

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO-UENF

CINTHYA DESSAUNE NEVES

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS IMPRINTADAS DE METILAÇÃO DO DNA NOS GENES
SNURF, IGF2 E IGF2R EM SAGUI (*Callithrix* spp.)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

2017

CINTHYA DESSAUNE NEVES

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS IMPRINTADAS DE METILAÇÃO DO DNA NOS GENES
SNURF, IGF2 E IGF2R EM SAGUI (*Callithrix* spp.)**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira.

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta.

Dr. Filipe Brum Machado.

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

2017

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS IMPRINTADAS DE METILAÇÃO DO DNA NOS GENES
SNURF, IGF2 E IGF2R EM SAGUI (*Callithrix* spp.)**

CINTHYA DESSAUNE NEVES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 30 de junho de 2017

Comissão Examinadora:

Dr. Edwards Frazão-Teixeira (Doutor em Ciência Animal) – Fiocruz

Dr. Filipe Brum Machado (Doutor em Genética) – USP

(Co-orientador)

Dr. Enrique Medina-Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular) – UENF.

(Co-orientador)

Dr. Leonardo Serafim da Silveira (Doutor em Ciência Animal) – UENF.

(Orientador)

Pegadas na areia

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor.

E através do Céu, passavam cenas de minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia. Um era o meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena de minha vida passou diante de nós, olhei para trás e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes do meu viver. Isso aborreceu-me deveras e perguntei:

– Senhor, Tu me disseste que uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo, todo o caminho. Mas notei que durante as maiores dificuldades do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo Senhor, por que nas horas que mais necessitava de ti, Tu me deixastes? Tu me abandonastes?

– Minha preciosa filha. Eu te amo e jamais te deixaria nas horas da tua provação e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que eu te carreguei em meus braços!

Mary Stevenson (1939).

DEDICATÓRIA

Não foram fáceis estes longos quatro anos, houve muita ausência, preocupação com a estrada, cansaço físico e mental, mas acredito que valeu cada dia que optei por vencer esta etapa. Conteí com a ajuda de muitas pessoas para chegar ao final desta jornada.

Agradeço a minha família, meus pais Dalvo e Marusa, meu marido Marcos, meu irmão Vinícius pela força, carinho, generosidade, paciência e amor. Sempre me incentivando a perseverar. Amo vocês!

Muito importante nesta caminhada foi meu orientador, prof. Leonardo Serafim que sempre me apoiou, foi um amigo, incentivador e com quem muito aprendi. Pessoa sempre dedicada a fazer o bem e a ensinar.

Ao meu coorientador, prof. Enrique Medina-Acosta agradeço a confiança depositada em mim, pois entregou as chaves de “sua casa Nudim” e me fez sentir em família, sem distinções e com a mesma preocupação e zelo, obrigada pelos ensinamentos, o senhor é um grande mestre. Agradeço, ao também coorientador, pela paciência, amizade, generosidade de partilhar seus conhecimentos; sua dedicação ao que faz torna tudo mais fácil de ser aprendido.

A família Nudim, Thiago, Douglas, Juliana, Katrine, Cristina, Pedro, Alan, Cleiton, Jozimara, Amanda, Rebeka, Luísa, Antônio, Ronaldo, Graziela, Cláudia, Maria, prof. Ana Beatriz Garcia e a Thaís e Diego pelo auxílio imensurável nos experimentos. A todos obrigada pelas conversas, pelos cafés, reclamações, carinho, enfim...pela amizade!

As meninas e funcionários do LMPA, Letícia, Isis, Anna, Raíssa, Beth, Luciana, Luciano, obrigada pelo carinho de sempre, pela ajuda e amizade.

Aos amigos que ouviram tantas vezes:- Não posso tô estudando! E não me abandonaram e nem me esqueceram! Laís, Graça, Nina, Laucinéia, Betina, Karla, Patrícia, Luciana, Thaísa, Francieli, meus primos (que estão esperando um churrasco há um ano), Warley, Elizangela. Obrigada agora vou dizer sim!!!!

Agradeço o apoio da UENF/FAPERJ pelo fomento, muito importante para a realização deste trabalho. A Jovana pela paciência comigo, sempre solícita e amiga.

Enfim a Deus que me permitiu chegar e continuar, me deu perseverança e me carregou no colo quando não mais suportava o peso e o cansaço desta caminhada.

RESUMO

NEVES, C.D., DSc, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2017. Identificação de marcas imprintadas de metilação do DNA nos genes *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R* em sagui (*Callithrix spp.*). Orientador: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira. Co-orientadores: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta; PhD. Filipe Brum Machado.

O *imprinting* genômico é a diferenciação epigenética dos cromossomos parentais. O processo envolve a discriminação dos alelos parentais com marcas de metilação do DNA no contexto da sequência CpG e resulta na expressão monoalélica origem parental-dependente de um conjunto de genes, determinante para o desenvolvimento embrionário normal. A diferenciação epigenética dos cromossomos parentais surgiu com a evolução dos marsupiais para prevenir a partenogênese, a poliploidia e controlar possíveis efeitos deletérios em genes essenciais para o desenvolvimento placentário. A maioria dos estudos sobre *imprinting* genômico é em roedores e humanos. Em primatas não humanos (chimpanzé, orangotango, macaco *rhesus*, sagui e galago) os estudos são escassos. O quimerismo, a gemelação e os cuidados alopais, características dos saguis (*Callithrix spp.*), podem impactar os efeitos do *imprinting* genômico. Neste estudo investigamos a existência de marcas imprintadas de metilação do DNA em tecidos não quiméricos de saguis nos domínios ortólogos das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *SNRPN*, *SNURF*, *GRB10*, *IGF2*, *IGF2R* em humanos. Esses genes estão relacionados ao comportamento, a reprodução, o crescimento e ao desenvolvimento embrionário. Para cada região determinamos o perfil de metilação pontual utilizando digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa fluorescente e investigamos se metilação é alelo-específica por minissequenciamento de SNPs. Em sangue, para os domínios dos genes *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R* o perfil de metilação foi intermediário (mediana de 50,7%) e a metilação foi alelo-específica, consistente com a ocorrência de marcas imprintadas. Contudo, os perfis variaram desde hipometilado a hipermetilado entre indivíduos e entre diferentes tecidos de um mesmo indivíduo. Concluimos que em sangue de saguis as regiões ortólogas das DMRs *SNURF*, *IGF2*, *IGF2R* possuem marcas imprintadas de metilação do DNA.

Palavras-chave: *Callitrix*, *imprinting* genômico, metilação, regiões diferencialmente metiladas, polimorfismos.

ABSTRACT

NEVES, C.D., DSc, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June 2017. Identification of imprinted DNA methylation marks in the *SNURF*, *IGF2* and *IGF2R* genes in marmoset (*Callithrix spp.*). Advisor: Prof. PhD. Leonardo Serafim da Silveira. Co-advisers: Prof. PhD. Enrique Medina-Acosta; PhD. Filipe Brum Machado.

Genomic imprinting is the epigenetic differentiation of the parental chromosomes. The process involves discriminating the parental alleles with DNA methylation marks in the context of the dinucleotide CpG sequence and results in the parental-of-origin dependent monoallelic expression of a group of genes that are determinant of the normal embryonic development. The epigenetic differentiation of the parental chromosomes emerged with the evolution of the marsupials to prevent the parthenogenesis, the polyploidy and to control possible deleterious effects in genes that are essential for the development of the placenta. Most studies about genomic imprinting are in rodents and humans. In the nonhuman primates (chimpanzees, orangutans, rhesus monkeys, marmosets and galagos) the studies are scarce. The chimerism, the twinning and the alloparental care are characteristic features in the marmoset (*Callithrix spp.*) and they can impact the effects of the genomic imprinting. In this study, we investigate in nonchimeric tissues of marmosets the occurrence of DNA methylation imprinted marks in the ortholog domains of human differentially methylated regions (DMR) of the *SNRPN*, *SNURF*, *GRB10*, *IGF2*, *IGF2R* genes. The target genes are related with the behavior, reproduction, growth and embryonic development. For each region, we determined the methylation profile at specific CpG sites, using a methylation-sensitive restriction enzyme method associated to quantitative fluorescent PCR and investigate by single nucleotide primer extension whether the methylation is allele-specific. In blood, for the *SNURF*, *IGF2* and *IGF2R* ortholog domains, the methylation profile was intermediate (median 50,7%) and the methylation was allele-specific, consistent with the occurrence of imprinting marks. Nevertheless, the profiles varied from hypomethylated to hypermethylated among individuals and between different tissues of the same individual. We conclude that the marmoset ortholog regions of the *SNURF*, *IGF2*, *IGF2R* human DMRs have DNA methylation imprinted marks in peripheral blood.

