

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI

Análise do padrão de metilação do DNA *Peg1*DMR bovina em células somáticas e embrionárias.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO 2014

PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI

Análise do padrão de metilação do DNA *Peg1DMR* bovina em células somáticas e embrionárias

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Clara Caldas Bussiere

Co- Orientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO 2014

PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI

Análise do padrão de metilação do DNA *Peg1*DMR bovina em células somáticas e embrionárias.

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para Título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 21 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

Prof. Dr. Ângelo José Burla-Dias

Profa. Dra. Clara Slade Oliveira

Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios – UENF (Co-orientador)

Profa. Dra. Maria Clara Caldas Bussiere – UENF (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser um amparo de fé e esperança!

À minha mãe, por ser um exemplo para mim. Por todo amor, carinho e dedicação, mesmo longe.

À minha amada avó, por simplesmente existir! Por me ensinar que a vida tem que ser levada com bom humor.

À minha irmã Karla pelo apoio nas horas de desespero, pela amizade e por ser mãe.

À minha irmã Bianca por me dar segurança e confiança. Pelos conselhos e companheirismo. E por me tornar “tia” novamente.

Ao Prof. Álvaro Fabricio Lopes Rios por ser um co-orientador-pai. Por ser exemplo de dedicação, orientação, e pesquisador pra mim.

A Profa. Maria Clara Caldas Bussiere pela orientação nesses 2 anos, pela confiança e por acreditar no projeto.

Ao meu Kayan, por 3 anos de alegria e companheirismo na minha vida. Por me permitir crescer e me apoiar todo esse tempo.

À Stéphanie, minha amiga e irmã de coração, pelos 19 anos de amizade. Por todos os momentos que vivemos, e por crescer comigo. Por todo apoio e confiança na minha capacidade.

À Lud, por se fazer presente na minha vida mesmo a kms de distância. Por ser ombro e colo todas as vezes que precisava de socorro.

À Amanda e Vivi, que me ajudaram ao longo do mestrado, tanto nos experimentos quanto pela amizade. Obrigada por estarem sempre presentes quando precisei. Minha conquista são as conquistas de vocês!

Aos amigos e parceiros de laboratório: Valter, por tornar o dia de trabalho mais engraçado e leve. E a Mariana, por ser a melhor parceira de experimentos e de conversas. Vocês foram os melhores presentes que o mestrado me deu!

Aos amigos que fiz no LRMGA (Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal), obrigada pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Ângelo Burla-Dias pela disponibilidade e paciência, por ajudar na realização e finalização desse projeto.

À FAPERJ, CAPES e UENF pela aprovação e pelo apoio financeiro do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Marcas e Mecanismos Epigenéticos	4
2.1.1 Metilação do DNA	4
2.1.2 <i>Imprinting</i> Genômico	6
2.2 Desenvolvimento Embrionário.....	7
2.2.1 Epigenética e o desenvolvimento embrionário	7
2.2.2 Biotecnologias da reprodução e alterações epigenéticas.....	8
2.3 O gene de estudo	11
2.3.1 O Gene <i>Peg1/MEST (Paternally expressed gene 1 / Mesoderm Specific Transcript)</i>	11
3 OBJETIVOS	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Análise <i>in silico</i>	14
4.1.1 Regiões estudadas.....	14
4.2 Preparação das amostras	14
4.2.1 Amostras analisadas	14
4.2.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	15
4.2.2.1 Seleção e maturação dos oócitos <i>in vitro</i> (MIV).....	15
4.2.2.2 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	16
4.2.3 Extração do DNA	16
4.2.3.1 Amostras de Tecidos	16
4.2.3.2 Amostras de Embriões	17
4.3 Análise <i>in vitro</i>	18
4.3.1 Estudo dos perfis de metilação do DNA por técnica de MSRE-qPCR ...	19
4.3.2 Análise da metilação do DNA em embriões bovinos através do ensaio de <i>quantitative DNA methylation analysis follow inverse COBRA assay (qDMA-IC assay)</i>	20
4.3.2.1 Modificação de DNA genômico por tratamento com Bissulfito de Sódio	20
4.3.2.2 Amplificação <i>genoma wide</i>	20
4.3.2.3 Digestão com enzimas de restrição sensíveis a metilação	21
4.3.2.4 Real time PCR – Quantitative PCR	21
4.3.3 Análise dos transcritos relativos nos tecidos.....	22
4.3.3.1 Extração de RNA.....	22

4.3.3.1.1	Amostras de Tecidos	22
4.3.3.2	Transcrição reversa e PCR quantitativo (RT-qPCR)	23
4.3.3.3	Reação de Cadeia de Polimerase – PCR	23
4.3.3.4	Real Time PCR – Quantitative PCR (qPCR)	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Identificação de regiões evolutivamente conservadas (ECRs, do inglês <i>Evolutionary Conserved Regions</i>) dentro da <i>Peg1DMR</i> com características de CGI-shores.....	25
5.2	Perfil de metilação do DNA (5mC) na CGI e CGI-shore da <i>Peg1DMR</i> ; identificação de candidato ao gene homólogo MESTIT1 bovino.....	29
5.3	Padrão de metilação do DNA em embriões bovinos através do ensaio de quantitative DNA methylation analysis follow inverse COBRA (qDMA-IC assay) ..	35
6	CONCLUSÕES	40
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

O mecanismo de *imprinting* genômico desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos, estando envolvido no crescimento fetal, no desenvolvimento placentário e no estabelecimento de padrões de comportamento pós-natal. A expressão monoalélica parental específica desses genes é controlada por elementos regulatórios localizados em regiões diferencialmente metiladas (DMRs). Estas regiões são frequentemente associadas com ilhas CpGs (CGIs). Regiões circundantes as CGI, *CGI-shores*, foram recentemente identificadas como DMRs com funções regulatórias associadas a genes próximas das mesmas. No entanto, é ainda desconhecido se *CGI-shores* regulatórias ocorrem em genes marcados. Muitos destes genes tem sido molecular e fenotipicamente caracterizados em seres humanos e camundongos. No entanto, comparado com estas duas espécies, os homólogos de genes marcados tem sido pouco caracterizados em ruminantes. A perda de *imprinting* (LOI) tem sido frequentemente detectado na prole derivada de tecnologias de reprodução assistida (ART). As consequências fenotípicas da LOI estão associadas a etiologia da *Abnormal Offspring Síndrome* (AOS) e a síndromes humanas relacionadas a genes marcados. Entre os principais genes estudados na AOS em bovinos estão o *H19*, o *Igf2* e o *Kcnq1ot1*. Evidências provenientes de estudos em humanos tem mostrado a ocorrência de LOI em outros *loci* marcados decorrentes de protocolos ART. O presente estudo, teve como objetivo caracterizar o padrão de metilação da *Peg1*DMR bovina tecidos somáticos e embriões. Utilizando os ensaios de MSRE-qPCR e qDMA-IC, foram caracterizadas o *status* de metilação de DNA de CGI e *CGI-shore* da *Peg1*DMR bovina. A região CGI apresentar uma 5mC% em torno de 40-60%, exceto para amostras de rim (5mC média de aproximadamente 20%). Os níveis 5mC no *CGI-shore* apresentaram uma média de aproximadamente 80%. O 5mC % do *CGI-shore* foi positivamente correlacionada com o homólogo do gene *Mest1* em bovinos. Os resultados de qDMA-IC diferiram de tecidos somáticos controles onde os perfis de metilação também foram analisados por MSRE-qPCR. Devido a essas diferenças, os resultados para quantificação de 5mC% utilizando tecido somático como controle, os resultados da análise de 5mC% em embriões devem ser analisados em paralelo com sequenciamento de DNA modificado com bissulfito de sódio para uma definição

da eficácia real do eficácia desse novo ensaio em amostras com quantidades diminutas de DNA.

ABSTRACT

The mechanism of genomic *imprinting* plays a crucial role during mammals embryonic development and, it is involved in the fetal growth, placental development and post-natal behavior phenotypes. The monoallelic parental specific expression of this genes are controlled by regulatory elements located into differentially methylated region (DMRs). These regions are frequently associated with CpG islands (CGI). Surrounding sequences of CGI, CGI-shores, has been recently reported as DMRs with regulatory function affecting many genes. However, if the same regulatory CGI-shores occurs in imprinted genes is yet unknown. Many of these genes have been molecular and phenotypically characterized, both in humans and mice. However, comparing with these two species, imprinted genes has few homologues been characterized in ruminants. Loss of *imprinting* (LOI) has been frequently detected in offspring derived from assisted reproductive technologies (ART). The phenotypically consequences of the LOI events have been associated with the etiology of Abnormal Offspring Syndrome (AOS) and imprinted syndromes in humans.

The major genes investigates in cattle presenting AOS are the *H19*, *IGF2*, and, *Kcnq1ot1*. Compelling evidences from human studies have pointed for LOI in other loci can be affected by ART protocols. The goal of the present study it was characterize the methylation pattern of Peg1DMR in bovine somatic tissues and embryos. Using MSRE-qPCR and qDMA-IC assays, the DNA methylation status of CGI and CGI-shore of bovine Peg1DMR were analyzed. The CGI region present a 5mC% around 40-60%, except for kidney samples (5mC mean around 20%). The 5mC levels at CGI shore stay around 80%. The 5mC% of CGI-shore was positively correlated with *MESTIT1* gene. The results of qDMA-IC controls differed from somatic tissues where methylation profiles were also analyzed by MSRE-qPCR. Because of these differences in the 5mC% results using somatic tissue as a control, the results for the quantification of 5mC embryos must be analyzed in parallel with sequencing of sodium bisulfite modified DNA for a definition of the real efficacy of this new protocol for test of samples with low amounts of DNA.

1 INTRODUÇÃO

A epigenética é um ramo da biologia que possui como foco de estudo, os mecanismos que levam a informação contida no genótipo a dar origem ao fenótipo. No contexto molecular, a epigenética estuda as modificações na função gênica, potencialmente herdáveis e reversíveis, que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA.

Entre as marcas epigenéticas, a metilação do DNA é a mais estudada estando envolvida na regulação basal dos diversos processos biológicos (GUPTA, NAGARAJAN, WAJAPYEE, 2010). O *status* de metilação do DNA contribui para regulação da transcrição dos genes, sendo uma marcação estável, porém reversível. Essa marca epigenética ocorre predominantemente em dinucleotídeos CpGs (citosina-fosfato-guanina), podendo estar localizada em regiões promotoras de genes, constatando sua habilidade de controlar a transcrição (DAY & SWEATT, 2011; PELIZZOLA & ECKER, 2011). Regiões genômicas ricas em CG, conhecidas como ilhas CpGs (*CpG Islands*, CpGI) geralmente se encontram sobrepostas a Regiões Diferencialmente Metiladas (DMR, do inglês *Differentially Methylated Region*), o que evidencia o envolvimento das CpGI na regulação da expressão gênica tecido específico. Porém, estudos recentes tem mostrado que regiões ao redor das ilhas CpGs, chamadas '*shores*', localizados a 2Kb de distância, também podem estar associadas a regulação da expressão gênica caracterizando-se como DMRs (IRIZARRY *et al*, 2009).

A metilação do DNA está envolvida também no *imprinting* genômico, sendo a principal marcação responsável por sua ocorrência. O *imprinting* genômico é um mecanismo onde somente um membro do par de alelos é expresso, dependendo da sua origem parental (FOWDEN *et al*, 2011). Pelo fato dos genes que sofrem *imprinting* apresentarem um estado haplóide, esses genes são muito susceptíveis a mutações ou alterações epigenéticas. A perda de *imprinting* (LOI, do inglês *Loss Of Imprinting*) está relacionada com a expressão bialélica de um gene, ou a perda total da expressão (ambas cópias silenciadas) (FEINBERG, 2008). Relatos da literatura científica sugerem que o período de maior susceptibilidade para ocorrência de eventos de LOI é a fase desenvolvimento pré-implantacional do embrião, onde as

principais marcações epigenéticas estão sendo apagadas e reestabelecidas (HIURA *et al*, 2012).

Portanto, o foco sobre os riscos decorrentes da utilização das tecnologias de reprodução assistida (ART) tem aumentado nos últimos anos, pois alterações epigenéticas decorrentes das ARTs podem estar associadas ao surgimento de malformações, aberrações cromossômicas e falhas no desenvolvimento embrionário. Estudos provenientes de diferentes laboratórios ao redor do mundo têm associado essas alterações e doenças com falhas na manutenção e/ou estabelecimento do *imprinting* genômico (ZHENG *et al*, 2011; HIURA *et al*, 2012). Isso ocorre, pois as ARTs sobrepõem-se a estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, manipulação de gametas até o cultivo do embrião. Portanto qualquer etapa do processo de reprodução assistida pode causar distúrbios no processo normal de *imprinting* (MANIPALVIRATN *et al*, 2009). Diversos estudos já tem demonstrado que o cultivo *in vitro* de embrião pode causar defeitos no padrão de metilação, consequentemente afetando o desenvolvimento embrionário e fetal (KHOSLA *et al*, 2001; POPLINSKI *et al*, 2010). As consequências do erro do *imprinting* genômico são manifestadas através da sua perda, que podem conduzir a uma variedade de doenças como a Prader-Willi e Angelman em humanos (BILIYA & BULLAR JR, 2010; DENOMME *et al*, 2012). A síndrome do bezerro grande (AOS, do inglês, *Abnormal Offspring Syndrome*), em ruminantes, é uma síndrome vista principalmente em embriões gerados por transferência nuclear de célula somática. Essa síndrome causa falhas no desenvolvimento embrionário e na placenta, além de anormalidade no evento de reprogramação. Essas falhas no desenvolvimento podem também ser causadas por alterações no padrão epigenético de reprogramação gênica durante o desenvolvimento (HIENDLEDER *et al*, 2006; CURCHOE *et al*, 2009).

Dentre os genes que sofrem alguma epimutação, o gene *Peg1/MEST* (*Paternally Expressed Gene 1 / Mesoderm Specific Transcript*) sofre o processo de *imprinting* genômico e só é expresso no alelo paterno e em tecidos mesodérmicos. Alterações no padrão de expressão desse gene, principalmente em ARTs, tem sido associada com a síndrome de Silver-Russel, em humanos, causada por perda de *imprinting* (LOI) e com a síndrome do bezerro grande, em ruminantes. (KAGAMI *et al*, 2007; MCMINN *et al*, 2004).

