMAI* e *TLL2*. Além disso, *NPAS3* mostrou hipometilação, conforme Figura 25.

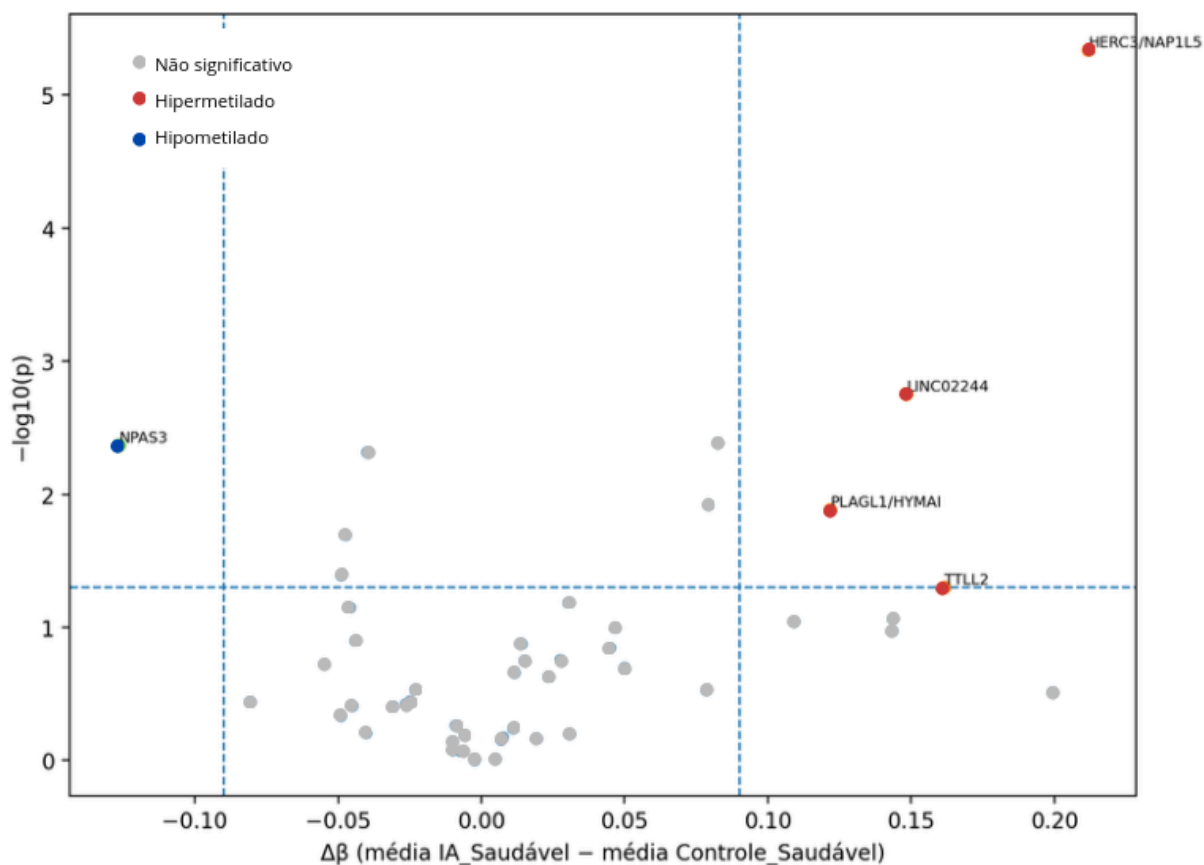


Figura 25. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo controle saudável vs IA saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Os grupos controle saudável e IA SLOS demonstraram as diferenças significativas ficaram concentradas em hipermetilação em *PLAGL1/HYMAI* e *BNIP3P12* e hipometilação de *RPS9P4*, conforme Figura 26.

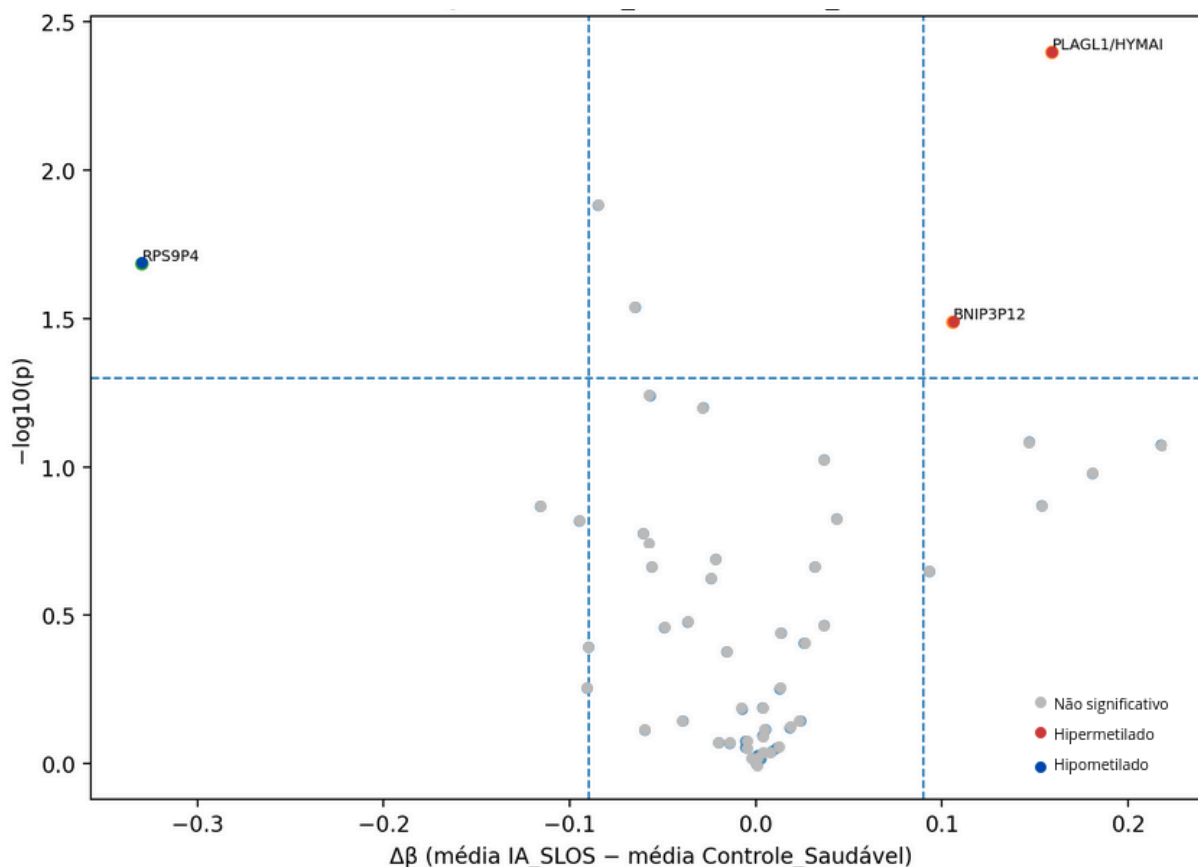


Figura 26. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs conhecidas no sangue nas comparações com o grupo controle saudável e IA SLOS. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Um ponto importante é que *PLAGL1/HYMAI* e *LINC02244* apareceram repetidamente com $\Delta\beta$ positivo (hipermetilação nos grupos caso) em mais de uma comparação, enquanto *NPAS3* apareceu com $\Delta\beta$ negativo (hipometilação) nas comparações com ART saudável e IA saudável. Isso sugere que, dentro deste conjunto, essas ICRs são as que mais sofrem alterações no perfil de metilação nos diferentes grupos caso no sangue.

Para visualizar o conjunto das ICRs conhecidas de forma integrada, o *heatmap* (Figura 27) resume o perfil de metilação por amostra. De forma geral, o padrão é bastante parecido entre os grupos para a maior parte das ICRs, com variações pontuais concentradas em algumas regiões (como as ICRs que também apareceram nos volcano plot). O grupo ART LOS tem apenas uma amostra e está

representado no *heatmap* apenas como referência visual, sem inferir conclusão estatística.

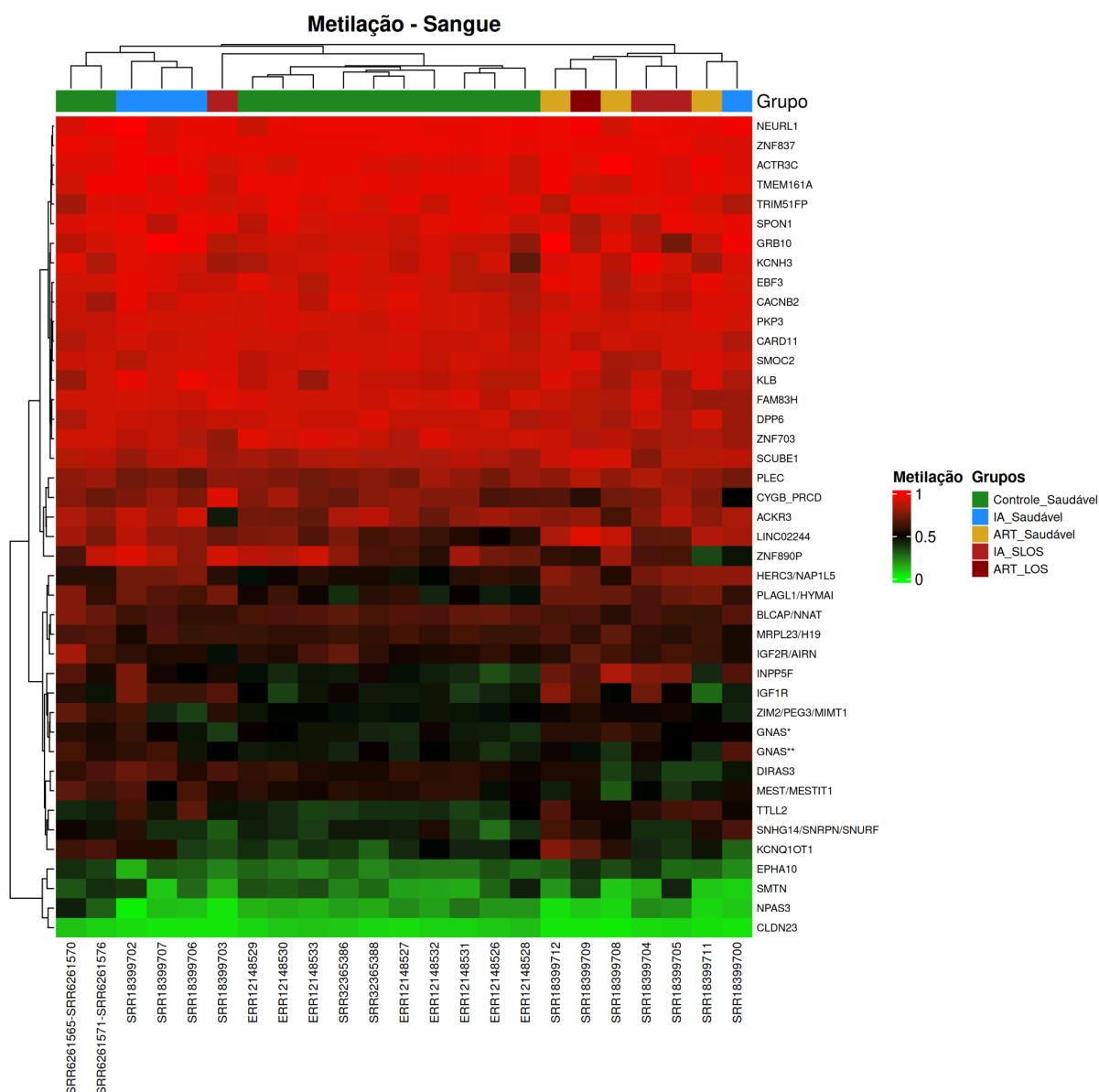


Figura 27. *ComplexHeatmap* de metilação (β) das ICRs conhecidas no sangue. **Nota:** Os valores de beta variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maior média de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

4.4.6. Sangue: ICRs candidatas

Para as ICRs candidatas no sangue, com o objetivo de verificar se essas regiões apresentavam diferenças de metilação entre o grupo controle saudável e os grupos caso (IA saudável, ART saudável, IA SLOS e ART LOS), foi calculado para

cada ICR o $\Delta\beta$ (diferença entre a média do grupo caso e a média do controle) e testada a significância estatística, destacando apenas os resultados que atingiram os critérios definidos para significância, conforme Tabela 7.

Tabela 7. ICRs candidatas significativas no tecido sanguíneo, comparando controle com ART saudável, IA saudável e IA LOS.

Comparação	ICR	Tipo de alteração	$\Delta\beta$	p-valor
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>ICR9</i>	hipermetilado	0,162	0,0126
Controle Saudável vs IA Saudável	<i>ICR1</i>	hipermetilado	0,172	0,0191
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>ICR1</i>	hipermetilado	0,138	0,0003
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>ICR14</i>	hipermetilado	0,132	0,0040
Controle Saudável vs ART Saudável	<i>ICR6</i>	hipermetilado	0,102	0,0471
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>ICR10</i>	hipermetilado	0,103	0,0138
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>ICR14</i>	hipermetilado	0,092	0,0183
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>ICR13</i>	hipermetilado	0,115	0,0250
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>ICR9</i>	hipermetilado	0,099	0,0359
Controle Saudável vs IA SLOS	<i>ICR1</i>	hipermetilado	0,141	0,0375

Fonte: Elaborado pela autora (2026). **Nota:** $\Delta\beta$ (média do grupo caso – média do grupo controle). Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann–Whitney bicaudal).

Na comparação entre controle saudável e ART saudável (Figura 28), três ICRs apresentaram diferença significativa: *ICR1* ($\Delta\beta = 0,138$; $p = 0,0003$), *ICR14* ($\Delta\beta = 0,132$; $p = 0,0040$) e *ICR6* ($\Delta\beta = 0,102$; $p = 0,0471$). Em todos os casos, os valores de $\Delta\beta$ foram positivos, indicando maior metilação no grupo ART saudável em relação ao controle. Entre elas, *ICR1* se destacou por apresentar o menor valor de p e um dos maiores $\Delta\beta$, sugerindo uma diferença mais consistente nessa comparação.

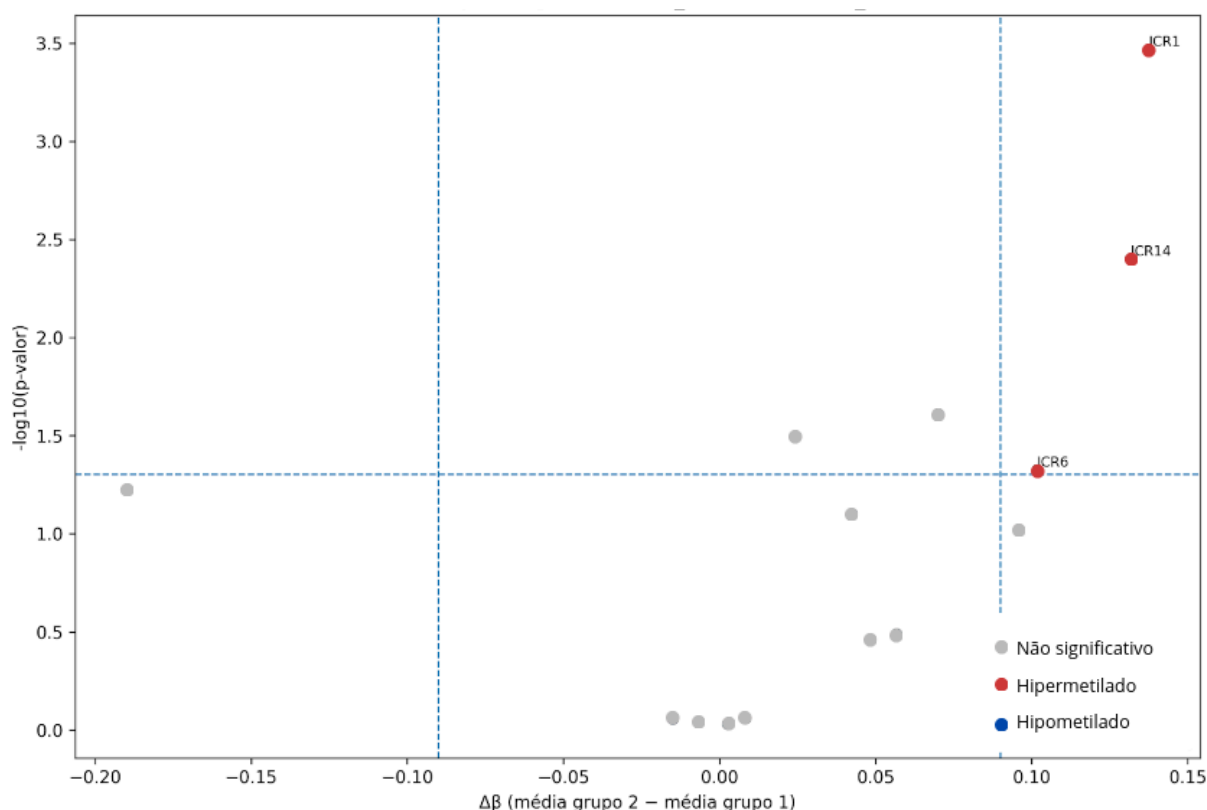


Figura 28. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs ART saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso – média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann–Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Na comparação controle saudável vs IA saudável (Figura 29), duas ICRs atingiram significância, a ICR9 ($\Delta\beta = 0,162$; $p = 0,0126$) e a ICR1 ($\Delta\beta = 0,172$; $p = 0,0191$). Assim como observado na análise com ART saudável, ambas apresentaram hipermetilação no grupo caso. A ICR1 voltou a aparecer como um dos principais achados, com $\Delta\beta$ elevado, reforçando que essa região pode ser uma das mais sensíveis às diferenças entre os grupos avaliados no sangue.

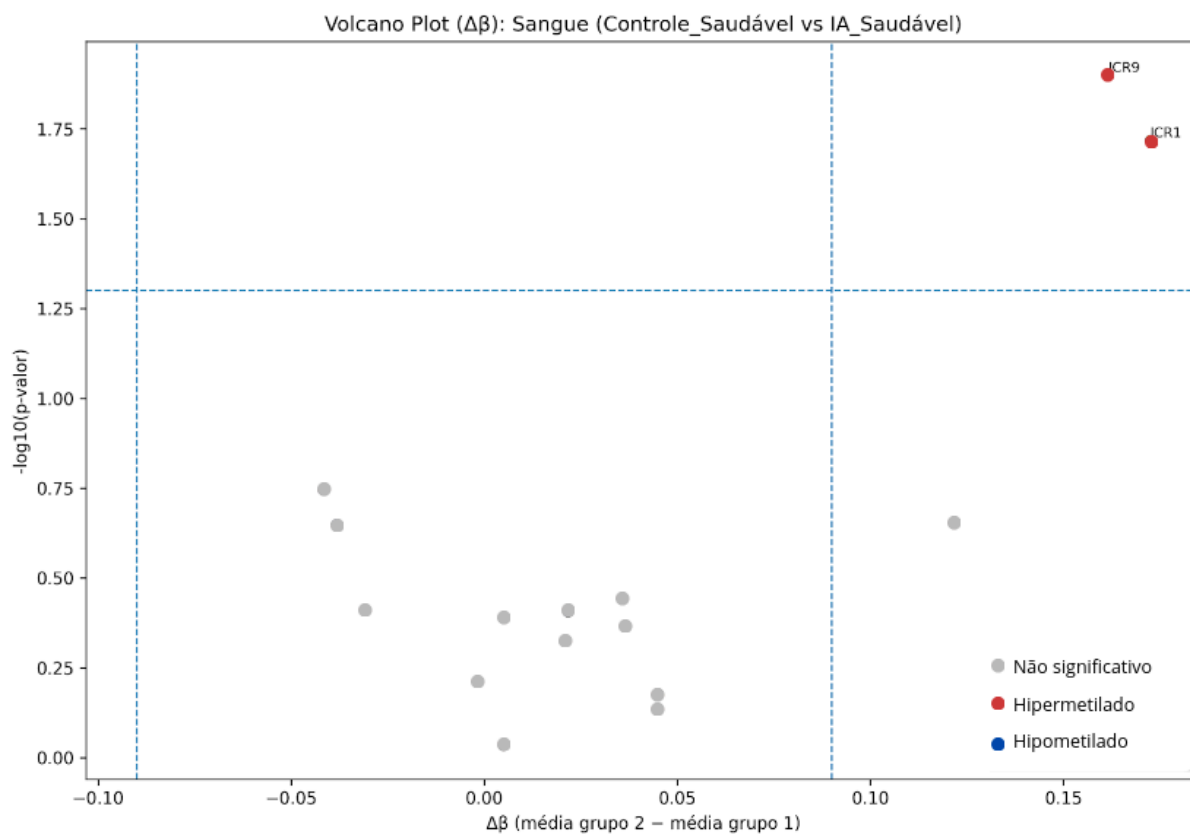


Figura 29. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs IA saudável. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Na comparação controle saudável vs IA SLOS (Figura 30), cinco ICRs foram significativas: *ICR10* ($\Delta\beta = 0,103$; $p = 0,0138$), *ICR14* ($\Delta\beta = 0,092$; $p = 0,0183$), *ICR13* ($\Delta\beta = 0,115$; $p = 0,0250$), *ICR9* ($\Delta\beta = 0,099$; $p = 0,0359$) e *ICR1* ($\Delta\beta = 0,141$; $p = 0,0375$). O padrão se manteve com $\Delta\beta$ positivo para todas as ICRs, sugerindo aumento de metilação no grupo IA SLOS em relação ao controle. Nessa comparação, *ICR1*, *ICR9* e *ICR14* voltaram a aparecer como regiões relevantes, enquanto *ICR10* e *ICR13* surgiram como achados adicionais específicos desse grupo.