Key words: *Callithrix*, differentially methylated region, imprinting, polymorphisms.

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	20
2.0 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2Específicos.....	21
3.0 JUSTIFICATIVA.....	21
4.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
4.1 <i>Callithrix</i> spp.....	24
4.1.1 Comportamento Sexual e Reprodutivo	27
4.2 Epigenética	35
4.2.1 <i>Imprinting</i> genômico	35
4.2.2 Metilação do DNA.....	41
5.0 MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1 Aspectos éticos	45
5.1.1. Licença Ambiental	45
5.2 <i>Procedência dos Animais</i>	45
5.3 Tipo de estudo.....	46
5.4 Delineamento	47
5.5 Material Biológico	47
5.6 Extração de DNA e RNA	50
5.7 Quantificação do DNA e RNA genômico	51
5.8 Análises <i>In Silico</i>	51
5.8.1 Seleção das candidatas a regiões diferencialmente metiladas	51
5.8.2 Identificação de polimorfismos nas candidatas a regiões diferencialmente metiladas.....	52

5.9 Desenho de iniciadores para os alvos selecionados	54
5.10 Análises <i>In Vitro</i>	56
5.10.1 PCR multiplex.....	56
5.10.2 Determinação do estado de metilação nas candidatas DMR	57
5.10.3 Validação da metilação alelo-específica nas candidatas DMR	60
5.11 Minissequenciamento de SNP por SnapShot.....	62
5.12 Eletroforese capilar para caracterização de alelos	63
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
6.1 Construção de blocos sintênicos entre <i>Callithrix jacchus</i> (C. J.) e <i>Homo Sapiens</i> (HS) para mapeamento dos genes de interesse	65
6.2 Análise comparativa das coordenadas físicas migradas de regiões diferencialmente metiladas de <i>Homo sapiens para Callithrix jacchus e Homo sapiens para Pan troglodytes</i>	71
6.3 Análise comparativa <i>in silico</i> das marcas epigenéticas nas candidatas a DMR a partir de coordenadas físicas migradas de regiões diferencialmente metiladas do <i>Homo sapiens para Callithrix jacchus</i> utilizando UCSC browser.....	77
6.4. Validações das áreas candidatas a regiões diferencialmente metiladas em <i>Callithrix jacchus</i>	86
6.5 Análise do minissequenciamento de base única em dados de metilação nas DMR	97
7.0 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

Lista de Figuras

Figura 1: Teoria da evolução do <i>imprinting</i> dos genes <i>IGF2R</i> e <i>IGF2</i>	23
Figura 2: <i>Callithrix spp.</i>	25
Figura 3: Classificação Taxonômica dos Primatas.	26
Figura 4: Seções transversais de anexo diamniótico-dicoriônica membranas separadas (esquerda) e diamniótico-monocorônico placenta de gêmeos.....	28
Figura 5: Esquema de implantações do blastocisto em útero de sagui.	29
Figura 6: Anastomoses vasculares em placenta de calitriquídeo.	30
Figura 7: Gêmeos de <i>Callithrix spp.</i> recebendo cuidados dos membros do grupo. Fonte: https://www.google.com.br/search?q=callithrix+penicillata	32
Figura 8: Esquema de <i>imprinting</i> genômico.....	36
Figura 9: Perda de metilação pelos gametas, reestabelecimento da metilação após fertilização (metilação de novo), manutenção das marcas de metilação durante a fase adulta e perda do <i>imprinting</i> genômico em humanos durante o desenvolvimento.	37
Figura 10: Metilação do DNA.....	42
Figura 11: <i>Callithrix spp.</i> em habitat natural.....	46
Figura 12: <i>Callithrix spp.</i> , fonte dos tecidos coletados.	49
Figura 13: Mapa cromossômico da DMR no gene <i>SNRPN</i> em humanos.....	53
Figura 14: Sequência do produto de amplificação <i>in silico</i> para alvos candidatos.	54
Figura 15: Fórmula utilizada para cálculo da metilação, empregando as áreas dos picos.	58

Figura 16: Ensaio de estado de metilação pontual nas cDMR.	60
Figura 17: Ensaio para validação da metilação alelo-específica.	61
Figura 18: Representação da inserção do ddNTP marcado com fluorocromo em SnapShot.	63
Figura 19: Eletroferograma ilustrativo dos polimorfismos de metilação para as cDMR.	64
Figura 20: Relações sintênicas entre <i>Homo sapiens</i> e <i>Callithrix jacchus</i> para os cromossomos que contém os genes de interesse.	68
Figura 21: Representação da homologia sintênica entre cromossomos de <i>Callithrix</i> (sagui) e <i>Homo sapiens</i> (humano), baseado na plataforma SynBuilder.	69
Figura 22: Mapa de sintenia entre cromossomos de <i>Callithrix jacchus</i> e <i>Homo sapiens</i> , baseado na plataforma Ensemble <i>Genome browser</i>	70
Figura 23: Correlação entre as coordenadas físicas referentes a DMR no genoma do humano (<i>Homo sapiens</i>) em relação ao genoma sagui (<i>Callithrix jacchus</i>).	75
Figura 24: Correlação entre as coordenadas físicas referentes a DMR no genoma do humano (<i>Homo sapiens</i>) em relação ao genoma chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>).	76
Figura 25: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene <i>SNRPN</i>	78
Figura 26: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene <i>SNURF</i>	80
Figura 27: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene <i>GRB10</i>	82
Figura 28: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene <i>IGF2</i>	84
Figura 29: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene <i>IGF2R</i>	85

Figura 30: Eletroferograma do perfil de amplificação de marcadores STR em amostra de tecido sanguíneo de <i>Callithrix spp.</i>	88
Figura 31: Eletroferogramas do perfil de metilação em tecidos de <i>Callithrix spp.</i> para a cDMR <i>SNURF</i>	89
Figura 32: Estados de metilação determinados pelo ensaio com ERSM de amostras sanguíneas de <i>C. jacchus</i> para as cDMR.....	92
Figura 33: Estados de metilação determinados pelo ensaio com ERSM de amostras teciduais de <i>C. jacchus</i> para as cDMR <i>SNRPN</i> , <i>SNURF</i> , <i>IGF2</i> e <i>IGF2R</i>	93
Figura 34: Eletroferogramas do perfil de metilação em diferentes tecidos de <i>Callithrix spp.</i> para as cDMR <i>IGF2R</i> , <i>IGF2</i> e <i>SNRPN</i>	95
Figura 35: Eletroferogramas representativos do perfil amplificações de minissequenciamento de base única.....	98
Figura 36: Eletroferogramas representativos do perfil de amplificações de minissequenciamento de base única.....	99
Figura 37: Eletroferogramas representativos do perfil de amplificações de minissequenciamento de base única.....	100

Lista de Tabelas

Tabela 1: Iniciadores para caracterização e validação de polimorfismos em cDMR em <i>C. jacchus</i>	55
Tabela 2: Iniciadores desenhados para minissequenciamento de base única para validação de cDMR em <i>C. jacchus</i>	55
Tabela 3: Sequências dos polimorfismos validados por DESM e minissequenciamento de <i>Callithrix spp.</i>	56
Tabela 4: Posição física das DMR humanas (OKAE <i>et al.</i> , 2014), posição ortóloga em . e de ilhas CpG.	73
Tabela 5: Parâmetros populacionais em <i>Callithrix spp.</i> para os SNP utilizados no estudo.....	97

Lista de Abreviaturas

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

UCSC: University of California, Santa Cruz

NUDIM: Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular.

Pb: Pares de base.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

QF-PCR: Reação Quantitativa por Fluorescência em Cadeia da Polimerase.

UENF: Universidade Estadual do Norte Fluminense.

UCSC: Universidade da Califórnia Santa Cruz.

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

RNA: Ácido ribonucléico.

IGF2: Insulin-like growth factor 2

IGF2R: Insulin-like growth factor 2 receptor

SNRPN: Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N

SNURF: *SNRPN* Upstream Reading Frame

GRB10: Growth Factor Receptor Bound Protein 10

M6P: Mannose-6-phosphate

URF: Unidade relativa de fluorescência

ERSM: Enzima de restrição sensível a metilação.

DESM: Digestão por enzima de restrição sensível a metilação.

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único.

MAF: Frequência do segundo menor alelo.

PBMC: Células Mononucleares de sangue periférico.