Devido a impossibilidade em se fazer pesquisas em embriões humanos manipulados *in vitro*, o modelo de desenvolvimento bovino tem sido apontado por diversos autores como mais adequado, para estudos de alterações epigenéticas, do que o de camundongos devido a semelhanças fenotípicas das síndromes bovinas com as síndromes de ocorrência em humanos. (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; WRENZYCKI *et al*, 2001).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Marcas e Mecanismos Epigenéticos

2.1.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA, ocorre através à adição de radicais metil no carbono 5' da citosina por ação de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (JIN, LI, ROBERTSON, 2011). Existem algumas DNMTs importantes para o estabelecimento e manutenção da metilação em mamíferos.

As enzimas DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela primeira marcação de metilação de uma célula, chamada de metilação *de novo*, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. A DNMT1 está envolvida com a metilação de manutenção, ou seja, permite que essa marcação seja herdada de uma célula para outra, para que todas as células tenham o mesmo padrão de metilação. E por fim, a DNMT3L que tem a função de auxiliar no funcionamento das DNMT3A e 3B, apesar de não possuir atividade de metiltransferase (HE, CHEN, ZHU, 2011; QIN, LEONHARDT, PICHLER, 2011).

A principal função da metilação do DNA é a regulação gênica, silenciando a transcrição; como pode ser observado em mecanismos associados a regulação epigenética, como o *imprinting* genômico, a inativação do cromossomo X e o silenciamento transcricional de elementos repetitivos (YU, BAEK, KAANG, 2011; BILIYA & BULLAR JR, 2010).

Em 98% das células somáticas, essa marcação se encontra nos dinucleotídeos CpGs, enquanto que nas células germinativas, um quarto de toda a metilação aparece em regiões não CpGs (JIN, LI, ROBERTSON, 2011). Dentre os dinucleotídeos CpGs no genoma dos mamíferos, cerca de 60 a 70% estão altamente metilados, com exceção de áreas densas de CpGs que geralmente se encontram nas regiões promotoras, e que são chamadas de ilhas CpGs (CGI, o inglês *CpG island*), as quais apresentam um padrão de metilação tecido específico. As regiões promotoras com CGI metiladas geralmente são encontradas nos cromossomos X inativados, no alelo que sofrem *imprinting*, em genes tecido específico e em regiões intragênicas, embora a função da metilação intragênica tem sido controversa (FOUSE, NAGARAJAN, COSTELLO, 2010). Nesses genes, as CGIs são

encontradas geralmente dentro de região diferencialmente metiladas (DMRs, do inglês *Differentially Methylated Region*). Na presença de metilação do DNA na região promotora, a repressão da transcrição gênica pode ocorrer de duas maneiras: 1) a presença de radicais metil impedem a chegada de fatores iniciadores de transcrição, ou 2) os radicais metil atraem proteínas ligantes repressoras de transcrição, como histonas deacetilases, domínios ligantes de CpG metilados (MBDs) e proteínas 2 ligantes de CpG metilados (MeCP2) (YU, BAEK, KAANG, 2011).

Porém, as CGI também podem ser encontradas dentro do corpo gênico (intragênico) ou, regiões genômicas entre os genes (intergênico), chamados de CGI "orfãs". Há evidências que essas regiões podem se comportar como sítios de início de transcrição, podendo agir como promotor alternativo para outros genes ou para transcrever um ncRNA que vai regular a expressão gênica. As CGIs são encontradas em estado não metilado nessas regiões, porém quando metiladas silenciam a transcrição do gene (DEATON & BIRD, 2011).

Contudo, estudos recentes sobre a metilação do DNA tem mostrado que pode haver variações em regiões circundantes as DMRs de vários genes, inclusive nos genes que sofrem *imprinting* genômico. Essas regiões circundantes, chamadas de "shore" ou "CGI-shores", estão localizadas até 2Kb de distância a montante ou a jusante das ilhas CpGs, podendo estar envolvidas na regulação da expressão gênica comportando-se como DMRs (IRIZARRY *et al*, 2009; DOI, A. *et al*, 2009). Embora as CGI apresentem níveis baixos de metilação em regiões promotoras, as regiões *shores* podem mostrar grande variação dos níveis de metilação. Estudos recentes demonstram tanto hipermetilação quanto hipometilação nessas regiões em células tumorais. (JEONG *et al*, 2013)

No estudo de IRIZARRY *et al* (2009), analisando a metilação do DNA em tecido normal e tumoral, mostrou-se que 76% das DMRs tecido específicas (T-DMRs) estão localizadas dentro de 2Kb das ilhas CpGs, sendo que somente 6% das T-DMRs estão dentro das ilhas. Os autores supracitados sugerem que a metilação nessa T-DMR associadas a CGI-shores estão associadas uma regulação diferencial da expressão gênica (IRIZARRY *et al*, 2009). A ação de CGI-shores como elementos regulatórios tem sido relatada por RAO *et al* (2013), os quais relataram a ação desse elemento regulatório na regulação do gene da Caveolina.

2.1.2 *Imprinting* Genômico

O *imprinting* genômico é um processo epigenético onde ocorre o silenciamento parental específico de uma das cópias de um gene autossômico, enquanto que a outra cópia é expressa, ou seja, os genes que sofrem *imprinting* são geneticamente diploides (duas cópias estão presentes), porém são “funcionalmente” haploides (somente uma cópia é expressa). (JOHN & LEFEBVRE, 2011). Essa expressão é parental específica, sendo regulado por modificações epigenéticas, como a metilação do DNA (SURANI, 1998).

A influência da expressão parental específica tem sido postulada como um fator que influencia no desenvolvimento embrionário e fetal de mamíferos, alguns autores tem denominado essa influência como “hipótese do conflito” (JIRTLE & WEIDMAN, 2007). Em alguns exemplos, como os genes *Igf2* e *H19*, o alelo paternalmente expresso do *Igf2*, influencia positivamente o crescimento do feto, enquanto que o alelo maternalmente do *H19* age como supressor de crescimento fetal (KOUKOURA *et al*, 2011).

Como os genes que sofrem *imprinting* são essenciais para o desenvolvimento normal do organismo, tanto no desenvolvimento placentário e embrionário, além do crescimento fetal muitos estudos tem mostrado a importância do entendimento da regulação gênica alelo-específico, já que esse processo regula a dosagem dos produtos gênicos. A perda do controle de *imprinting* pode acarretar super expressão ou baixa expressão de genes regulados pelo mesmo, como observado em alguns tipos de câncer (TYCKO, 2010).

Em muitos genes que sofrem *imprinting*, um dos alelos parentais adquire a metilação diferencial durante a gametogênese, ocorrendo principalmente nas CGI associadas aos mesmos. Se o estabelecimento da metilação diferencial em uma DMR de um gene regulado por *imprinting*, ocorrer durante a gametogênese, a DMR é definida como gamética. No entanto, se a metilação ocorrer durante o desenvolvimento embrionário, essa DMR é denominada pós-zigótica. As DMRs gaméticas tem sido associadas à regulação da expressão monoalélica de mais de um gene marcado, dessa forma essas regiões são denominadas centros de *imprinting* (IC), elemento de controle de *imprinting* (ICE) ou regiões de controle de *imprinting* (ICRs) (BUITING *et al*, 1995; RIPOCHE *et al*, 1997; SUTCLIFFE *et al*, 1994; ZWART *et al*, 2001; JOHN & LEFEBVRE, 2011)

O padrão parental específico de metilação do DNA nas ICRs é estabelecido durante a gametogênese. A programação epigenética do *imprinting* genômico ocorre em duas fases. A primeira, que ocorre na linhagem germinativa, envolve a desmetilação e remetilação para remover todo o padrão de metilação que existia e assim, estabelecer um novo padrão nos gametas. A segunda etapa ocorre depois da fertilização até a implantação, onde há uma completa demetilação do embrião; e a global remetilação depois da implantação. Durante esse processo, o *imprinting* das DMRs gaméticas é mantido nas células somáticas, no entanto, as DMRs pós-zigóticas podem sofrer alterações (BILIYA & BULLAR JR, 2010; OSWALD *et al*, 2000; MAYER *et al*, 2000).

2.2 Desenvolvimento Embrionário

2.2.1 Epigenética e o desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento nos mamíferos se inicia com a totipotência do zigoto, no qual tem o poder de desenvolver um organismo inteiro. Essa totipotência não é adquirida por um conjunto de modificações genéticas, pois, de um modo geral, todas as células possuem a mesma sequência de DNA, mesmo cada célula tendo uma capacidade própria de desenvolvimento. O que difere cada célula em sua funcionalidade são as características epigenéticas, que definem o desenvolvimento do zigoto e permite a distinção entre as células (SEISENBERGER *et al*, 2012).

Diferentemente da maioria das células, as células primordiais germinativas (PGCs, do inglês *Primordial GermCell*) sofrem um processo unidirecional, chamado de reprogramação. Essa reprogramação ocorre a partir das modificações epigenéticas, como remodelamento da cromatina, apagamento das marcas de *imprinting* e a total demetilação do DNA. Essas marcas epigenéticas, principalmente de metilação, constituem uma barreira epigenética para aquisição da totipotência; portanto, a reprogramação nessas células apaga todas essas marcações garantindo a eficiência no processo de totipotência celular (HACKETT, ZYLICZ, SURANI, 2012). Durante a reprogramação, a metilação do DNA e a manutenção do *imprinting* genômico são de fundamental importância para o desenvolvimento embrionário, na

pré-implantação e manutenção da gravidez (NEWELL-PRICE *et al*, 2000; LUCIFERO *et al*, 2004).

A reprogramação epigenética ocorre em dois períodos: durante a gametogênese e logo após a fertilização, no começo do desenvolvimento embrionário. Durante a gametogênese, as marcas e mecanismos epigenéticos são totalmente apagadas em ambos os gametas para um novo estabelecimento dessas marcas quando os gametas se formam por completo. E logo após a fecundação e fertilização dos gametas, ambos genomas materno e paterno passam pela segunda reprogramação, onde ocorre demetilação total do DNA e somente reestabelecidas quando o embrião já está na fase de blastocisto. Nessa segunda fase da reprogramação, os genes que sofrem *imprinting* não sofrem alteração, já que esses genes apresentam papel fundamental durante o desenvolvimento inicial do embrião (HALES *et al*, 2011; LEPIKHOV *et al*, 2010).

O processo de demetilação nos genomas paterno e materno ocorre de maneiras distintas, passando por um processo ativo e passivo de demetilação, respectivamente. A demetilação passiva pode acontecer através da supressão da atividade das metiltransferases, ao longo da divisão celular, nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Já a demetilação ativa ocorre pela oxidação da 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina através da atividade da enzima da família TET – a TET3. (TAHILIANI *et al*, 2009; ITO *et al*, 2011; HE *et al*, 2011). Ambos os genomas, paterno e materno, completam a demetilação no estágio de 16 células. (EROGLU & LAYMAN, 2012)

2.2.2 Biotecnologias da reprodução e alterações epigenéticas

Desde o surgimento das diversas tecnologias de reprodução assistida (ARTs), a incidência de casais que utilizam dessas biotécnicas cresceu significativamente. Estimativas indicam que de cada 10 pessoas, 1 é infértil; sendo que nos dias atuais aproximadamente 3% dos nascimentos em países desenvolvidos são obtidos através das ARTs. Na medicina veterinária, muitas espécies também tem utilizado das biotecnologias de reprodução para estudos de melhoramento genético e até conservação da espécie. Porém, embora essas ARTs sejam de grande valia o tratamento da infertilidade e até para o melhoramento genético animal, estudos

desde 2002 demonstram o surgimento de síndromes no nascimento (EROGLU & LAYMAN, 2012).

As ARTs tem sido associadas desde complicações durante a gestação (pré-eclampsia e complicações na placenta), logo após o nascimento (baixo peso, mortalidade perinatal e malformações congênitas) e com indução de alterações epigenéticas. (ILIADOU, JANSON, CNATTINGIUS, 2011).

Fatores presentes nos meios de cultura *in vitro* (como o soro fetal, por exemplo) de gametas e embriões têm sido relacionados ao aparecimento de mutações epigenéticas, as epimutações (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; KHOSLA *et al*, 2001).

O efeito do cultivo *in vitro* afetando os mecanismos de *imprinting* genômico foi observado pela primeira vez em ruminantes em um estudo com ovinos. YOUNG *et al* (2001) mostraram uma relação entre a LOI e a alteração da expressão e padrão de metilação aberrante de gene *Igf2r* em ovinos produzidos *in vitro*. Há mais de uma década estudos usando camundongos como modelo tem mostrado uma relação entre o cultivo de embriões e o bloqueio da expressão e metilação de genes que sofrem *imprinting* (DOHERTY *et al*, 2000; DE RYCKE *et al*, 2002; THOMPSON *et al*, 2002; GOSDEN *et al*, 2003).

A perda de *imprinting* (LOI, do inglês, *Loss of Imprinting*) e falhas no desenvolvimento são observadas em muitas espécies geradas por transferência nuclear (clonadas), como por exemplo, em camundongo e bovinos (TAMASHIRO *et al*, 2000). A LOI está relacionada a alterações do desenvolvimento normal embrionário e placentário, a doenças neuropsiquiátricas e a muitos tipos de cânceres, como o de pulmão, mama e cólon, sendo associado com a inativação de genes supressores de tumor ou ativação de genes promotores de crescimento (JELINIC & SHAW, 2007).

Os erros de *imprinting* em ARTs podem ocorrer tanto nos gametas, através da hiperestimulação dos ovários, a maturação *in vitro* dos gametas, a criopreservação dos gametas; quanto nos embriões já formados, através do cultivo dos embriões e criopreservação destes. (EROGLU & LAYMAN, 2012). Dentro as causas dos erros de *imprinting* estão: i. deleção ou mutação nas regiões de controle de *imprinting*; ii. deleção ou duplicação de regiões cromossômica; iii. dissomia uniparental. (AMOR & HALLIDAY, 2008).

O processo de reprogramação epigenética também é influenciada durante os protocolos de ARTs, principalmente da transferência nuclear de célula somática (SCNT), onde a célula receptora já possui as marcações epigenéticas estabelecidas e ao receber o núcleo de outra célula, se torna incapaz de reprogramar suas marcas epigenéticas. Como consequência pelas falhas na reprogramação, alguns genes sofrem alterações no seu padrão de expressão (SMITH & MURPHY, 2004).