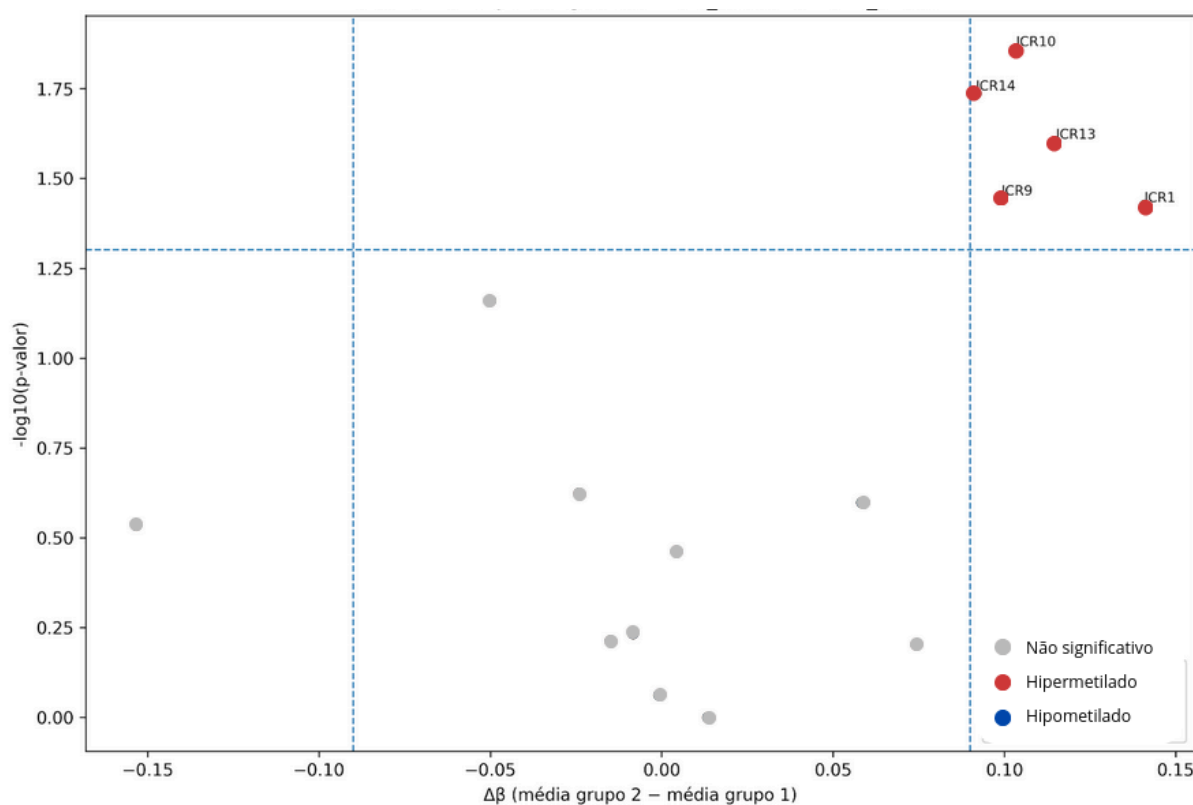


Figura 30. Volcano plot ($\Delta\beta$) das ICRs candidatas no sangue na comparação controle saudável vs IA SLOS. **Fonte:** Elaborado pela autora (2026). **Nota:** o eixo x representa $\Delta\beta$ (média do grupo caso - média do grupo controle) e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$. As linhas tracejadas indicam os limiares de significância ($p < 0,05$) e de efeito ($|\Delta\beta| \geq 0,09$). Pontos destacados representam ICRs com diferença de metilação acima do limiar e com significância estatística. Os testes estatísticos foram escolhidos automaticamente conforme a distribuição dos dados (t de Welch quando ambos os grupos foram considerados normais; caso contrário, Mann-Whitney bicaudal). Em cinza resultados não significativos, azul padrão hipometilado e vermelho padrão hipermetilado.

Para complementar a leitura dos volcanos, foi construído um *heatmap* (Figura 31) com os valores de metilação (β) das 15 ICRs candidatas em todas as amostras de sangue, incluindo controle saudável, IA saudável, ART saudável, IA SLOS e ART LOS.

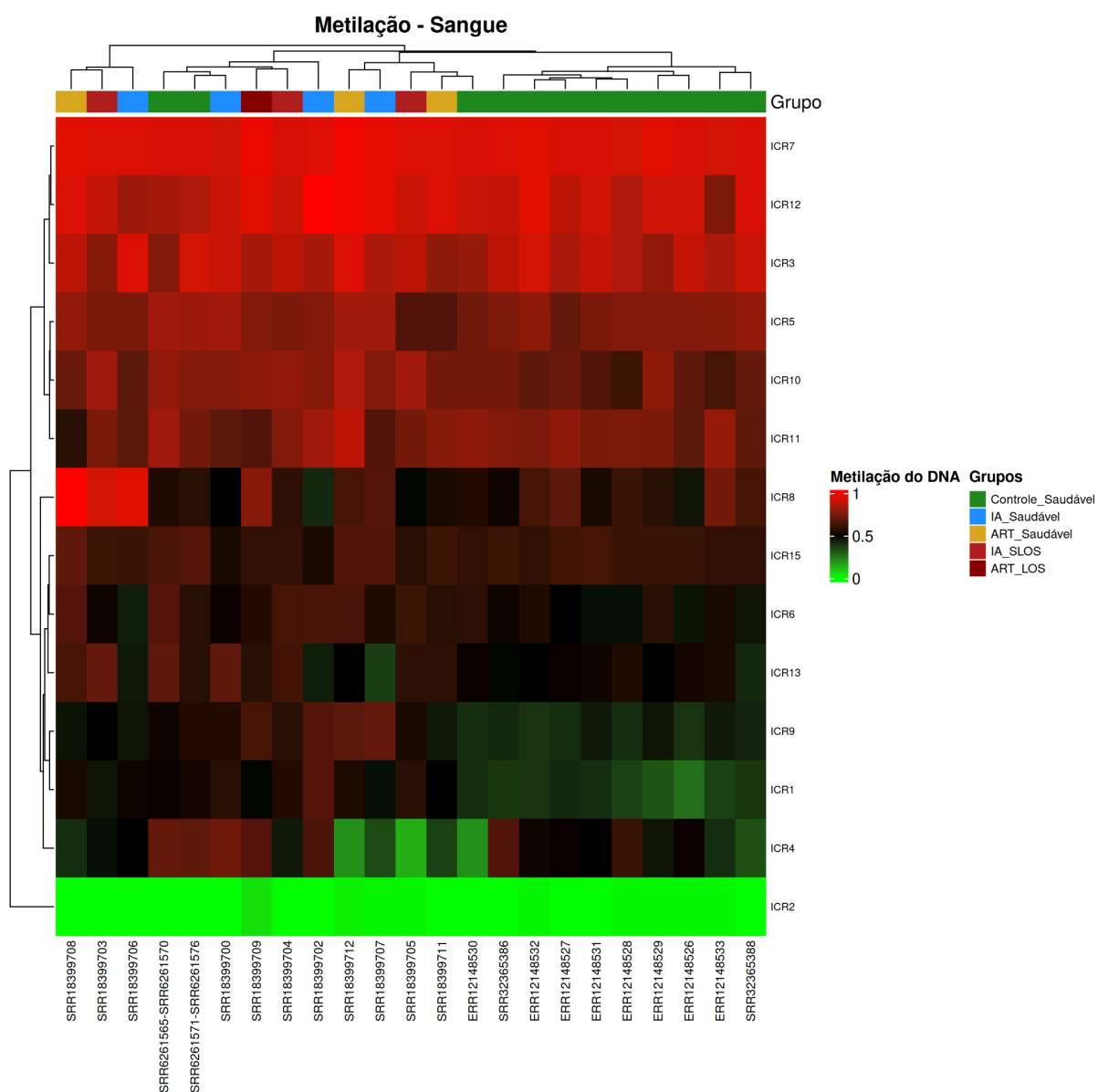


Figura 31. *ComplexHeatmap* dos valores de metilação (β) das 15 ICRs candidatas no sangue, com agrupamento hierárquico das amostras e indicação dos grupos. **Nota:** beta-valores variam de 0 a 1; valores próximos de 0 indicam menores médias de metilação e valores próximos de 1 indicam maior média de metilação. A barra superior identifica os grupos. ICRs com dados ausentes foram excluídas da visualização.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do perfil de metilação das ICRs conhecidas e candidatas

A análise integrada de dados de bioinformática, baseada em dados de WGBS e de genômica funcional obtidos nas plataformas públicas como o NCBI e o UCSC *Genome Browser*, permitiu o mapeamento detalhado de regiões associadas ao *imprinting* genômico no genoma bovino. Esses achados forneceram subsídios para a compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos no *imprinting* genômico, contribuindo para o entendimento de variações nos padrões de metilação relacionadas ao desenvolvimento embrionário e às ARTs. Esta pesquisa utilizou abordagens de bioinformática para analisar grandes volumes de dados gerados pelo *Next Generation Sequencing* (NGS). A abordagem reforça a importância do uso de dados públicos de alta qualidade para gerar conhecimento original e preencher lacunas na literatura sobre epigenética bovina.

A análise dos perfis de metilação entre as diferentes estruturas, tecidos e gametas revelou uma elevada variabilidade epigenética. Ao investigar os dados para identificar regiões de estabilidade, constatou-se que nenhuma ICR, seja conhecida ou candidata, manteve-se integralmente dentro dos padrões de metilação esperados em todas as estruturas e tecidos analisados.

Da mesma forma, ao comparar os gametas, não foi observada nenhuma região que atendesse aos critérios de metilação esperados para oócito e espermatozoide simultaneamente, possivelmente devido à diferença de cobertura. Esses achados sugerem que a manutenção da marca de *imprinting* é altamente dependente do contexto e do estágio de diferenciação celular, não havendo, neste estudo, evidência de uma região de controle compartilhada para todas as estruturas e tecidos avaliados.

O mapeamento das regiões diferencialmente metiladas resultou em um painel com 63 regiões, sendo 48 próximas a genes previamente descritos e 15 associadas a genes candidatos à regulação por *imprinting* genômico.

Os valores esperados de metilação monoalélica, conforme descritos por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011), não foram observados em todas as ICRs e em todas as estruturas, tecidos ou gametas. É importante reconhecer que resultados

fora do esperado podem ser influenciados por fatores, como especificidade tecidual. Segundo os resultados de Monteagudo-Sánchez et al. (2019), diversas DMRs apresentaram 5mC% placenta-específica, por exemplo, não sendo observadas em demais tecidos, uma vez que alguns gDMRs transitórios herdados do oócito podem estar presentes apenas em embrião pré-implantação e placenta.

Um ponto que merece discussão é a adequação das faixas consideradas como esperadas para a espécie bovina. A literatura ainda é escassa, e grande parte das referências disponíveis se concentra em humanos. Nossos dados apontam, para bovinos, uma faixa consistente de 52,5%, com variações de, no máximo, 5,05% nas principais ICRs conhecidas. Assim, além da validação experimental das regiões mais promissoras, é necessário discutir se os limites adotados refletem de fato a biologia do *imprinting* em bovinos ou se precisam ser ajustados com base em dados da própria espécie, conforme a literatura avançar.

As ICRs validadas na literatura e utilizadas como parâmetros para estabelecer a média de metilação em bovinos foram: *H19/IGF2* (Hansmann et al., 2011), *KvDMR1* do *cluster* regulado por *KCNQ1OT1* (Robbins et al., 2012), *IGF2R/AIRN* (Liu et al., 2022), *PLAGL1/HYMAI*, *MEST/MESTIT1* e *ZIM2/PEG3/MIMT1* (O'Doherty et al., 2015; Rutkowska; Xu; Flisikowski, 2019; Huang; Kim, 2009), domínio *SNHG14/SNRPN/SNURF* (Suzuki et al., 2009), *BLCAP/INNAT* (Zaitoun; Khatib, 2006), entre outras.

Dentro do conjunto de ICRs analisadas para a caracterização do perfil de metilação em bovinos, todas apresentaram médias de metilação dentro do intervalo esperado descrito por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011). Dessa forma, a metilação ocorreu em apenas um dos alelos e, portanto, valores em torno de 50% são frequentemente observados em tecidos somáticos. Para reduzir o efeito de ruído técnico, esta análise foi restrita aos tecidos cuja cobertura média foi superior a 10x, o que tende a reduzir as variações associadas à baixa profundidade de sequenciamento e a aumentar a confiabilidade das estimativas por amostra.

A média de referência para bovinos de 52,0% \pm 5,05%, aplicados como faixa de aceitabilidade mais restritiva, mostraram que parte expressiva das ICRs permaneceu dentro do intervalo em todos os cinco tecidos, o que sugere manutenção do padrão de metilação bimodal alelo específica esperado ao longo dos tecidos avaliados. Entre essas, destacam-se regiões canônicas amplamente descritas na literatura, como *MRPL23/H19*, *IGF2R/AIRN* e *PLAGL1/HYMAI*, além de

GNAS, que também apresentaram baixos desvios entre tecidos no resumo global. Algumas ICRs apresentaram variação entre tecidos mais ampla, sendo *GRB10* o exemplo mais evidente, com diferença entre tecidos e desvio padrão elevado ($\pm 20,15$).

Considerando os critérios validados na literatura por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011), uma parte das regiões analisadas apresentou padrões compatíveis com o esperado (35-65%). Observou-se que as ICRs *MRPL23/H19*, *GNAS** e *IGF1R* mantiveram níveis intermediários de metilação em todos os tecidos somáticos, frequentemente próximos de 50%, sugerindo manutenção adequada do *imprinting*. Esses resultados demonstram que, nessas ICRs somáticas, a metilação tende a refletir a contribuição de um alelo metilado e de outro não metilado, resultando em um perfil intermediário estável em diferentes estruturas e tecidos.

Para as ICRs analisadas em amostras de gametas, os valores esperados refletem o estado de *imprinting* de origem parental. Em nosso conjunto de dados, apenas as ICRs *SPON1* e *PKP3* apresentaram esse padrão. A ICR *SPON1* apresentou metilação média próxima de 0–10% no gameta masculino, enquanto o gameta feminino apresentou metilação média próxima de 90–100%. A ICR *PKP3* apresentou esse perfil um pouco controverso, pois ambos os gametas feminino e masculino apresentaram metilação entre os níveis de 90–100%.

Apenas o achado da ICR *SPON1* reforça o modelo clássico de ICRs gaméticas, porém, nos tecidos somáticos, essa ICR não apresentou o padrão consistente esperado em nenhum tecido analisado, reforçando os achados de Monteagudo-Sánchez et al. (2019) descrito acima. Todos os tecidos somáticos da ICR *SPON1* (com exceção do blastocisto, que apresentou níveis próximos a 11%) apresentaram níveis médios superiores a 88,7%. Portanto, a marca de metilação estabelecida na linhagem germinativa não foi mantida ao longo do desenvolvimento. Para a ICR *PKP3*, os níveis de metilação se mantiveram próximos ao esperado apenas nos tecidos de blastocisto e de sangue. Nos demais tecidos, os níveis médios de metilação foram superiores a 80%.

Um conjunto de ICRs apresentou nas estruturas e tecidos somáticos níveis de metilação fora dos perfis esperados. Em particular, observou-se tendência a hipometilação em algumas ICRs como *IGF2R/AIRN* (em blastocisto), *PLAGL1/HYMAI* (fígado neonato), *GNAS*** (blastocisto), *HERC3/NAP1L5* (blastocisto), *ZIM2/PEG3/MIMT1* (blastocisto), *SNHG14/SNRPN/SNURF*

(blastocisto), *INPP5F* (blastocisto), *CLDN23* (todos os tecidos) e *KCNQ1OT1* (blastocisto e músculo), e hipermetilação em ICRs como *BLCAP/NNAT* (blastocisto, sangue e cérebro), *PLEC* (todos exceto blastocisto) e *DIRAS3* (cérebro), refletindo, em grande parte, a dinâmica em estruturas e tecidos em desenvolvimento.

Esses perfis desviam do comportamento descrito como padrão para ICRs somáticas por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011) e podem refletir tanto aspectos específicos quanto a abordagem de análise utilizada, como por exemplo, a cobertura de sequenciamento em amostras de blastocistos, ou variações biológicas na manutenção de perfis de metilação do DNA em ICRs durante o desenvolvimento descritas por Monteagudo-Sánchez et al. (2019).

Os níveis mais altos ou mais baixos de metilação podem indicar regulação entre tecidos e especificidade, dinâmica epigenética em determinados estágios de desenvolvimento ou mesmo heterogeneidade celular no tecido analisado. Além disso, fatores como tamanho amostral reduzido, variação entre indivíduos e diferenças na região amplificada em relação ao estudo original, podem deslocar os valores médios em relação à faixa proposta (Wei; Wu; 2022).

Nas ICRs analisadas em amostras de gametas, embora o padrão esperado de metilação tenha sido observado em parte das regiões, diversas ICRs apresentaram valores intermediários em um ou ambos os gametas. Em *BNIP3P12*, por exemplo, o oócito apresentou metilação em torno de 65,5% e o espermatozóide em torno de 85%, sugerindo um estado parcial de metilação.

Os valores de desvio padrão fornecem uma medida importante da estabilidade do perfil de metilação. Em diversas ICRs, especialmente naquelas que se enquadraram dentro da faixa esperada nos tecidos somáticos, como *MRPL23/H19* e *GNAS**, os desvios padrão foram relativamente baixos, sugerindo um padrão de metilação consistente entre as amostras analisadas. Em contraste, em ICRs como *IGF1R*, observaram-se desvios padrão elevados ($\pm 19,09\%$ em blastocisto), indicando heterogeneidade aumentada. Essa variabilidade pode refletir diferenças individuais, mistura de tipos celulares com estados epigenéticos distintos, ou ainda processos dinâmicos de estabelecimento e manutenção da metilação. ICRs com alta variabilidade podem representar regiões mais sensíveis a influências ambientais ou a perturbações durante o desenvolvimento (Jaffe; Irizarry; 2014; Fu et al., 2025).

É importante considerar também limitações técnicas que podem contribuir para os desvios em relação ao modelo descrito por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011). Diferenças nas regiões genômicas analisadas, como posição do *amplicon* em relação ao DMR original, no desenho dos *primers*, na eficiência de conversão com bissulfito e no número de CpGs incluídos nas médias de metilação podem afetar os valores obtidos (Grunau; Clark; Rosenthal, 2001; Genereux *et al.*, 2008; Wojdacz; Hansen; Dobrovic, 2008). Além disso, o tamanho amostral e a qualidade do DNA em cada tecido podem influenciar tanto as médias quanto os desvios padrão. Assim, parte das incompatibilidades observadas pode refletir particularidades do protocolo utilizado para o WGBS, devendo ser interpretadas com cautela (Ehrich *et al.*, 2007; Ehrich *et al.*, 2014).

Em conjunto, as ICRs candidatas não apresentaram perfis de metilação dentro do esperado para todas as estruturas e tecidos somáticos, apenas na *ICR15*, esses perfis se aproximaram do descrito para ICRs clássicas, com as demais ICRs variando em pelo menos um tecido, por exemplo, a *ICR1* variou apenas em blastocisto fora do esperado.

A *ICR15* apresentou níveis bimodais de metilação em todos tecidos somáticos, frequentemente próximos de 50%, com valores de desvio padrão relativamente baixos. Os níveis de metilação foram: blastocisto 40,67% ($\pm 8,08$), sangue 62,08% ($\pm 2,5$), cérebro 61,2% ($\pm 4,15$), fígado neonato 48,17% ($\pm 5,85$), fígado adulto 55,5% ($\pm 1,91$), músculo LD 58,5% ($\pm 3,25$), músculo esquelético 47,8% ($\pm 6,65$), glândula mamária 57,5% ($\pm 3,54$) e ovário 53,6% ($\pm 3,86$). Esse padrão aproxima essa região do comportamento clássico de ICRs somáticas, em que um alelo metilado e outro não metilado resultam em uma média intermediária estável em tecidos somáticos. Assim, essa ICR se destaca como forte candidata a regiões controladoras de *imprinting* de natureza somática, uma vez que reproduzem o perfil descrito para ICRs já consolidadas na literatura.

Um fato interessante é que na *ICR15* o perfil gamético feminino apresentou média de 16,7% $\pm 17,7$ e o perfil gamético masculino apresentou consistência ao padrão esperado com média de 93,5% $\pm 3,5$. Portanto, apesar dos tecidos somáticos e o espermatozoide terem apresentado o perfil esperado, em oócito, esse perfil não ficou dentro do esperado para algumas amostras, o que pode estar associado à baixa cobertura apresentada nessas amostras de oócitos, refletindo o impacto na média final.

Ao analisar as amostras de oócito de forma individual, percebe-se que há impacto da média da cobertura para as análises. As amostras SRR8107756, SRR8107757, SRR8107758, SRR8107765, SRR8107766, SRR8107767, SRR8107784 e SRR8107786 apresentam cobertura de sequenciamento de 10x e para essas amostras a metilação média da *ICR15* foi de 5% após a concatenação desse grupo. A amostra SRR9182887, possui cobertura de sequenciamento de 11.9x e apresentou metilação de 8%. Já no grupo de amostras SRR13623115, SRR13623116, SRR13623117, SRR13623118, SRR13623119, SRR13623120, SRR13623121, SRR13623122, SRR13623123, SRR13623124, SRR13623125, SRR13623126, SRR13623127 e SRR13623128, a média foi de 37%, porém não há relato nos bancos de dados públicos sobre a média de cobertura das amostras. Os resultados do grupo de amostras SRR13623115 à SRR13623128 impactaram fortemente a média e o desvio padrão nesta análise e por isso novas análises com número amostral maior devem ser realizadas.