1.0 INTRODUÇÃO

O *imprinting* é um mecanismo epigenético que resulta na expressão gênica monoalélica, dependente da origem parental, por meio do silenciamento de um dos alelos, sem causar alteração na sequência de nucleotídeos do DNA (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014). Uma das marcas de silenciamento gênico é a metilação diferencial do dinucleotídeo CpG em áreas denominadas ilhas CpG de regiões diferencialmente metiladas, comumente encontradas em regiões promotoras gênicas (MARQUES *et al.*, 2007). O *imprinting*, portanto, estabelece uma diferenciação funcional dos genomas parentais. Em mamíferos, a diferenciação parental epigenética de genes é determinante para o desenvolvimento embrionário normal. Os genes *imprintados* são expressos em diferentes tecidos, porém durante a embriogênese são altamente expressos na placenta e no cérebro. Alguns genes imprintados maternos tendem a promoverem o desenvolvimento embrionário, como o *IGF2*, enquanto os paternos como *IGF2R* o limitariam (SURANI *et al.*, 1984). Uma segunda hipótese em relação ao *imprinting* teoriza que os genes maternos silenciados estariam envolvidos no desenvolvimento do córtex frontal, enquanto os paternos na região hipotalâmica e amígdala. Nesse sentido, o *imprinting* parece estabelecer uma competição necessária entre os genomas parentais (JIRTLE, R., 2014).

O modelo experimental para o estudo de *imprinting* é o camundongo (EDWARDS e FERGUSON-SMITH, 2007). Não obstante, nem todos os aproximadamente 100 genes que sofrem *imprinting* em humanos (JIRTLE, 2017) apresentam o mesmo perfil do roedor. Os primatas calitriquídeos, especialmente os saguis, tornaram-se um importante arquétipo para muitas doenças humanas e estudos neurológicos. Globalmente, há um interesse crescente em projetos de mapeamento cerebral, esses projetos visam mapear a estrutura e a função dos circuitos neuronais para, em última análise, compreender a grande complexidade do cérebro humano. Projetos como MINDS são focados na parte estrutural de mapeamento funcional do cérebro do sagui (*Callithrix*), que apresenta vantagens como córtex frontal bem desenvolvido. Algumas funções cerebrais são controladas por *imprinting*, mas pouco se sabe a respeito em modelo primata não humano (OKANO e MITRA, 2015). Alguns genes imprintados maternos estão expressos em tecido nervoso,

como *GRB10* (BARAN *et al.*, 2015) e amostras humanas deste tecido são difíceis de se obter, podendo ser o sagui um bom modelo experimental, fornecendo amostras viáveis e resultados possivelmente extrapoláveis para humanos.

O gênero *Callithrix* tem atraído considerável atenção como animais potencialmente úteis para modelo em áreas como a neurociência, investigação de células germinais, toxicologia, doenças auto-imunes, biologia reprodutiva e medicina regenerativa (MANSFIELD, 2003), doenças de cunho epigenético, ligados aos genes *SNRPN* e *SNURF*, como Síndrome de Prader-Willi e Angelman (UBEDA e GARDINER, 2008). Por isso, sua relevância cresce progressivamente, e faz-se necessária uma apreciação e compreensão de sua biologia (SWEENEY, 2012). Neste projeto propomos usar o sagui (*Callithrix*) como modelo primata não humano de *imprinting*. O sagui apresenta qualidades relevantes como gestação gemelar, tamanho corporal reduzido, cuidado aloparental; características exploráveis no contexto de *imprinting* genômico. Para tal, objetivou-se investigar a existência de marcas imprintadas de metilação do DNA em tecidos não quiméricos de saguis nos domínios ortólogos das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *SNRPN*, *SNURF*, *GRB10*, *IGF2*, *IGF2R* em humanos.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a existência de marcas imprintadas de metilação do DNA em tecidos não quiméricos de saguis nos domínios ortólogos das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *SNRPN*, *SNURF*, *GRB10*, *IGF2*, *IGF2R* em humanos.

2.2 Específicos

- Mapear biocomputacionalmente as regiões controladoras do *imprinting* genômico no genoma de humanos;

- Determinar o grau de conservação dessas sequências no sagui;
- Determinar experimentalmente o estado de metilação dessas regiões em diferentes tecidos de saguis.

3.0 JUSTIFICATIVA

O modelo animal experimental mais utilizado para o estudo de *imprinting* genômico é o camundongo porque tem grandes vantagens para pesquisas experimentais, tais como o desenvolvimento rápido, curto ciclo de vida, adultos de pequeno tamanho, fácil disponibilidade e manutenção. Contudo apenas 30% dos genes são identificados em comum com humanos (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014). Existem fatos que tornam outros animais mais adequados a determinados questionamentos. Worley *et al.*, (2014) em seu estudo verificaram que de oito elementos de células-tronco de camundongo avaliadas, seis tinham pouca ou nenhuma similaridade com os genes ortólogos em humanos, enquanto eram preservados em saguis.

Respostas biológicas e consequências da divergência do *imprinting* genômico são difíceis de extrapolar entre espécies, portanto o modelo animal aplicado deve ser filogeneticamente mais próximo ao humano. Taxonomicamente, o sagui (*Callithrix spp.*) e o humano (*Homo sapiens*) compartilham a mesma origem até a sua infra ordem *Simiiformes*, diferindo a partir desta; o homem integrando a parvorder *Catharrini* superfamília *Hominoidea* e o sagui a parvorder *Platyrrhini*, família *Callitricidae* (NCBI, 2017).

O *imprinting* não parece estar generalizado entre os quatro reinos eucarióticos que incluem protista, fungos, plantas e animais. Contudo, ele existe, em uma forma possivelmente relacionada, nos artrópodes, no endosperma de algumas plantas como milho e *Arabidopsis*. Esta distribuição indica que o *imprinting* surgiu independentemente pelo menos três vezes durante a evolução da vida (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014).

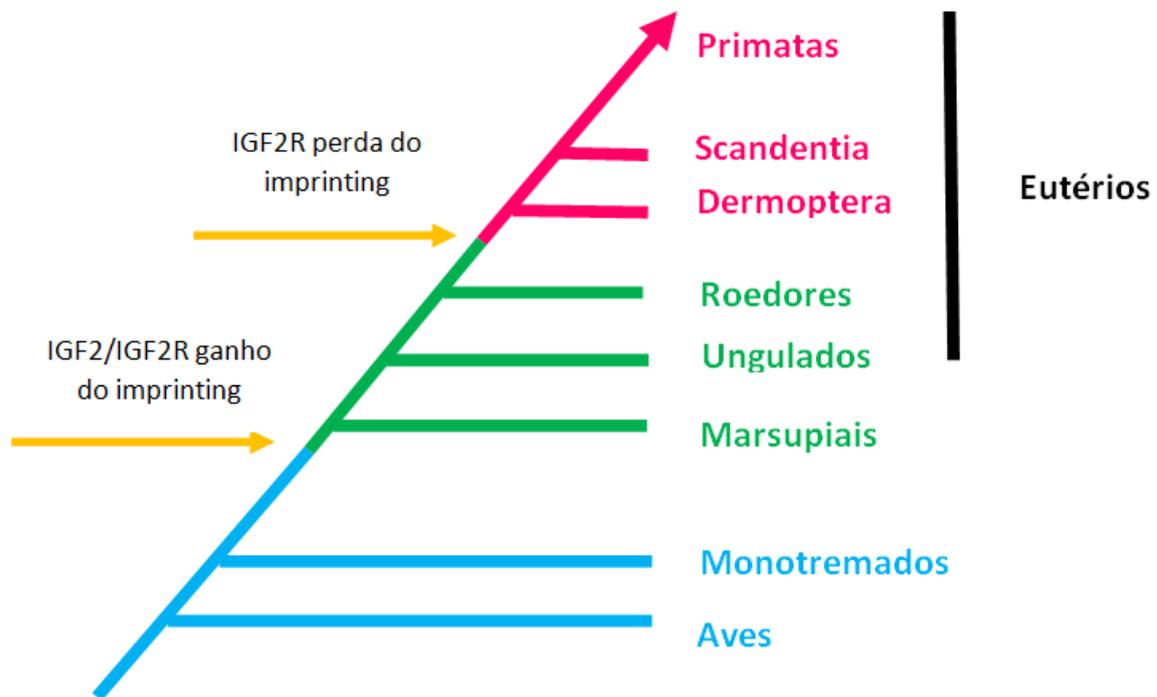


Figura 1: Teoria da evolução do *imprinting* dos genes *IGF2R* e *IGF2*. Ocorrência de *imprinting* genômico há 150 milhões de anos e perda do *imprinting* do gene *IGF2R* há 75 milhões de anos. Adaptado (Conferência Anual Internacional de Medicina, Epigenetics, Genomic *Imprinting*, and the Effect of Nutrition/ JIRTLE, R., 2014).