Para espécies bovinas, existe um número considerável de estudos que mostram que a reprogramação epigenética é severamente comprometida em embriões providos de SCNT; sendo muitas anormalidades baseadas na demetilação do DNA genômico no início do desenvolvimento, no efeito da metilação no *imprinting*, e problemas gestacionais relacionados com LOI (SUZUKI, J. *et al*, 2009). Portanto, muito do que se conhece da espécie bovina provém de estudos sobre as ICRs e métodos qualitativos para determinar a expressão parental. LOS tem sido observada no segundo e terceiro semestre de gestação de SCNT, e está atribuída a reprogramação epigenética (SUZUKI, J. *et al*, 2011).

A prole de ruminantes e camundongos gerados por protocolos de ART podem apresentar diversas anomalias, como hiper crescimento e gestação prolongada, em um fenômeno caracterizado como “*Large Offspring Syndrome*” (LOS) ou como foi mais recentemente denominada, *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS). A etiologia da AOS tem sido associada a alterações no padrão de expressão gênica, especialmente em genes marcados (WRENZYCKI *et al*, 2005). Uma das hipóteses para ocorrência da AOS, é o efeito dos meios de cultivo e da reprogramação genômica dos núcleos somáticos (em protocolos de transferência nuclear) sobre o padrão de metilação do DNA nos embriões (BOURC’HIS *et al*, 2001; DEAN *et al*, 2001; REIK *et al*, 2001).

Embora a espécie bovina seja a mais usada para o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida, estudos de *imprinting* em bovinos permanecem pouco elucidados na área de pesquisa devido a falta de informação sobre polimorfismo e genes que sofrem *imprinting* genômico. Isso pode indicar que bovinos clonados podem tolerar uma alta modificação do padrão de *imprinting* no estágio fetal, no qual pode proporcionar uma alta eficiência na clonagem bovina. Essas alterações, entretanto, tornam o clone mais fraco que os de reprodução natural, e a mudança ambiental pós-natal abrupta é suficiente para induzir um stress

ao recém-nascido causando a morte dele poucos dias depois do nascimento (ZHANG, S. *et al*, 2004).

2.3 O gene de estudo

2.3.1 O Gene *Peg1/MEST (Paternally expressed gene 1 / Mesoderm Specific Transcript)*

Analisando embriões partenogênicos de camundongo, KANEKO-ISHINO *et al* (1995), conseguiu identificar 8 *Pegs*, sendo dois deles (*Peg1* e *Peg3*) associados com comportamento materno anormal em fêmeas *knockout*. O *Peg1*, ou *MEST*, é expresso em humanos e bovinos, sendo encontrado no cromossomo 7 e 4, respectivamente (LI *et al*, 2002), sendo associado com o crescimento de células originadas do mesoderma (MOON *et al*, 2010). Análise da metilação do DNA indicou metilação materna em uma ilha CpG sobreposta ao promotor desse gene e hipometilação do alelo paterno.

Já foi relatado que em humanos esse gene possui duas isoformas, usando diferentes promotores. A isoforma 1 é expressa somente no alelo paterno, enquanto a isoforma 2 tem expressão bialélica (non-imprinted) (KOSAKI *et al*, 2000).

No ano de 2002, NAKABAYASHI identificou um RNA não codificante (ncRNA) dentro do gene *Peg1*. Este ncRNA, chamado de MESTITI (MEST intronic transcript), pode participar da regulação da expressão do gene *Peg1*, porém não tem uma função esclarecida. Assim como o *Peg1*, o MESTIT é transcrito somente pelo alelo paterno e em tecido fetais; tem sua sequência localizada dentro do intron do gene e é composto por somente 2 exons e um tamanho de até 4,2 Kb. (MEYER *et al*, 2003)

Alterações epigenéticas na *Peg1*DMR humana tem sido relacionadas à Síndrome de Silver-Russell (SRS) (KAGAMI *et al*, 2007), sendo caracterizada por problemas intrauterinos e retardamento do crescimento pós natal e, alguns pacientes portadores dessa síndrome exibiram dissomia uniparental materna no cromossomo 7 (mUPD7, do inglês *Maternal Uniparental Disomy*) (ZHENG *et al*, 2011). Alguns estudos caracterizam a *Peg1*DMR como a região alvo nessa síndrome por estar localizado no cromossomo 7 (RIESEWIJK *et al.*, 1998). Dentro da sequência do gene *Peg1/MEST* existe uma DMR, onde o padrão de metilação

varia nos tecidos. A manipulação de embrião em cultura in vitro pode causar um desequilíbrio nesse padrão de metilação ocasionando problemas genéticos. Apesar de relatada em humanos, alterações na *Peg1*DMR não foram estudadas em bovinos devido à falta de caracterização de sua sequência e de seu padrão de metilação do DNA, o que impede estudos semelhantes em bovinos normais ou derivados de reprodução assistida.

3 OBJETIVOS

- ✓ Caracterizar o perfil de metilação do DNA na região diferencialmente metilada (DMR) do gene *Peg1* bovino em embriões e tecidos somático derivados de cada uma das diferentes camadas germinativas;

- ✓ Caracterizar *in silico* as ilhas CpGs e *shore* dentro da *Peg1*DMR

- ✓ Quantificar a status de metilação em tecidos somático por MSRE-qPCR (*Methylation Sensitive Restriction Enzyme assay – quantitative PCR*).

- ✓ Estabelecer o ensaio de *quantitative DNA methylation analysis follow inverse COBRA* (qDMA-IC assay) para análise da metilação do DNA em embriões bovinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Análise in silico*

4.1.1 Regiões estudadas

As regiões genômicas escolhidas para análise do padrão de metilação do gene *Peg1DMR* foi obtida no banco de dados da **Universidade da Califórnia Santa Cruz – UCSC** (<http://genome.ucsc.edu>), onde houve também a identificação de regiões evolucionariamente conservadas entre diferentes espécies. Esse gene é encontrado no cromossomo 4 (*bosTau6/Cow* - chr4:95,066,962-95,079,689), onde foi analisado a região 5' do gene mais 2Kb a montante do sítio de início da transcrição, para identificação de ilhas CpGs sendo esta realizada através do software CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>). Os parâmetros utilizados foram: Razão CpG observado/esperado = 0.6; e, porcentagem GC mínima = 50%. As regiões escolhidas foram a ilhas CpGI e uma “*shore*” 5' da *bPeg1DMR*, sendo a posição, tamanho e os *primers* mostrados na Figura 3 e Tabela 2.

4.2 *Preparação das amostras*

4.2.1 Amostras analisadas

As amostras de blastocisto e embriões foram fornecidas pelo Setor de Biotecnologia de Embriões do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense. As amostras de tecidos de diferentes origens embrionárias foram obtidas no Matadouro de Campos dos Goytacazes, RJ (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras para o estudo de metilação da região DMR do gene *Peg1* bovino.

Amostras	Origem	Especificação	Animal	Tempo de Coleta
Blastocisto	Setor de Biotecnologia de Embriões do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal	Inicial	<i>Bos taurus</i> <i>taurus</i>	Rotina do laboratório
Fígado Rim Coração Cérebro	Matadouro em Campos dos Goytacazes, RJ	4 animais	<i>Bos taurus</i> <i>taurus</i>	Logo após abate

4.2.2 Produção *in vitro* de embriões

4.2.2.1 Seleção e maturação dos oócitos *in vitro* (MIV)

Após a coleta de ovários em matadouros locais, complexos *cumulus*-oócito (COC) serão selecionados com graus 1 e 2, de acordo com a classificação de qualidade relatada por LOOS *et al* (1989). Após a seleção, estes foram lavados 3 a 4 vezes em meio de cultura de tecidos (TCM) 199 com HEPES, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 10UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, e posteriormente transferidos para o meio de maturação.

O meio utilizado para maturação *in vitro* foi o TCM 199 acrescido de 10% de BSA, 0,5 µg de hormônio folículo estimulante (FSH), assim como dos antibióticos citados anteriormente. A maturação foi realizada em placas de quatro poços contendo 500µL de meio de cultivo em estufa a 38,5°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

durante 22h. Após este período, foi realizada a remoção das células do *cumulus* pelo método mecânico de pipetagem.

4.2.2.2 Fertilização in vitro (FIV)

Foi utilizado sêmen congelado de touros que foram testados separadamente de uma mesma partida que passará pelo gradiente Percoll (Pharmacia) e logo em seguida foi lavado com 5mL de TALP-sp acrescido de BSA para remover o excedente do Percoll e tratamentos. Após a maturação, grupos de 30 oócitos foram lavados (3x) em meio de fertilização e transferidos para gotas de 150µL de meio de fertilização sob óleo mineral em placa de Petri (Corning 35x10mm). A concentração final de espermatozóide foi ajustada para 2×10^6 /mL e estes foram co-incubados com os COC a uma temperatura de 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 18h. O meio de fecundação *in vitro* utilizado foi o TALP-fecundação suplementado com 6mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 2mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina, 250mM de epinefrina e heparina a 1%. Após este período, os supostos zigotos foram lavados (3x) em meio de cultivo (TCM 199 suplementado com 10% de SFB e antibióticos - 100UI/mL de penicilina e 100UI/mL de estreptomicina) para remoção das células do *cumulus* e espermatozoides e, em seguida, transferidos para gotas de cultivo de 100µL (20 oócitos por gota) sob óleo mineral, onde foram mantidos por 7-8 dias a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.2.3 Extração do DNA

4.2.3.1 Amostras de Tecidos

As amostras de DNA dos diferentes tecidos foram extraídas de acordo com o protocolo modificado de OLERUP & ZETTERQUIST (1992). Para a extração de DNA das amostras fragmentos de 0,3 a 0,5 cm de tecido foram macerado com lamina de bisturi estéril e, subsequentemente colocados em um microtubo de 1,5mL. Em cada microtubo contendo a amostra de tecido macerada foi adicionado 500µL de PBS, homogeneizado em vortex por 8 segundos e posteriormente centrifugados por 2 min a

5.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 80µL de tampão proteinase K (0,375M de NaCl; 0,12M de EDTA), 280µL de água milli-Q, 10µL de SDS 20%, e 4µL de proteinase K 25mg/mL). A mistura final (374µL) foi então homogeneizada gentilmente com o pipetador. Cada amostra foi incubada a 55°C por *overnight*. Após a digestão com a proteinase K, os tubos foram colocados na geladeira por 15 min. Adicionou-se então 500µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Invitrogen®), as amostras foram misturadas de 3 a 5 vezes por inversão e centrifugadas a 20.000 x g por 8 min (centrífuga refrigerada – 0°).

Após a centrifugação, a fase aquosa (aproximadamente 400µL) foi transferida para um novo tubo estéril onde se adicionou 1mL de etanol absoluto gelado. Logo após, o material foi centrifugado (0°C) por 10 min a 20.000 x g e então o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguir, foi adicionado 1mL de etanol 70%, sendo também centrifugado por 10 min a 20.000 x g. O sobrenadante foi descartado logo após e o material ficou secando em temperatura ambiente sobre papel filtro por 20 min. Por fim, para a diluição do material, foram adicionados 30µL de água milli-Q estéril, permanecendo aquecida (37°C) por 30 min para a diluição do material. Logo após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas por meio da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop2000). A pureza do DNA foi verificada a partir da relação 260/280nm, sendo o último comprimento de onda utilizado para detectar proteínas. Quando a relação das densidades ópticas (260/280) se encontrava entre valores de 1.8 a 2.0, o material foi considerado como tendo boa qualidade para uso.

4.2.3.2 Amostras de Embriões

A extração de DNA de embriões bovinos foi realizada segundo o protocolo descrito no EZ *DNA-Methylation Direct kit* (ZYMO). Foi extraído 1 embriões na fase de blastocisto

4.3 Análise *in vitro*

A análise do projeto se dividiu na análise do perfil de metilação do DNA das amostras de tecidos e embriões, e estudo dos transcritos relativos do gene *Peg1* bovino. Para o estudo em embriões houve a padronização de uma nova técnica com bissulfito de sódio que permitiu a análise do status de metilação do pouco material celular que o embrião possui como está mostra no esquema da Figura 1.

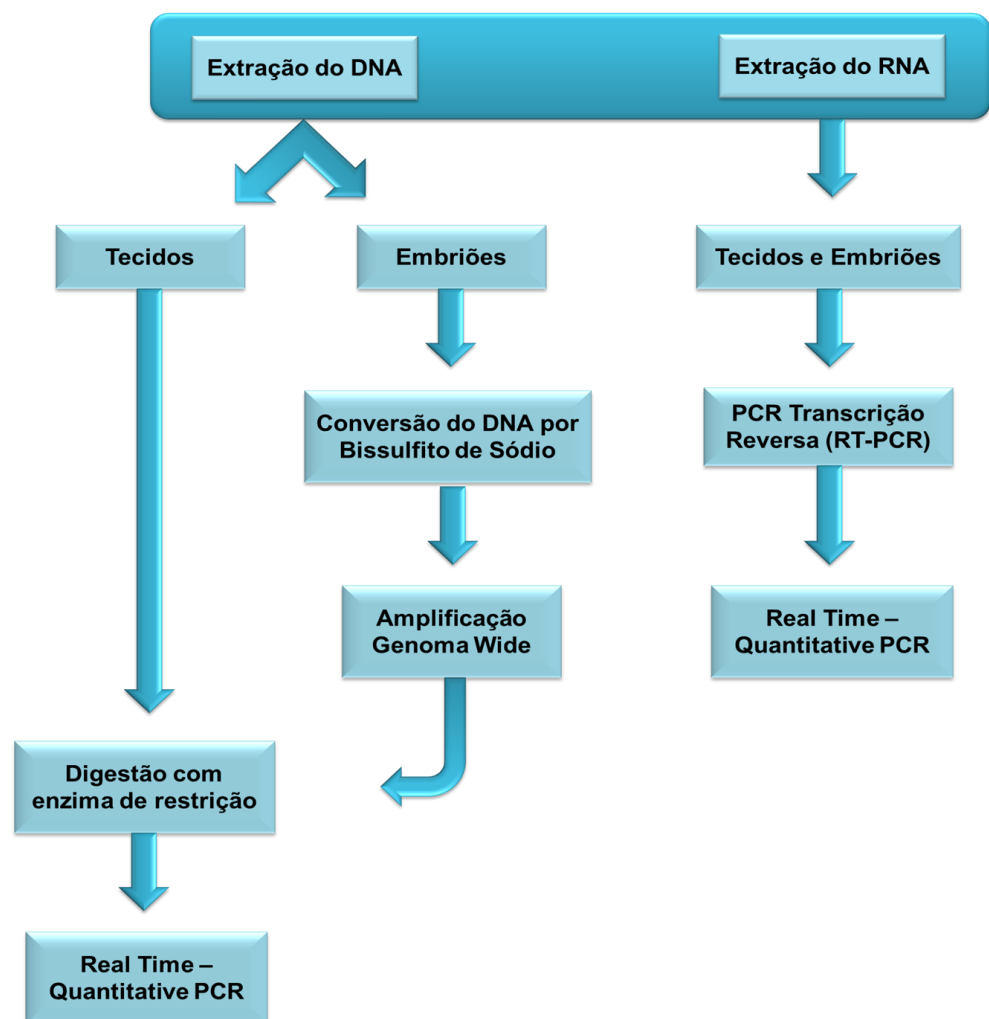


Figura 1: Procedimento experimental do presente estudo para análise dos perfis de metilação do DNA e transcritos relativos do gene *Peg1*DMR.