Por outro lado, um subconjunto das ICRs candidatas mostrou um padrão mais compatível com ICRs gaméticas. Apresentaram o perfil de metilação esperado a *ICR1* (oócito média 8,33%, \pm 6,5; e espermatozoide média 3,88%, \pm 2,2), *ICR2* (oócito média 1,5%, \pm 0,7 e espermatozoide média 1,4%, \pm 3) e *ICR6* (oócito média 9,3%, \pm 12,8 e espermatozoide média 2,3%, \pm 1,4). Porém nessas ICRs, os níveis de metilação nos gametas não aproximaram-se do modelo binário esperado em todas as ICRs analisadas, em que um gameta está completamente metilado e o outro desmetilado.

Esse comportamento é consistente com a ideia de que a marca de *imprinting* é estabelecida na linhagem germinativa e, posteriormente, transmitida aos tecidos somáticos, sugerindo que essas regiões podem atuar como ICRs gaméticas. Uma explicação para esse perfil de metilação é a possibilidade dessas ICRs estarem passando pela desmetilação global que ocorre nos pró-núcleos gaméticos durante o período pré-implantacional (Roidor; Chebli; Borensztein, 2024). Além disso, algumas ICRs candidatas apresentam valores intermediários em alguns tecidos somáticos, dentro da faixa de 35–65%, com exceção, por exemplo, da *ICR1* (blastocisto e músculo fugiram ao perfil esperado), *ICR2* (todas as somáticas fugiram ao perfil esperado) e *ICR6* (blastocisto fugiu ao perfil esperado). Essa combinação reforça a interpretação se tais ICRs são reguladas pelo mecanismo de *imprinting*, devendo, posteriormente, analisa-las com nível amostral maior.

Nem todas as ICRs candidatas, porém, se encaixaram claramente no modelo proposto. Em algumas ICRs, foram observados níveis de metilação abaixo ou acima do esperado. Nesses casos, como na *ICR3* (exceção de blastocisto e cérebro, que estavam dentro do esperado) e *ICR7* (exceção de blastocisto, que estava dentro do esperado), apresentaram-se com tendência à hipermetilação. Na *ICR4* (exceção de blastocisto e ovário, que ficaram fora do esperado) e *ICR9* (exceção de blastocisto, que ficou fora do esperado), apresentaram-se com tendência à hipometilação na maioria dos tecidos.

O perfil se afasta do padrão esperado para ICRs somáticas candidatas, como na *ICR2* e *ICR7*, aproximando-se mais de regiões completamente metiladas ou não metiladas. Esses resultados podem indicar que, apesar de terem sido inicialmente selecionados como candidatas, nem todas as ICRs atuam como clássicas, ou que o *imprinting* seja restrito a contextos teciduais ou de estágio de desenvolvimento muito específicos não presentes nas amostras analisadas neste estudo (Daskeviciute *et al.*, 2025).

Os desvios padrão foram baixos na maioria dos tecidos espermáticos, porém, apresentaram desvios maiores nos oócitos. Por exemplo, a *ICR3*, que apresentou desvio de $\pm 29,7$, indicando perfis de metilação relativamente heterogêneos entre as amostras e sugerindo uma marca epigenética instável em oócitos ou podendo ser resultado da baixa cobertura observada para esse tecido em algumas amostras, uma vez que nem todas as amostras tinha o mínimo aceitável de 10x para cobertura de sequenciamento, como citado acima.

No grupo de amostras de embriões em estágio de blastocisto, foi observado um cenário particularmente variável. Além da baixa cobertura que dificulta a interpretação, houve grande heterogeneidade entre as amostras, embora algumas regiões tenham se mantido estáveis, como *MRPL23/H19*, *PLAGL1/HYMAI*, *NEURL1* e *EPHA10*. Em contrapartida, um conjunto de regiões permaneceu fora do padrão esperado em todas as amostras, como *GNAS*** e *BLCAP/NNAT*. Adicionalmente, algumas regiões não puderam ser avaliadas devido à ausência total de dados em todas as réplicas, como *CYGB/PRCD*, *ACTR3C* e *CTNNA3/LRRTM3*, o que reflete a problemática da cobertura.

Para as ICRs candidatas avaliadas em blastocisto, a maioria desvia do padrão bimodal (monoalélico), indicando baixa estabilidade global nesse estágio. Nesse contexto, apenas a *ICR15* permaneceu dentro da faixa esperada em todas as

amostras, enquanto as demais apresentaram ao menos uma réplica fora do padrão. A *ICR12*, por sua vez, apresentou resultados inconclusivos devido à ausência de leituras em todas as amostras analisadas, o que mais uma vez reforça o impacto da cobertura de sequenciamento na avaliação dessas regiões.

O estágio de blastocisto corresponde a um período de intensa reprogramação epigenética, no qual a metilação do DNA pode ser altamente dinâmica e, conseqüentemente, mais heterogênea (Zhu *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2014). Considerando a ausência de dados em blocos inteiros para algumas regiões, é plausível que os resultados de blastocistos esteja sub-representado devido à cobertura insuficiente, o que limita a interpretação para *loci* específicos e exige cautela na comparação direta com tecidos somáticos.

Os tecidos somáticos adultos, em geral, apresentaram o maior grau de estabilidade, em conformidade com a literatura (Woodfine; Huddleston; Murrel, 2011), perfil de metilação entre 35% e 65%. Os dados apresentaram destaque para a glândula mamária, que exibiu 18 ICRs bimodais em todas as amostras. No sangue, por outro lado, regiões clássicas como *MRPL23* e *H19* variaram em direção à hipermetilação em algumas amostras, enquanto outras permaneceram estáveis, evidenciando que mesmo ICRs bem caracterizados podem apresentar variação dependente do tecido e do conjunto amostral.

Nas ICRs candidatas, o conjunto formado por cérebro, glândula mamária e ovário apresentou estabilidade marcante para *ICR1*, *ICR6*, *ICR9* e *ICR15* dentro da faixa esperada. Observamos, ainda, que a *ICR15* também se manteve estável no sangue. Em contraste, a *ICR7* exibiu padrão consistentemente fora do esperado nos quatro tecidos analisados.

Esses achados sugerem que, entre os tecidos investigados, a glândula mamária apresentou maior estabilidade epigenética e manutenção mais consistente das marcas, possivelmente refletindo menor heterogeneidade nos perfis de metilação do DNA e maior consistência experimental nesse conjunto. Ainda assim, essa interpretação deve ser feita com cautela, pois diferentes combinações de cobertura, composição celular e variabilidade individual podem contribuir para esse padrão, como discutido anteriormente.

O caso da *ICR7* merece atenção especial, uma vez que apresenta falha consistente em todos os tecidos somáticos, exceto blastocisto e espermatozoide, pode indicar que essa região não se comporta como uma ICR canônica ou sua

regulação depende de um contexto não contemplado nas amostras avaliadas, ou ainda que a região precisa ser revisada e ajustada, seja em termos de anotação, mapeamento ou definição de limites regionais.

Nos tecidos musculares, várias ICRs candidatas apresentaram médias de metilação conservadas, mantendo diversas regiões estáveis, por exemplo, *ICR1*, *ICR4*, *ICR6*, *ICR9*, *ICR10* e *ICR15* no músculo LD e *ICR4*, *ICR6*, *ICR9*, *ICR10* e *ICR15* no esquelético, enquanto as demais apresentaram tendências à hipometilação ou hipermetilação.

As ICRs que mostraram maior estabilidade no espermatozoide e maior heterogeneidade no oócito podem refletir comportamento relacionado à contribuição paterna ou ao estabelecimento mais tardio de certas marcas na linhagem materna, de acordo com o processo de desmetilação ativa e passiva em espermatozoides e ovócitos, respectivamente (Oswald *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2014). No conjunto de dados gaméticos, o espermatozoide se destaca por apresentar marcas mais bem definidas, enquanto o oócito apresenta maior variabilidade (Caniçais *et al.*, 2025).

Por fim, quanto aos tecidos que ficaram dentro do limite do estudo e dos padrões de Woodfine, Huddleston e Murrell (2011), demonstra-se ICRs altamente estáveis em nosso conjunto de dados e mais alinhadas ao intervalo descrito na literatura. Isso indica que ICRs que permanecem compatíveis com o comportamento esperado, mesmo quando apresentam desvios moderados, estão dentro dos valores esperados descritos na literatura. Dessa forma, os resultados sustentam que as ICRs canônicas analisadas mantêm padrões coerentes com *imprinting* nos tecidos com boa cobertura, ao mesmo tempo em que evidenciam que ICRs e tecidos que não foram incluídos nesta análise merecem investigação adicional para separar variação biológica de possíveis limitações técnicas.

5.2. Impacto das ARTs nas ICRs

As análises realizadas para avaliar o impacto das tecnologias reprodutivas demonstra que para o grupo de embriões em estágio de blastocisto, é possível observar alterações pontuais, com ICRs sensíveis a PIV. Nas ICRs conhecidas, na análise entre controle e PIV, observa-se três ICRs com diferença significativa no blastocisto. A ICR *HERC3/NAP1L5* apresentou hipermetilação em PIV ($\Delta\beta = 0,406$; $p = 0,0143$). A *BLCAP/NNAT* apresentou hipometilação em FIV ($\Delta\beta = -0,360$; $p =$

0,0339). E a *MRPL23/H19* com hipometilação em FIV ($\Delta\beta = -0,100$; $p = 0,0218$). O *heatmap* (Figura 13) e o *volcano plot* (Figura 12) reforçam que *MRPL23/H19* tende a valores mais baixos no grupo PIV, enquanto *HERC3/NAP1L5* apresentou o aumento mais consistente.

Para as ICRs candidatas, apenas duas demonstraram impactos significativos, a *ICR15* com hipometilação em PIV ($\Delta\beta = -0,100$; $p = 0,0218$) e a *ICR9* com hipermetilação em PIV ($\Delta\beta = 0,282$; $p = 0,0447$). Algumas ICRs apresentaram tendências mistas de perda ou ganho de metilação, como *ICR5* e *ICR6* (Figura 15). A *ICR1* apresentou consistência entre as amostras PIV e controle. Esses resultados sugerem que não há impacto global no *imprinting* genômico, apenas alterações pontuais em *loci* específicos, em um estágio em que a epigenética é mais dinâmica.

O resultado de *HERC3/NAP1L5* indica uma alteração epigenética significativa associada à produção *in vitro* nesse estágio inicial do desenvolvimento. A literatura sobre bovinos ainda é escassa quanto à avaliação direta do impacto das tecnologias de reprodução assistida (ARTs) nessa região específica, especialmente em blastocistos. Portanto, esse resultado pode ser interpretado como um achado original desta pesquisa, sugerindo que a região pode estar entre os alvos sensíveis às condições de cultivo e de manipulação embrionária. A hipermetilação observada amplia o conjunto de regiões potencialmente vulneráveis a alterações epigenéticas em embriões bovinos gerados por PIV. Isso reforça a necessidade de estudos adicionais para avaliar a persistência desse sinal em estágios posteriores e sua possível relação com desfechos do desenvolvimento.

Os relatos de Li et al. (2022) evidenciam alterações epigenéticas associadas a ARTs a genes como *BLCAP/NNAT*. O grupo comparou o metiloma de tecidos bovinos de animais com LOS espontânea (SLOS), produzidos por inseminação artificial, e de animais com LOS associada à produção *in vitro* (ART-LOS), para verificar se a SLOS apresenta as mesmas epimutações observadas na ART-LOS. Nesse estudo, os autores identificaram 320 *loci* com alterações de metilação em LOS quando comparados aos controles. Eles destacaram 25 *loci* altamente vulneráveis com potencial para atuar como marcadores moleculares, incluindo o corpo gênico de *BLCAP/NNAT* (Li et al. 2022). Eles também observaram padrões específicos de tecido de músculo e sangue e conservação de alterações induzidas por ARTs entre esses tecidos. Assim, embora esse achado aponta a vulnerabilidade do *locus BLCAP/NNAT*, em contextos de LOS e ART, ele difere do nosso resultado

por se basear em tecidos pós-natais de animais com a síndrome e não em blastocistos produzidos por PIV (Li *et al.*, 2022).

Hori *et al.* (2010) avaliaram animais produzidos por SCNT e por PIV, investigando metilação em ICRs em bezerros pós nascimento e expressão gênica em tecidos somáticos. Nos indivíduos com hipometilação em *KvDMR1*, observaram aumento de *KCNQ1OT1* e redução de *CDKN1C*, enquanto não foi observada diferença detectável na expressão de *H19* e *IGF2* em comparação ao controle. Esses resultados, em conjunto com evidências de outros tecidos, podem ser compatíveis com alterações observadas em estágios iniciais do desenvolvimento que não necessariamente se mantêm de forma evidente em tecidos pós-natais. A ausência de diferença em *H19/IGF2* nesse estudo não contradiz, por si só, achados obtidos em outro contexto experimental (por exemplo, em blastocisto), podendo refletir especificidade de estágio e tecido.

Verruma *et al.* (2024) descrevem a reprogramação epigenética do *H19* ao longo da produção *in vitro* em bovinos, mostrando que a metilação do *H19* varia significativamente entre oócitos e embriões. Nos estudos desse grupo há o relato do aumento da metilação em ovócitos do estágio de vesícula germinativa (GV) para a metáfase II (MII), com 68,04% e 98,05%, respectivamente, em *H19*. Os dados do grupo apontaram que, após a fecundação, a metilação cai até a mórula, mantendo-se em na fase de blastocisto expandido, diminuindo nos zigotos (85,83%) até o estágio de mórula (61,65%). O período pré-implantacional é, por si só, uma janela de alta dinâmica, o que explica a heterogeneidade observada pelos autores na *H19*-DMR (ICR associada a *IGF2/H19*). Assim, a hipometilação observada no blastocisto (PIV vs controle) em nosso estudo pode representar uma sensibilidade em relação ao padrão esperado nessa fase e não necessariamente persiste em tecidos mais tardios.

Os estudos de Zhang *et al.* (2016) reforçam nossos achados, eles apontaram que a metilação das DMRs *H19* foi acompanhada durante o desenvolvimento pré-implantacional em embriões bovinos, comparando PIV e SCNT. Eles observaram metilação moderada em embriões FIV, incluindo blastocistos, mas uma queda acentuada (hipometilação) em blastocistos derivados de SCNT. Isso sugere falha de reprogramação no *locus* sob condições mais adversas de manipulação embrionária.

Os estudos de Curchoe *et al.* (2009) demonstraram uma região intergênica rica em CpGs no domínio *IGF2/H19* em tecidos de clones a termo (fígado, cérebro,

pulmão, rim e placenta). A pesquisa identificou variações de metilação em alguns animais, com predominância de hipometilação em tecidos específicos, como fígado e placenta, em comparação aos controles. Eles também discutem que essa hipometilação se alinha a observações prévias de expressão bialélica de *H19* em clones e apontam que alterações epigenéticas nessa região podem estar relacionadas à perda de *imprinting* do *locus*. Portanto, a hipometilação no domínio *H19* pode ter impacto funcional dependendo do tecido e da persistência do erro.

Su et al. (2011) observou que em bezerros transgênicos clonados com quadro de LOS a expressão de genes como *H19*, *IGF2*, *XIST*, *PEG3*, *IGF2R* e *SNRPN* havia alterações de expressão e de metilação em diferentes tecidos (como músculo, fígado, baço, pulmão e rim), com maior gravidade no grupo de natimortos com LOS. Quando as alterações epigenéticas não são apenas transitórias e se mantêm, podem aparecer em tecidos somáticos e associar-se a fenótipos de desenvolvimento. Portanto, o achado no blastocisto é um sinal precoce, mas não determina sozinho o desfecho fenotípico.

Em bovinos, também há evidências de que etapas anteriores à fecundação já podem alterar o *imprinting* de *H19*. No estudo sobre maturação *in vitro* modulada por gonadotrofinas, Lu et al. (2014) relataram a metilação e a desmetilação aberrantes de *H19* em oócitos MII sob várias concentrações de gonadotrofinas. Embora as gonadotrofinas melhorem a maturação nuclear e aumentem o potencial da membrana mitocondrial interna e os níveis de ATP, os pesquisadores relataram que houve impactos na metilação de genes como, *H19*, *SNRPN* e *PEG3* em oócitos em MII para todas as concentrações estudadas. Esses achados são consistentes com a detecção no blastocisto, uma vez que essa mudança pode começar ainda no oócito, devido às condições de MIV, e ser remodelada durante a cultura embrionária.

Por outro lado, nem toda manipulação *in vitro* necessariamente interfere no *H19* de forma detectável. No estudo de maturação estendida de Heinzmann et al. (2015), os autores observaram queda de desempenho embrionário, mas não encontraram diferenças significativas na metilação do alelo inteiro de *H19* nos oócitos entre os protocolos. O *locus* pode ser sensível, mas o efeito depende do tipo de estresse e do protocolo, como se trate de MIV, PIV ou cultivo, por exemplo.

Nos estudos de Driver et al. (2012), blastocistos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* foram selecionados no mesmo estágio e com a mesma qualidade morfológica, ou seja, blastocistos expandidos e considerados excelentes. As

análises por RNA-seq mostraram diferenças importantes que vão além da morfologia. Os autores detectaram a expressão de 17.634 genes e identificaram 793 genes diferencialmente expressos entre os grupos. Além disso, 395 novas unidades foram transcritas, das quais 45 também foram diferenciais. Eles ainda observaram evidências de *splicing* alternativo em 4.800 genes, com 873 genes apresentando *splicing* alternativo diferencial entre os grupos. Além disso, apareceram vias enriquecidas relacionadas, por exemplo, à síntese de colesterol e esteróis, desenvolvimento de sistemas e diferenciação celular. Esses dados sustentam a interpretação de que o ambiente *in vitro* pode alterar o programa transcricional do blastocisto mesmo quando o embrião é considerado normal pela avaliação morfológica.

Em blastocistos, as alterações pontuais em *loci* específicos sugerem sensibilidade do estágio pré-implantacional à PIV, compatível com um período de reprogramação epigenética dinâmica, no qual pequenas perturbações podem se refletir em marcas de metilação. Além disso, os números amostrais do controle são baixos para algumas ICRs devido à ausência de dados, portanto, esse achado necessita de confirmação posterior.

As análises no tecido muscular revelaram padrões distintos entre as ARTs analisadas, demonstrando que diversas ICRs conhecidas foram impactadas, com variações de ganho ou perda de metilação, com ênfase no ganho de metilação em *LINC01267* e *KCNQ1OT1*, e também alterações em *SMTN*, com perda de metilação.

O tecido muscular tem sido amplamente estudado para avaliar os efeitos pós-natais de embriões produzidos por ARTs, mesmo quando não há um fenótipo evidente ao nascimento. Nos estudos de Rabaglino et al. (2022) bezerros gerados por PIV foram comparados à bezerros produzidos *in vivo*. Eles integraram metiloma (WGBS) e transcriptoma (RNA-seq) e mostraram que o músculo carrega assinaturas moleculares associadas a regulação energética, sugerindo programação tecidual decorrente do ambiente *in vitro*. Em nossos resultados, observamos que a PIV causou alterações no epigenoma muscular, resultando em indivíduos com peso ao nascer e taxa de crescimento semelhantes à de controles. Isso demonstra que embora as características fenotípicas sejam semelhantes, o epigenoma pode não apresentar o mesmo *status* de metilação em determinadas ICRs.

Em uma linha de pesquisa semelhante, Thompson et al. (2025) avaliaram o transcriptoma hepático e muscular de bezerros com 4 meses de idade concebidos

por IA e PIV. Os autores observaram diferenças marcantes entre fêmeas produzidas por PIV e IA. No fígado, verificou-se regulação negativa de vias de fosforilação oxidativa e aumento de processos relacionados ao sistema imune. No músculo, observaram-se genes hipoexpressos associados à via de sinalização p53, responsável pela defesa celular, e genes hiperexpressos relacionados ao desenvolvimento da estrutura muscular. Esses achados sugerem que a PIV pode induzir alterações no transcriptoma, possivelmente decorrentes de modificações epigenéticas iniciais, especialmente em fêmeas, refletindo-se em perfis transcriptômicos distintos no período pós-natal .

Quando o foco é LOS, o músculo também se destaca por concentrar alterações ligadas ao *imprinting* e às vias do desenvolvimento. Os estudos de Chen *et al.* (2015) caracterizaram a LOS como uma condição de perda de *imprinting* multilocus e dependente de tecido. A LOS apresenta expressão bialélica de genes de *imprinting* em órgãos fetais, incluindo músculos. Além disso, apresenta associação dessas perdas com hipometilação tecido-específica do alelo normalmente metilado.

Em outro estudo de Chen *et al.* (2017), os autores citam que analisaram o transcriptoma e o metiloma de músculo esquelético em fetos LOS e relataram desregulação que, no músculo, a relação entre metilação local e expressão pode ser indireta, dependente do tempo e do contexto do desenvolvimento.