A validação dos ensaios pode ser um dos principais fatores limitantes para a compreensão da evolução humana em nível genético funcional. O uso do sagui como modelo para estudos de doenças humanas já é realidade, mas ainda é pouco utilizado para estudar aspectos da evolução humana, e poderia revelar novos conceitos sobre o progresso dos elementos reguladores, tamanho corporal e cerebral, comportamento, reprodução (SATO, 2015).

A sequência de referência do DNA genômico (2,26 Gb) de sagui fêmea foi montada e apresentada em 2014. A análise permite a comparação com os genomas de outros primatas do Novo e Velho Mundo e a identificação de características que possam contribuir para elucidar doenças humanas (WORLEY *et al.*, 2014).

A escolha dos loci a serem estudados foram baseados em análises de Baran *et al.* (2015), que observou nos genes *SNRPN* e *SNURF* expressão em quase todos os tecidos analisados. O alvo *GRB10* mostra-se interessante pois apenas é expresso em

cérebro, já *IGF2* é um dos alvos mais estudados em todas as espécies, visto que está envolvido em crescimento intra-uterino e desenvolvimento pós-natal e *IGF2R* foi selecionado, pois em humanos não é *imprintado* como os demais, mas em *Macaca fascicularis*, segundo Cheong *et al.* (2015) apresenta preferencialmente expressão monoalélica.

O número de estudos biomédicos utilizando saguis tem crescido vertiginosamente nos últimos anos, pois são animais de pequeno porte, fácil captura, baixo custo de manutenção em cativeiro e taxa de reprodução mais elevada que os macacos do velho mundo (TOKUNO *et al.*, 2012).

Existem poucos estudos sobre regiões diferencialmente metiladas e imprintadas nesta espécie, lacunas ainda não exploradas e que possibilitarão uma compreensão mais aprofundada da espécie que poderão ser correlacionados com humanos.

4.0 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Callithrix spp.*

O sagui (*Callithrix spp.*) (figura 2), também conhecido como sagui-de-tufos-brancos, é um diminuto primata antropóide, membro da família *Callitrichidae* dos primatas do Novo Mundo não humanos, é nativo no norte e leste do Brasil (CARRION e PATTERSON, 2012; OKANO *et al.*, 2012; TOKUNO *et al.*, 2012), sendo as espécies de *Callithrix* distribuídas na Mata Atlântica brasileira e fora desta (MALUKIEWICZ *et al.*, 2014). Os primatas (figura 3) do Novo Mundo (*Platyrrhinis*) divergiram de primatas do Velho Mundo (*Catarrhinis*) há aproximadamente 43 milhões de anos. O gênero *Callithrix* surgiu há aproximadamente 2,5 milhões de anos (PERELMAN *et al.*, 2011).



Figura 2: *Callithrix* spp.. Fonte: MIRANDA, C.R.R. (2017).

Compõem os primatas neotropicais as cinco famílias (*Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae* e *Atelidae*), sendo 19 gêneros e cerca de 139 espécies (IUCN, 2008). Os membros da família *Callitrichidae* são derivados de um ancestral comum, incluindo os gêneros *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix*. Hierarquicamente nesta família os membros foram se miniaturizando, a começar pelo *Leontopithecus*, seguido do gênero *Callimico*, *Callithrix* e o *Mico*, o menor *platyrrhini* (*Cebuella pygmaea*) (PERELMAN *et al.*, 2011).

Acredita-se que a família *Callitrichidae* seja composta de 16 espécies de micos e 11 espécies de saguis, incluindo o *Callithrix*. O grupo *jacchus* abrange o *C. aurita*, *C. khulli*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *jacchus* que dá nome ao grupo. Estas duas últimas espécies apresentam a menor abóbada craniana do grupo *jacchus*. O *C. jacchus* é o menor entre os do seu gênero e apresenta 15 características morfológicas distintas do seu grupo, sete contrastes são relativos ao crânio e oito a face, estas alterações provavelmente são fatores predisponentes ao tipo de alimentação baseada em goma de árvores, insetos e frutas (MARROIG *et al.*, 2004). O *C. jacchus* e *penicillata* apresentam a

menor distância de alinhamento de sequências gênicas mitocondriais do grupo *jacchus* (MALUKIEWICZ *et al.*, 2014).

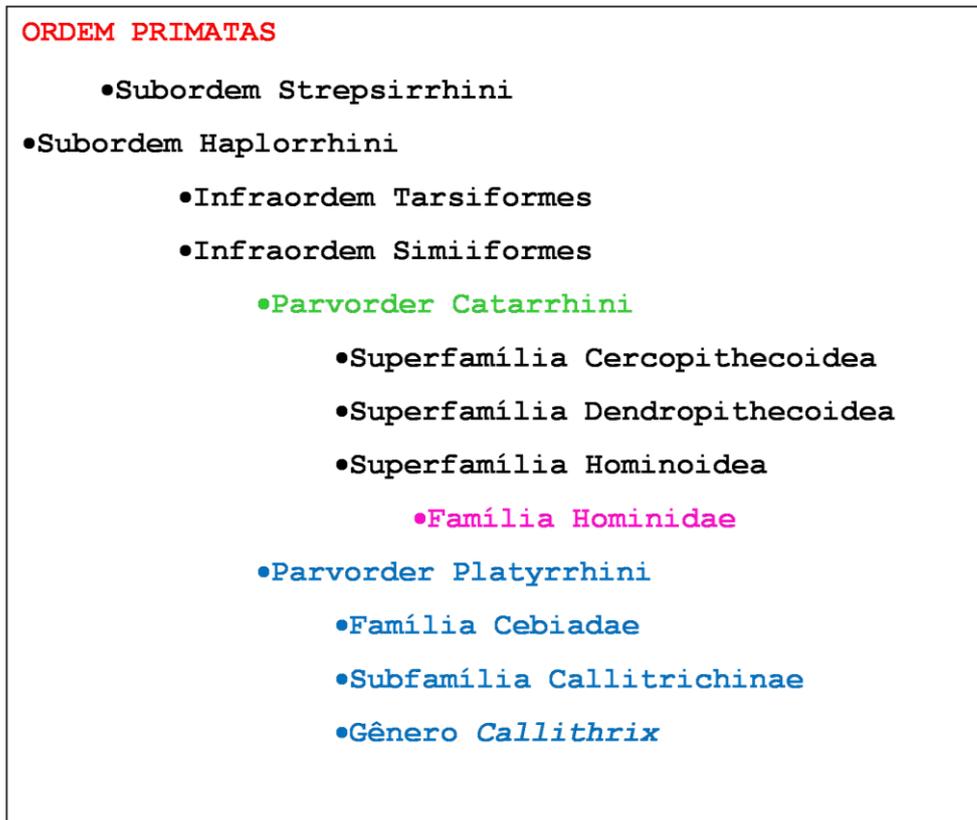


Figura 3: Classificação Taxonômica dos Primatas.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=9443>

Baseado em morfologia, desenvolvimento e características genéticas o gênero *Callithrix* pode ser subdividido em dois grupos, um composto pelas espécies *aurita* e *flaviceps* e outro grupo onde se aloca o *jacchus*, *geoffroyi*, *penicillata* e *kuhlii* (PERELMAN *et al.*, 2011).

De acordo com ZUHLKE e WEINBAUER (2003) a nomenclatura deste primata não humano vem sendo debatida e novas espécies ainda poderão ser descobertas. O sagui é uma espécie residente da fauna brasileira, eles pesam entre 250 a 500 gramas (CLARKE, 1994; ZUHLKE e WEINBAUER, 2003). Segundo Morais Jr. (2010) os pesos de machos e fêmeas em todas as idades são semelhantes, contudo quando os indivíduos são híbridos tornam-se mais pesados que *C. jacchus* e *C. penicillata* puros.

A espécie *C. jacchus* organiza-se em grupos podendo chegar a 15 integrantes (AURICHIO, 1995). A maturidade sexual é alcançada aos 18 meses (ZUHLKE e WEINBAUER, 2003). A espécie *C. jacchus* pode viver em cativeiro em média 10 a 15 anos, apesar do desempenho reprodutivo das fêmeas declinar a partir dos oito a dez anos de idade. A gestação dura em média de 141 a 145 dias (CLARKE, 1994).