4.3.1 Estudo dos perfis de metilação do DNA por técnica de MSRE-qPCR

As amostras de DNA foram incubadas por 6h a 37°C em um volume total de 10µL (1,0µL Tp10x, 5U de enzima, 30ng DNA da amostra, e H₂O Milli-Q para completar o volume total). Para controle, usamos DNA das amostras não digeridas; onde o volume de enzima foi substituído por H₂O ultrapura (Milli-Q). A enzima de restrição utilizada foi a *HpaII* (sensível a metilação do DNA) que reconhece o sítio 5'-CCGG-3'. Para a análise quantitativa do padrão de metilação das amostras de tecido da região CGI e shore do gene *Peg1* foi feito PCR em tempo real conforme o protocolo de HASHIMOTO *et al* (2007). As porcentagens de metilação do DNA de cada amostra foram calculadas segundo a fórmula $5mC \% = 100 \times 2^{-(\Delta Ct)}$ ($\Delta Ct = Ct$ da amostra digerida – Ct da amostra não digerida) (HASHIMOTO *et al* 2007). Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10µL (5,0µL PCR Mastermix [SybrGreen, Applied Biosystem]; 2,7µL água; 150 mM de cada *primer sense* e *antisense*); para cada ensaio foram adicionados 2,0 µL de amostra de DNA digerido ou *sham*.

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Toda distribuição das alíquotas de mix de qPCR foram realizadas utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson e a distribuição das amostras de DNA digeridas e não digeridas utilizando um micropipetador multicanal da mesma marca. As curvas de dissociação foram obtidas seguindo os ciclos. Cada reação foi feita em duplicata.

4.3.2 Análise da metilação do DNA em embriões bovinos através do ensaio de *quantitative DNA methylation analysis follow inverse COBRA assay* (qDMA-IC assay)

4.3.2.1 Modificação de DNA genômico por tratamento com Bissulfito de Sódio

Foram utilizado 5 ng de DNA genômico derivados de tecido somático (fígado e Coração para modificação por bissulfito de sódio. A extração de DNA genômico de células embrionárias de bovinos foi realizada segundo o protocolo descrito no EZ DNA-Methylation Direct kit (ZYMO). Para cada amostra analisada foram utilizados de 1 a 6 embriões na fase blastocisto.

O tratamento com bissulfito de sódio permite distinguir citosinas de metilcitosinas no carbono 5' (5mC) no DNA. O bissulfito de sódio causa deaminação do DNA genômico em condições nas quais as citosinas são convertidas em uracilas e as 5mC permanecem inalteradas. Após o tratamento, todas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. Desta maneira é possível distinguir entre DNA metilado e DNA não metilado, uma vez que a presença de citosinas após este tratamento é um indicativo de sequência metilada (FROMMER *et al*, 1992). O DNA genômico de células somáticas e embrionárias foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando o EZ DNA-Methylation Direct kit (ZYMO) seguindo especificações do fornecedor.

4.3.2.2 Amplificação *genoma wide*

Após a conversão do DNA por bissulfito de sódio, as amostras passaram pelo processo de amplificação global do DNA convertido utilizando o EpiTect Whole Bisulfite kit (QIAGEN) conforme as especificações do fabricante.

4.3.2.3 Digestão com enzimas de restrição sensíveis a metilação

Logo após a amplificação global do DNA convertido por bissulfito de sódio, cerca de 1µg de DNA foram incubadas por 1h ou 8h a 37°C ou 55°C (dependendo da enzima utilizada) em um volume total de 20µL (1,0µL Tp10x, 0,15µL BSA, 5U de enzima, e H₂O Milli-Q para completar o volume total). Para controle, usamos DNA das amostras não digeridas; onde o volume de enzima foi substituído por H₂O ultrapura (Milli-Q). Para os ensaios de qDMA-IC foram utilizadas diferentes endonucleases (*HhaI* e *FauI*).

4.3.2.4 Real time PCR – Quantitative PCR

Para a análise das amostras de embrião convertidos por bissulfito de sódio, o status de metilação da região CGI do gene *Peg1* foi feito PCR em tempo real conforme o protocolo de HASHIMOTO *et al* (2007). As porcentagens de metilação do DNA de cada amostra foram calculadas segundo a fórmula $5mC\% = 100 \cdot 2^{-(\Delta Ct)}$ ($\Delta Ct = Ct$ da amostra digerida – Ct da amostra não digerida) (GOMES *et al*, 2007). As amostras foram diluídas 1:1µL (v:v) de H₂O e os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 20 µL (10,0 µL PCR Mastermix [SybrGreen, AppliedBiosystem]; 5,4µL água; 150mM *primer sense*; 150mM *primer antisense*; 4,0µL de cada amostra).

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min. Toda distribuição das alíquotas de mix de qPCR foram realizadas utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson e a distribuição das amostras de DNA digeridas e não digeridas utilizando um micropipetador multicanal da mesma marca. As curvas de dissociação foram obtidas seguindo os ciclos. Cada reação foi feita em triplicata.

4.3.3 Análise dos transcritos relativos nos tecidos

4.3.3.1 Extração de RNA

4.3.3.1.1 Amostras de Tecidos

As amostras de RNA dos diferentes tecidos foram extraídas de acordo com o protocolo do Trizol. Para a extração de RNA das amostras, foi colocado em um placa de petri estéril um pedaço do tecido (aproximadamente 0.3 – 0.5 cm), cada amostra foi macerada gentilmente utilizando laminas de bisturi estéreis. As amostras maceradas foram colocadas em um tubo de microcentrífuga de 1.5 mL sendo subsequente adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen®) a cada amostra. Para cada de 1,5mL e foram adicionados 200µL de clorofórmio, logo em seguida misturados por inversão por 15 segundos e deixados em temperatura ambiente (15-30°C) por 3 minutos. As amostras então foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min (centrífuga refrigerada – 2-8°C). Após a centrifugação, a fase aquosa (aproximadamente 300µL) foi transferida para um novo tubo estéril onde se adicionou 500µL de isopropanol. Após a homogeneização das amostras por inversão (de 3 a 5 vezes), as amostras ficaram em temperatura ambiente (15-30°C) por 10 min. Logo após, o material foi centrifugado (2-8°C) por 10 min a 12.000 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão. A seguir, foi adicionado 1mL de etanol 75%, vortexado por 10 segundos e centrifugado por 5 min a 7.500 x g. O sobrenadante foi descartado logo após e o material ficou secando em temperatura ambiente sobre papel filtro por 15 min. Por fim, para a diluição do material, foram adicionados 30µL de água milli-Q passada. Logo após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas através da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop2000). A pureza do DNA foi verificada a partir da relação 260/280nm, sendo o último comprimento de onda utilizado para detectar proteínas. Quando a relação das densidades ópticas (260/280) se encontrava menor que 1.6, o material foi considerado como tendo boa qualidade para uso.

4.3.3.2 Transcrição reversa e PCR quantitativo (RT-qPCR)

Aproximadamente 900-1000 ng de RNA total foram submetidos a ensaio de digestão com DNase I (1U) por 10 minutos a 37°C para eliminação de qualquer resquício de DNA genômico nas amostras. Logo em seguida, foi adicionado EDTA (25mM) por 15 minutos a 75°C para a inativação da DNase I. Por fim, a transcrição reversa foi realizada utilizando *High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems®) conforme instruções do fabricante. As condições de ciclagem para a transcrição reversa foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 segundos.

4.3.3.3 Reação de Cadeia de Polimerase – PCR

Logo após a transcrição reversa foi feito uma PCR para comprovação de que houve a completa conversão de RNA para cDNA. As amostras de cDNA foram diluídas na proporção 1:5 (v:v) em ddH₂O, sendo utilizados 2µL de cDNA por reação. A PCR foi realizada em um volume final de 10µL [5,85µL ddH₂O; 1,0µL 10x RT-Buffer; 150mM de cada primer (*Sense* e *antisense*); 100mM dNTP (25mM cada); 1.5mM de MgCl₂; 0,05µL AmpliTaq Gold DNA Polimerase Applied Biosystems]; 2,0µL de cDNA). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.3.3.4 Real Time PCR – Quantitative PCR (qPCR)

Para a análise dos transcritos relativos das amostras de tecidos e embrião do gene *Peg1* foi feito PCR em tempo real conforme o protocolo de HASHIMOTO *et al* (2007). As porcentagens de metilação do DNA de cada amostra foram calculadas segundo a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10 µL (5,0 µL PCR Mastermix [SybrGreen, AppliedBiosystem]; 2,7µL água; 150mM de cada primer (sense e antisense); 2,0µL de cada amostra).

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min. Toda distribuição das alíquotas de mix de qPCR foram

realizadas utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson e a distribuição das amostras de DNA digeridas e não digeridas utilizando um micropipetador multicanal da mesma marca. As curvas de dissociação foram obtidas seguindo os ciclos. Cada reação foi feita em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de regiões evolucionariamente conservadas (ECRs, do inglês *Evolutionary Conserved Regions*) dentro da *Peg1*DMR com características de CGI-shores

Foram identificadas regiões evolucionariamente conservadas, correspondentes a *Peg1*DMR, entre diferentes espécies de mamíferos (26 espécies). A ilha CpG associada a região promotora do gene *Peg1* bovino foi identificada como região onde transcritos desse gene foram identificados nessas espécies.

No entanto, os critérios para identificação de CGI-shores ainda são recentes na literatura, o critério de região aproximadamente 2 a 4 Kb a montante ou a jusante de ilhas CpGs identificou uma região altamente conservada (acima de 70% de identidade entre 26 espécies).

No entanto, se observado na Figura 2, com os dados de *MultiZ alignment* derivados do UCSC *web Browser*, torna-se clara a sobreposição da CGI-shore analisada, com a sequência homóloga do gene *MESTIT1* (*MEST intronic transcript 1*), também conhecido como *Peg1-AS* (NAKABAYASHI *et al*, 2002). Poucos trabalhos tem sido publicados sobre a função de *MESTIT1*, esse gene é paternalmente expresso em humanos e sua instabilidade de *imprinting* tem sido observada em cultura de células-tronco embrionárias humanas (KIM *et al*, 2007, YAMADA *et al*, 2004, MEYER *et al*, 2003, NAKABAYASHI *et al*, 2002).



Figura 2. Representação gráfica das regiões cujos níveis de metilação do DNA (5mC) foram investigados na *Peg1*DMR bovina. ***CGI-shore e ****CGI. Gráfico gerado segundo dados do UCSC genome browser para alinhamento entre diferentes espécies de mamíferos (*Multiz alignment*).

Após o alinhamento da sequência da *Peg1*DMR com outras espécies, a região DMR foi analisada para identificação das ilhas CpG através do software CpG Plot (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpghplot/). Usando identidade de 70-80% de CG foram observadas duas ilhas. A região CGI para o presente estudo foi escolhida devido a proximidade da região promotora do gene e a CGI-shore por estar a aproximadamente 2-4 Kb de distância da CGI (Fig 3). Em seguida foi desenhado os primers para ambas regiões, além da região para estudo dos

transcritos relativos do gene *Peg1/MEST* através do software GeneRunner v3.05 (Tabela 2)

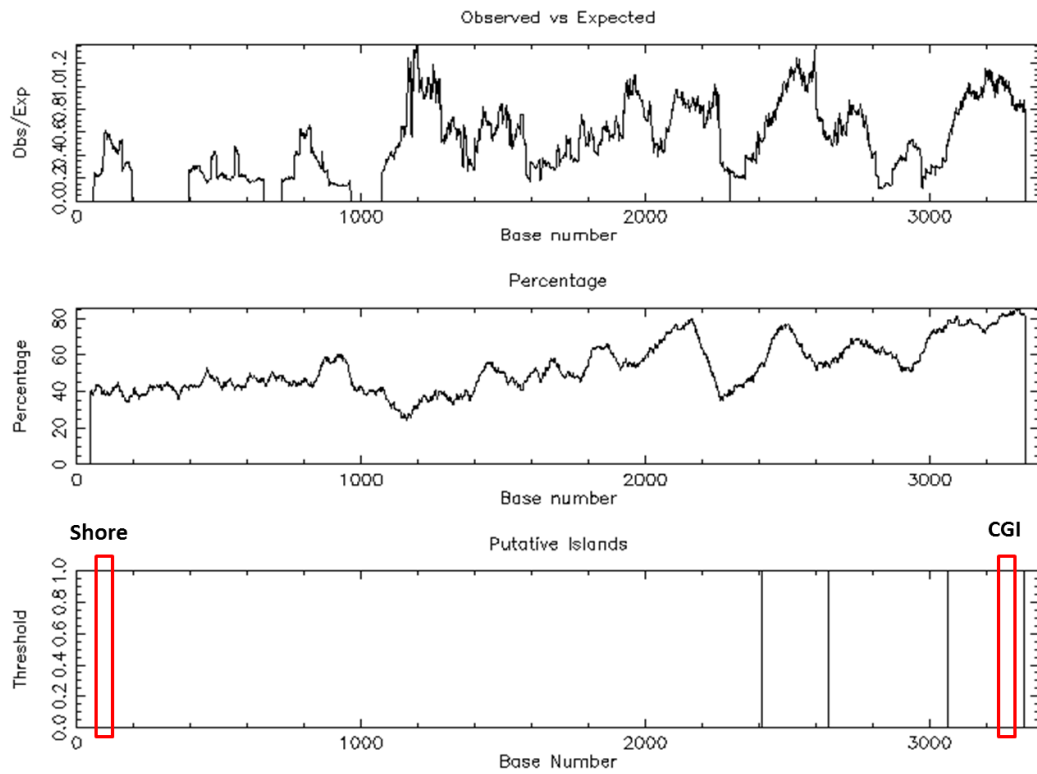


Figura 3: **Resultados do software CpGPlot.** Identificação das ilhas CpGs (aproximadamente 80% de CG) e a sua *Shore* (aproximadamente 40% de CG) (linhas em vermelho).