O estudo de Li *et al.* (2022) investigou as diferenças entre a SLOS e a ART-LOS no músculo. O grupo comparou diretamente SLOS e ART-LOS por meio de WGBS e mostrou que ambos compartilham epimutações no metiloma. Evidenciaram padrões tecido-específicos de músculo e, ao mesmo tempo, demonstraram a conservação de alterações induzidas por ARTs entre músculos. Esse tipo de evidência, detectada em músculo, fortalece a interpretação de que alterações epigenéticas cedo detectadas, como as observadas em blastocistos, podem ter consequências que variam conforme o tecido e o estágio. Além disso, o músculo pode funcionar como um tecido-chave para investigar a persistência, as assinaturas de ARTs e as diferenças entre SLOS e ART-LOS. Portanto, o padrão observado em nossas análises para músculo, hipermetilação predominante em FIV saudável e inversão para hipometilação em FIV LOS, é consistente com os achados de (Li *et al.*, 2022).

No domínio *KCNQ1OT1/CDKN1C*, há evidência de que em bovinos, as ARTs podem induzir hipometilação em *KvDMR1*. As associações sugerem que o aumento de expressão de *KCNQ1OT1* e à redução de *CDKN1C* em bezeros produzidos por PIV e, sobretudo, em subconjuntos de casos oriundos de SCNT são vinculados à LOS (Hori *et al.*, 2010). Em nossos resultados para o tecido muscular, a identificação de alterações em *KCNQ1OT1* em diferentes contrastes, incluindo IA saudável *versus* controle e PIV saudável *versus* controle, reforça a sensibilidade desse domínio às condições pré-concepcionais. Além disso, o padrão observado em PIV LOS, caracterizado por predomínio de hipometilação no conjunto de ICRs significativas, é compatível com o que tem sido descrito para LOS, em que a desestabilização do *imprinting* no *locus* frequentemente se manifesta como perda de metilação nas regiões de controle e desregulação transcricional subsequente (Hori *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015).

Para *IGF2R/AIRN*, as maiores perdas de metilação observadas em PIV LOS são consistentes com a literatura. Caracteriza-se esse *locus* como um dos mais recorrentes em quadros de sobrecrescimento fetais associados às ARTs. Em fetos bovinos com LOS (com aproximadamente 105 dias), o *IGF2R* foi descrito com perda de *imprinting* de forma consistente, com expressão bialélica em múltiplos tecidos, incluindo o músculo, acompanhada de hipometilação tecido-específica no alelo normalmente metilado (Chen *et al.*, 2015). Em neonatos com LOS (incluindo SLOS e ART-LOS), análises de metilação em escala genômica também destacam *IGF2R* como *locus* vulnerável recorrente, com assinaturas detectáveis em músculo, reforçando seu potencial como marcador epigenético associado ao fenótipo (Li *et al.*, 2022).

No *locus BLCAP/NNAT*, a perda de metilação detectada no músculo do grupo PIV LOS é observada em estudos de metiloma. Em análise por WGBS comparando SLOS e ART-LOS, o *BLCAP/NNAT* foi identificado entre os loci altamente vulneráveis, com alterações consistentes em tecidos, incluindo músculo (Li *et al.*, 2022). Além disso, a caracterização de *imprinting* de *NNAT* e de genes relacionados, como *NAP1L5* e *H19*, em bovinos fornece base para a interpretação de que variações de metilação nesse domínio podem refletir falhas na manutenção de marcas parentais (Zaitoun; Khatib, 2006). Assim, a hipometilação observada em PIV LOS no músculo é compatível com loci previamente descritos como vulneráveis em

LOS, ampliando a evidência de envolvimento desse domínio no tecido analisado (Li *et al.*, 2022).

O *locus HERC3/NAP1L5* apresentou perfis contrastantes entre PIV saudável (ganho de metilação) e PIV LOS (perda de metilação), aspecto relevante, por *NAP1L5* ser um gene *intronless* inserido em *HERC3* e descrito como regulado por *imprinting* em bovinos, com expressão detectável no músculo (Zaitoun; Khatib, 2006). No contexto de LOS induzida por ARTs, *NAP1L5* já foi relatado com expressão bialélica em parte dos casos, em um quadro de perda de *imprinting* multilocus, incluindo tecidos como músculo (Chen *et al.*, 2015). Dessa forma, a inversão de direção entre PIV saudável e PIV LOS pode refletir estados biológicos distintos. Um desvio epigenético associado à produção *in vitro*, sem manifestação fenotípica evidente e um estado compatível com desregulação de *imprinting* associada à LOS, considerando que a relação entre metilação e expressão pode variar conforme a região avaliada (ICR, promotor ou corpo gênico) e o tecido.

Em *INPP5F*, a hipermetilação observada no músculo do grupo PIV saudável pode ser discutida em função de tecido específico descrito para LOS. Em bovinos com LOS por ARTs, *INPP5F* foi apontado como *locus* com perda de *imprinting* em um padrão dependente de tecido, com evidência marcante de expressão bialélica no cérebro, indicando que a suscetibilidade do domínio pode se manifestar de forma distinta entre tecidos (Chen *et al.*, 2015). Ainda que não correspondam diretamente ao mesmo tecido e à mesma direção de efeito, esses dados sustentam a inclusão de *INPP5F* no conjunto de loci sensíveis a perturbações do *imprinting*.

No domínio *PLAGL1/HYMAI*, o ganho de metilação observado no músculo em PIV saudável pode ser contextualizado pelo fato de *PLAGL1* já ter sido reportado como bialélico em uma fração dos casos de LOS bovina induzida por ARTs, no contexto de um padrão multilocus e tecido específico (Chen *et al.*, 2015). As análises de metiloma em LOS reforçam que domínios de *imprinting*, incluindo *PLAGL1*, compõem um núcleo de loci frequentemente envolvidos em ART-LOS, ainda que com heterogeneidade de direção entre tecidos e indivíduos (Li *et al.*, 2022). Assim, alterações em *PLAGL1/HYMAI* no músculo, mesmo em PIV saudável, podem ser interpretadas como desvio epigenético em *locus* sensíveis.

Para *MEST/MESTIT1*, a presença de alterações nas análises entre controle e IA saudável não foi localizada em relatos prévios específicos para músculo bovino sob impacto de IA ou ARTs, configurando um achado do presente estudo no tecido

analisado. Isso pode ser sustentado pelo conhecimento de que marcas de metilação em genes de *imprinting* (incluindo *MEST*) são estabelecidas durante o crescimento do oócito em bovinos, tornando a concepção especialmente sensível a perturbações ambientais e de manejo reprodutivo (O'Doherty *et al.*, 2012). Nesse sentido, a alteração em *MEST/MESTIT1* pode refletir susceptibilidade do *locus* a variações concepcionais, ainda que o mecanismo específico demande investigação adicional.

Para *LINC01267* não foram encontrados estudos em bovinos que relacionem esse *locus* a ART/LOS especificamente em tecido muscular, de modo que o ganho de metilação observado em IA saudável *versus* controle e também em PIV LOS constitui um achado original. Para *SMTN*, a perda de metilação foi observada de forma consistente em múltiplos contrastes, incluindo IA saudável *versus* controle, como exceção hipometilada em PIV saudável *versus* controle, e entre as maiores perdas em PIV LOS *versus* controle. Não foram localizados relatos em bovinos discutindo *SMTN* como ICRs afetadas por ART/LOS em músculo, de modo que esse resultado se caracteriza como um achado do presente estudo, o que o torna candidato relevante para investigação adicional.

Em *ACKR3*, a alteração detectada no músculo, no contraste controle *versus* IA saudável, não encontra, até o momento, suporte específico na literatura bovina que conecte esse *locus* a ART/LOS nesse tecido, caracterizando também um achado do presente estudo. As ICRs *CARD11*, *EBF3* e *CACNB2* foram identificados como hipermetilados no músculo em PIV saudável no conjunto de ICRs significativas, porém, não foram encontrados estudos em bovinos que avaliassem o impacto de ART/LOS especificamente nesses genes no músculo.

Por fim, os ganhos de metilação observados em *CYGB/PRCD* e *BNIP3P12* no músculo do grupo PIV LOS não apresentam, até o momento, evidência publicada em bovinos que os relacione diretamente à ART/LOS nesse tecido, o que confirma os achados do presente estudo. A presença de *loci* com ganho de metilação, mesmo em um cenário geral de predomínio de hipometilação em PIV LOS, sugere que a LOS não se caracteriza apenas por perda global de metilação, mas por um rearranjo *locus* específico do metiloma no músculo, com direções distintas conforme o domínio genômico e o contexto.

No tecido sanguíneo, observou-se o menor número de alterações entre os tecidos avaliados, com diferenças significativas, com 15 registros significativos entre os grupos controle e caso para ICRs conhecidas.

Em ARTs saudáveis, foram identificados ganhos de metilação em *LINC02244*, *PLAGL1/HYMAI*, *SNHG14/SNRPN/SNURF* e *TLL2*, e perdas em *NPAS3*, *SMTN* e *DIRAS3*. Em IA saudável, os ganhos em *HERC3/NAP1L5*, *LINC02244*, *PLAGL1/HYMAI* e *TLL2*, com perda em *NPAS3*. Em IA SLOS, observa-se ganhos de metilação em *PLAGL1/HYMAI* e *BNIP3P12* e perda em *RPS9P4*.

Esses dados são coerentes com evidências achadas pelo grupo de Li *et al.* (2022), como citado anteriormente. Os autores apontam que alterações de metilação em LOS apresentam especificidade no tecido de sangue. Esses dados também podem evidenciar conservação de assinaturas induzidas por ARTs nesses tecidos.

A recorrência de *PLAGL1/HYMAI* e do *locus SNHG14/SNRPN/SNURF* no sangue é particularmente relevante por se tratar de domínios de *imprinting* clássicos e frequentemente discutidos em distúrbios LOI. Em bovinos, a metilação em regiões diferencialmente metiladas de genes *imprinting* como *PLAGL1* e *SNRPN* é descrita como estabelecida precocemente durante a foliculogênese, e alterações anormais nesses sítios são reconhecidas como parte do perfil associado a LOS, reforçando o fato de que desvios detectados no sangue reflitam perturbações na manutenção de *imprinting* (Lafontaine; Sirard *et al.*, 2022). Além disso, a conservação do *status* monoalélico e dos padrões de metilação em domínios associados ao sobre crescimento entre bovinos e humanos sustenta a interpretação de que variações no *loci PLAGL1/HYMAI* têm potencial valor interpretativo em modelos bovinos de LOS (Robbins *et al.*, 2012).

Análises de metilação foram realizadas em fígado e coração em DMRs dos genes *H19* (*H19-DMR*), *KCNQ1OT1* (*KvDMR1*) e *PEG1/MEST* (*PEG1-DMR*) em indivíduos nascidos por SCNT e com LOS. No grupo de estudo, o *H19-DMR* apresentou, um perfil próximo ao dos controles no fígado e uma tendência a menor metilação no coração, sugerindo alterações discretas e tecido específicas nessa ICR. Já o *KvDMR1* mostrou um padrão claramente divergente entre tecidos, houve perda de metilação significativa no coração dos clones em relação aos controles, enquanto no fígado foi observado um perfil compatível com ganho de metilação em parte dos clones. Para *PEG1-DMR*, o principal achado foi ganho de metilação no fígado dos clones, com diferença significativa frente aos controles, enquanto no coração os valores foram mais variáveis e, na análise global, não diferiram significativamente dos controles, reforçando a ocorrência de LOI em padrão multilocus e dependente do tecido em bovinos clonados (Mangiavacchi *et al.*, 2022).

Para os demais *loci* no sangue, como *LINC02244*, *TLL2*, *NPAS3*, *SMTN*, *DIRAS3*, *BNIP3P12* e *RPS9P4*, não foram identificados, na literatura consultada, estudos em bovinos que os descrevem como alvos diretos de ARTs/LOS no tecido sanguíneo. Portanto, esses resultados ampliam o conjunto de candidatos e configuram os achados do presente estudo, os quais devem ser validados em estudos independentes.

Para as ICRs candidatas no sangue, o padrão significativo observado foi consistentemente de hipermetilação nos grupos, com repetição clara de *ICR1* e *ICR9* em mais de uma comparação, além de *ICR14*, *ICR6*, *ICR10* e *ICR13* dependendo do grupo.

6. CONCLUSÃO

A presente dissertação avançou na caracterização de ICRs em bovinos ao integrar evidências epigenéticas, reduzindo uma lacuna decorrente da escassez e da inconsistência de coordenadas descritas na literatura. Essa avaliação permitiu definir regiões no genoma bovino, entre elas ICRs já reportadas e novas ICRs candidatas. No conjunto de ICRs conhecidas, caracterizamos um perfil médio de metilação próximo ao esperado para regiões reguladas por *imprinting* em humanos, em múltiplos tecidos.

A avaliação das ICRs candidatas evidencia a heterogeneidade entre tecidos e gametas. Quanto ao impacto das ARTs nas ICRs, os resultados apontam para um efeito predominantemente específico para ICR e tecido, e não para uma desorganização global dos genes regulados por *imprinting*. No embrião, a comparação entre controle e PIV evidenciou diferenças significativas em diversas ICRs conhecidas, além de alterações em candidatas.

A hipótese de sensibilidade de regiões específicas às condições *in vitro* em blastocistos é um achado original e potencialmente relevante literatura em bovinos, que ainda é limitada para diversas ICRs. Em músculo, observou-se sensibilidade de domínios clássicos já discutidos na literatura, além de um contraste importante entre ARTs saudáveis e casos associados à LOS, com a direção de metilação variando conforme o contexto. No mesmo tecido, avaliamos ICRs ainda pouco exploradas na literatura bovina para ART/LOS, em amostras de inseminação artificial, o que os torna candidatos promissores para validação e investigação quanto à técnica. No sangue, verificamos mudanças pontuais em grupos associados a ARTs, em concordância com a ideia de especificidade tecidual dos eventos LOI.

Essa dissertação contribui para a literatura, uma vez que, este trabalho oferece (i) um conjunto de ICRs no genoma bovino, incluindo candidatas com critérios de seleção; (ii) uma referência quantitativa do comportamento de metilação em ICRs conhecidas em diferentes tecidos; e (iii) evidências de que ARTs podem induzir alterações pontuais em regiões específicas desde fase embrionárias e com assinaturas distintas em tecidos como músculo e sangue.

Embora os achados sejam consistentes com um modelo de alterações epigenéticas, recomenda-se cautela na interpretação de algumas comparações, especialmente no embrião, onde há limitações de nível amostral e ausência de dados para determinadas ICRs. Essa análise, em particular, necessita de avaliação posterior.

Como perspectiva, serão realizados novos testes com um nível amostral maior em bovinos clonados por SCNT, a fim de validar as ICRs candidatas identificadas por meio de análises de bancada e comparar o impacto das ARTs nas principais ICRs observadas nessa dissertação, com diferença estatística ou tendência à hipometilação ou à hipermetilação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILA, Luis *et al.* Dysregulated gene expression of imprinted and X-linked genes: A link to poor development of bovine haploid androgenetic embryos. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 640712, p. 640712, 2021.

AGUILA, Luis *et al.* Replacing sperm with genotyped haploid androgenetic blastomeres to generate cattle with predetermined paternal genomes. **Biology of Reproduction**, v. 111, n. 6, p. 1311–1325, 2024.

ALHASSAN, Daniel; OLBRICHT, Gayla R.; ADEKPEDJOU, Akim. Differential methylation region detection via an array-adaptive normalized kernel-weighted model. **PloS One**, v. 19, n. 6, p. e0306036, 2024.

AMBROSI, Christina; MANZO, Massimiliano; BAUBEC, Tuncay. Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. **Journal of molecular biology**, v. 429, n. 10, p. 1459–1475, 2017.

An introduction to seaborn — seaborn 0.13.2 documentation. Disponível em: <<https://seaborn.pydata.org/tutorial/introduction.html>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

ANVAR, Zahra *et al.* Maternal loss of mouse Nlrp2 alters the transcriptome and DNA methylome in GV oocytes and impairs zygotic genome activation in embryos. **Clinical Epigenetics**, v. 17, n. 1, p. 92, 2025.

ARNER, Peter *et al.* The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 93, 2015.

Babraham bioinformatics - FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

BAKER, Emilie C. *et al.* Inter-individual variation in DNA methylation patterns across two tissues and leukocytes in mature Brahman cattle. **Biology**, v. 12, n. 2, p. 252, 2023.

BALATON, Bradley P. *et al.* Cross-species examination of X-chromosome inactivation highlights domains of escape from silencing. **Epigenetics & chromatin**, v. 14, n. 1, p. 12, 2021.

BANTA, Joshua A.; RICHARDS, Christina L. Quantitative epigenetics and evolution. **Heredity**, v. 121, n. 3, p. 210–224, 2018.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 311, n. 6998, p. 171–174, 1995.

BARLOW, D. P. *et al.* The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 84–87, 1991.

BARLOW, Denise P.; BARTOLOMEI, Marisa S. Genomic imprinting in mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 2, p. a018382–a018382, 2014.

BARTOLOMEI, Marisa S.; OAKEY, Rebecca J.; WUTZ, Anton. Genomic imprinting: An epigenetic regulatory system. **PLoS genetics**, v. 16, n. 8, p. e1008970, 2020.

BARUSELLI, Pietro S. *et al.* Review: Development, adoption, and impact of assisted reproduction in domestic buffaloes. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, v. 17 Suppl 1, p. 100764, 2023.

BASU, Amitava; TIWARI, Vijay K. Epigenetic reprogramming of cell identity: lessons from development for regenerative medicine. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 144, 2021.

BATISTA, Rita A.; KÖHLER, Claudia. Genomic imprinting in plants-revisiting existing models. **Genes & Development**, v. 34, n. 1–2, p. 24–36, 2020.

BOCHTLER, Matthias; KOLANO, Agnieszka; XU, Guo-Liang. DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 2017.

BRACKETT, B. G. *et al.* Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147–158, 1982.

BRETON-LARRIVÉE, Mélanie; ELDER, Elizabeth; MCGRAW, Serge. DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 465–474, 2019.

BURTON, Adam; TORRES-PADILLA, Maria-Elena. Epigenome dynamics in early mammalian embryogenesis. **Nature Reviews. Genetics**, v. 26, n. 9, p. 587–603, 2025.

CAMPAGNA, Maria Pia *et al.* Epigenome-wide association studies: current knowledge, strategies and recommendations. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 214, 2021.

CANIÇAIS, Carla *et al.* DNA methylation mechanisms in the maturing and ageing oocyte. **Epigenetics & Chromatin**, v. 18, n. 1, p. 34, 2025.

CANONICAL LTD. **Sistema Operacional Linux Ubuntu**. Disponível em: <<https://ubuntu.com/>>. Acesso em: 6 nov. 2025.

CANOVAS, Sebastian *et al.* DNA methylation in embryo development: Epigenetic impact of ART (assisted reproductive technologies). **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 39, n. 11, 2017.

CANOVAS, Sebastian; ROSS, Pablo Juan. Epigenetics in preimplantation mammalian development. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 69–79, 2016.

CAO, Zubing *et al.* Dynamic reprogramming of 5-hydroxymethylcytosine during early porcine embryogenesis. **Theriogenology**, v. 81, n. 3, p. 496–508, 2014.

CASTILLO-FERNANDEZ, Juan E. *et al.* DNA methylation changes at infertility genes in newborn twins conceived by in vitro fertilisation. **Genome medicine**, v. 9, n. 1, p. 28, 2017.

CHAKRAVORTY, Nishant. Non-coding RNAs: the silent regulators of health and diseases. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 7, p. 6971–6973, 2022.

CHAO, Yunqi *et al.* Promising therapeutic aspects in human genetic imprinting disorders. **Clinical Epigenetics**, v. 14, n. 1, p. 146, 2022.

CHEN, Chuan *et al.* Epigenetic regulation of cell fate transition: learning from early embryo development and somatic cell reprogramming. **Biology of Reproduction**, v. 107, n. 1, p. 183–195, 2022.

CHEN, Siqian *et al.* Cross-species comparative DNA methylation reveals novel insights into complex trait genetics among cattle, sheep, and goats. **Molecular biology and evolution**, v. 41, n. 2, 2024.

CHEN, Zhiyuan *et al.* Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4618–4623, 2015.

CHEN, Zhiyuan *et al.* Global misregulation of genes largely uncoupled to DNA methylome epimutations characterizes a congenital overgrowth syndrome. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12667, 2017.

CHEN, Zhiyuan *et al.* Allelic H3K27me3 to allelic DNA methylation switch maintains noncanonical imprinting in extraembryonic cells. **Science Advances**, v. 5, n. 12, p. eaay7246, 2019.

COSTER, Albart *et al.* The imprinted gene DIO3 is a candidate gene for litter size in pigs. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e31825, 2012.

COULDREY, Christine; WELLS, David N. DNA methylation at a bovine alpha satellite I repeat CpG site during development following fertilization and somatic cell nuclear transfer. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55153, 2013.

Criswell DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. [S.l.: S.n.]

CURCHOE, Carol Lynn *et al.* Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 3–4, p. 213–225, 2009.

DASKEVICIUTE, Dagne *et al.* Non-canonical imprinting, manifesting as post-fertilization placenta-specific parent-of-origin dependent methylation, is not conserved in humans. **Human Molecular Genetics**, v. 34, n. 7, p. 626–638, 2025.

DE MENDOZA, Alex *et al.* Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. **Genome Biology**, v. 23, n. 1, p. 163, 2022.

DESHMUKH, Rahul S. *et al.* DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 6, n. 2, p. 177–187, 2011.

D'OCCHIO, Michael J. *et al.* Pleomorphic adenoma gene1 in reproduction and implication for embryonic survival in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 102, 2024.

DRIVER, Ashley M. *et al.* RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 118, 2012.

DU, Zhenhai; ZHANG, Ke; XIE, Wei. Epigenetic reprogramming in early animal development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 14, n. 6, p. a039677, 2022.