Seu tamanho diminuto é resultado de nanismo filético possivelmente pela oferta de alimentos e competição. Este tamanho reduzido o torna vulnerável ao ataque de muitos predadores (EISENBERG, 1977).

Segundo Morais Jr. (2010) espécies exóticas causam grande impacto ambiental e econômico. As espécies de saguis, *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*, são exemplos no Brasil da introdução de primatas de maneira desordenada. Apesar de serem oriundos desse país, estes são considerados exóticos em alguns estados.

Os primatas não humanos têm sido muito utilizados como modelo animal de doenças humanas, em parte por causa de seu estreito elo evolutivo, genético e as relações fisiológicas. Os primatas do Novo Mundo, em particular, têm sido valorizados por equilibrar tanto essa proximidade evolutiva com a sua prática criação, visto muitas vezes as limitações logísticas. Essa espécie também tem o menor tempo de vida média de qualquer primata utilizado na pesquisa biomédica, e essas características, combinadas com sucesso na criação moderna, podem proporcionar grandes populações estáveis e controladas de calitriquídeos adultos (TARDIF *et al.*, 2003).

4.1.1 Comportamento Sexual e Reprodutivo

O *C. jacchus* não apresenta sazonalidade para reprodução estando apto em qualquer fase luminosa (MORAIS JR., 2010). O intervalo entre partos acontece em aproximadamente 6 meses, podendo haver duas gestações gemelares por ano. O estro no pós-parto ocorre em cinco dias (TARDIF *et al.*, 2003). Apresenta poli ovulação por ciclo com rotineiras gestações múltiplas. Na natureza pode gerar gêmeos (80%), trigêmeos (15%) e gestação única (5%) (HEARN, 1978). Em cativeiro observa-se nascimentos de trigêmeos com maior frequência que gêmeos, provavelmente pela maior oferta de

alimentos e recursos, esconderijos, ausência de predadores naturais, o que facilita a procriação (TARDIF *et al.*, 2003).

Gêmeos são 15-19% do peso da mãe, logo na natureza gêmeos pode-se desenvolver bem pelos auxílios nos cuidados. Contudo, não se mostra assim quando se trata de cativeiro os trigêmeos são mais comuns, pois a disponibilidade de alimentos, abrigo, a quase inexistência de predadores. A fertilidade da mãe aumenta (HEARN, 1978).

Moore *et al.* (1985) estudaram a morfologia do estado inicial de implantação placentária espécie *C. jacchus*. Consideraram para efeito o primeiro dia pós ovulação quando os níveis sanguíneos de progesterona fossem acima de 20 ng/ml. Com cerca de 12 dias após a ovulação/fertilização há implantação de dois ou três blastocistos. Os anexos se consolidam a medida que a massa celular cresce e se introduz no endométrio. A fusão coriônica inicia-se por volta de 19 dias e se completa com 29 dias, quando o embrião ainda é uma única massa de células. Completada a fusão os embriões apresentarão anexos embrionários (Figura 4).

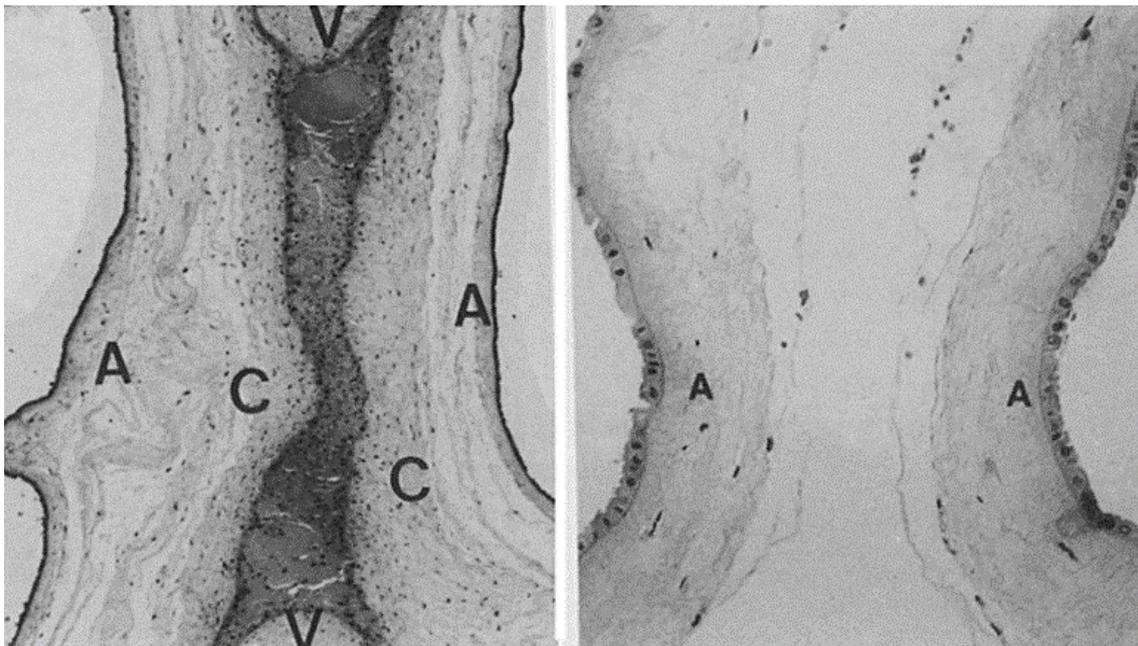


Figura 4: Seções transversais de anexo diamniótico-dicoriônico (membranas separadas a esquerda) e diamniótico-monocoriônico placenta de gêmeos. Córions, C; âmnions A; veia (V). Fonte: RUTHERFORD e TARDIF (2009).

As placentas bidiscoidais são separadas e precocemente sofrem anastomoses vasculares, isto ocorre no corpo uterino. Acredita-se que estas múltiplas anastomoses vasculares entre cordão umbilical e placenta ocorram como uma estratégia a síndrome da transfusão entre gêmeos, uma alteração deletéria, que ocorre em humanos quando há um fluxo unidirecional para um feto em relação ao seu irmão que geralmente é reabsorvido (HAIG, 1999).

Posteriormente os discos placentários são formados (Figura 5), e as anastomoses vasculares são desenvolvidas em equivalência não havendo limite definido entre elas (figura 6). Quando a implantação é oposta irá desenvolver anexos separadamente mas com fusão coriônica (RUTHERFORD e TARDIF, 2009). A placenta formada é classificada como hemocorial, onde o tecido do conceito invade o endométrio e os vasos sanguíneos, o córion é irrigado pelo sangue da mãe (LEUTERNEGGER, 1973), sendo a mais intimista, que permite por uma camada de células entre mãe e feto a troca de gases e nutrientes. Este tipo de placentação ocorre em humanos, primatas e roedores (ROA *et al.*, 2012). Pela mistura sanguínea entre os fetos, em ambos gêmeos de *Callithrix jacchus*, as células XY geralmente excedem as células XX no sangue (ARDITO *et al.*, 1995).

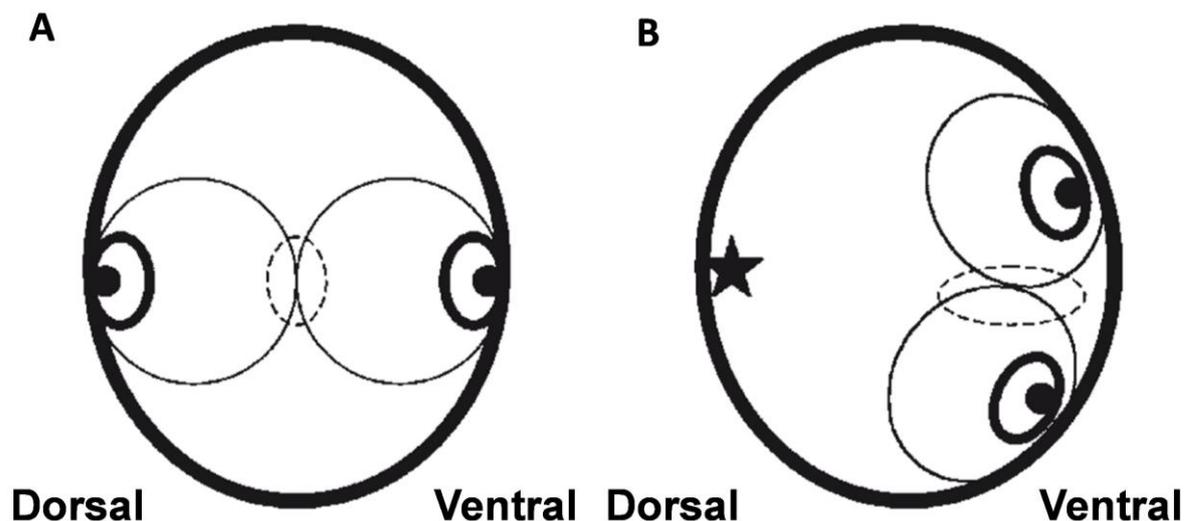


Figura 5: Esquema de implantações do blastocisto em útero de sagui. Círculo tracejado ilustra região de eventual fusão coriônica criando assim cavidade comum. (a) Implantação dos blastocistos nas paredes opostas do útero. Cada local de implantação forma um disco. A estrela indica o local de formação do disco secundário em polo sem embrião. Fonte: RUTHERFORD e TARDIF, (2009).