Região	Sequência	Tamanho do Amplicon (pb)
CGI-shore		
Sense	5' - 'TCTCTTTATGTGCTGCTGTTCAA - 3'	105 pb
Antisense	3' - AACAGGACAGAACTGAGACTGC - 5'	
CGI		
Sense	5' - GGGTGGGCTCTAAAAGTCG - 3'	100 pb
Antisense	3' - CCTCCTCTGCGGCAACCG - 5'	
cDNA		
Sense	5' - GCGGTGCCCTGCTTGCG - 3'	184 pb
Antisense	3' - TGGATGTTGAAAGCCGTGT - 5'	
CGI-BIS		
Sense	5' - AGTTTAGAGGTAGGTTTAGTTTAG - 3	172 pb
Antisense	3' - CCTCAAATACAATAAAACCCAAAA - 5'	

Tabela 2. Sequência nucleotídeos dos *primers* utilizados nos ensaios de MSRE-qPCR e qDMA-IC para a *Peg1DMR* bovina.

5.2 Perfil de metilação do DNA (5mC) na CGI e CGI-shore da *Peg1DMR*; identificação de candidato ao gene homólogo *MEST1T1* bovino

Foram utilizadas amostras de tecidos derivados de animais do matadouro como fonte de DNA na idade adulta. Os dados dos resultados de MSRE - qPCR são expressos como média \pm desvio padrão (média \pm SD) a partir de quatro amostras diferentes para cada tecido. A percentagem de metilação do DNA (5mC%) para *Peg1DMR* CGI foram 38,25 (\pm 3,92) para o cérebro; 45,08 (\pm 17,14) para a amostras de tecido renal; de 20,7 (\pm 6,71) para o amostras de tecido cardíaco; 40,23 (\pm 12,43) para amostras de fígado (Figura 4).

Os coeficientes de variação encontrados para CGI foram 10,25%, 38,02%, 32,44%, 30,89% para o cérebro, coração, rins e fígado, respectivamente. Recentemente trabalhos publicados por de diferentes grupos de pesquisa tem demonstrado que a 5mC% em DMRs de genes regulados por *imprinting* genômico em tecidos adultos de humanos apresentam valores entre 40-60% (WOODFINE *et al*, 2011). Essa discordância para a níveis hipotéticos e esperados de 50% de 5mC pode ser atribuído a estímulos ambientais vivenciados por indivíduos durante seu tempo de vida.

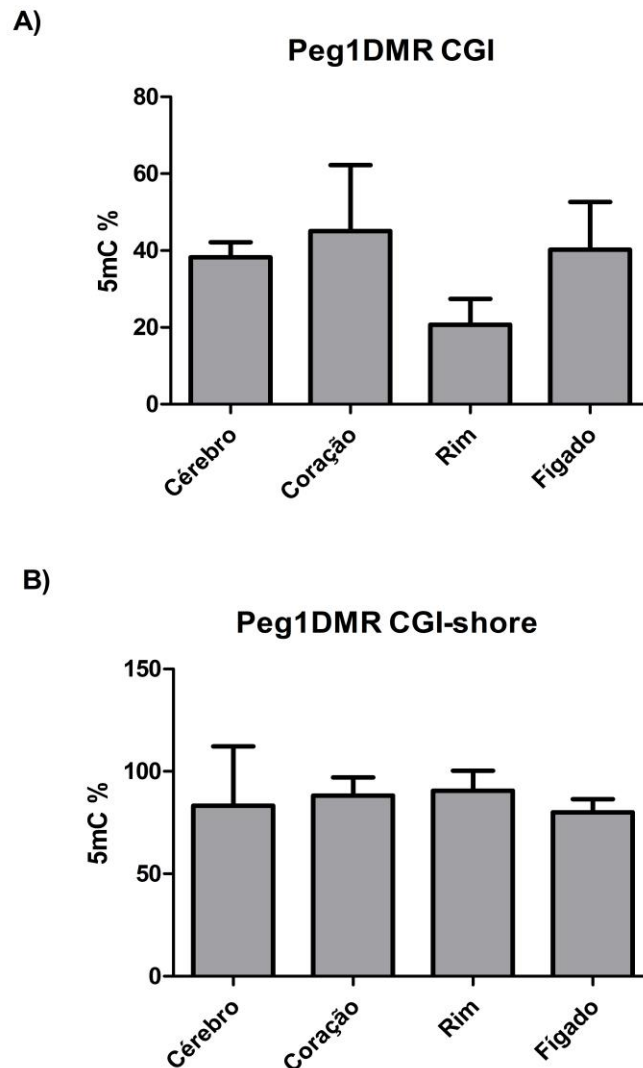


Figura 4. Resultados dos ensaios de MSRE-qPCR demonstrando a 5mC% na *Peg1DMR* bovina nas regiões CGI (A) e CGI-shore (B).

Para bovinos, os animais são submetidos a uma série de diferentes fatores que podem afetar os níveis 5mC em diferentes *loci* do genoma, incluindo genes marcados. Fatores que podem afetar a deposição ou remoção das marcas epigenéticas como a alimentação, o estado nutricional durante o período de pré-natal, os antibióticos e a exposição a agentes patogênicos tem sido relatados em camundongos e humanos (BIERNE *et al*, 2012; GONG *et al*, 2010; HOYO *et al*, 2011; PERNG *et al*, 2012; SHIN *et al*, 2011; SOUBRY *et al*, 2011; VIDAL *et al*, 2013; WATERLAND *et al*, 2010; HEIJMANS *et al*, 2008; BOKS *et al*, 2009; STEEGERS–THEUNISSEN *et al*, 2009; TOBI *et al*, 2009). Essas alterações

epigenéticas poderiam ocorrer também em bovinos, o que explicaria a discordância na 5mC% observado no presente estudo.

Também foram encontradas diferenças na 5mC% entre a média das amostras de tecidos, como por exemplo a média de 5mC% das amostras de tecido renal (20,7 - $\pm 6,71$), o que representa quase 50% de redução (hipometilação) comparando as médias de outros tecidos analisados (cerca de 40% de 5mC detectada). Estes resultados demonstraram que a variação em CGI de *Peg1*DMR pode diferenciar de forma indivíduo e tecido específico.

Se há algum significado fenotípico dessa variabilidade epigenética, ainda precisa ser investigada. Se a origem das diferenças de metilação do DNA observados ocorre durante o período entre o nascimento e a vida adulta desses animais é impossível saber no presente estudo, pois para cada uma das amostras utilizadas, não há amostras de períodos de vida precoce dos animais.

A variabilidade epigenética induzida por estímulos ambientais são um componente mais importante da teoria chamada *Developmental Origem of Health and Disease* (DOHaD) (UAUY *et al*, 2011; WOJTYLA, 2011; GILLMAN *et al*, 2007; NEWNHAM, 2007; SILVEIRA *et al*, 2007). O efeito da exposição a diferentes "epimutators" durante o desenvolvimento pré e pós-natal já foi reportado associado a etiologia de diferentes doenças em humanos e ratos concebidos *in vivo*.

Em ruminantes, apesar dos estudos em animais derivados de transferência nuclear e fertilização *in vitro*, as influências da história do desenvolvimento do epigenoma dos animais não tem sido investigado para *in vivo* (SU *et al*, 2011; YANG *et al*, 2005; SUTEEVUN-PHERMTHAI *et al*, 2009; CURCHOE *et al*, 2009; SUZUKI *et al*, 2009).

Apesar das consequências fenotípicas que as diferenças interindividuais na metilação do DNA podem provocar (assumindo possíveis influências sobre a origem de diversas doenças), se o mesmo ocorre *in vivo* em ruminantes ainda é uma questão a ser investigada.

Portanto, a variabilidade de *imprinting* genômico ocorrida nos protocolos de manipulação *in vitro* pode representar uma questão importante para o uso de tecidos bovinos como fonte de núcleos celulares em protocolos de biotecnologia, como a transferência nuclear. Se a LOI ocorrer durante a cultura *in vitro* para a obtenção de células doadoras de núcleo, é possível supor que as diferenças epigenéticas podem contribuir para a ocorrência de epimutações em animais clonados.

Além do foco das pesquisas nas ilhas CpGs nos genes regulados por *imprinting* genômico, as regiões a montante e a jusante das ilhas CpG (regiões *shores*) tem ganhado a atenção nos últimos cinco anos, como uma possível nova classe de DMRs atuando como regiões reguladoras (KINOSHITA *et al*, 2013; PERISIC *et al*, 2012; RAO *et al*, 2013; DOI *et al*, 2009).

Para a análise quantitativa de CGI-*shore*, encontramos meios para 5mC% de 83,30 (\pm 28.93) para o cérebro, 88,20 (\pm 8.91) para o coração, 90,60 (\pm 9.66) para os rins e, 80,10 (\pm 6.34) para o fígado (Figura 1B). Os coeficientes de variação foram 34,72% para o cérebro, de 10,10% para o coração, 10,66% para os rins e, 7,92% para o fígado. Ao invés de uma maior variabilidade encontrada ser na região CGI-*shore*, como muitos estudos mostram, em nosso estudo verificamos a situação inversa; tendo maior variabilidade na região CGI (DOI *et al*, 2009; IRIZARRY *et al*, 2009).

Devido à complexidade na estrutura genômica em genes regulados por *imprinting* genômico, as interpretações sobre possíveis novas sequências regulatórias devem ser cautelosas. Foi observado, a partir dos resultados de MSRE-qPCR, um perfil de hipermetilação do DNA. Não foram encontrados perfis de metilação que pudessem correlacionar a 5mC% na CGI *shore* com a expressão de *Peg1* nos tecidos analisados. No entanto, se observarmos na figura 5, a sobreposição da sequência analisada da CGI-*shore* ao possível *locus* ancorando o corpo gênico de um homólogo bovino do gene *MESTIT1* (*Mest Intronic Transcript 1*) essa locação poderia explicar pelo menos uma razão para os padrões de hipermetilação encontrados (Figura 6).

Apesar da clássica associação da metilação do DNA ao silenciamento gênico em regiões promotoras gênicas, o inverso tem sido relatado em corpos gênicos (*gene bodies*), onde a metilação do DNA está associada positivamente a atividade transcricional do gene (JJINGO *et al*, 2012, ARAN *et al*, 2011, HELLMAN & CHESS, 2007).

A própria existência de um homólogo *MESTIT1* em bovinos não tem sido identificado na literatura científica. No presente estudo, utilizando o par de *primers* para CGI-*shore* associada a *Peg1*DMR bovina, foi detectada transcrição dessa região em amostras de cérebro (cortéx frontal) e fígado, sendo essa a primeira detecção desse gene em bovinos.

A função do gene *MESTIT1*, um ncRNA (do inglês - *noncoding RNA*), foi sugerida por NAKABAYASHI *et al* (2002) como regulador de *Peg1/MEST*, no entanto, nenhuma caracterização molecular foi realizada nos últimos 12 anos. Outra evidência indireta da função de *MESTIT1* vem dos trabalhos de LI *et al* (2002), os quais identificaram a presença de transcritos de *MESTIT1* no testículo e em espermatozoides maduros em humanos. Esses autores sugerem que esse transcrito possa participar de eventos de fertilização em mamíferos.

A expressão de *MESTIT1* variou até 10 vezes entre amostras do mesmo tecido, sendo uma maior abundância relativa de transcritos detectada em tecido cerebral.

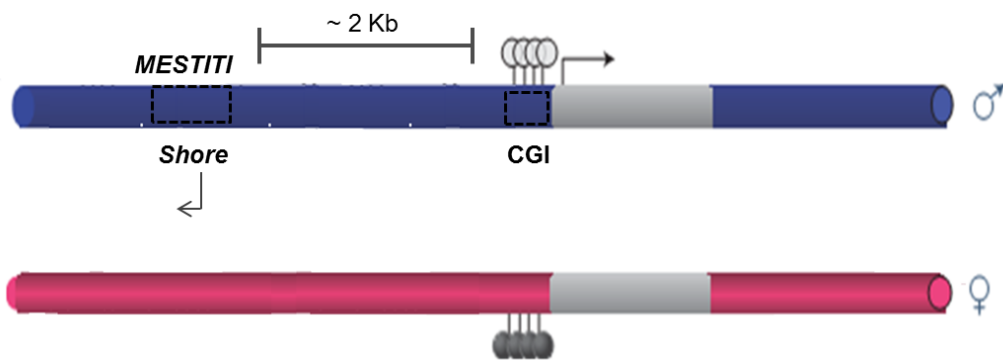


Figura 5. **Esquema hipotético da sobreposição do gene *MESTIT1* bovino e sua sobreposição a CGI-Shore identificada no presente estudo.** Posição da região CGI, CGI-Shore e do transcrito *MESTIT1*, demarcados pelos quadrados pontilhados.