DUAN, J. **Analysis of mRNA abundance for histone variants, histone- and DNA-modifiers in bovine in vivo and in vitro oocytes and embryos. Scientific reports.** [S.l.: S.n.].

DURANTHON, V.; CHAVATTE-PALMER, P. Long term effects of ART: What do animals tell us? Molecular reproduction and development. p. 348–368, 2018.

EGGERMANN, Thomas *et al.* Imprinting disorders. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 33, 2023.

EHRICH, M. *et al.* A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 19, p. 12331–12331, 2014.

EHRICH, Mathias *et al.* A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 5, p. e29, 2007.

EL HAJJ, Nady; HAAF, Thomas. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 3, p. 632–641, 2013.

FANG, Lingzhao *et al.* Integrating signals from sperm methylome analysis and genome-wide association study for a better understanding of male fertility in cattle. **Epigenomes**, v. 3, n. 2, p. 10, 2019.

FARSETTI, Antonella; ILLI, Barbara; GAETANO, Carlo. How epigenetics impacts on human diseases. **European Journal of Internal Medicine**, v. 114, p. 15–22, 2023.

FERRONATO, Giuliana de Avila *et al.* Bovine in vitro oocyte maturation and embryo culture in liquid marbles 3D culture system. **PloS one**, v. 18, n. 4, p. e0284809, 2023.

FOISSAC, Sylvain *et al.* Multi-species annotation of transcriptome and chromatin structure in domesticated animals. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 108, 2019.

FONSECA BALVÍS, Noelia *et al.* Cultured bovine embryo biopsy conserves methylation marks from original embryo. **Biology of reproduction**, v. 97, n. 2, p. 189–196, 2017.

FONTANA, L. *et al.* Characterization of multi-locus imprinting disturbances and underlying genetic defects in patients with chromosome 11p15.5 related imprinting disorders. **Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society**, v. 13, n. 9, p. 897–909, 2018.

FRATTINI, Stefano *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in hypothalamus and ovary of *Capra hircus*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 476, 2017.

FU, Maggie Po-Yuan *et al.* Examining cellular heterogeneity in human DNA methylation studies: Overview and recommendations. **STAR Protocols**, v. 6, n. 1, p. 103638, 2025.

FUKUDA, Y. *et al.* Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of reproduction**, v. 42, n. 1, p. 114–119, 1990.

GAO, Rui *et al.* Defining a TFAP2C-centered transcription factor network during murine peri-implantation. **Developmental Cell**, v. 59, n. 9, p. 1146–1158.e6, 2024.

GEHRS, Stephanie *et al.* DNMT3A-dependent DNA methylation shapes the endothelial enhancer landscape. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. 10, 2025.

Geneimprint : Genes. Disponível em:

<<https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Bos+taurus>>. Acesso em: 9 dez. 2025a.

Geneimprint : Genes. Disponível em:

<<https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Bos+taurus.imprinted-All>>. Acesso em: 16 jan. 2026b.

GENEREUX, Diane P. *et al.* Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 22, p. e150, 2008.

GHAFOURI-FARD, Soudeh; ESMAEILI, Mohammadhosein; TAHERI, Mohammad. H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]**, v. 123, n. 109774, p. 109774, 2020.

GHOSH, J. Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. **Clin Epigenetics**, n. 9, 2017.

GIABICANI, Eloïse; PERRIERE, Amélie; NETCHINE, Irène. Silver-Russell syndrome in 2025: Is it still a distinct diagnostic entity? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 110, n. 11, p. e3905–e3906, 2025.

GONG, Fade; MILLER, Kyle M. Histone methylation and the DNA damage response. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, v. 780, p. 37–47, 2019.

GOPINATHAN, Gokul; DIEKWISCH, Thomas G. H. Epigenetics and early development. **Journal of Developmental Biology**, v. 10, n. 2, p. 26, 2022.

GOSZCZYNSKI, Daniel E. *et al.* Transcription initiation mapping in 31 bovine tissues reveals complex promoter activity, pervasive transcription, and tissue-specific promoter usage. **Genome research**, v. 31, n. 4, p. 732–744, 2021.

GRUNAU, C.; CLARK, S. J.; ROSENTHAL, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 13, p. E65-5, 2001.

GU, Shukai *et al.* ZNF597 is a maternally expressed imprinted gene in the Holstein breed. **Theriogenology**, v. 143, p. 133–138, 2020.

GUAN, Dailu *et al.* **An integrated multi-tissue atlas of epigenomic landscapes and regulatory elements in the bovine genome.** 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2025.08.21.671512>>.

GUO, Fan *et al.* Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 4, p. 447–459, 2014.

HALLBERG, Ida *et al.* Bovine oocyte exposure to perfluorohexane sulfonate (PFHxS) induces phenotypic, transcriptomic, and DNA methylation changes in resulting embryos in vitro. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 109, p. 19–30, 2022.

HALSTEAD, Michelle M. *et al.* A comparative analysis of chromatin accessibility in cattle, pig, and mouse tissues. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 698, 2020a.

HALSTEAD, Michelle M. *et al.* Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4654, 2020b.

HALUŠKOVÁ, Jana; HOLEČKOVÁ, Beáta; STANIČOVÁ, Jana. DNA methylation studies in cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 62, n. 1, p. 121–136, 2021.

HANNA, Courtney W. *et al.* Endogenous retroviral insertions drive non-canonical imprinting in extra-embryonic tissues. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 225, 2019.

HANNA, Courtney W.; KELSEY, Gavin. Genomic imprinting beyond DNA methylation: a role for maternal histones. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 177, 2017.

HANNA, Courtney W.; KELSEY, Gavin. Features and mechanisms of canonical and noncanonical genomic imprinting. **Genes & Development**, v. 35, n. 11–12, p. 821–834, 2021.

HANSMANN, T. *et al.* Characterization of differentially methylated regions in 3 bovine imprinted genes: a model for studying human germ-cell and embryo development. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 4, p. 239–247, 2011.

HARA, Satoshi *et al.* Identification of responsible sequences which mutations cause maternal H19-ICR hypermethylation with Beckwith-Wiedemann syndrome-like overgrowth. **Communications biology**, v. 7, n. 1, p. 1605, 2024.

HARRIS, Charles R. *et al.* Array programming with NumPy. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 357–362, 2020.

HASIN, Yehudit; SELDIN, Marcus; LUSIS, Aldons. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 83, 2017.

HATTORI, Hiromitsu *et al.* Association of four imprinting disorders and ART. **Clinical epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 21, 2019.

HATTORI, Naoko; LIU, Yu-Yu; USHIJIMA, Toshikazu. DNA methylation analysis. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2691, p. 165–183, 2023.

HEARD, Edith; MARTIENSSEN, Robert A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 95–109, 2014.

HEINZMANN, Julia *et al.* Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 10, p. 770–782, 2015.

HERATH, Ruwani; TRINDADE, Alex; ZHANG, Fangyuan. **Monte Carlo Expectation-Maximization algorithm to detect imprinting and maternal effects for discordant sib-pair data**. 2024. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/2401.00520>>.

HOLTZ, Yan. **Ggplot2**. Disponível em: <<https://r-graph-gallery.com/ggplot2-package.html>>. Acesso em: 16 jan. 2026a.

HOLTZ, Yan. **The R graph gallery**. Disponível em: <<http://www.r-graph-gallery.com/>>. Acesso em: 16 jan. 2026b.

Home - SRA - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

HORI, Noboru *et al.* Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3–4, p. 303–312, 2010.

HOSSAIN, Md Nazmul *et al.* Cold exposure impacts DNA methylation patterns in cattle sperm. **Frontiers in Genetics**, v. 15, p. 1346150, 2024.

HU, Yisi *et al.* Comparative analysis reveals epigenomic evolution related to species traits and genomic imprinting in mammals. **Innovation (Cambridge (Mass.))**, v. 4, n. 3, p. 100434, 2023.

HU, Zhenbin *et al.* Exploring tissue- and sex-specific DNA methylation in cattle using a pan-mammalian Infinium array. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 9, p. 4284, 2025.

HUANG, Jennifer M.; KIM, Joomyeong. DNA methylation analysis of the mammalian PEG3 imprinted domain. **Gene**, v. 442, n. 1–2, p. 18–25, 2009.

HUBERT, Jean-Noël; DEMARS, Julie. Genomic imprinting in the new omics era: A model for systems-level approaches. **Frontiers in genetics**, v. 13, p. 838534, 2022.

HUO, Haonan *et al.* A novel imprinted locus on bovine chromosome 18 homologous with human chromosome 16q24.1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 299, n. 1, p. 40, 2024.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KHATIB, H. **Epigenetics of livestock health, production, and breeding. Em: Handbook of Epigenetics.** [S.l.]: Elsevier, 2023.

INOUE, Azusa *et al.* Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. **Genes & Development**, v. 31, n. 19, p. 1927–1932, 2017a.

INOUE, Azusa *et al.* Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. **Nature**, v. 547, n. 7664, p. 419–424, 2017b.

INOUE, Azusa. Noncanonical imprinting: intergenerational epigenetic inheritance mediated by Polycomb complexes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 78, n. 102015, p. 102015, 2023.

Introduction to dplyr. Disponível em: <<https://dplyr.tidyverse.org/articles/dplyr.html>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

IVANOVA, Elena *et al.* DNA methylation changes during preimplantation development reveal inter-species differences and reprogramming events at imprinted genes. **Clinical Epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 64, 2020.

JAFFE, Andrew E.; IRIZARRY, Rafael A. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. **Genome Biology**, v. 15, n. 2, p. R31, 2014.

JIANG, Weijun *et al.* ZFP57 dictates allelic expression switch of target imprinted genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 5, p. e2005377118, 2021.

JIANG, Zongliang *et al.* mRNA levels of imprinted genes in bovine in vivo oocytes, embryos and cross species comparisons with humans, mice and pigs. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 17898, 2015.

JIANG, Zongliang *et al.* DNA methylomes of bovine gametes and in vivo produced preimplantation embryos. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 5, p. 949–959, 2018.

JIMA, Dereje D. *et al.* Genomic map of candidate human imprint control regions: the imprintome. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 17, n. 13, p. 1920–1943, 2022.

JOHNSON, D. R. Hairpin-tail: a case of post-reductional gene action in the mouse egg. **Genetics**, v. 76, n. 4, p. 795–805, 1974.

JOHNSON, John P. *et al.* Detection of a case of Angelman syndrome caused by an imprinting error in 949 pregnancies analyzed for AS following IVF. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, n. 6, p. 981–984, 2018.

Kamensky, I.U. Shamakina Prenatal alcohol exposure and DNA methylation. [S.l.: S.n.].

KANEDA, Masahiro *et al.* Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis. **Nihon chikusan Gakkaiho [Animal Science Journal]**, v. 88, n. 11, p. 1678–1685, 2017.

KANEKO-ISHINO, Tomoko; ISHINO, Fumitoshi. Evolution of viviparity in mammals: what genomic imprinting tells us about mammalian placental evolution. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 31, n. 7, p. 1219–1227, 2019.

KHALID, Zahra *et al.* Silver-Russell syndrome: Orthodontic perspective. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP**, v. 30, n. 12, p. 1352–1354, 2020.

KLIBANER-SCHIFF, Eleanor *et al.* Environmental exposures influence multigenerational epigenetic transmission. **Clinical Epigenetics**, v. 16, n. 1, p. 145, 2024.

KOBAYASHI, Eri H. *et al.* Genomic imprinting in human placentation. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 21, n. 1, p. e12490, 2022.

KOBAYASHI, Hisato. Canonical and non-canonical genomic imprinting in rodents. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 713878, 2021.

KURUP, Uttara *et al.* Approach to the patient with suspected silver-Russell syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 109, n. 10, p. e1889–e1901, 2024.

LAFONTAINE, Simon *et al.* Specific imprinted genes demethylation in association with oocyte donor's age and culture conditions in bovine embryos assessed at day 7 and 12 post insemination. **Theriogenology**, v. 158, p. 321–330, 2020.

LAFONTAINE, Simon; SIRARD, Marc-André. IGF2R, KCNQ1, PLAGL1, and SNRPN DNA methylation is completed in bovine by the early antral follicle stage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 89, n. 7, p. 290–297, 2022.

LANDRY, David A. *et al.* Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**, v. 156, n. 3, p. 239–248, 2018.

LANG, Thomas A.; ALTMAN, Douglas G. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: the “Statistical Analyses and Methods in the Published Literature” or the SAMPL Guidelines. **International journal of nursing studies**, v. 52, n. 1, p. 5–9, 2015.

LI, Shibo; WU, Xiaohua. Common fragile sites: protection and repair. **Cell & Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 29, 2020.

LI, Shizhao; TOLLEFSBOL, Trygve O. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 187, p. 28–43, 2021.

LI, Y.; DONNELLY, C. G.; RIVERA, R. M. Overgrowth syndrome. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, v. v. 35, p. 265–276, 2019a.

LI, Yahan *et al.* Conditions of embryo culture from days 5 to 7 of development alter the DNA methylome of the bovine fetus at day 86 of gestation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 37, n. 2, p. 417–426, 2020.

LI, Yahan *et al.* Spontaneous and ART-induced large offspring syndrome: similarities and differences in DNA methylome. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 17, n. 11, p. 1477–1496, 2022a.

LI, Yahan *et al.* **Spontaneous and ART-induced large offspring syndrome: similarities and differences in DNA methylome.** 2022b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2022.02.07.479430>>.

LI, Yahan *et al.* Allele-specific aberration of imprinted domain chromosome architecture associates with large offspring syndrome. **iScience**, v. 25, n. 5, p. 104269, 2022c.

LI, Yahan; DONNELLY, Callum G.; RIVERA, Rocío Melissa. Overgrowth syndrome. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 35, n. 2, p. 265–276, 2019b.

LI, Yuanyuan *et al.* Genome-wide analyses reveal a role of Polycomb in promoting hypomethylation of DNA methylation valleys. **Genome biology**, v. 19, n. 1, p. 18, 2018.

LIO, Chan-Wang J. *et al.* TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, 2020.

LITTLEJOHN, Brittini P. *et al.* Prenatal transportation stress alters genome-wide DNA methylation in suckling Brahman bull calves. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 12, p. 5075–5099, 2018.

LIU, Shuli *et al.* A multi-tissue atlas of regulatory variants in cattle. **Nature genetics**, v. 54, n. 9, p. 1438–1447, 2022a.

LIU, X. Shawn *et al.* Editing DNA methylation in the mammalian genome. **Cell**, v. 167, n. 1, p. 233–247.e17, 2016.

LIU, Xiaoqian *et al.* Genomic imprinting of the IGF2R/AIR locus is conserved between bovines and mice. **Theriogenology**, v. 180, p. 121–129, 2022b.

LLÈRES, David; IMAIZUMI, Yui; FEIL, Robert. Exploring chromatin structural roles of non-coding RNAs at imprinted domains. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 4, p. 1867–1879, 2021.

LOYFER, Netanel; ROSENSKI, Jonathan; KAPLAN, Tommy. **wgbstools: A computational suite for DNA methylation sequencing data representation, visualization, and analysis**. 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2024.05.08.593132>>.

LU, Cui-Ling *et al.* Gonadotropin-mediated dynamic alterations during bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 2, p. 44, 2014.

LU, Xukun *et al.* Evolutionary epigenomic analyses in mammalian early embryos reveal species-specific innovations and conserved principles of imprinting. **Science advances**, v. 7, n. 48, p. eabi6178, 2021.

LUO, Chongyuan; HAJKOVA, Petra; ECKER, Joseph R. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 361, n. 6409, p. 1336–1340, 2018.

MA, Y. Changes in DNA methylation and imprinting disorders in E9.5 mouse fetuses and placentas derived from vitrified eight-cell embryos: MA *et al.* **Molecular reproduction and development**, p. 404–415, 2019.

MACKAY, Deborah J. G. *et al.* Multi-locus imprinting disturbance (MLID): interim joint statement for clinical and molecular diagnosis. **Clinical Epigenetics**, v. 16, n. 1, p. 99, 2024.

MALPOTRA, Shivani; HUSSAIN, Ahmad. Global DNA methylation: role, status and genome-wide approaches to study epigenetic mark in cloned embryos. **The Applied Biology & Chemistry Journal**, p. 41–59, 2020.

MANGIAVACCHI, Paula Magnelli *et al.* Multi-locus imprinting disturbances of Beckwith-Wiedemann and Large offspring syndrome/Abnormal offspring syndrome: A brief review. **Theriogenology**, v. 173, p. 193–201, 2021.

MANGIAVACCHI, Paula Magnelli *et al.* Multi-locus DNA methylation analysis of imprinted genes in cattle from somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 186, p. 95–107, 2022.

MANI, Sneha *et al.* Epigenetic changes in preterm birth placenta suggest a role for ADAMTS genes in spontaneous preterm birth. **Human molecular genetics**, v. 28, n. 1, p. 84–95, 2019.

MARSHALL, Kira L.; RIVERA, Rocio Melissa. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. **Molecular reproduction and development**, v. 85, n. 2, p. 90–105, 2018.

MARTIN, Marcel. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.

MASUNAGA, Yohei *et al.* IGF2 mutations. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 105, n. 1, p. 116–125, 2020.

MATHEWS, Herbert L.; JANUSEK, Linda Witek. Epigenetics and psychoneuroimmunology: mechanisms and models. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 1, p. 25–39, 2011.

Matplotlib documentation — Matplotlib 3.10.8 documentation. Disponível em: <<https://matplotlib.org/stable/index.html>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

MIKKOLA, Marja *et al.* Recent advancements to increase success in assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, p. e20240031, 2024.

MIRANDA FURTADO, Cristiana Libardi *et al.* Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019.

MOHAN, C.; DAS, C.; TYLER, J. **Histone and Chromatin Dynamics Facilitating DNA repair**. **DNA repair**, v. 107, n. 103183. [S.l.: S.n.].

MOINDROT, Benoit; IMAIZUMI, Yui; FEIL, Robert. Differential 3D genome architecture and imprinted gene expression: cause or consequence? **Biochemical Society Transactions**, v. 52, n. 3, p. 973–986, 2024.

MONK, David *et al.* Recommendations for a nomenclature system for reporting methylation aberrations in imprinted domains. **Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society**, v. 13, n. 2, p. 117–121, 2018.

MONTEAGUDO-SÁNCHEZ, Ana *et al.* Differences in expression rather than methylation at placenta-specific imprinted *loci* is associated with intrauterine growth restriction. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 35, 2019.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10314–10331, 2017.

NAKATO, Ryuichiro; SAKATA, Toyonori. Methods for ChIP-seq analysis: A practical workflow and advanced applications. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 187, p. 44–53, 2021.

NECHIN, Julianna *et al.* Hemimethylation of CpG dyads is characteristic of secondary DMRs associated with imprinted *loci* and correlates with 5-hydroxymethylcytosine at paternally methylated sequences. **Epigenetics & Chromatin**, v. 12, n. 1, p. 64, 2019.

NumPy. Disponível em: <<https://numpy.org/>>. Acesso em: 9 dez. 2025a.

NumPy. Disponível em: <<https://numpy.org/pt/>>. Acesso em: 16 jan. 2026b.

O'DOHERTY, Alan M. *et al.* DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-implantation embryo development. **BMC developmental biology**, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.

O'DOHERTY, Alan M. *et al.* Intragenic sequences in the trophectoderm harbour the greatest proportion of methylation errors in day 17 bovine conceptuses generated using assisted reproductive technologies. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 438, 2018.

O'DOHERTY, Alan M.; O'SHEA, Lynne C.; FAIR, Trudee. Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 67, 2012.

OLDROYD, Benjamin P.; YAGOUND, Boris. Parent-of-origin effects, allele-specific expression, genomic imprinting and paternal manipulation in social insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 376, n. 1826, p. 20200425, 2021.

ONODERA, Atsushi *et al.* Roles of TET and TDG in DNA demethylation in proliferating and non-proliferating immune cells. **Genome Biology**, v. 22, n. 1, p. 186, 2021.

ORDOÑEZ, Raquel *et al.* Genomic context sensitizes regulatory elements to genetic disruption. **Molecular Cell**, v. 84, n. 10, p. 1842- 1854.e7, 2024.

OSWALD, J. *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology**, v. 10, n. 8, p. 475–478, 2000.

ÕUNAP, Katrin. Silver-Russell syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome: Opposite phenotypes with heterogeneous molecular etiology. **Molecular Syndromology**, v. 7, n. 3, p. 110–121, 2016.

pandas. Disponível em: <<https://pandas.pydata.org/>>. Acesso em: 9 dez. 2025.

PANZERI, Ilaria; POSPISILIK, John Andrew. Epigenetic control of variation and stochasticity in metabolic disease. **Molecular metabolism**, v. 14, p. 26–38, 2018.

PARRA, Alejandro *et al.* Identification of copy-number variants in patients with overgrowth disorders. **Clinical Genetics**, v. 106, n. 5, p. 614–624, 2024.

PILEGGI, Silvana *et al.* Cohesin mutations induce chromatin conformation perturbation of the H19/IGF2 imprinted region and gene expression dysregulation in Cornelia de Lange Syndrome cell lines. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1622, 2021.

POIRIER, Mikhael *et al.* Metabolism-associated genome-wide epigenetic changes in bovine oocytes during early lactation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2345, 2020.

PYTHON SOFTWARE FOUNDATION. **Python Language Reference**. Disponível em: <<http://www.python.org/>>. Acesso em: 2 dez. 2025.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 2 dez. 2025.

RABAGLINO, María B. *et al.* In vitro- and in vivo-produced male dairy calves show molecular differences in the hepatic and muscular energy regulation. **Biology of Reproduction**, v. 107, n. 4, p. 1113–1124, 2022.