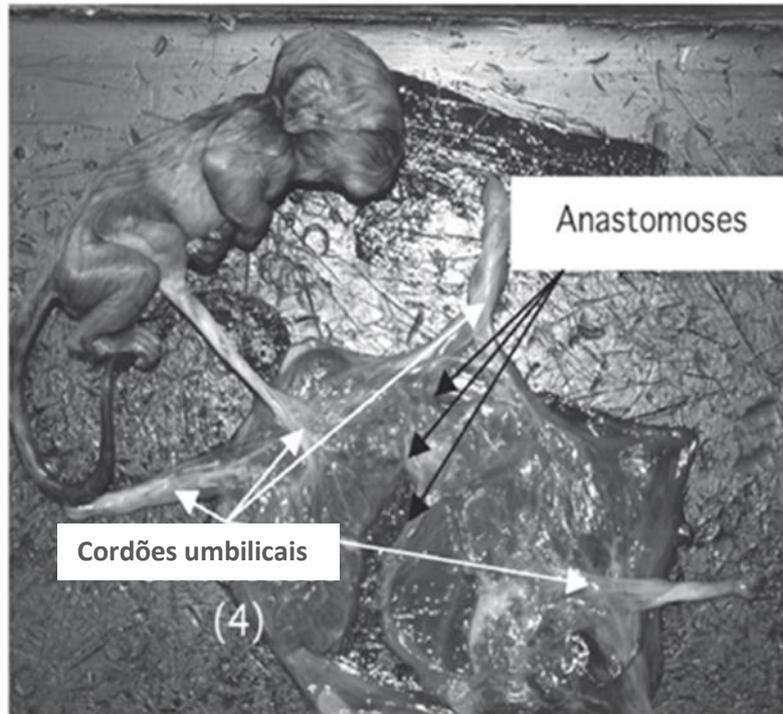


Figura 6: Anastomoses vasculares em placenta de calitriquídeo. Fonte: RUTHERFORD e TARDIF (2009).

Devido a esta fina intimidade entre os anexos fetais ocorre o quimerismo sanguíneo, de medula óssea, baço e se estende aos outros tecidos e até mesmo na linhagem germinativa, sendo um processo comum à família *Callitrichidae* gerando descendentes férteis e normais. Em humanos é raríssimo o aparecimento de quimeras (DEERLIN e WILLIAMS, 2007).

Segundo Ardito *et al.* (1995), em 40 indivíduos cariotipados da espécie *Callithrix jacchus* investigados sobre a frequência de quimerismo, e determinando se a fertilidade da colônia foi de alguma forma afetada pelo mesmo, nota-se que nos indivíduos considerados, o grau de quimerismo variou de 2% a 97% e não foi estabelecida correlação entre o grau de quimerismo e fertilidade dos primatas. Os dois animais que apresentaram altas taxas de quimerismo foram considerados melhores cuidadores e apresentaram 84% e 97% de quimerismo, respectivamente.

Alguns autores relataram que a troca de células entre gêmeos fraternos não é limitada a tecidos linfático e hematopoiético, mas envolve também células germinais, que, no início das fases de desenvolvimento, também migram do epitélio endodérmico do saco vitelino para os sulcos germinais (HAMPTON, 1973).

O quimerismo sempre recebeu especial interesse dos pesquisadores da área de citogenética em bovinos, pois nesta espécie ocorre um fenômeno chamado *Freemartin*, caracterizado por sinais de virilização da fêmea nascida em parto gemelar com macho (SANCHES-MOGADO *et al.*, 2003). Rejduch *et al.* (2000) corroboram o estudo acima citado, utilizando hibridização "*in situ*" com fluorescência (FISH), identificou que em touros gêmeos com fêmeas, quiméricos no sistema hematopoiético e em células germinativas haviam células provenientes da irmã. Esses animais são inférteis, assim incapazes de transmitir para as próximas gerações o quimerismo.

Todavia, os calitriquídeos quimeras apresentam fertilidade normal (HAMPTON, 1973). Sanches-Mogado *et al.* (2003) observaram que uma fêmea de *C. jacchus* apresentava genitália externa ambígua. A concentração de testosterona correlacionou-se com a esperada para sagui fêmea, assim como genitália interna, consistia em ovários, com folículos em vários estádios de desenvolvimento e útero normais. Embora genotipicamente, o cariótipo encontrado determinava quimerismo XX / XY. O gene ZFY e o SRY foram amplificados, indicando que este sagui fêmea possuía sequências cromossômicas ligadas ao cromossomo Y.

Ross *et al.* (2007), relataram a existência do quimerismo fora do sistema hematopoiético. Sweeney *et al.* (2012), encontrou quimerismo em todos os sistemas de órgãos testados (cérebro, baço, fígado, pâncreas, rim, pulmão, medula óssea, jejuno, coração, sangue, fibroblastos). Nesses os níveis de quimerismo variaram muito, entretanto, e em grande parte, não atingiram os níveis observados no sangue, medula óssea ou outros tecidos hematopoiéticos. Além disso, níveis de quimerismo não variaram muito entre os tecidos ao longo das linhas germinativas. Dado o nível geralmente baixo de quimerismo em alguns tecidos, uma hipótese razoável sugere que a infiltração sanguínea ou linfocítica estaria influenciando no quimerismo visto nos órgãos. Esta hipótese foi ancorada pela comprovação de que os animais com enterite linfocítica crônica, apresentaram níveis mais elevados de linfócitos quiméricos nos tecidos afetados. Além disso, estudos de fibroblastos puros, não contaminados por células de origem

hematopoiética, não mostram evidências de quimerismo. Corroborando Sweeney *et al.* (2012), Takabayashi e Katoh (2015) detectaram quimerismo restrito aos tecidos linfáticos e hematopoiéticos, como medula óssea, timo, baço, linfonodos e células sanguíneas, como resultado do DNA extraído de unhas sem contato com sangue. Estes achados respaldam a origem do quimerismo de que um fluxo sanguíneo comum, presumivelmente incluindo células-tronco hematopoiéticas, ocorre em gêmeos durante o desenvolvimento uterino (BENIRSCHKE *et al.* 1962). Esta hipótese concilia a observação do quimerismo em órgãos derivados de mesmo folheto (SWEENEY *et al.*, 2012). Em humanos o quimerismo é raro, Sudik *et al.* (2001) descreveu o caso de uma mulher fértil que apresentava células XY em 99% dos linfócitos, proveniente de gestação gemelar.

O sagui comum apresenta um sistema de reprodução no qual um casal é o dominante ou apenas uma fêmea é a dominante, as demais são inibidas hormonalmente e por intimidação. O sistema prevê auxílio na criação (figura 7), incluindo alimentação e proteção aos filhotes, visando o retorno da fêmea dominante à reprodução após desmame e sucesso da prole (ZUHLKE e WEINBAUER, 2003).



Figura 7: Gêmeos de *Callithrix spp.* recebendo cuidados dos membros do grupo.
Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=callithrix>.

Os calitriquídeos são os únicos mamíferos que tem como hábito a reprodução cooperativa dividindo entre os membros o cuidado à prole. O cerne da reprodução é a propagação dos genes do indivíduo, que pode ocorrer de forma direta ou através de seus parentes. Logo a cooperatividade exercida traria benefícios a colônia (figura 8) (HAMILTON, 1964; MENDES, 2010). As análises de genotipagem de microssatélites e o sequenciamento de DNA mitocondrial têm revelado que apesar dos grupos serem compostos por famílias ampliadas, é possível que haja heterogeneidade genética devido a migrações entre populações. Um estudo demonstrou que em um grupo de nove animais, os indivíduos apresentavam cinco linhagens maternas. A existência de grupos com diferentes linhagens aponta questões sobre conflitos reprodutivos, troca de capela (grupo de macacos), na evolução e manutenção do cuidado cooperativo nesta espécie (FAULKES *et al.*, 2009).