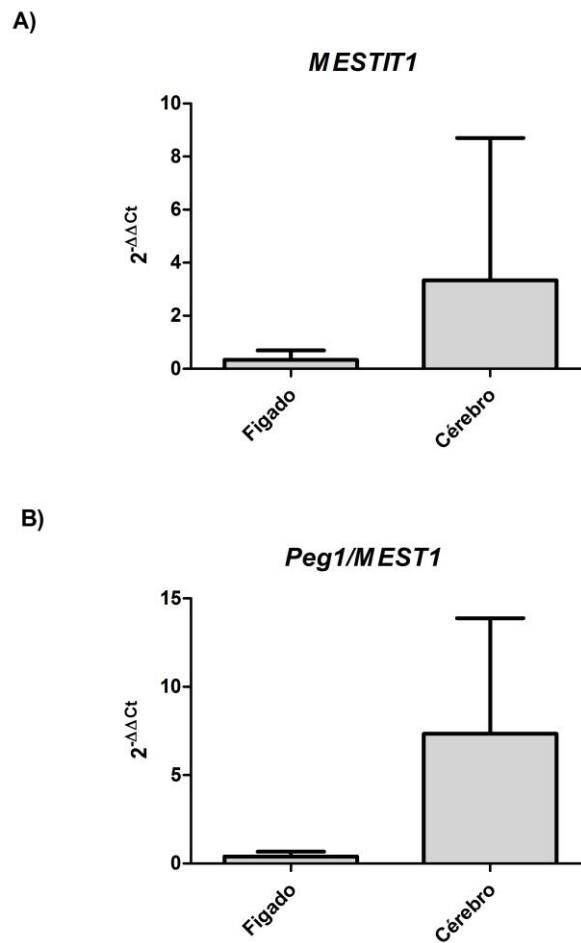


Figura 6. Gráfico representando as médias dos resultados de RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para o genes *Peg1/MEST* e *MESTIT1*. *Peg1/MEST* (Cérebro = 7.338, SD ±6.538; Fígado = 0.3894, SD ±0.2845) e *MESTIT1* (Cérebro = 3.335, SD ±5.366; Fígado = 0.3375, ±0.3576) bovinos, em amostras onde *MESTIT1* foi detectado (Cérebro e fígado).

5.3 Padrão de metilação do DNA em embriões bovinos através do ensaio de quantitative DNA methylation analysis follow inverse COBRA (qDMA-IC assay)

Apesar da utilização do ensaio de MSRE-qPCR durante a análise 5mC em tecidos somático, essa técnica não é eficaz para análise de concentrações diminutas de DNA (concentrações menores que 1 ng inicial de material). Para analisar o perfil de 5mC do DNA em amostras de embriões bovino no período pré-implantacional, tem sido desenvolvido junto ao grupo de Epigenética de Eucariotos, associado ao Laboratório de Biotecnologia (LBT/CBB/UENF) o protocolo de qDMA-IC o qual se baseia em princípios do ensaio de COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Assay*) e PCR quantitativo. O termo "*inverse COBRA*" vem da inversão do ensaio de restrição enzimática (utilizado pós-PCR: no ensaio de COBRA) utilizado antes da amplificação do DNA alvo.

Para obter concentrações suficientes de DNA foi empregado o protocolo de amplificação genômica total (*Genome Wide Amplification*) específica para DNA tratado com bissulfito de sódio (WBA - *Whole Bisulfite Amplification*) utilizando o *EpiTect Whole Bisulfite Kit* (Qiagen).

A partir de 5 ng de DNA genômico modificado com bissulfito de sódio, foram gerados 10 µl de DNA modificado. Para cada amostra utilizada no presente estudo, 5 µl de DNA modificado (aproximadamente 1.8 ng de DNA) foram submetidos ao ensaio de WBA, gerando aproximadamente 40 µg por ensaio. Esses resultados demonstram o sucesso na amplificação do genoma total a partir do *EpiTect Whole Bisulfite Kit* (QIAGEN).

Apesar da alta concentração de DNA gerado pelo ensaio de WBA, a amplificação do DNA por qPCR alcançando números de Cts entre 30 e 38 (foi observado que em Cts acima de 38, as replicatas apresentavam desvios de mais de um ciclo), foi necessário utilizar de 100 a 200 ng de DNA digerido com enzimas de restrição apresentando ao menos um dinucleotídeo CpG em sua sequência alvo, o que difere do protocolo MSRE-qPCR, onde podem ser realizados ensaios com uma média de 10 ng de gDNA por poço de PCR.

Para a análise da *Peg1*DMR bovina, apenas duas amostras de tecido somático e uma amostra de blastocisto individual foi possível analisar o padrão de metilação por qDMA-IC. Devido ao presente estudo ser a primeira caracterização desse ensaio, foi analisado também o padrão de metilação da *H19*DMR bovina no

intuito de investigar se outras sequências alvos, com outros pares de *primer* poderiam apresentar resultados diferentes. Para a análise de qDMA-IC foi possível obter resultados para 4 amostras de tecido somático e uma amostra de DNA embrionário.

As porcentagens de 5mC% estão presentes na tabela 3. A média da 5mC% para *H19DMR* (ensaio com *HhaI*) foi de 49.66 (SD \pm 14.36) para o ensaio qDMA-IC e, 61.18 (SD \pm 7.14) para o ensaio de MSRE-qPCR. As amostras onde a análise da *Peg1DMR* (ensaio com *FauI*) foi possível mostrar uma tendência a hipermetilação em tecido somático (Tabela 3) e; a única amostra de embrião analisada apresentou um perfil de 20% de metilação. Apesar de apenas uma amostra de embrião ter sido analisada para a 5mC% (aproximadamente 20% de 5mC) na *Peg1DMR* bovina, os resultados são parecidos com o trabalho publicado por HUNTRISS *et al* (2011), os quais obtiveram um resultado 14% de metilação do DNA na *PEG1DMR* em embriões humanos por pirosequenciamento.

Amostras	qMDA-IC (5mC%)	MSRE-qPCR (5mC%)
<i>H19DMR</i> – FIG	74.045199	67.54615982
<i>H19DMR</i> – RIM	39.72274	67.03910168
<i>H19DMR</i> – CER	47.855985	53.66770579
<i>H19DMR</i> – COR	38.384351	56.48615181
<i>H19DMR</i> – Embrião	48.295055	NA
<i>Peg1DMR</i> – Embrião	20.611607	NA
<i>Peg1DMR</i> – COR	96.708946	40.27892263
<i>Peg1DMR</i> – FIG	99.038053	36.24371741

Tabela 3. **Resultados de porcentagem de 5mC% para *Peg1DMR* e *H19DMR* bovina utilizando os ensaios de MSRE-qPCR e qDMA-IC.** CER = Cérebro (Córtex frontal); RIM = amostras de tecido renal; COR = músculo cardíaco; FIG = fígado bovino; Embrião = Blastocisto no sétimo dia de desenvolvimento; NA = Não avaliado.

Comparando os resultados entre MSRE-qPCR e de qDMA-IC foi observado variações entre as técnicas para hipometilação e hipermetilação ocorrendo uma tendência para hipometilação quando analisados os mesmos pontos de metilação do DNA na H19DMR. Uma explicação para esse tipo de resultado poderia ser o efeito da clivagem diferencial entre os ensaios. No ensaio de MSRE-qPCR, considerando ambas as fitas do DNA como metiladas, as enzimas de restrição sensíveis a metilação do DNA podem ser bloqueadas por metilação total de um (*FauI*) ou dois (*HhaI*) nucleotídeos "C" em seu sítio de restrição.

Nesse cenário, o ensaio de MSRE-qPCR pode encontrar vários padrões de alelos considerados como "metilados". No ensaio de qDMA-IC, o cenário para identificação e quantificação de alelos metilados é menor, o que poderia explicar a tendência de hipometilação do DNA em algumas amostras, como mostrado na Figura 4 e Tabela 3. Devido ao presente estudo ser a primeira tentativa de utilização do ensaio qDMA-IC, a comparação com metodologias semelhantes é indireta mas, pode auxiliar no esclarecimento de alguns dos resultados encontrados.

Quanto a hipometilação do DNA, esse tipo de resultado já foi relatado em experimentos de análise da metilação do DNA em técnicas que utilizam a modificação por bissulfato de sódio (SHEN *et al*, 2007, WARNECKE *et al*, 1997). WARNECKE *et al* (1997) hipotetizaram que esse efeito seria resultado da formação de estruturas secundárias na molécula de DNA do alelo metilado pós tratamento com bissulfato de sódio. Essa formação de estruturas secundárias no alelo metilado, dificultaria o acesso ao mesmo durante a PCR, facilitando a amplificação do alelo não metilado. Como medida para prevenir esse tipo de efeito, SHEN *et al* (2007) demonstraram que o aumento da temperatura de pareamento (*annealing*) durante os ensaios de PCR (utilizando 60°C) diminui ou elimina a tendência de amplificação preferencial do alelo não metilado.

Quando DNA modificado por bissulfato de sódio é submetido a amplificação genome wide, o mesmo efeito tem sido relatado, como por exemplo no ensaio de qMAMBA (*quantitative Methylation Analysis of Minute DNA amounts after whole Bisulfite Amplification*) (REINS *et al*, 2011). Para o ensaio de qDMA-IC foram utilizadas temperaturas de *annealing* de 60°C, o que deveria prevenir a amplificação preferencial do alelo não metilado. No entanto, o ensaio de qDMA-IC difere dos ensaios de qMAMBA e pirosequenciamento direto (onde a análise quantitativa é

focada na fase de *plateau* da reação de PCR). A quantificação alélica do qDMA-IC é centrada na fase exponencial da reação de qPCR.

Esse foco diferente na quantificação alélica pode ainda sofrer uma tendência à amplificação do alelo metilado, devido à pré-tratamento do DNA com enzimas de restrição que eliminam sequências metiladas para possibilitar a quantificação do alelo não metilado.

A utilização de enzimas de restrição com sítios de corte apresentando mais de um nucleotídeo C seguido de G, poderia gerar uma variabilidade no número de alelos amplificados durante a fase de qPCR (Figura 7).

Quando analisados em paralelo, os resultados da quantificação de 5mC em amostras de fígado e coração por MSRE-qPCR e qMDA-IC utilizando enzimas de restrição com diferentes números de cópia na sequência alvo (consequentemente diferente número de nucleotídeos "C" seguido de "G") (Fig 7) demonstra os possíveis resultados de clivagem e estabelecimento de alelos metilados e não metilados na quantificação utilizando as enzimas *FauI* e *HhaI*, que possuem apenas um sítio de clivagem nos alelos das regiões analisadas.

Apesar da possibilidade de se analisar diversas regiões a partir de quantidades pequenas de DNA inicial, proporcionada pela amplificação do DNA modificado por bissulfito de sódio no ensaio de qDMA-IC, a variabilidade entre os resultados de 5mC% entre amostras analisadas por ambas as técnicas no presente estudo abre uma discussão sobre a variabilidade induzida devido a características de cada uma delas. Para que ambas possam ser melhor investigadas e qual perfil de metilação se aproxima de um resultado real, as amostras analisadas deverão ser reanalisadas por sequenciamento de DNA modificado por bissulfito de sódio. Devido ao perfil de metilação assimétrico de reconhecimento de algumas enzimas, ambas as fitas de DNA deverão ser sequenciadas.

A)

Digestão pré-amplificação (<i>Faul</i>)	Digestão pós-amplificação WBA (<i>Faul</i>)
m5 GGGCG CCCGC sw	Clivagem bloqueada
GGGCG CCCGC sw	Clivagem bloqueada
GGGCG CCCGC	Clivagem
	GGGTG TTTAT Não clivagem

B)

Digestão pré-amplificação (<i>HhaI</i>)	Digestão pós-amplificação WBA (<i>HhaI</i>)
m5 m5 GCGC CGCG sw sw	Clivagem bloqueada
m5 GCGC CGCG sw	Clivagem bloqueada
m5 GCGC CGCG sw	Clivagem bloqueada
m5 GCGC CGCG sw	Clivagem bloqueada
GCGG CCGC	Clivagem
	GCGC CGCC Clivagem
	GTGT CACA Não clivagem
	GTGC CACG Não clivagem
	GCGT CGCA

Figura 7. Representação esquemática demonstrando os padrões de clivagem do DNA nos ensaios de MSRE-qPCR e qDMA-IC para as enzimas *Faul* (A) e *HhaI* (B). (Fonte REBASE website. <http://rebase.neb.com/cgi-bin/>).

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os níveis de metilação na *Peg1*DMR bovina podem apresentar variações dos níveis hipotéticos esperados para genes marcados (aprox. 50% de metilação do DNA) de maneira tecido específica;
- ✓ A região identificada como uma CGI-*shore*, com sequência evolucionariamente conservada, corresponde a gene homólogo *MESTIT1* (um ncRNA) bovino transcrito em amostras de cérebro e fígado analisadas;
- ✓ Essa foi a primeira identificação da transcrição de *MESTIT1* em bovinos, cuja transcrição pode estar relacionada aos perfis de hipermetilação do DNA encontrada nessa região;
- ✓ O protocolo de qDMA-IC, mostrou-se eficiente para amplificação da metilação do DNA a partir de amostras com baixa concentração de DNA inicial;
- ✓ Devido a variabilidade encontrada em amostras de tecido somático, a 5mC% encontrada em embriões no período de blastocisto ainda precisa ser comparada a protocolos padrões como sequenciamento de DNA modificado por bissulfato de sódio.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Devido a variação encontrada nos níveis de 5mC% na *Peg1*DMR bovina em animais adultos, estudos similares deverão ser efetuados em amostras de animais recém nascidos para identificar e estimar o impacto de fatores ambientais sobre o *status* epigenético dessa região;
- ✓ Apesar do ensaio qDMA-IC ser capaz de avaliar a metilação do DNA em amostras de 20 a 100 células, as diferenças nos ensaios com tecido somáticos (controle conhecido) sugerem que variações entre protocolos devam ser melhor investigados para estimar os reais níveis de metilação do DNA de cada amostra.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR & HALLIDAY. **A review of known *imprinting* syndromes and their association with assisted reproduction technologies.** Human Reproduction. Vol: 23. Pages: 2826 - 2834, 2008

ARAN, TOPEROFF, G., ROSENBERG, M., HELLMAN, A. **Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes.** Human Molecular Genetics. Vol: 20. Pages: 4670 – 680, 2011

BIERNE, H., HAMON, M., COSSART, P. **Epigenetics and bacterial infections.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Vol:2. Pages: 1 - 25, 2012

BILIYA, S., & BULLAR JR, L.A. **Genomic *imprinting*: the influence of differential methylation in the two sexes.** Experimental Biology and Medicine. Vol: 235. Pages: 139 - 147, 2010

BOKS, M.P., DERKS, E.M., WEISENBERGER, D.J., STRENGMAN, E., JANSON, E., SOMMER, I.E., KAHN, R.S., OPHOFF, R.A. **The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls.** Plos One. Vol: 4. Pages: 1 - 8, 2009

BOURC'HIS, D., LE BOURHIS, D., PATIN, D., NIVELEAU, A., COMIZZOLI, P., RENARD, J.P., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. **Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos.** Current Biology. Vol: 2. Pages: 1542 - 1546, 2001