Read Excel Files [R package readxl version 1.4.5]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/index.html>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

REGMI, Shaili *et al.* Methylation is maintained specifically at imprinting control regions but not other DMRs associated with imprinted genes in mice bearing a mutation in the Dnmt1 intrinsically disordered domain. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1192789, 2023.

RIBEIRO, André Mauric F. *et al.* DNA methylation profile in beef cattle is influenced by additive genetics and age. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 12016, 2022.

RIVERA, Rocío Melissa. Consequences of assisted reproductive techniques on the embryonic epigenome in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 32, n. 2, p. 65–81, 2019.

RIZZARDI, L. F. *et al.* Human brain region-specific variably methylated regions are enriched for heritability of distinct neuropsychiatric traits. **Genome Biol**, v. 2021, n. 1, [S.d.].

ROBBINS, Katherine Marie *et al.* Expression of KCNQ1OT1, CDKN1C, H19, and PLAGL1 and the methylation patterns at the KvDMR1 and H19/IGF2 imprinting control regions is conserved between human and bovine. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, p. 95, 2012.

ROIDOR, Clara; CHEBLI, Karim; BORENSZTEIN, Maud. Epigenetic reprogramming, germline and genomic imprinting. **Medecine sciences**, v. 40, n. 12, p. 892–903, 2024.

ROSENSKI, Jonathan *et al.* Atlas of imprinted and allele-specific DNA methylation in the human body. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 2141, 2025.

RUTKOWSKA, Karolina; XU, Hongen; FLISIKOWSKI, Krzysztof. Differentially methylated region in bovine MIMT1 detected by small-scale whole-genome methylation sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 60, n. 3–4, p. 401–404, 2019.

SAAL, Howard M.; HARBISON, Madeleine D.; NETCHINE, Irene. Silver-Russell Syndrome. *In*: **GeneReviews**(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.

SAHOO, Karishma; SUNDARARAJAN, Vino. Methods in DNA methylation array dataset analysis: A review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 23, p. 2304–2325, 2024.

SALILEW-WONDIM, Dessie *et al.* Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0140467, 2015.

SALILEW-WONDIM, Dessie *et al.* Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 424, 2018.

SANLI, Ildem; FEIL, Robert. Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 67, p. 139–147, 2015.

SANMIGUEL, Jennifer M.; ABRAMOWITZ, Lara K.; BARTOLOMEI, Marisa S. Imprinted gene dysregulation in a Tet1 null mouse model is stochastic and variable in the germline and offspring. **Development (Cambridge, England)**, v. 145, n. 7, 2018.

SANMIGUEL, Jennifer M.; BARTOLOMEI, Marisa S. DNA methylation dynamics of genomic imprinting in mouse development. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 252–262, 2018.

SATHEESHA, G. M. *et al.* A review on epigenetics: Importance in livestock breeding and production. 2020.

SCHMITZ, Robert J.; LEWIS, Zachary A.; GOLL, Mary G. DNA methylation: Shared and divergent features across eukaryotes. **Trends in genetics: TIG**, v. 35, n. 11, p. 818–827, 2019.

SCHULTZ, Matthew D.; SCHMITZ, Robert J.; ECKER, Joseph R. “Leveling” the playing field for analyses of single-base resolution DNA methylomes. **Trends in genetics: TIG**, v. 28, n. 12, p. 583–585, 2012.

SEIDEL, George E., Jr. Translating basic research to animal agriculture. **Annual review of animal biosciences**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2022.

SERGEEVA, A. *et al.* Mechanisms of human DNA methylation, alteration of methylation patterns in physiological processes and oncology. **Gene**, v. 875, n. 147487, p. 147487, 2023.

SHUMAN, Cheryl; KALISH, Jennifer M.; WEKSBERG, Rosanna. Beckwith-Wiedemann syndrome. *In*: **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.

SINDHU, Pushpa *et al.* Unravelling the impact of epigenetic mechanisms on offspring growth, production, reproduction and disease susceptibility. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 32, n. 3, p. 190–206, 2024.

SIQUEIRA, L. G. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by embryo production in vitro using reverse X-sorted semen. **J Dairy Sci**, v. 100, p. 5899–5908, 2017.

SMITH, Zachary D. *et al.* DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 611–615, 2014.

SONG, M. P2016 Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes relevant with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. suppl_4, p. 45–45, 2016.

SRIRAMAN, Anusha *et al.* Making it or breaking it: DNA methylation and genome integrity. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 5, p. 687–703, 2020.

STAPLES, Timothy L. Expansion and evolution of the R programming language. **Royal Society Open Science**, v. 10, n. 4, p. 221550, 2023.

STATELLO, Luisa *et al.* Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 96–118, 2021.

STEWART, Kathleen R.; VESELOVSKA, Lenka; KELSEY, Gavin. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. **Epigenomics**, v. 8, n. 10, p. 1399–1413, 2016.

SU, Jianmin *et al.* Aberrant mRNA expression and DNA methylation levels of imprinted genes in cloned transgenic calves that died of large offspring syndrome. **Livestock Science**, v. 141, n. 1, p. 24–35, 2011.

SULLIVAN-PYKE, Chantae S. *et al.* In Vitro fertilization and adverse obstetric and perinatal outcomes. **Seminars in perinatology**, v. 41, n. 6, p. 345–353, 2017.

SUZUKI, Joao, Jr *et al.* In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. **BMC Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 9, 2009.

THAMBAN, Thushara; AGARWAAL, Viplove; KHOSLA, Sanjeev. Role of genomic imprinting in mammalian development. **Journal of biosciences**, v. 45, n. 1, 2020.

The national mouse archive. Disponível em:

<<http://www.mousebook.org/mousebook-catalogs/imprinting-resource>>. Acesso em: 13 jan. 2026.

THOMPSON, Laura *et al.* Sex-related changes in liver and muscle transcriptome of calves derived from artificial insemination or the transfer of an in vitro-produced embryo. **Biology of Reproduction**, v. 113, n. 6, p. 1390–1403, 2025.

Tidyr. Disponível em: <<https://tidyr.tidyverse.org/>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

TRÍBULO, Paula *et al.* Production and culture of the bovine embryo. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2006, p. 115–129, 2019.

TUCCI, Valter *et al.* Genomic imprinting and physiological processes in mammals. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 952–965, 2019.

UCSC Genome Browser Home. Disponível em: <<https://genome.ucsc.edu/>>. Acesso em: 16 jan. 2026.

UDDIN, Md Gias; FANDY, Tamer E. DNA methylation inhibitors: Retrospective and perspective view. **Advances in Cancer Research**, v. 152, p. 205–223, 2021.

URREGO, R. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in *Bos indicus* blastocysts produced in vivo and in vitro. **Zygote**, v. 25, p. 131–140, 2017.

UYSAL, Fatma; OZTURK, Saffet; AKKOYUNLU, Gokhan. Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, n. 3, p. 503–513, 2018.

VELAND, Nicolas *et al.* DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 1, p. 152–167, 2019.

VERRUMA, C. Folic acid supplementation during oocytes maturation influences in vitro production and gene expression of bovine embryos. **Zygote**, n. 5, p. 342–349, 2021.

VERRUMA, Carolina G. *et al.* Dynamic methylation pattern of H19DMR and KvDMR1 in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 41, n. 2, p. 333–345, 2024.

VIRTANEN, Pauli. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. **Nature Methods**, p. 261–272, 2020.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.

WANG, Mengqi *et al.* Whole genome DNA methylation variations in mammary gland tissues from Holstein cattle producing milk with various fat and protein contents. **Genes**, v. 12, n. 11, p. 1727, 2021.

WANG, Sung Eun; JIANG, Yong-Hui. Novel epigenetic molecular therapies for imprinting disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 8, p. 3182–3193, 2023.

WANG, Yang *et al.* Epigenetic regulation and risk factors during the development of human gametes and early embryos. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 21–40, 2019.

WEI, Alex; WU, Hao. Mammalian DNA methylome dynamics: mechanisms, functions and new frontiers. **Development (Cambridge, England)**, v. 149, n. 24, 2022.

Welcome to. Disponível em: <<https://www.python.org/>>. Acesso em: 9 dez. 2025.

WICKHAM, Hadley. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**. New York: Springer-Verlag, 2016.

WILKINSON, Amy L.; ZORZAN, Irene; RUGG-GUNN, Peter J. Epigenetic regulation of early human embryo development. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 12, p. 1569–1584, 2023.

WILLETT, E. L. *et al.* Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science (New York, N.Y.)**, v. 113, n. 2931, p. 247–247, 1951.

WOJDACZ, Tomasz K.; HANSEN, Lise Lotte; DOBROVIC, Alexander. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 1, p. 54, 2008.

WOLFIEN, Markus *et al.* Workflow development for the functional characterization of ncRNAs. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1912, p. 111–132, 2019.

WOODFINE, Kathryn; HUDDLESTON, Joanna E.; MURRELL, Adele. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of

epigenetic stability in adult somatic tissue. **Epigenetics & chromatin**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011.

WU, Hao; ZHANG, Yi. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 45–68, 2014.

WU, Xiaoji; ZHANG, Yi. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature reviews. Genetics**, v. 18, n. 9, p. 517–534, 2017.

WYSS, Phillip; SONG, Carol; BINA, Minou. Along the *Bos taurus* genome, uncover candidate imprinting control regions. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 478, 2022.

XIA, Weikun; XIE, Wei. Rebooting the Epigenomes during Mammalian Early Embryogenesis. **Stem Cell Reports**, v. 15, n. 6, p. 1158–1175, 2020.

XIE, Guojing *et al.* The role of imprinting genes' loss of imprints in cancers and their clinical implications. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1365474, 2024.

XU, Zhen *et al.* Zfp57 exerts maternal and sexually dimorphic effects on genomic imprinting. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 784128, 2022.

YAO, Yilong *et al.* BMP15 modulates the H19/miR-26b/SMAD1 axis influences yak granulosa cell proliferation, autophagy, and apoptosis. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 30, n. 4, p. 1266–1280, 2023.

ZAHOUANI, Tarik; MENDEZ, Magda D. Omphalocele. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

ZAITOUN, Ismail; KHATIB, Hasan. Assessment of genomic imprinting of SLC38A4, NNAT, NAP1L5, and H19 in cattle. **BMC Genetics**, v. 7, n. 1, p. 49, 2006.

ZENG, Yang; CHEN, Taiping. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. **Genes**, v. 10, n. 4, p. 257, 2019.

ZHANG, Chunlong *et al.* DNA hypomethylation mediates immune response in pan-cancer. **Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society**, v. 18, n. 1, p. 2192894, 2023a.

ZHANG, Jing *et al.* Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 5, p. 3963–3971, 2019.

ZHANG, Jingyao *et al.* Dissecting the molecular features of bovine-arrested eight-cell embryos using single-cell multi-omics sequencing. **Biology of Reproduction**, v. 108, n. 6, p. 871–886, 2023b.

ZHANG, Junxing *et al.* Effects of DNA methylation on gene expression and phenotypic traits in cattle: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 15, p. 11882, 2023c.

ZHANG, Lian; LU, Qianjin; CHANG, Christopher. Epigenetics in health and disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1253, p. 3–55, 2020.

ZHANG, Meng *et al.* Genome-wide DNA methylation profiles reveal novel candidate genes associated with meat quality at different age stages in hens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

Zhang Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. [S.l.: S.n.]

ZHANG, Sheng *et al.* Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Scientific reports**, v. 6, p. 30345, 2016.

ZHAO, Chunping *et al.* The profiling of DNA methylation and its regulation on divergent tenderness in Angus beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 939, 2020.

ZHENG, Kunhua *et al.* The imprinted Igf2-Igf2r axis is critical for exosome biogenesis during the early development of bovine placenta. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 71, n. 1, p. 41–48, 2025.

ZHOU, Chuan *et al.* Histone remodeling reflects conserved mechanisms of bovine and human preimplantation development. **EMBO Reports**, v. 24, n. 3, p. e55726, 2023.

ZHOU, Yang *et al.* Comparative whole genome DNA methylation profiling of cattle sperm and somatic tissues reveals striking hypomethylated patterns in sperm. **GigaScience**, v. 7, n. 5, 2018.

ZHU, Ping *et al.* Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. **Nature Genetics**, v. 50, n. 1, p. 12–19, 2018.

ZIMIN, Aleksey V. *et al.* A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology**, v. 10, n. 4, p. R42, 2009.

Disponível em: <<https://www.canva.com/>>. Acesso em: 5 jan. 2026.

8. APÊNDICES

Apêndice A - Amostras grupo controle (N= 158).

N°	Tecido	Bioproject	N° da amostra	Sexo	Idade	Saúde
1	Embrião	PRJNA541282	SRR9034691	NA	Blastocisto	Saudável
2	Embrião	PRJNA541282	SRR9034690	NA	Blastocisto	Saudável
3	Embrião	PRJNA541282	SRR9034693	NA	Blastocisto	Saudável
4	Sangue	PRJEB67806	ERR12148526	NA	NA	Saudável
5	Sangue	PRJEB67806	ERR12148527	NA	NA	Saudável
6	Sangue	PRJEB67806	ERR12148528	NA	NA	Saudável
7	Sangue	PRJEB67806	ERR12148529	NA	NA	Saudável
8	Sangue	PRJEB67806	ERR12148530	NA	NA	Saudável
9	Sangue	PRJEB67806	ERR12148531	NA	NA	Saudável
10	Sangue	PRJEB67806	ERR12148532	NA	NA	Saudável
11	Sangue	PRJEB67806	ERR12148533	NA	NA	Saudável
12	Sangue	PRJNA1224318	SRR32365386	NA	NA	Saudável
13	Sangue	PRJNA1224318	SRR32365388	NA	NA	Saudável
14	Sangue	PRJNA417285	SRR6261565	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
15	Sangue	PRJNA417285	SRR6261567	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
16	Sangue	PRJNA417285	SRR6261568	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
17	Sangue	PRJNA417285	SRR6261569	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
18	Sangue	PRJNA417285	SRR6261570	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
19	Sangue	PRJNA417285	SRR6261571	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
20	Sangue	PRJNA417285	SRR6261572	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
21	Sangue	PRJNA417285	SRR6261573	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
22	Sangue	PRJNA417285	SRR6261575	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
23	Sangue	PRJNA417285	SRR6261576	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
24	Cérebro	PRJNA748751	SRR15209958	NA	NA	Saudável
25	Cérebro	PRJNA748751	SRR15209959	NA	NA	Saudável
26	Cérebro	PRJNA748751	SRR15209960	NA	NA	Saudável
27	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261541	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
28	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261542	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
29	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261543	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
30	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261545	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
31	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261547	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
32	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261548	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
33	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261549	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável

34	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261550	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
35	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261551	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
36	Cérebro	PRJNA417285	SRR6261552	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
37	Fígado	PRJNA612978	SRR11422675	Fêmea	Adulto	Saudável
38	Fígado	PRJNA748751	SRR15209964	NA	NA	Saudável
39	Fígado	PRJNA748751	SRR15209965	NA	NA	Saudável
40	Fígado	PRJNA748751	SRR15209966	NA	NA	Saudável
41	Fígado	PRJNA944231	SRR23852396	NA	42 dias	Saudável
42	Fígado	PRJNA944231	SRR23852397	NA	43 dias	Saudável
43	Fígado	PRJNA944231	SRR23852398	NA	44 dias	Saudável
44	Fígado	PRJNA944231	SRR23852404	NA	45 dias	Saudável
45	Fígado	PRJNA944231	SRR23852405	NA	46 dias	Saudável
46	Fígado	PRJNA944231	SRR23852406	NA	47 dias	Saudável
47	Músculo LD	PRJNA748751	SRR15209961	NA	NA	Saudável
48	Músculo LD	PRJNA748751	SRR15209962	NA	NA	Saudável
49	Músculo LD	PRJNA748751	SRR15209963	NA	NA	Saudável
50	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528262	Macho	28 meses	Saudável
51	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528263	Macho	28 meses	Saudável
52	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528264	Macho	28 meses	Saudável
53	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528265	Macho	28 meses	Saudável
54	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528266	Macho	28 meses	Saudável
55	Músculo LD	PRJNA386305	SRR5528267	Macho	28 meses	Saudável
56	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528459	Macho	18 meses	Saudável
57	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528460	Macho	18 meses	Saudável
58	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528461	Macho	18 meses	Saudável
59	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528462	Macho	18 meses	Saudável
60	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528463	Macho	18 meses	Saudável
61	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528464	Macho	18 meses	Saudável
62	Músculo LD	PRJNA481390	SRR7528465	Macho	18 meses	Saudável
63	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261553	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
64	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261554	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
65	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261555	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
66	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261556	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
67	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261558	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
68	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261559	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
69	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261560	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
70	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261561	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
71	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261562	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável

72	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261563	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
73	Glândula Mamária	PRJNA417285	SRR6261564	Fêmea	3 a 4 anos	Saudável
74	Músculo	PRJNA869947	SRR21085977	Macho	Adulto	Saudável
75	Músculo	PRJNA869947	SRR21085979	Macho	Adulto	Saudável
76	Músculo	PRJNA1056565	SRR27371757	NA	NA	Saudável
77	Músculo	PRJNA1056565	SRR27371758	NA	NA	Saudável
78	Músculo	PRJNA1056565	SRR27371759	NA	NA	Saudável
79	Músculo	PRJNA818312	SRR18399717	Macho	Natimortos	SLOS
80	Músculo	PRJNA818312	SRR18399719	Fêmea	Natimortos	SLOS
81	Músculo	PRJNA818312	SRR18399720	Fêmea	Natimortos	SLOS
82	Músculo	PRJNA818312	SRR18399722	Macho	Natimortos	SLOS
83	Músculo	PRJNA818312	SRR18399723	Fêmea	Natimortos	SLOS
84	Músculo	PRJNA818312	SRR18399725	Macho	Natimortos	SLOS
85	Oócito	PRJNA699313	SRR13623115	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
86	Oócito	PRJNA699313	SRR13623116	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
87	Oócito	PRJNA699313	SRR13623117	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
88	Oócito	PRJNA699313	SRR13623118	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
89	Oócito	PRJNA699313	SRR13623119	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
90	Oócito	PRJNA699313	SRR13623120	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
91	Oócito	PRJNA699313	SRR13623121	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
92	Oócito	PRJNA699313	SRR13623122	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
93	Oócito	PRJNA699313	SRR13623123	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
94	Oócito	PRJNA699313	SRR13623124	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
95	Oócito	PRJNA699313	SRR13623125	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
96	Oócito	PRJNA699313	SRR13623126	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
97	Oócito	PRJNA699313	SRR13623127	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
98	Oócito	PRJNA699313	SRR13623128	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
99	Oócito	PRJNA498323	SRR8107756	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
100	Oócito	PRJNA498323	SRR8107757	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
101	Oócito	PRJNA498323	SRR8107758	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
102	Oócito	PRJNA498323	SRR8107765	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
103	Oócito	PRJNA498323	SRR8107766	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
104	Oócito	PRJNA498323	SRR8107767	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
105	Oócito	PRJNA498323	SRR8107784	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
106	Oócito	PRJNA498323	SRR8107786	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
107	Oócito	PRJNA545948	SRR9182887	Fêmea	<i>In vivo</i>	Saudável
108	Ovário	PRJNA612978	SRR11422678	Fêmea	NA	Saudável
109	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948970	Fêmea	4.5 anos	Saudável

110	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948971	Fêmea	4.5 anos	Saudável
111	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948972	Fêmea	4.5 anos	Saudável
112	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948973	Fêmea	2.5 anos	Saudável
113	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948974	Fêmea	2.5 anos	Saudável
114	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948975	Fêmea	2.5 anos	Saudável
115	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948976	Fêmea	0.5 anos	Saudável
116	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948977	Fêmea	0.5 anos	Saudável
117	Ovário	PRJNA1170463	SRR30948978	Fêmea	0.5 anos	Saudável
118	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261519	Macho	Jovem	Saudável
119	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261520	Macho	Jovem	Saudável
120	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261521	Macho	Jovem	Saudável
121	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261522	Macho	Jovem	Saudável
122	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261524	Macho	Jovem	Saudável
123	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261525	Macho	Jovem	Saudável
124	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261527	Macho	Jovem	Saudável
125	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261528	Macho	Jovem	Saudável
126	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261529	Macho	Jovem	Saudável
127	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261530	Macho	Jovem	Saudável
128	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261531	Macho	Jovem	Saudável
129	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261532	Macho	Jovem	Saudável
130	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261533	Macho	Jovem	Saudável
131	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261534	Macho	Jovem	Saudável
132	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261535	Macho	Jovem	Saudável
133	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261536	Macho	Jovem	Saudável
134	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261537	Macho	Jovem	Saudável
135	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261538	Macho	Jovem	Saudável
136	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261539	Macho	Jovem	Saudável
137	Espermatozoide	PRJNA417285	SRR6261540	Macho	Jovem	Saudável
138	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770512	Macho	NA	Saudável
139	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770516	Macho	NA	Saudável
140	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770522	Macho	NA	Saudável
141	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770528	Macho	NA	Saudável
142	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770532	Macho	NA	Saudável
143	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770538	Macho	NA	Saudável
144	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770547	Macho	NA	Saudável
145	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770549	Macho	NA	Saudável
146	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770557	Macho	NA	Saudável
147	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770561	Macho	NA	Saudável

148	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770568	Macho	NA	Saudável
149	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770573	Macho	NA	Saudável
150	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770579	Macho	NA	Saudável
151	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770583	Macho	NA	Saudável
152	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770589	Macho	NA	Saudável
153	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770598	Macho	NA	Saudável
154	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770603	Macho	NA	Saudável
155	Espermatozoide	PRJNA488627	SRR7770605	Macho	NA	Saudável
156	Espermatozoide	PRJNA498323	SRR8107787	Macho	NA	Saudável
157	Espermatozoide	PRJNA498323	SRR8107788	Macho	NA	Saudável
158	Espermatozoide	PRJNA498323	SRR8107789	Macho	NA	Saudável

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** **NA** representa ausência de dados. Em **amarelo**, há o destaque para animais não saudáveis utilizados no grupo controle.