Estima-se que tenha ocorrido a redução no tamanho corporal dos saguis por pressão de predação. Quanto menor o tamanho corporal, mais fácil obter esconderijos, menor a quantidade de alimentos e maior a população no mesmo espaço (EISENBERG, 1981). Marroig e Cheverud (2009) observaram que em saguis há um desvio significativo no tamanho corporal diminuto e peso ao nascer quando comparados a outros Macacos do Novo Mundo. Esse fenômeno ocorre devido a um processo heterocrônico, onde o índice de crescimento embrionário em saguis foi reduzido, contrastando com os demais primatas onde a miniaturização ocorre após o nascimento.

Harris *et al.* (2014) observaram seleção positiva entre as adaptações reprodutivas como gestação gemelar, tamanho do feto reduzido e a redução do tamanho corporal quando adulto. Também notaram que os genes *WFIKKN1*, *GH* e *IGF* apresentam diferenças entre animais gemelares e não gemelares (*Callimico*) na família *Callitrichidae*. Possivelmente esta redução dos fetos em relação aos adultos, sua gestação em período menor que seus ancestrais, lentidão no crescimento intrauterino, proporcionou melhora reprodutiva, uma vez que se enquadram melhor para passagem através da pelve materna, gerando menos casos de distocias. Em relação aos *Callimicos*, o peso destes é maior ao nascer em relação ao adulto e provavelmente tenha interferido para a gestação simples como reflexo adaptativo (MARTIN, 1992).

Segundo Lin *et al.* (2012), o sagui apresenta diferenças de padrão de metilação em relação ao rato nas células testiculares denominadas Sertoli, que dão origem aos

espermatozoides. Os genes *POU5F1* e *NANOG* apresentam inversão no padrão de metilação entre rato e sagui, indicando a discrepância existente entre espécies de mamíferos, tornando o sagui um modelo mais próximo do humano pela ancestralidade comum. A alteração na transcrição proteica ocorre ao longo da vida do animal de neonato até a fase adulta, sugerindo que podem ocorrer reduções transitórias ou até mesmo a perda da produção proteica. Os humanos e saguis apresentam desenvolvimento testicular similares, pois mantém gonócitos mesmo após o nascimento, sendo que esta não foi observada em outros primatas (ALBERT *et al.* 2010). Recentemente, o sagui tem atraído muita atenção (WORLEY *et al.*, 2014), uma vez que tem susceptibilidade a doenças e perfis farmacológicos similares aos seres humanos, tornando-se um modelo adequado para triagem toxicológica e desenvolvimento de medicamentos. Os efeitos teratogênicos de alguns compostos têm mostrado diferir significativamente entre roedores e primatas (MANSFIELD, 2003).

O projeto de sequenciamento de DNA montado pela Universidade de Washington St. Louis (Missouri, EUA) (WUSTL), no Centro de Sequenciamento da Faculdade de Medicina e Genômica, e do Colégio de Medicine Baylor (BCM) o Centro de Sequenciamento Genômico Humano, Texas, EUA está disponível através do NCBI *GenBank*. O genoma do sagui foi sequenciado usando DNA a partir de um sagui fêmea (com base de dados de 10 genomas ao todo) fornecido pelo Centro Nacional de Pesquisa em Primatas em San Antonio, Texas, EUA, assumindo uma cobertura de 95% de todo o genoma. Este sequenciamento aumenta as perspectivas para o desenvolvimento de muitas pesquisas (WORLEY *et al.*, 2014).

Os gêmeos monozigóticos (MZ) originam-se de um único óvulo fertilizado e forma um zigoto, que se divide em dois embriões. Em humanos cerca de 1% dos nascidos vivos são provenientes de gestações gemelares, sendo a mortalidade mais acentuada nestes (SILVA *et al.* 1988). Segundo Peralta *et al.* (2009) casos com transfusão sanguínea entre fetos gemelares têm prognóstico ruim, com alta mortalidade e elevados índices alterações neurológicas nos sobreviventes. Esta condição ocorre por meio de anastomoses vasculares arteriovenosas placentárias em cerca de 10 a 30% das gestações gemelares monocoriônicas.

Os gêmeos fraternos ou dizigóticos (DZ) são observados em cerca de 2/3 das gestações múltiplas. Estes são oriundos da fecundação de dois óvulos por dois

espermatozoides, sendo seus genótipos cerca de 50% diferentes, como qualquer parente em primeiro grau, a gestação pode ser dicoriônica e diamniótica (FINBERG, 1992).

4.2 Epigenética

É um termo usado na genética para inferir sobre modificações na expressão gênica que não estão relacionadas a alterações na sequência de bases do DNA, podendo ser reversíveis (RUSH e PLASS, 2002) e herdáveis durante a divisão celular (FEINBERG e TYCKO, 2004).

A regulação epigenética é caracterizada por uma série de modificações complexas, que incluem a metilação do DNA em regiões do genoma geralmente ricas em dinucleotídeos CpG (FUKS, 2005), modificações de proteínas denominadas histonas, como acetilação, fosforilação e metilação (TAMBURINI e TYLER, 2005; LEBEDEV e SAZHENOVA, 2008) e RNAs não codificadores (ncRNAs) (NOWSHEEN *et al.*, 2012). As causas das marcas epigenéticas podem ser fatores ambientais ou meio no qual essas moléculas de DNA se encontram, sendo a sua base molecular traduzida em modificações do DNA (extra nucleotídicas) e histonas, integrando a cromatina que o envolve (VARDHMAN e RAKYAN, 2006).

As modificações epigenéticas do DNA e da cromatina regulam o funcionamento do genoma durante o desenvolvimento dos animais e quando adulto (REIK e WALTER, 2003). Nas células somáticas, as alterações epigenéticas são geralmente estáveis sendo distintas para cada um dos diferentes tipos de tecidos especializados (VARDHMAN e RAKYAN, 2006).

4.2.1 *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico é uma modificação epigenética de regulação gênica que resulta em expressão de origem parental monoalélica específica (KILLIAN *et al.*, 2000; BARLOW e BARTOLOMEI, 2014) (Figura 9). O *imprinting* caracteriza-se como uma

modificação normal e essencial para a evolução do indivíduo, definindo mecanismos de adaptação da espécie ao meio (COURT *et al.*, 2014). Diferentes teorias têm sido sugeridas para esclarecer o aparecimento do *imprinting* genômico em mamíferos (BARTOLOMEI e TILGHMAN, 1997). O modelo mais aceito infere que a marca surgiu a partir da constatação de que os genes *H19*, *IGF2R* são paternalmente e *IGF2* maternalmente silenciados. Haig e Graham (1991) sugeriram que o *imprinting* genômico resultou de um “cabo de guerra” na tentativa de permitir o crescimento fetal sem esgotar os recursos maternos.

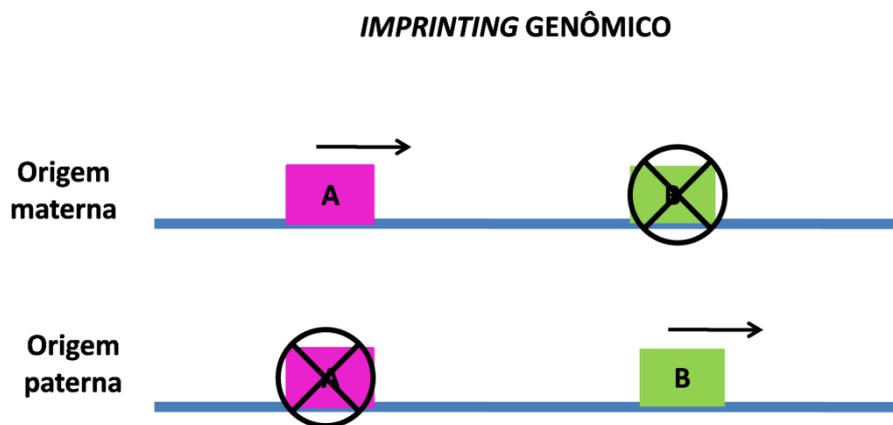


Figura 8: Esquema de *imprinting* genômico. Expressão materna: gene A sendo transcrito e gene B "silenciado"; Expressão paterna: gene A "silenciado" e gene B sendo transcrito. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

De acordo com Wang *et al.* (2013) a descoberta do *imprinting* genômico por meio de estudos em embriões manipulados indicou que o genoma paterno tem uma influência maior no desenvolvimento placentário. Os genomas parentais são funcionalmente, não equivalentes, durante o desenvolvimento de mamíferos. Deve-se tal fato a um grupo de genes denominados imprintados cuja expressão é dependente da sua origem parental. Alguns destes genes são transcritos quando herdados do pai enquanto outros são expressos quando herdados da mãe. A característica mais marcante destes genes é que os alelos herdados ativos e inativos coexistem dentro de células individuais. A origem parental dos alelos sujeitos ao *imprinting* pode muitas vezes ser distinguida pela sua metilação diferencial no DNA que é uma das alterações responsáveis por regular a sua expressão monoalélica durante o desenvolvimento (SURANI, 2001; SANLI e FEIL, 2015).