BUITING, K., SAITOH, S., GROSS, S., DITTRICH, B., SCHWARTZ, S., NICHOLLS, R.D., HORSTHEMKE, B. **Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willis syndromes define an *imprinting* centre on human chromosome 15.** National Genetics. Vol: 9. Pages: 395 – 400, 1995

CURCHOE, C.L.; ZHANG, S.; YANG, L.; PAGE, R.; TIAN, X.C. **Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle.** Animal Reproduction Science. Vol: 116. Pages: 213 – 225, 2009

DAY, J.J & SWEATT, J.D. **Epigenetic mechanisms in cognition.** Neuron. Vol: 70. Pages: 813 - 829, 2011

DE RYCKE, M., LIEBAERS, I., STEIRTEGHEM, A.V. **Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance.** Human Reproduction. Vol: 17. Pages: 2487 - 2494, 2002

DEAN, W., SANTOS, F., STOJKOVIC, M., ZAKHARTCHENKO, V., WALTER, J., WOLF, E., REIK, W. **Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos.** Proceedings of the National Academy of Science. Vol: 98. Pages: 13734 - 13738, 2001

DEATON & BIRD. **CpG island and the regulation of transcription.** Genes & Development. Vol: 25. Pages: 1010 - 1022, 2011

DENOMME, M.M., WHITE, C.R., GILLIO-MEINA, C., MACDONALD, W.A., DEROO, B.J., KIDDER, G.M., MANN, M.R.W. **Compromised fertility disrupts Peg1 but not Snrpn and Peg3 imprinted methylation acquisition in mouse oocytes.** Vol: 3. Pages: 1 - 11, 2012

DOHERTY, A.S., MANN, M.R.W., TREMBLAY, K.D., BARTOLOMEI, M.S. **Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo.** Biology of Reproduction. Vol: 62. Pages: 1526 - 1535, 2000

DOI, K., PARK, I-H., WEN, B., MURAKAMI, P., ARYEE, M.J., IRIZARRY, R., HERB, B., LADD-ACOSTA, C., RHO, J., LOEWER, S., MILLER, J., SCHLAEGER, T.,

DALEY, G.Q., FEINBERG, A. **Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts.** Nature Genetics. Vol: 41. Pages: 1350 - 1353, 2009

EROGLU & LAYMAN. **Role of ART in *imprinting* disorders.** SeminReprod Med. Vol: 93. Pages: 92 - 104, 2012

FEINBERG, A.P. **Epigenetics at the epicenter of modern medicine.** JAMA. Vol: 299. Pages: 1345 – 1350, 2008

FOUSE, S.D., NAGARAJAN, R.P., COSTELLO, J.F. **Genome-scale DNA methylation analysis.** Epigenomics. Vol: 2. Pages: 105 - 117, 2010

FOWDEN, A.L., COAN, P.M., ANGIOLINI, E., BURTON, G.J., CONSTANCIA, M. **Imprinted genes ant the epigenetic regulation of placental phenotype.** Progress in Biophysics and Molecular Biology. Vol: 106. Pages: 281 - 288, 2011

FROMMER, M., MCDONALD, L.E., MILLAR, D.S., COLLIS, C.M., WATT, F., GRIGG, G.W., MOLLOY, P.L., PAUL, C.L. **A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.** Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol: 89. Pages: 1827 - 1831, 1992

GILLMAN, M.W., BARKER, D., BIER, D., CAGAMPANG, F., CHALLIS, J., FAL,L C., GODFREY, K., GLUCKMAN, P., HANSON, M., KUH, D., NATHANIELSZ, P., NESTEL, P., THORNBURG, K.L. **Meeting report on the 3rd Internacional Congress on Developmental origins of Health and Disease (DOHaD).** Pediatric Research. Vol: 61. Pages: 625 - 629, 2007

GOMES, M.V., GOMES, C.C., PINTO-JR, W., RAMOS, E.S. **Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann Syndrome conceived by ICSI.** American Journal of Medical Genetics. Vol: 143. Pages: 625 - 29, 2007

GONG, L., PAN, Y.X., CHEN, H. **Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation.** Epigenetics. Vol: 5. Pages: 619 - 626, 2010

GOSDEN, R., TRASLER, J., LUCIFERO, D., FADDY, M. **Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology.** Lancet. Vol: 361. Pages: 1975 - 1977, 2003

GUPTA, R., NAGARAJAN, A., WAJAPEREE, N. **Advances in genome-wide DNA methylation analysis.** BioTechniques. Vol: 10. Pages: 3 - 11, 2010

HACKETT, J.A., ZYLICZ, J.J., SURANI, M.A. **Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline.** Trends in Genetics. Vol: 28. Pages: 164 -174, 2012

HALES, B.F., GRENIER, L., LALANCETTE, C & ROBAIRE, B. **Epigenetic programming: from gametes to blastocyst.** Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology. Vol: 91. Pages: 652 – 665, 2011

HASHIMOTO, K., KOKUBUN, S., ITOI, E., ROACH, H.I. **Improved quantification of DNA methylation using methylation-sensitive restriction enzymes and Real-Time PCR.** Epigenetics. Vol: 2. Pages: 86 - 95, 2007

HE, X-J., CHEN, T., ZHU, J-K. **Regulation and function of DNA methylation in plants and animals.** Cell Research. Vol: 21. Pages: 442 - 465, 2011

HE, Y.F., LI, B.Z., LI, Z., LIU, P., WANG, Y., TANG, Q., DING, J., JIA, Y., CHEN, Z., LI, L., SUN, Y., LI, X., DAI, Q., SONG, C.X., ZHANG, K., HE, C., XU, G.L. **Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.**

Science. Vol: 333. Pages: 1303 – 1307, 2011

HEIJMANS, B.T., TOBI, E.W., STEIN, A.D., PUTTER, H., BLAUW, G.J., SUSSER, E.S., SLAGBOOM, P.E., LUMEY, L.H. **Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.**

Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. Vol: 105. Pages: 17046 - 17049, 2008

HELLMAN, A. & CHESS, A. **Gene body-specific methylation on the active X chromosome.** Science. Vol: 315. Pages: 1141 – 1143, 2007

HIENDLEDER, S., WIRTZ, M., MUND, C., KLEMP, M., REICHENBACH, H-D., STOJKOVIC, M., WEPPERT, M., WENIGERKIND, H., ELMLINGER, M., LYKO, F. **Tissue-specific effects of *in vitro* fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses.**

Biology of Reproduction. Vol: 75. Pages: 17 – 23, 2006

HIURA, H., OKAE, H., MIYAUCHI, N., SATO, F., SATO, A., VANDEPETTE, M. **Characterization of DNA methylation errors in patients with *imprinting disorders* conceived by assisted reproduction technologies.**

Human Reproduction. Vol: 27. Pages: 41 – 48, 2012

HOYO, C., MURTHA, A.P., SCHILDKRAUT, J.M., JIRTLE, R.L., DEMARK-WAHNEFRIED, W., FORMAN, M.R., IVERSEN, E.S., KURTZBERG, J., OVERCASH, F., HUANG, Z., MURPHY, S.K. **Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy.**

Epigenetics. Vol: 6. Pages: 928 - 936, 2011

HUNTRISS, J., WOODFINE, K., HUDDLESTON, J.E., MURRELL, A., RUTHERFORD, A.J., ELDER, K., KHAN, A.A., HEMMINGS, K., PICTON, H. **Quantitative analysis of DNA methylation of imprinted genes in single human blastocysts by pyrosequencing.** Fertility and Sterility. Vol. 30. Pages: 2564-2567, 2011

ILIADOU, A.N., JANSON, P.C.J., CNATTINGIUS. **Epigenetic and assisted reproductive technology.** Journal of Internal Medicine. Vol: 270. Pages: 414 - 420, 2011

IRIZARRY, R.A., LADY-ACOSTA, C., WEN, B., WU, Z., MONTANO, C., ONYANGO, P., CUI, H., GABO, K., RONGIONE, M., WEBSTER, M., JI, H., POTASH, J., SABUNCIYAN, S., FEINBERG, A.P. **Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores.** Nature Genetics. Vol: 41. Pages: 178 - 186, 2009

ITO, S., SHEN, L., DAI, Q., WU, S.C., COLLINS, L.B., SWENBERG, J.A., HE, C., ZHANG, Y. **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.** Science. Vol: 333. Pages: 1300 - 1303, 2011

JELENIC, P., SHAW, P. **Loss of imprinting and cancer.** Journal of Pathology. Vol: 3. Pages: 261 - 268, 2007

JEONG, M., SUN, D., LUO, M., HUANG, Y., CHALLEN, G.A., RODRIGUEZ, B., ZHANG, X., CHAVEZ, L., WANG, H., HANNAH, R., KIM, S.B., YANG, L., KO, M., CHEN, R., GOTTGENS, B., LEE, J.S., GUNARATNE, P., GODLEY, L.A., DARLINGTON, G.J., RAO, A., LI, W., GOODELL, M.A. **Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a.** Nature Genetics. Vol: 46. Pages: 17 - 26, 2013

JIN, B., LI, Y., ROBERTSON, K.D. **DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?**. *Genes & Cancer*. Vol: 2. Pages: 607 - 617, 2011

JIRTLE & WEIDMAN. **Imprinted and more equal**. *American Scientist*. Vol: 95. Pages: 143 - 149, 2007

JJINGO, D., CONLEY, A.B., YI, S.V., LUNYAK, V.V., JORDAN, I.K. **On the presence and role of human gene-body DNA methylation**. *Oncotarget*. Vol.3. Pages: 462 - 474, 2012

JOHN, R.M., LEFEBVRE, L. **Developmental regulation of somatic imprints**. *Differentiation*. Vol: 81. Pages: 270 - 280, 2011

KAGAMI, M., NAGAI, T., FUKAMI, M., YAMAZAWA, K., OGATA, T. **Silver-Russell syndrome in a girl born after *in vitro* fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of *Peg1/MEST***. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Vol: 24. Pages: 131 - 136, 2007

KANEKO-ISHINO, T., KUROIWA, Y., MIYOSHI, N., KOHDA, T., SUZUKI, R., YOKOYAMA, M., VIVILLE, S., BARTON, S.C., ISHINO, F., SURANI, M.A. ***Peg1/Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization**. *Nature*. Vol: 11. Pages: 52 - 59, 1995

KHOSLA, S., DEAN, W., BROWN, D., REIK, W., FEIL, R. **Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes**. *Biology of Reproduction*. Vol: 64. Pages: 918 – 926, 2001

KIM, K.P., THURSTON, A., MUMMERY, C., WARD-VAN OOSTWAARD, D., PRIDDLE, H., ALLEGRUCCI, C., DENNING, C., YOUNG, L. **Gene-specific vulnerability to *imprinting* variability in human embryonic stem cell lines**. *Genome Research*. Vol: 17. Pages: 1731 – 1742, 2007

KIM, K.P., THURSTON, A., MUMMERY, C., WARD-VAN OOSTWAARD D, PRIDDLE, H., ALLEGRUCCI, C., DENNING, C., YOUNG, L. **Gene-specific vulnerability to *imprinting* variability in human embryonic stem cell lines.** Genome Research. Vol: 12. Pages: 1731 - 42, 2007

KINOSHITA, M., NUMATA, S., TAJIMA, A., SHIMODERA, S., ONO, S., IMAMURA, A., IGA, J., WATANABE, S., KIKUCHI, K., KUBO, H., NAKATAKI, M., SUMITANI, S., IMOTO, I., OKAZAKI, Y., OHMORI, T. **DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia.** Neuromolecular Medicine. Vol: 15. Pages: 95 - 101, 2013

KOBAYASHI, S., KOHDA, T., MIYOSHI, N., KUROIWA, Y., AISAKA, K., TSUTSUMI, O., KANEKO-ISHINO, T., ISHINO, F. **Human *Peg1/MEST*, an imprinted gene on chromosome 7.** Human Molecular. Genetics. Vol: 6. Pages: 781 - 786, 1997

KOSAKI, K., KOSAKI, R., CRAIGEN, W.J., MATSUO, N. **Isoform-specific *imprinting* of the human *Peg1/MEST* gene.** The American Journal of Human Genetics. Vol: 66. Pages: 309 - 312, 2000

KOUKOURA, O., SIFAKIS, S., SOUFLA, G., ZARAVINOS, A., APOSTOLIDOU, S., JONES, A., WIDSCHWENDTER, M., SPANDIDOS, D.A. **Loss of *imprinting* and aberrant methylation of *IGF2* in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction.** Internacional Journal of Molecular Medicine. Vol: 28. Pages: 480 - 487, 2011

LEPIKHOV, K., WOSSIDLO, M., ARAND, J & WALTER, J. **DNA methylation reprogramming and DNA repair in the mouse zygote.** International Journal of Developmental Biology. Vol: 54. Pages: 1565 – 1574, 2010

LI, T., VU, T.H., LEE, K-O., YANG, Y., NGUYEN, C.V., BUI, H.Q., ZHENG, Z-L., NGUYEN, B.T., HU, J-F., MURPHY, S.K., JIRTLE, R.L., HOFFMAN, A.R. **An imprinted *Peg1/MEST* antisense expressed predominantly in human testis and**

in mature spermatozoa. The Journal of Biological Chemistry. Vol: 277. Pages: 13518 - 13527, 2002

LOOS, F., VAN VLIET, C., VAN MAURIK, P. **Morphology of immature bovine oocytes.** Gamete Research. Vol: 24. Pages: 197 - 204, 1989

LUCIFERO, D., MANN, M.R., BARTOLOMEI, M.S., TRASLER, J.M. **Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting.** Human Molecular Genetics. Vol: 13. Pages: 839 – 849, 2004

MANIPALVIRATN, S., DECHERNEY, A., SEGARS, J. **Imprinting disorders and assisted reproductive technology.** Fertility and Sterility. Vol:3. Pages: 05 – 15, 2009

MAYER, W., NIVELEAU, A., WALTER, J., FUNDELE, R., HAAF, T. **Demethylation of the zygotic paternal genome.** Nature. Vol: 403. Pages: 501 – 502, 2000

MCMINN, J., WEI, M., SADOVSKY, Y., THAKER, H.M., TYCKO, B. **Imprinting of Peg1/MEST isoform 2 in human placenta.** Placenta. Vol: 27. Pages: 119-126, 2004