Apêndice B - Amostras grupo caso (N=32).

Nº	Tecido	Bioproject	Nº da amostra	Sexo	Idade	Saúde	Concepção
1	Embrião	PRJNA601899	SRR10907232	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
2	Embrião	PRJNA541282	SRR9034689	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
3	Embrião	PRJNA541282	SRR9034692	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
4	Embrião	PRJNA541282	SRR9034687	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
5	Embrião	PRJNA541282	SRR9034688	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
6	Embrião	PRJNA541282	SRR9034686	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
7	Embrião	PRJNA541282	SRR9034694	NA	Blastocisto	Saudável	PIV
8	Sangue	PRJNA818312	SRR18399700	Macho	NA	Saudável	IA
9	Sangue	PRJNA818312	SRR18399702	Macho	NA	Saudável	IA
10	Sangue	PRJNA818312	SRR18399703	Fêmea	NA	SLOS	IA
11	Sangue	PRJNA818312	SRR18399704	Macho	NA	SLOS	IA
12	Sangue	PRJNA818312	SRR18399705	Macho	NA	SLOS	IA
13	Sangue	PRJNA818312	SRR18399706	Macho	NA	Saudável	IA
14	Sangue	PRJNA818312	SRR18399707	Macho	NA	Saudável	IA
15	Sangue	PRJNA818312	SRR18399708	Macho	NA	Saudável	IA
16	Sangue	PRJNA818312	SRR18399709	Fêmea	NA	LOS	ART
17	Sangue	PRJNA818312	SRR18399711	Macho	NA	Saudável	ART
18	Sangue	PRJNA818312	SRR18399712	Macho	NA	Saudável	ART
19	Músculo	PRJNA818312	SRR18399713	Macho	Neonatos	Saudável	IA
20	Músculo	PRJNA818312	SRR18399714	Macho	Neonatos	Saudável	IA
21	Músculo	PRJNA818312	SRR18399715	Macho	Neonatos	Saudável	IA
22	Músculo	PRJNA818312	SRR18399727	Macho	Neonatos	Saudável	IA
23	Músculo	PRJNA818312	SRR18399728	Macho	Neonatos	Saudável	IA

24	Músculo	PRJNA818312	SRR18399729	Macho	Neonatos	Saudável	IA
25	Músculo	PRJNA818312	SRR18399730	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
26	Músculo	PRJNA818312	SRR18399731	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
27	Músculo	PRJNA818312	SRR18399732	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
28	Músculo	PRJNA818312	SRR18399733	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
29	Músculo	PRJNA818312	SRR18399734	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
30	Músculo	PRJNA818312	SRR18399735	Macho	Neonatos	Saudável	PIV
31	Músculo	PRJNA818312	SRR18399736	Macho	Neonatos	LOS	PIV
32	Músculo	PRJNA818312	SRR18399737	Fêmea	Neonatos	LOS	PIV

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA representa ausência de dados. Em amarelo, há o destaque para animais não saudáveis utilizados no grupo caso.

Apêndice C - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR conhecidas por tecido somático (Parte A).

ICRs	Blastocisto		Sangue		Cérebro		Fígado Neonato		Fígado Adulto	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BNIP3P12	16,50	23,33	82,42	5,20	80,20	5,97	NA	NA	34,25	16,48
SMOC2	38,00	18,00	90,58	1,56	82,20	5,12	83,67	4,59	80,75	5,06
MRPL23/H19	40,67	8,08	62,08	2,50	61,20	4,15	48,17	5,85	55,50	1,91
TLL2	3,50	4,95	41,33	3,98	85,80	5,54	NA	NA	76,75	17,06
IGF2R/AIRN	28,00	31,43	60,92	9,09	58,00	10,4	63,83	4,45	51,00	11,52
PLAGL1/ HYMAI	37,00	NA	54,08	10,1	60,20	5,45	33,00	10,1	46,75	6,8
NFIC	61,00	27,73	55,08	7,69	12,60	9,15	32,67	6,8	7,00	5,35
CACNB2	21,00	12,73	90,42	3,63	44,00	10,0	NA	NA	79,75	5,56
GNAS*	49,33	15,50	47,50	5,23	49,00	8,94	47,17	5,74	48,75	2,75
GNAS**	1,00	1,00	47,83	6,58	52,20	9,42	51,67	10,9	48,00	6,98
TMEM161A	29,00	11,14	95,17	2,41	86,00	4,47	77,17	1,47	88,25	2,87
BLCAP/NNAT	76,67	6,51	68,33	3,63	67,20	7,60	46,00	13,2	50,75	3,30
KLB	0,00	NA	87,75	3,47	46,20	6,69	50,00	NA	25,25	3,86
PLEC	55,67	27,68	78,00	3,54	74,20	7,46	82,67	1,21	79,50	3,87
FAM83H	54,00	17,09	91,25	1,48	91,20	2,95	83,17	1,72	84,50	2,38
SPON1	11,00	NA	93,00	2,59	96,80	0,45	89,00	1,41	94,25	1,71
B3GNT6	16,50	10,61	89,58	4,38	92,60	5,94	81,50	13,6	91,50	7,33
SMTN	28,50	40,31	28,58	9,38	53,00	14,1	29,67	6,98	51,75	5,74
HERC3/NAP1L5	0,00	0,00	54,33	4,64	54,20	7,66	NA	NA	64,25	5,62
SCUBE1	50,00	45,51	85,33	2,19	89,60	3,29	59,50	9,27	79,25	6,13
RPS9P4	43,50	33,23	40,67	16,1	65,00	19,7	56,50	10,4	77,50	7,85
ZNF837	17,67	13,65	96,25	0,62	94,60	1,67	90,67	1,21	96,25	0,50

ZIM2/PEG3/ MIMT1	18,33	18,58	50,67	6,96	49,00	8,46	44,67	12,9	50,00	4,83
CYGB/PRCD	NA	NA	75,00	5,44	57,00	11,1	50,00	NA	68,50	17,86
TRIM51FP	4,00	NA	93,25	3,79	35,00	15,4	30,50	18,1	37,25	24,17
KCNH3	48,67	36,75	88,58	6,67	84,80	9,01	67,00	8,44	39,25	18,5
DPP6	26,50	16,26	89,58	2,57	84,40	3,36	79,17	2,48	81,25	1,71
ACTR3C	NA	NA	93,75	1,76	81,20	15,1	NA	NA	89,00	0,82
MEST/MESTIT1	26,00	36,77	56,83	5,39	54,00	9,46	51,50	9,52	62,75	6,55
GRB10	31,50	30,41	89,50	3,29	59,80	6,65	47,83	20,6	35,25	8,81
SNHG14/SNRPN/ SNURF	0,00	NA	42,92	7,35	49,40	5,5	50,33	25,3	47,00	8,76
LINC02244	10,00	13,23	67,42	9,88	79,40	4,72	60,67	5,35	74,75	3,59
IGF1R	45,50	19,09	45,92	5,78	53,80	5,93	56,67	14,1	44,75	7,63
NPAS3	12,67	6,03	20,67	8,87	61,20	14,9	6,50	2,51	8,25	4,57
LINC01267	35,33	41,96	14,75	3,14	76,60	12,2	76,50	12,3	81,50	11,03
ZNF890P	68,00	25,46	76,00	11,5	69,60	18,2	54,83	10,9	60,00	12,11
CARD11	29,67	4,16	90,00	1,76	81,60	3,65	76,33	5,72	80,75	3,10
NEURL1	44,50	7,78	96,00	2,30	51,00	15,9	30,33	12,8	39,25	23,37
INPP5F	0,00	0,00	46,92	8,80	57,00	5,96	55,50	35,8	58,00	4,97
EBF3	72,00	28,00	90,00	3,28	63,40	6,47	77,17	11,2	73,00	4,08
CLDN23	0,00	0,00	8,50	1,45	8,40	3,58	4,00	1,79	4,75	1,71
ZNF703	34,50	28,99	91,17	2,44	36,20	8,76	57,50	17,7	80,25	4,65
CTNNA3/ LRRTM3	NA	NA	89,00	3,49	48,20	6,22	NA	NA	85,75	5,74
ACKR3	0,00	NA	79,08	5,96	57,80	9,63	22,67	21,2	60,25	9,29
EPHA10	40,00	NA	28,50	5,63	10,80	3,27	13,50	3,51	14,75	2,87
KCNQ1OT1	7,50	10,61	44,75	10,6	50,40	12,7	38,33	8,52	45,75	25,6
DIRAS3	45,33	28,02	57,67	3,77	65,40	9,24	57,67	18,5	52,75	4,86
PKP3	62,00	21,0	65,03	10,7	92,20	1,30	85,50	1,05	90,25	0,50

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice C - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR conhecidas por tecido somático (Parte B).

ICRs	Músculo LD		Músculo		Glândula Mamária		Ovário	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BNIP3P12	79,19	5,87	74,20	5,26	80,00	5,66	75,40	5,15
SMOC2	80,94	2,64	79,40	2,19	48,50	4,95	75,20	2,78
MRPL23/H19	58,50	3,25	47,80	6,65	57,50	3,54	53,60	3,86
TLL2	73,75	5,52	80,80	1,64	81,50	2,12	76,20	4,78
IGF2R/AIRN	56,75	10,17	47,80	8,70	59,50	0,71	52,80	6,78

PLAGL1/HYMAI	58,25	9,61	45,80	9,86	62,00	1,41	53,60	5,10
NFIC	8,88	6,92	8,20	3,11	11,00	1,41	6,70	7,39
CACNB2	51,25	4,93	47,00	4,36	70,50	0,71	37,10	8,35
GNAS*	57,69	3,77	51,00	4,47	51,00	0,00	52,00	7,70
GNAS**	53,50	6,10	45,00	5,24	47,50	6,36	50,70	7,47
TMEM161A	77,56	4,13	77,60	2,70	87,50	0,71	64,20	12,54
BLCAP/NNAT	57,50	5,20	59,40	3,58	67,50	2,12	62,40	5,25
KLB	22,19	5,00	15,20	1,92	66,50	0,71	20,10	6,37
PLEC	69,38	4,26	68,00	6,67	66,50	3,54	74,90	4,82
FAM83H	66,38	6,22	62,40	2,97	85,00	1,41	90,00	1,56
SPON1	91,81	1,68	93,00	1,58	92,50	2,12	88,70	6,33
B3GNT6	86,13	5,23	94,40	1,82	88,50	2,12	90,30	1,70
SMTN	53,56	7,66	63,20	6,76	59,50	20,51	49,10	9,05
HERC3/NAP1L5	52,31	6,00	49,20	8,14	57,50	9,19	54,90	7,22
SCUBE1	75,19	4,02	66,80	7,26	63,00	12,73	72,90	4,63
RPS9P4	73,19	5,66	76,40	7,99	66,00	1,41	71,89	6,83
ZNF837	90,81	1,97	91,80	1,10	89,50	3,54	90,10	2,77
ZIM2/PEG3/ MIMT1	50,50	6,64	40,20	6,22	50,50	0,71	46,30	5,70
CYGB/PRCD	31,75	10,00	27,40	7,27	58,00	1,41	73,10	8,17
TRIM51FP	50,38	13,13	30,80	15,39	41,00	15,56	38,40	12,65
KCNH3	57,69	6,68	62,80	9,04	92,00	5,66	81,60	3,66
DPP6	80,63	2,28	81,60	3,78	77,00	1,41	78,50	3,17
ACTR3C	90,06	2,72	86,80	5,07	91,50	0,71	83,70	5,87
MEST/MESTIT1	51,44	7,22	42,20	9,83	66,50	12,02	46,80	5,53
GRB10	55,81	5,31	49,60	3,65	23,50	0,71	69,00	7,26
SNHG14/ SNRPN/SNURF	51,25	8,66	35,60	7,64	40,00	1,41	45,30	8,38
LINC02244	43,00	8,59	40,20	9,86	59,50	0,71	80,50	4,84
IGF1R	50,31	7,83	40,40	9,21	52,50	4,95	53,50	4,88
NPAS3	54,37	10,52	47,20	10,18	18,00	12,73	22,50	14,39
LINC01267	67,81	15,27	51,00	5,87	56,50	14,85	88,20	4,89
ZNF890P	67,13	12,08	70,20	20,54	74,50	7,78	61,30	15,92
CARD11	67,31	2,60	64,60	2,88	63,00	4,24	55,90	4,33
NEURL1	66,69	8,83	64,20	15,55	48,50	13,44	44,50	20,11
INPP5F	60,31	6,60	48,80	8,98	54,00	2,83	50,90	3,38
EBF3	76,88	3,79	71,80	3,56	72,50	7,78	80,00	3,68
CLDN23	4,19	1,56	5,60	0,89	13,50	0,71	7,30	1,70
ZNF703	52,50	10,55	59,60	12,16	42,00	8,49	28,70	10,69
CTNNA3/ LRRTM3	88,75	3,30	91,80	1,79	90,00	4,24	90,00	3,80

ACKR3	39,69	3,48	20,00	7,18	50,00	5,66	40,30	18,81
EPHA10	15,63	4,88	12,60	2,30	6,50	4,95	20,56	6,84
KCNQ1OT1	56,69	12,05	32,20	8,04	61,50	2,12	55,40	11,88
DIRAS3	57,94	6,41	52,00	2,24	58,00	0,00	50,20	11,33
PKP3	83,63	1,63	84,00	2,12	80,00	1,41	81,30	2,41

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice D - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR conhecidas gametas.

ICRs	Oócito		Espermatozóide	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
BNIP3P12	65,50	36,06	85,00	9,56
SMOC2	20,00	18,03	96,44	0,92
MRPL23/H19	16,67	17,67	93,56	3,50
TTLL2	34,00	25,46	95,91	2,63
IGF2R/AIRN	40,33	47,65	2,04	2,39
PLAGL1/HYMAI	64,00	43,84	1,60	1,00
NFIC	38,33	41,43	11,29	15,23
CACNB2	88,00	2,83	89,36	4,89
GNAS*	72,33	14,19	4,68	1,25
GNAS**	18,67	12,22	25,08	4,64
TMEM161A	87,67	17,21	4,56	2,47
BLCAP/NNAT	88,33	16,07	40,88	7,34
KLB	38,00	NA	86,91	4,94
PLEC	86,67	9,61	94,68	2,82
FAM83H	90,33	7,37	32,88	9,73
SPON1	97,67	2,52	5,33	3,73
B3GNT6	61,00	33,94	1,60	1,58
SMTN	51,33	37,81	3,68	2,98
HERC3/NAP1L5	67,00	35,36	3,12	1,42
SCUBE1	36,00	27,73	95,96	2,03
RPS9P4	72,00	NA	93,27	4,76
ZNF837	46,33	14,84	26,24	6,17
ZIM2/PEG3/MIMT1	51,67	33,20	2,36	0,81
CYGB/PRCD	57,00	36,77	97,64	3,24
TRIM51FP	11,67	17,67	2,24	1,92
KCNH3	32,50	0,71	95,48	3,48
DPP6	52,00	36,77	92,44	3,68
ACTR3C	52,00	57,98	1,22	1,13

MEST/MESTIT1	72,00	26,87	10,68	4,34
GRB10	90,50	2,12	80,04	13,03
SNHG14/SNRPN/SNU RF	64,00	22,52	1,12	1,48
LINC02244	43,00	33,94	80,83	13,40
IGF1R	77,00	22,63	1,56	1,29
NPAS3	28,67	30,09	1,52	1,39
LINC01267	44,50	27,58	95,25	4,45
ZNF890P	80,67	18,56	2,80	1,96
CARD11	26,33	25,70	95,24	1,33
NEURL1	23,00	9,90	1,48	1,12
INPP5F	63,00	45,25	5,08	2,50
EBF3	84,00	19,80	92,52	2,92
CLDN23	45,00	55,15	0,72	0,54
ZNF703	53,00	35,36	6,00	7,68
CTNNA3/LRRTM3	20,00	NA	96,86	3,12
ACKR3	18,00	NA	95,57	4,72
EPHA10	18,67	6,43	1,40	1,44
KCNQ1OT1	44,00	48,77	1,92	0,91
DIRAS3	73,00	35,36	2,08	1,32
PKP3	91,00	7,00	95,88	2,24

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice E - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata por tecidos somáticos (Parte A).

ICRs	Blastocisto		Sangue		Cérebro		Fígado Neonato		Fígado Adulto	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ICR1	0,33	0,58	39,25	7,31	47,40	6,88	40,50	13,22	35,50	9,57
ICR2	0,00	NA	0,42	0,51	9,40	20,46	1,67	0,82	0,50	0,58
ICR3	35,00	NA	86,17	4,80	64,40	2,70	87,00	NA	74,50	10,15
ICR4	7,00	9,90	51,00	15,23	40,20	18,10	61,40	28,06	56,25	10,47
ICR5	53,67	16,50	77,33	3,45	64,20	4,76	60,33	5,05	54,25	3,59
ICR6	4,00	4,36	53,50	6,39	51,80	7,26	44,83	9,58	52,25	3,77
ICR7	40,33	14,47	93,25	0,97	94,40	0,89	86,33	1,97	92,75	2,06
ICR8	3,50	4,95	59,25	7,68	78,40	6,58	45,50	14,10	52,25	9,00
ICR9	6,00	8,49	44,08	5,25	51,60	4,72	44,83	18,20	47,50	3,70
ICR10	0,00	NA	71,67	5,58	62,40	6,23	46,67	13,53	47,00	4,90
ICR11	0,00	NA	76,17	4,09	53,20	11,34	55,40	18,26	78,50	5,07
ICR12	NA	NA	88,33	4,98	86,20	5,89	NA	NA	23,50	9,29

ICR13	3,00	4,24	52,83	6,56	44,80	4,71	4,00	6,20	16,75	4,86
ICR14	0,00	0,00	55,17	8,38	39,40	12,22	39,00	39,60	31,25	10,81
ICR15	40,67	8,08	62,08	2,50	61,20	4,15	48,17	5,85	55,50	1,91

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice E - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata por tecidos somáticos (Parte B).

ICRs	Músculo LD		Músculo		Glândula Mamária		Ovário	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ICR1	47,38	6,75	32,80	10,28	47,00	4,24	49,80	4,21
ICR2	0,13	0,34	2,40	2,30	1,00	0,00	0,22	0,44
ICR3	68,38	5,37	68,20	2,86	71,00	1,41	67,80	5,63
ICR4	45,38	10,81	43,00	12,41	59,50	24,75	34,40	14,01
ICR5	71,31	4,21	70,00	2,12	71,50	0,71	68,30	6,82
ICR6	46,31	5,56	39,40	6,39	48,50	0,71	46,80	4,13
ICR7	90,13	1,93	90,40	1,67	93,00	1,41	90,40	1,51
ICR8	81,31	6,26	80,00	4,18	71,00	4,24	72,00	9,99
ICR9	47,69	7,03	37,00	3,67	45,50	4,95	48,00	6,36
ICR10	56,69	7,48	48,20	11,90	78,50	4,95	70,80	4,37
ICR11	85,06	3,70	84,60	2,97	41,50	0,71	56,60	6,85
ICR12	66,00	4,05	74,60	7,50	34,50	4,95	26,10	5,92
ICR13	26,00	3,81	20,40	4,04	19,50	0,71	19,60	6,52
ICR14	71,88	9,29	67,40	13,89	63,00	15,56	51,80	5,39
ICR15	58,50	3,25	47,80	6,65	57,50	3,54	53,60	3,86

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice F - Porcentagens médias e desvio padrão de cada ICR candidata gametas.