MEYER, E., WOLLMANN, H.A., EGGERMANN T. **Searching for genomic variants in the MESTIT1 transcript in Silver-Russell syndrome patients.** Journal of Medical Genetics. Vol: 40. Pages: 1 - 2, 2003

MEYER, E., WOLLMANN, H.A., EGGERMANN, T. **Searching for genomic variants in the MESTIT1 transcript in Silver-Russell syndrome patients.** Journal of Medical Genetics. Vol: 40. Pages: 01 - 02, 2003

MOON, Y-S., PARK, S-K., KIM, H-T., LEE, T.S., KIM, J.H., CHOI, Y.S. **Imprinting and Expression Status of Isoforms 1 and 2 of Peg1/MEST Gene in Uterine Leiomyoma.** Gynecology and Obstetric Investigation. Vol: 70. Pages: 120 – 125, 2010

NAKABAYASHI, K., BENTLEY, L., HITCHINS, M.P., MITSUYA, K., MEGURO, M., MINAGAWA, S., BAMFORTH, J.S., STANIER, P., PREECE, M., WEKSBERG, R., OSHIMURA, M., MOORE, G.E., SCHERER, S.W. **Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (*MESTIT1*) in the human MEST locus on chromosome 7q32.** Human Molecular Genetics. Vol: 11. Pages: 1743 - 1756, 2002

NEWELL-PRICE, J., CLARK, A.J., KING, P. **DNA methylation and silencing of gene expression.** Trends in Endocrinology & Metabolism. Vol: 11. Pages: 142 – 148, 2000

NEWNHAM, J.P. **The developmental origins of health and disease (DOHaD) - why it is so important to those who work in fetal medicine.** Ultrasound Obstetrics & Gynecology. Vol: 29. Pages: 121 - 123, 2007

NIEMANN, H & WRENZYCKI, C. **Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development.** Theriogenology. Vol: 53. Pages: 21 - 34, 2000

OLERUP O, & ZETTERQUIST, H. **HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation.** Tissue Antigens. Vol: 39. Pages: 225 – 35, 1992

OSWALD, J., ENGEMANN, S., LANE, N., MAYER, W., OLEK, A., FUNDELE, R., DEAN, W., REIK, W., WALTER, J. **Active demethylation of the paternal genome in the mouse-zygote.** Current Biology. Vol: 10. Pages: 475 – 478, 2000

PELIZZOLA, M & ECKER, J.R. **The DNA methylome.** FEBS Letter. Vol: 585. Pages: 1994 - 2000, 2011

PERISIC, T., HOLLSBOER, F., REIN, T., ZSCHOCKE, J. **The CpG island shore of the GLT-1 gene acts as a methylation-sensitive enhancer.** *Glia*. Vol: 60. Pages: 1345 - 1355, 2012

PERNG, W., ROZEK, L.S., MORA-PLAZAS, M., DUCHIN, O., MARIN, C., FORERO, Y., BAYLIN, A., VILLAMOR, E. **Micronutrient status and global DNA methylation in school-age children.** *Epigenetics*. Vol: 7. Pages: 1133 - 1141, 2012

POPLINSKI, A., TUTTELMANN, F., KANBER, D., HORSTHEMKE, B., GROMOLL, J. **Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1.** *International Journal of Andrology*. Vol: 4. Pages: 642 - 649, 2010

QIN, W., LEONHARDT, H., PICHLER, G. **Regulation of DNA methyltransferase 1 by interaction and modifications.** *Nucleus*. Vol: 2. Pages: 392 - 402, 2011

RAO, X., EVANS, J., CHAE, H., PILROSE, J., KIM, S., YAN, P., HUANG, R.L., LAI, H.C., LIN, H., LIU, Y., MILLER, D., RHEE, J.K., HUANG, Y.W., GU, F., GRAY, J.W., HUANG, T.M., NEPHEW, K.P. **CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer.** *Oncogene*. Vol: 32. Pages: 4519 - 4528, 2013

REIK, W., DEAN, W., WALTER, J. **Epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Science*. Vol: 293. Pages: 1089 - 1093, 2001

REINS, J., MOSSNER, M., RICHTER, L., KMETSCH, A., THIEL, E., HAASE, D., HOFMANN, W.K. **Whole genome amplification of sodium bisulfite converted DNA can substantially impact quantitative methylation analysis using pyrosequencing.** *Biotechniques*. Vol: 50. Pages: 161 – 164, 2011

RIESEWIJK, A.M., BLAGITKO, N., SCHINZEL, A.A., HU, L., SCHULZ, U., HAMEL, B.C.J., ROPERS, H-H., KALSCHEUER, V.M. **Evidence against a major role of Peg1/MEST in silver-russel syndrome.** *European Journal of Human Genetics*. Vol: 6. Pages: 114 - 120, 1998

RIESEWIJK, A.M., HU, L., SCHULZ, U., TARIVERDIAN, G., HOGLUND, P., KERE, J., ROPERS, H.H., KALSCHEUER. **Monoallelic expression of human *Peg1/MEST* is paralleled by parent-specific methylation in fetuses.** Genomics. Vol: 42. Pages: 236 - 244, 1997

RIPOCHE, M-A., KRESS, C., POIRIER, F., DANDOLO, L. **Deletion of the *H19* transcription unit reveals the existence of a putative *imprinting* control element.** Genes Developmental. Vol: 11. Pages: 1596 – 1604, 1997

SEISENBERGER, S., PEAT, J.R., HORE, T.A., SANTOS, F., DEAN, W., REIK, W. **Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers.** Philisophical Transactions of the Royal Society. Vol: 368. Pages: 01 - 11, 2012

SHEN, L., GUO, Y., CHEN, X., AHMED, S., ISSA, J.P. **Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis.** Biotechniques. Vol: 42. Pages: 48 – 52, 2007

SHIN, S.H., PARK, S.Y., KO, J.S., KIM, N., KANG, G.H. **Aberrant CpG island hypermethylation in pediatric gastric mucosa in association with *Helicobacter pylori* infection.** Archives of Pathology & Laboratory Medicine. Vol: 135. Pages: 759 - 765, 2011

SILVEIRA, P.P., PORTELLA, A.K., GOLDANI, M.Z., BARBIERI, M.A. **Developmental origins of health and disease (DOHaD).** Jornal de Pediatria. Vol: 83. Pages: 494 - 504, 2007

SMITH & MURPHY. **Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals.** Cloning and Stem Cells. Vol: 6. Pages: 126 - 132, 2004

SOUBRY, A., MURPHY, S., HUANG, Z., MURTHA, A., SCHILDKRAUT, J., JIRTLE, R., WANG, F., KURTZBERG, J., DEMARK-WAHNEFRIED, W., FORMAN, M., HOYO, C. **The effects of depression and use of antidepressive medicines during pregnancy on the methylation status of the IGF2 imprinted control regions in the offspring.** *Clinical Epigenetics*. Vol: 3. Pages: 1 - 10, 2011

STEEGERS-THEUNISSEN, R.P., OBERMANN-BORST, S.A., KREMER, D., LINDEMANS, J., SIEBEL, C., STEEGERS, E.A., SLAGBOOM, P.E., HEIJMANS, B.T. **Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child.** *Plos One*. Vol: 4. Pages: 1 - 5, 2009

SU, H., LI, D., HOU, X., TAN, B., HU, J., ZHANG, C., DAI, Y., LI, N., LI, S. **Molecular structure of bovine Gtl2 gene and DNA methylation status of Dlk1-Gtl2 imprinted domain in cloned bovines.** *Animal Reproduction Science*. Vol: 127. Pages: 23 - 30, 2011

SURANI, M.A. ***Imprinting* and the initiation of gene silencing in the germ line.** *Cell*. Vol: 93. Pages: 309 – 312, 1998

SUTCLIFFE, J.S., NAKAO, M., CHRISTIAN, S., ORSTAVIK, K.H., TOMMERUP, N., LEDBETTER, D.H., BEAUDET, A.L. **Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative *imprinting* control region.** *Nature Genetics*. Vol: 8. Pages: 52 – 58, 1994

SUTEEVUN-PHERMTHAI, T., CURCHOE, C.L., EVANS, A.C., BOLAND, E., RIZOS, D., FAIR, T., DUFFY, P., SUNG, L.Y., DU, F., CHAUBAL, S., XU, J., WECHAYANT, T., YANG, X., LONERGAN, P., PARNPAI, R., TIAN, X.C. **Allelic switching of the imprinted IGF2R gene in cloned bovine fetuses and calves.** *Animal Reproduction Science*. Vol: 116. Pages: 19 - 27, 2009

SUZUKI, J., THERRIEN, J., FILION, F., LEFEBVRE, R., GOFF, A.K., SMITH, L.C. ***In vitro* culture and somatic cell nuclear transfer affect *imprinting* of SNRPN gene**

in pre- and post-implantation stages of development in cattle. BMC Developmental Biology. Vol: 9. Pages: 1 - 13, 2009

SUZUKI, J., THERRIEN, J., FILLION, F., LEFEBVRE, R., GOFF, A.K., PERECIN, F., MEIRELLES, F.V. **Loss of Methylation at *H19* DMD Is Associated with Biallelic Expression and Reduced Development in Cattle Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer.** Biology of Reproduction. Vol: 84. Pages: 947 – 956, 2011

TAHILIANI, M., KOH, K.P., SHEN, Y., PASTOR, W.A., BANDUKWALA, H., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., IYER, L.M., LIU, D.R., ARAVIND, L., RAO, A. **Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1.** Science. Vol: 324. Pages: 930 – 935, 2009

TAMASHIRO, K.L., WAKAYAMA, T., BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., YANAGIMACHI, R. **Posnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells.** Biology of Reproduction. Vol: 1. Pages: 328 - 334, 2000

THOMPSON, J.G., KIND, K.L., ROBERTS, C.T., ROBERTSON, S.A., ROBINSON, J.S. **Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies.** Human Reproduction. Vol.17. Pages: 2783 – 2786, 2002

TOBI, E.W., LUMEY, L.H., TALENS, R.P., KREMER, D., PUTTER, H., STEIN, A.D, SLAGBOOM, P.E., HEIJMANS, B.T. **DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific.** Human Molecular Genetics. Vol: 18. Pages: 4046 - 4053, 2009

TYCKO, B. **Allele-specific DNA methylation: beyond *imprinting*.** Human Molecular Genetics. Vol: 19. Pages: 210 - 220, 2010

UAUY, R., KAIN, J., CORVALAN, C. **How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries?** *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol: 94. Pages: 01 - 12, 2011

VIDAL, A.C., MURPHY, S.K., MURTHA, A.P., SCHILDKRAUT, J.M., SOUBRY, A., HUANG, Z., NEELON, S.E., FUEMMELER, B., IVERSEN, E., WANG, F., KURTZBERG, J., JIRTLE, R.L., HOYO, C. **Associations between antibiotic exposure during pregnancy, birth weight and aberrant methylation at imprinted genes among offspring.** *Internacional Journal of Obesity*. Vol: 37. Pages: 907 - 913, 2013

WARNECKE, P.M., STIRZAKER, C., MELKI, J.R., MILLAR, D.S., PAUL, C.L., CLARK, S.J. **Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA.** *Nucleic Acids Res*. Vol: 25. Pages: 4422 – 4426, 1997

WATERLAND, R.A., KELLERMAYER, R., LARITSKY, E., RAYCO-SOLON, P., HARRIS, R.A., TRAVISANO, M., ZHANG, W., TORSKAYA, M.S., ZHANG, J., SHEN, L., MANARY, M.J., PRENTICE, A.M. **Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles.** *Plos Genetics*. Vol: 6. Pages: 1 - 10, 2010

WOJTYŁA, A. **Application of the hypothesis of Developmental Origin of Health and Diseases (DOHaD) in epidemiological studies of women at reproductive age and pregnant women in Poland.** *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. Vol: 18. Pages: 355 - 364, 2011

WOODFINE, K., HUDDLESTON, J.E., MURRELL, A. **Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue.** *Epigenetics Chromatin*. Vol: 4. Pages: 1- 13, 2011

WRENZYCKI, C., HERMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS JR, A., SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., NIEMANN, H. **Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos.** Human Reproduction. Vol: 16. Pages: 893 - 901, 2001

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., GEBERT, C., KORSAWE, K., LEMME, E., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H. **Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies.** Birth Defects Research. Vol: 75. Pages: 01 - 09, 2005

YAMADA, T., MITSUYA, K., KAYASHIMA, T., YAMASAKI, K., OHTA, T., YOSHIURA, K., MATSUMOTO, N., YAMADA, H., MINAKAMI, H., OSHIMURA, M., NIIKAWA, N., KISHINO, T. **Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST-flanking region at human chromosome 7q32.** Genomics. Vol: 3. Pages: 402 - 12, 2004

YANG, L., CHAVATTE-PALMER, P., KUBOTA, C., O'NEILL, M., HOAGLAND, T., RENARD, J.P., TANEJA, M., YANG, X., TIAN, X.C. **Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones.** Molecular Reproduction Development. Vol: 71. Pages: 431 - 438, 2005

YOUNG, L.E., FERNANDES, K., MCEVOY, T.G., BUTTERWITH, S.C., GUTIERREZ, C.G., CAROLAN, C., BROADBENT, P.J., ROBINSON, J.J., WILMUT, I., SINCLAIR, K.D. **Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture.** Nature. Vol: 2. Pages: 153 - 154, 2001

YU, N-K., BAEK, S.H., KAANG, B-K. **DNA methylation-mediated control of learning and memory.** Molecular Brain. Vol: 4:5. Pages: 02 - 09, 2011

ZHANG, S., KUBOTA, C., YANG, L., ZHANG, Y., PAGE, R., O'NEIL, M., YANG, X., TIAN, C. **Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle.** *Biology of Reproduction*. Vol: 71. Pages: 1540 - 44, 2004

ZHENG, H-Y., SHI, X-Y., WU, F-R., WU, Y-Q., WANG, L-L., CHEN, S-L. **Assisted reproductive technologies do not increase risk of abnormal methylation of *Peg1/MEST* in human early pregnancy loss.** *Fertility and Sterility*. Vol: 96. Pages: 84 - 89, 2011

ZWART, R., SLEUTELS, F., WUTZ, A., SCHINKEL, A.H., BARLOW, D.P. **Bidirectional action of the *Igf2r* imprint control element on upstream and downstream imprinted genes.** *Genes & Development*. Vol: 15. Pages: 2361 – 2366, 2001