ICRs	Oócito		Espermatozóide	
	Média	DP	Média	DP
ICR1	8,33	6,51	3,88	2,20
ICR2	1,50	0,71	1,43	3,00
ICR3	73,00	29,70	1,57	2,69
ICR4	12,00	16,97	0,29	0,69
ICR5	18,00	15,13	96,64	1,68
ICR6	9,33	12,86	2,32	1,46
ICR7	38,00	30,51	94,52	3,62
ICR8	27,50	33,23	0,80	1,80

ICR9	72,00	14,14	1,44	1,29
ICR10	31,00	22,63	10,88	7,10
ICR11	21,50	21,92	55,08	15,64
ICR12	50,00	70,71	94,09	5,14
ICR13	11,00	15,56	5,86	3,45
ICR14	31,00	5,66	96,21	5,00
ICR15	16,67	17,67	93,56	3,50

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice G - Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Embrião (Blastocisto) para as ICRs conhecidas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Embrião (Blastocisto)			
	Controle		ART	
	Média	DP	Média	DP
BNIP3P12	16,50	23,33	36,00	42,58
SMOC2	38,00	18,00	33,29	22,68
MRPL23/H19	40,67	8,08	30,71	2,21
TTLL2	3,50	4,95	30,50	22,13
IGF2R/AIRN	28,00	31,43	5,50	6,69
PLAGL1/HYMAI	37,00	NA	34,00	39,47
NFIC	61,00	27,73	50,33	41,40
CACNB2	21,00	12,73	7,00	9,90
GNAS*	49,33	15,50	31,14	14,90
GNAS**	1,00	1,00	2,57	2,44
TMEM161A	29,00	11,14	21,80	15,43
BLCAP/NNAT	76,67	6,51	40,67	30,61
KLB	0,00	NA	0,00	NA
PLEC	55,67	27,68	34,71	15,78
FAM83H	54,00	17,09	40,71	10,45
SPON1	11,00	NA	12,33	18,01
B3GNT6	16,50	10,61	14,40	18,09
SMTN	28,50	40,31	44,50	15,63
HERC3/NAP1L5	0,00	0,00	40,57	31,46
SCUBE1	50,00	45,51	45,29	29,80
RPS9P4	43,50	33,23	41,67	33,83
ZNF837	17,67	13,65	18,33	21,66
ZIM2/PEG3/MIMT1	18,33	18,58	16,17	10,53
CYGB_PRCD	NA	NA	11,00	7,44
TRIM51FP	4,00	NA	8,00	10,37

KCNH3	48,67	36,75	34,00	32,36
DPP6	26,50	16,26	34,00	22,16
ACTR3C	NA	NA	NA	NA
MEST/MESTIT1	26,00	36,77	39,71	24,06
GRB10	31,50	30,41	52,80	33,67
SNHG14/SNRPN/SNURF	0,00	NA	47,50	36,09
LINC02244	10,00	13,23	43,67	38,21
IGF1R	45,50	19,09	3,00	3,61
NPAS3	12,67	6,03	7,50	5,69
LINC01267	35,33	41,96	50,20	33,01
ZNF890P	68,00	25,46	46,43	21,96
CARD11	29,67	4,16	32,57	14,64
NEURL1	44,50	7,78	18,60	35,63
INPP5F	0,00	0,00	24,00	24,16
EBF3	72,00	28,00	38,33	8,50
CLDN23	0,00	0,00	3,00	6,00
ZNF703	34,50	28,99	36,67	36,68
CTNNA3/LRRTM3	NA	NA	15,75	20,47
ACKR3	0,00	NA	36,00	26,58
EPHA10	40,00	NA	1,50	3,00
KCNQ1OT1	7,50	10,61	32,00	25,38
DIRAS3	45,33	28,02	17,67	15,40
PKP3	62,00	21,00	45,57	14,86

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice H - Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Sangue para as ICRs conhecidas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Sangue					
	Controle		IA Saudável		SLOS/LOS	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BNIP3P12	82,42	5,20	80,83	7,47	89,25	8,38
SMOC2	90,58	1,56	89,86	3,24	91,00	4,08
MRPL23/H19	62,08	2,50	62,14	6,36	59,75	2,06
TLL2	41,33	3,98	59,29	8,85	55,25	6,85
IGF2R/AIRN	60,92	9,09	58,00	3,27	60,00	8,98
PLAGL1/HYMAI	54,08	10,09	68,86	5,18	70,50	3,87
NFIC	55,08	7,69	58,50	33,92	48,75	13,65
CACNB2	90,42	3,63	91,71	2,81	90,50	2,38
GNAS*	47,50	5,23	54,43	5,83	50,50	9,68

GNAS**	47,83	6,58	52,57	10,78	50,25	2,06
TMEM161A	95,17	2,41	95,57	2,94	92,50	2,65
BLCAP/NNAT	68,33	3,63	62,57	3,36	63,25	2,75
KLB	87,75	3,47	91,29	5,38	89,00	4,55
PLEC	78,00	3,54	75,86	3,72	83,50	3,70
FAM83H	91,25	1,48	87,29	4,39	89,75	5,12
SPON1	93,00	2,59	94,00	3,37	90,75	6,70
B3GNT6	89,58	4,38	91,50	2,66	76,75	7,41
SMTN	28,58	9,38	17,00	11,68	26,75	15,00
HERC3/NAP1L5	54,33	4,64	73,57	8,16	70,25	9,18
SCUBE1	85,33	2,19	87,86	3,44	84,50	7,00
RPS9P4	40,67	16,15	41,14	19,53	7,67	13,28
ZNF837	96,25	0,62	95,57	1,90	96,25	0,50
ZIM2/PEG3/MIMT1	50,67	6,96	48,29	8,67	54,50	2,65
CYGB_PRC4	75,00	5,44	71,57	10,39	77,50	15,72
TRIM51FP	93,25	3,79	92,00	4,04	94,75	1,89
KCNH3	88,58	6,67	91,00	4,20	92,00	6,48
DPP6	89,58	2,57	87,57	3,46	87,75	2,22
ACTR3C	93,75	1,76	97,57	1,99	94,00	1,83
MEST/MESTIT1	56,83	5,39	51,00	12,25	49,00	7,07
GRB10	89,50	3,29	96,43	3,87	83,50	6,45
SNHG14/SNRPN/SNURF	42,92	7,35	53,43	9,98	42,50	11,27
LINC02244	67,42	9,88	84,14	4,22	76,25	12,53
IGF1R	45,92	5,78	56,57	17,65	64,00	9,42
NPAS3	20,67	8,87	7,29	3,09	13,25	8,10
LINC01267	14,75	3,14	10,33	5,54	16,75	7,80
ZNF890P	76,00	11,50	69,00	22,06	70,00	15,06
CARD11	90,00	1,76	90,43	2,07	90,50	2,08
NEURL1	96,00	2,30	96,00	2,77	97,00	1,41
INPP5F	46,92	8,80	63,57	15,69	68,00	10,49
EBF3	90,00	3,28	92,71	3,95	91,50	2,65
CLDN23	8,50	1,45	4,29	0,95	5,25	1,50
ZNF703	91,17	2,44	87,00	2,65	83,50	2,65
CTNNA3/LRRTM3	89,00	3,49	89,67	8,64	94,50	5,57
ACKR3	79,08	5,96	81,14	9,06	72,50	18,91
EPHA10	28,50	5,63	27,14	7,47	33,25	9,22
KCNQ1OT1	44,75	10,68	51,29	15,70	46,25	15,61
DIRAS3	57,67	3,77	52,86	14,22	50,25	12,53
PKP3	90,83	1,64	92,29	1,25	91,25	0,50

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice I - Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Músculo para as ICRs conhecidas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Músculo Esquelético							
	Controle		IA Saudável		PIV Saudável		PIV LOS	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BNIP3P12	74,20	5,26	74,50	9,26	80,33	11,57	85,17	2,79
SMOC2	79,40	2,19	81,50	3,57	83,50	1,52	77,67	5,82
MRPL23/H19	47,80	6,65	48,50	5,99	52,83	8,73	43,83	3,66
TLL2	80,80	1,64	78,20	6,21	76,33	5,75	76,83	2,71
IGF2R/AIRN	47,80	8,70	47,70	8,67	48,17	13,45	16,50	4,46
PLAGL1/HYMAI	45,80	9,86	51,90	12,80	66,67	9,91	46,50	15,2
NFIC	8,20	3,11	10,60	6,74	5,17	9,39	11,67	6,77
CACNB2	47,00	4,36	47,70	7,87	58,83	7,78	47,17	6,59
GNAS*	51,00	4,47	50,80	6,96	55,17	5,78	38,33	10,4
GNAS**	45,00	5,24	46,30	7,99	43,50	7,09	52,67	8,07
TMEM161A	77,60	2,70	74,80	4,52	81,67	8,43	71,67	6,95
BLCAP/NNAT	59,40	3,58	55,80	3,29	56,17	3,31	44,50	7,15
KLB	15,20	1,92	24,40	9,00	29,17	10,76	14,50	7,29
PLEC	68,00	6,67	72,30	6,67	71,00	4,98	72,50	6,63
FAM83H	62,40	2,97	70,20	7,50	68,67	12,56	69,17	5,42
SPON1	93,00	1,58	90,90	3,14	94,00	6,57	89,50	4,23
B3GNT6	94,40	1,82	88,00	5,08	86,50	10,11	87,33	4,08
SMTN	63,20	6,76	47,40	10,22	50,83	7,52	31,67	16,4
HERC3/NAP1L5	49,20	8,14	46,90	12,09	62,17	5,71	32,83	6,34
SCUBE1	66,80	7,26	68,50	8,49	77,67	14,19	65,33	6,25
RPS9P4	76,40	7,99	79,50	9,29	79,00	7,16	77,67	6,41
ZNF837	91,80	1,10	92,10	1,91	93,00	2,45	92,67	1,97
ZIM2/PEG3/MIMT1	40,20	6,22	44,90	6,66	47,50	6,44	41,00	10,7
CYGB_PRC	27,40	7,27	38,50	17,63	41,00	16,99	53,67	16,59
TRIM51FP	30,80	15,39	20,50	11,81	55,33	28,37	35,67	21,1
KCNH3	62,80	9,04	61,60	9,59	62,33	20,23	54,20	4,02
DPP6	81,60	3,78	80,30	2,83	78,50	3,15	79,83	2,64
ACTR3C	86,80	5,07	88,90	3,48	89,83	2,79	88,33	2,73
MEST/MESTIT1	42,20	9,83	55,00	8,35	56,00	8,88	45,00	12,3
GRB10	49,60	3,65	54,40	11,29	44,33	17,11	39,33	7,23
SNHG14/SNRPN/ SNURF	35,60	7,64	41,50	8,32	39,83	22,17	30,83	17,5
LINC02244	40,20	9,86	40,90	7,31	51,83	18,25	45,67	12,1
IGF1R	40,40	9,21	46,50	12,57	45,17	17,80	29,17	9,97

NPAS3	47,20	10,18	43,80	14,83	52,50	8,60	40,00	11,4
LINC01267	51,00	5,87	78,40	11,38	58,83	26,78	84,17	11,3
ZNF890P	70,20	20,54	66,90	12,29	55,17	28,53	31,67	13,2
CARD11	64,60	2,88	68,20	6,51	75,83	5,85	65,17	2,64
NEURL1	64,20	15,55	45,30	15,06	59,60	19,02	53,33	12,3
INPP5F	48,80	8,98	55,80	14,67	64,33	6,62	28,67	21,4
EBF3	71,80	3,56	81,40	3,10	82,00	5,10	80,67	1,75
CLDN23	5,60	0,89	3,10	1,97	2,67	1,21	3,00	1,26
ZNF703	59,60	12,16	51,60	10,78	62,33	9,69	51,00	10,1
CTNNA3/LRRTM3	91,80	1,79	86,60	8,88	94,17	5,42	86,67	6,86
ACKR3	20,00	7,18	32,60	9,83	42,17	20,64	24,83	14,9
EPHA10	12,60	2,30	12,00	2,62	18,17	6,74	17,00	3,41
KCNQ1OT1	32,20	8,04	44,20	9,91	51,33	8,78	37,00	10,7
DIRAS3	52,00	2,24	47,10	4,77	47,33	9,85	37,00	10,7
PKP3	84,00	2,12	84,60	2,37	87,83	3,31	83,67	2,58

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice J - Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Embrião (Blastocisto) para as ICRs candidatas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Embrião (Blastocisto)			
	Controle		ART	
	Média	Desvio	Média	Desvio
ICR1	0,33	0,58	0,71	1,50
ICR2	0,00	NA	0,00	0,00
ICR3	35,00	NA	6,00	6,54
ICR4	7,00	9,90	25,75	26,41
ICR5	53,67	16,50	24,71	20,61
ICR6	4,00	4,36	13,86	21,09
ICR7	40,33	14,47	27,50	9,59
ICR8	3,50	4,95	14,25	28,50
ICR9	6,00	8,49	34,17	21,66
ICR10	0,00	NA	5,40	5,37
ICR11	0,00	NA	8,83	14,29
ICR12	NA	NA	6,67	11,55
ICR13	3,00	4,24	0,00	NA
ICR14	0,00	0,00	27,50	7,78
ICR15	40,67	8,08	30,71	2,21

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice K - Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Sangue para as ICRs candidatas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Sangue					
	Controle		IA Saudável		SLOS/LOS	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
ICR1	36,70	4,67	55,00	6,61	52,25	5,68
ICR2	0,50	0,53	0,43	0,79	1,50	2,38
ICR3	86,50	3,87	87,71	5,50	84,50	4,73
ICR4	47,10	13,49	45,43	18,53	43,75	22,31
ICR5	76,30	2,71	78,29	5,91	73,50	4,43
ICR6	51,60	4,50	58,14	8,82	58,50	5,51
ICR7	93,30	1,06	94,57	2,15	94,50	1,73
ICR8	59,80	8,34	67,57	22,23	69,50	19,23
ICR9	42,10	2,56	57,43	11,73	56,50	5,97
ICR10	70,30	5,01	76,14	5,40	81,25	2,06
ICR11	75,70	3,80	73,14	10,35	73,25	4,35
ICR12	89,00	5,21	93,43	5,97	91,00	2,71
ICR13	50,70	3,59	52,71	11,94	62,50	6,19
ICR14	55,90	8,69	67,83	8,18	62,25	5,06
ICR15	61,20	1,40	62,14	6,36	59,75	2,06

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice L- Comparação das porcentagens médias e desvio padrão no Músculo para as ICRs candidatas: Controle *versus* estudo de caso.

ICRs	Músculo Esquelético							
	Controle		IA Saudável		PIV Saudável		PIV LOS	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
ICR1	24,84	26,30	25,57	1,03	19,44	12,28	18,25	9,95
ICR2	1,12	0,82	0,97	0,22	0,78	0,40	0,72	0,35
ICR3	37,26	44,61	40,93	5,20	32,00	18,12	29,69	15,14
ICR4	28,70	14,85	21,78	9,79	18,78	8,24	17,02	7,70
ICR5	32,97	39,24	36,10	4,43	28,19	16,04	26,16	13,38
ICR6	27,09	28,55	27,82	1,03	21,12	13,41	19,84	10,85
ICR7	38,80	50,88	44,84	8,54	35,77	18,81	32,94	16,13
ICR8	37,37	28,92	33,15	5,98	26,35	14,02	24,30	11,97
ICR9	26,84	27,70	27,27	0,61	20,60	13,33	19,39	10,75
ICR10	33,97	40,89	37,43	4,89	29,29	16,51	27,16	13,81
ICR11	32,98	36,80	34,89	2,70	26,84	16,17	25,07	13,26

ICR12	39,66	48,00	43,83	5,89	34,35	19,27	31,83	16,15
ICR13	27,39	27,97	27,68	0,41	20,86	13,64	19,66	10,97
ICR14	30,40	31,71	31,06	0,93	23,53	15,07	22,12	12,18
ICR15	26,34	31,66	29,00	3,76	22,69	12,81	21,04	10,71

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** NA = ausência de dados; DP = desvio padrão; valores em porcentagem.

Apêndice M- Regiões *imprinting* analisadas, ICRs conhecidas no genoma bovino.

Gene mais próximo a coordenada	Chr	Start	End	Tamanho	Nomenclatura (Jima et al., 2022)
<i>BNIP3P12</i>	chr11	9378131	9379390	1259	ICR_1101 [^] _P_BNIP3P12
<i>SMOC2</i>	chr9	102624743	102628191	3448	ICR_418 [*] _P_SMOC2
<i>MRPL23/H19</i>	chr29	49503428	49515780	12352	ICR_716 [^] #_P_MRPL23_H19_RF01972/RF01973/ENSBTAG00000054745
<i>TLL2</i>	chr9	101982488	101983097	609	ICR_414 [^] _P_TLL2
<i>IGF2R/AIRN</i>	chr9	96220999	96224181	3182	ICR_410 [^] _M_IGF2R_AIRN
<i>PLAGL1/HYMAI</i>	chr9	81417577	81420016	2439	ICR_404 [^] #_M_PLAGL1_HYMAI_RF02143
<i>NFIC</i>	chr7	20481948	20483168	1220	ICR_1072 [^] _M ^{**} _NFIC
<i>CACNB2</i>	chr13	32711296	32712698	1402	ICR_640 [^] _M_CACNB2
<i>GNAS[*]</i>	chr13	57516259	57522973	6714	ICR_1207 [^] _M_GNAS
<i>TMEM161A</i>	chr7	4117237	4118599	1362	ICR_1099 [*] _M_TMEM161A
<i>GNAS^{**}</i>	chr13	57528926	57533824	4898	ICR_1205 [^] #_M_GNAS
<i>BLCAP/NNAT</i>	chr13	66460624	66466978	6354	ICR_1192 [^] #_M_BLCAP_NNAT
<i>KLB</i>	chr6	58528448	58529089	641	ICR_254 [^] _P_KLB
<i>PLEC</i>	chr14	876064	880995	4931	ICR_557 [^] _P ^{**} _PLEC
<i>FAM83H</i>	chr14	1032933	1037637	4704	ICR_555 [^] _M_FAM83H
<i>SPON1</i>	chr15	38464041	38464603	562	ICR_726 [^] _M_SPON1
<i>B3GNT6</i>	chr15	56452564	56453720	1156	ICR_741 [^] _M ^{**} _B3GNT6
<i>SMTN</i>	chr17	69960803	69961938	1135	ICR_1366_M_SMTN
<i>HERC3/NAP1L5</i>	chr6	36082348	36084116	1768	ICR_275 [^] _M_HERC3_NAP1L5
<i>SCUBE1</i>	chr5	114049057	114051288	2231	ICR_1379 [^] _P ^{**} _SCUBE1
<i>RPS9P4</i>	chr18	63196736	63197310	574	ICR_1126_M ^{**} _RPS9P4

<i>ZNF837</i>	chr18	63909393	63912844	3451	ICR_1147_M**_ZNF837
<i>ZIM2/PEG3/MIMT1</i>	chr18	64119661	64124723	5062	ICR_1142*^#_M_ZIM2_PEG3_MIMT1_RF02151
<i>CYGB_PRC</i>	chr19	55211741	55212331	590	ICR_1025^_P_CYGB_PRC
<i>TRIM51FP</i>	chr20	62607760	62608370	610	ICR_732_M**_TRIM51FP
<i>KCNH3</i>	chr5	30288524	30289181	657	ICR_779_P_KCNH3
<i>DPP6</i>	chr4	116897582	116899231	1649	ICR_490*^_M_DPP6
<i>ACTR3C</i>	chr4	116046762	116047355	593	ICR_487^_M_ACTR3C
<i>MEST/MESTIT1</i>	chr4	94249350	94252289	2939	ICR_481*^#_M_MEST_MESTIT1
<i>GRB10</i>	chr4	5116823	5117434	611	ICR_454*^#_M_GRB10
<i>SNHG14/SNRPN/SNURF</i>	chr21	1937435	1939290	1855	ICR_893*^_M_SNHG14_SNRPN_SNURF
<i>LINC02244</i>	chr21	7146122	7148291	2169	ICR_914^_P_LINC02244
<i>IGF1R</i>	chr21	7995487	7997279	1792	ICR_913^_M_IGF1R
<i>NPAS3</i>	chr21	44284198	44285369	1171	ICR_853_M_NPAS3
<i>LINC01267</i>	chr22	57902415	57902942	527	ICR_194^_P_LINC01267
<i>ZNF890P</i>	chr25	38594587	38596222	1635	ICR_439*^_M_ZNF890P
<i>CARD11</i>	chr25	40375931	40379347	3416	ICR_436*^_P_CARD11
<i>NEURL1</i>	chr26	24154053	24154731	678	ICR_678_P**_NEURL1
<i>INPP5F</i>	chr26	39936429	39939288	2859	ICR_681*^_M_INPP5F
<i>EBF3</i>	chr26	49151549	49153897	2348	ICR_688_P**_EBF3
<i>CLDN23</i>	chr27	24739724	24741308	1584	ICR_510_M_CLDN23
<i>ZNF703</i>	chr27	32981317	32982812	1495	ICR_522^_M_ZNF703
<i>CTNNA3/LRRTM3</i>	chr28	23366105	23366830	725	ICR_662_P**_CTNNA3_LRRTM3
<i>ACKR3</i>	chr3	116102843	116103852	1009	ICR_184*^_P_ACKR3
<i>EPHA10</i>	chr3	108152744	108153498	754	ICR_37_M**_EPHA10
<i>KCNQ1OT1</i>	chr29	48907702	48909901	2199	ICR_721*^#_M_KCNQ1_KCNQ1OT1
<i>DIRAS3</i>	chr3	77246259	77248606	2347	ICR_46*^_M_DIRAS3
<i>PKP3</i>	chr29	50879233	50882910	3677	ICR_709*^_P_PKP3

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** Regiões genômicas convertidas com base em Jima et al. (2022) e Rosenski et al. (2025).

Apêndice N- Regiões *imprinting* analisadas, ICRs candidatas no genoma bovino.

ICRs	Chr	Start	End	Tamanho	Gene mais próximo a coordenada
ICR1	chr13	57484933	57487383	2450	GNAS_1
ICR2	chr13	66471320	66471883	563	BLCAP/ENSBTAG00000052053
ICR3	chr18	62419665	62420470	805	ENSBTAG00000047953
ICR4	chr21	1208163	1208673	510	MAGEL2
ICR5	chr21	65706455	65711409	4954	RF01928
ICR6	chr21	65722118	65726699	4581	ENSBTAG00000052189
ICR7	chr21	65778486	65782018	3532	RLT1/BTA/MIR/BTA/MIR/433
ICR8	chr4	94245319	94246053	734	RF02148
ICR9	chr4	12062262	12066142	3880	SGCE/PEG10
ICR10	chr29	48730341	48731740	1399	CDKN1C_1
ICR11	chr29	48741863	48743161	1298	CDKN1C_2
ICR12	chr4	5107640	5108203	563	GRB10_3
ICR13	chr4	5106629	5107458	829	GRB10_4
ICR14	chr29	49404644	49405191	547	IGF2_2
ICR15	chr29	49503428	49515780	12352	RF01972/RF01973/ENSBTAG000000547 45

Fonte: Dados da pesquisa (2026). **Nota:** Regiões genômicas convertidas com base em Jima et al. (2022) e Rosenski et al. (2025).