O mecanismo de *imprinting* envolve um processo de marcas epigenéticas específicas das células germinativas quando os cromossomos homólogos são segregados em células germinativas masculina e feminina. Estas modificações são então herdadas após a fertilização quando regulam a expressão de genes que sofreram *imprinting* durante o desenvolvimento e em adultos. Os genes de expressão monoalélica têm um papel significativo no desenvolvimento de mamíferos, por exemplo, na regulação do crescimento embrionário e na diferenciação celular. O desenvolvimento partenogenético é impossível em mamíferos por causa destes genes (SURANI, 1984). Baquet *et al.* (2008) revelaram que em *Tympanoctomys barrerae*, um roedor tetraploide, há manutenção do *imprinting* genômico, apresentando-se como uma exceção a regra. Demonstraram que há silenciamento parental específico de pelo menos um gene, e a inativação do cromossomo X é conservada.

O *imprinting* é um processo epigenético que se associa a três etapas: a marcação do DNA dos gametas parentais, a manutenção dessa marca durante o desenvolvimento embrionário e nos tecidos somáticos adultos e o reajuste da marcação no início da gametogênese do indivíduo (HALL, 1990) (Figura 9).

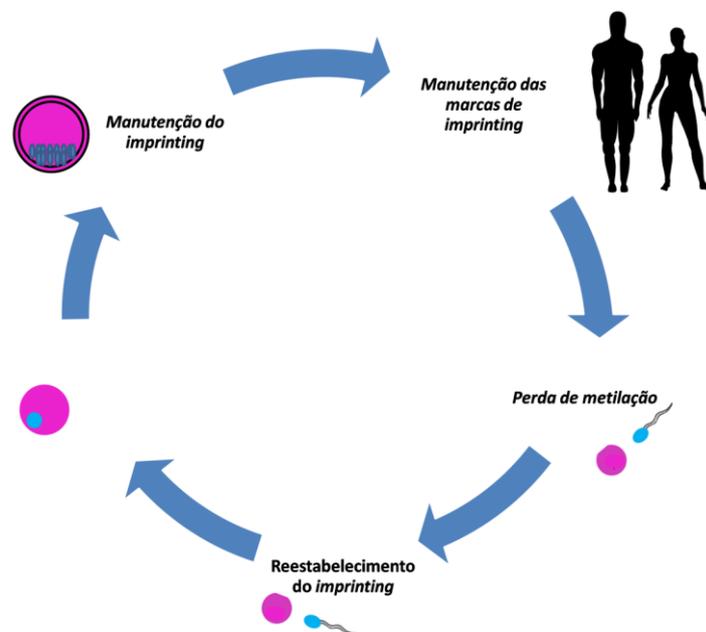


Figura 9: Perda de metilação pelos gametas, reestabelecimento da metilação após fertilização (metilação de novo), manutenção das marcas de metilação durante a fase adulta e perda do *imprinting* genômico em humanos durante o desenvolvimento. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

O primeiro passo envolve a remoção de todas as marcas parentais nas células germinais primordiais (PGCs) de modo que os cromossomos homólogos alcancem um estado epigenético equivalente (HALL, 1990). Os cromossomos recebem marcas (metilação *de novo*) as quais determinam a sua origem materna ou paterna, e estas podem ser preservadas durante várias gerações de células somáticas. Aparentemente, ocorrem alterações idênticas nas PGCs nos machos e nas fêmeas (RIBEIRO, 1997). A marca que é denominada *imprinting*, ocorre devido à ativação ou inativação diferencial de *locus* nos cromossomos de origem materna e paterna, e é alterada durante a meiose, na formação dos gametas. Isto inclui a perda de metilação específica de alelos associada a genes imprintados (SANLI e FEIL, 2015), bem como a reativação do cromossomo X inativo na linha germinal feminina. Existe uma reprogramação do genoma no zigoto e durante o desenvolvimento pré-implantação. Isto inclui a desmetilação extensa do genoma. A diferença crucial é que a metilação parental alelo-específica não é apagada em embriões em estágios precoces (SURANI, 2001).

Muitos genes que sofrem *imprinting* em camundongos mapeiam-se fisicamente próximos uns dos outros formando arranjos de 3 a 12 genes, chamados *clusters* (SURANI 2001), expandindo 100 a 3700 kb de DNA genômico. Esses arranjos podem conter tanto genes com *imprinting* materno quanto paterno. Contudo, as marcas epigenéticas podem controlar genes a longa distância e influenciar a expressão de múltiplos genes no mesmo cromossomo (EDWARDS e FERGUSON-SMITH, 2007; BARLOW e BARTOLOMEI, 2014).

Vários genes imprintados estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento fetal, e a maioria é expressa na placenta. Estes demonstram uma complexa interação da regulação gênica incluindo envolvimento de RNA não codificador, metilação diferencial das ilhas CpG e regiões controladoras de *imprinting* (POON *et al.*, 2002).

Sabe-se que os genes *imprintados* são constantemente associados com crescimento. Entre os mecanismos epigenéticos, o *imprinting* é o mais esclarecido. O modelo correto de desmetilação garante que o padrão de genes expressos em cada tipo celular seja o correto, na tentativa de resguardar o indivíduo de alterações fenotípicas indesejáveis (COURT *et al.*, 2014).

Segundo Surani (2001) os efeitos fenotípicos grosseiros de erros de *imprinting* incluem letalidade embrionária precoce, efeitos no crescimento e distúrbios comportamentais. O gene *IGF2* situado no braço longo do cromossomo 7, foi o primeiro a ser identificado como imprintado em camundongos. Estes animais com mutação neste gene apresentam retardo no crescimento, mas surpreendentemente, apenas quando a mutação foi herdada do pai. A herança da mutação materna produz prole normal. Isso ocorre porque apenas o alelo paterno do *IGF2* é ativo e o alelo materno é "silenciado". O *IGF2* desempenha papel significativo na regulação do crescimento embrionário em camundongos e em seres humanos.

Surani (2001) ainda descreve uma mutação embrionária (deleção), no cromossomo 17, que é letal quando herdada da mãe, mas a herança paterna da mutação resulta em camundongos normais. Esta região contém o gene *imprintado IGF2R* e apenas o alelo materno deste gene é expresso. Assim, nos camundongos mutantes a perda de *imprinting* no *IGF2R* representa aumento de aproximadamente 30% no tamanho do neonato em relação aos nascidos "normais". Young *et al.* (2001) relataram que há uma relação entre a *Large Offspring Syndrome (LOS)*, ou síndrome da cria grande em ovelhas, e alterações da expressão e do padrão de metilação do gene *IGF2R* em ovinos produzidos *in vitro*, sendo este também um gene *imprintado* nesta espécie.

Segundo Cheong *et al.* (2015) embora o *imprinting* seja mantido entre os mamíferos, ocorrem domínios de expressão específicos entre espécies e tecidos. Em seu estudo utilizaram um primata não humano, *Macaca fascicularis*, para avaliar *imprinting* no gene *IGF2R* que tal como no rato e ao contrário do humano sofre *imprinting*. O autor sugere ainda diferenças fundamentais nos mecanismos de controle de *imprinting* entre espécies de primatas e roedores em alguns domínios. A análise da expressão do gene *IGF2R* em vários tecidos de *Macaca fascicularis* indica que a expressão monoalélica ocorra de forma consistente, exceto nos testículos, onde a expressão de *IGF2R* foi bialélica. Contudo, o gene *IGF2R* é polimorficamente imprintado em placenta humana (MONK *et al.* 2006).

Saguis e roedores apresentam diferenças epigenéticas as quais podem ou não estar conservadas em humanos; análises de metilação do DNA identificaram perfis epigenéticos únicos para sagui e camundongos. Os promotores *NANOG* e *POU5F1* em células espermatogênicas exibiram estado oposto de metilação entre saguis e camundongos, enquanto que os *loci DDX4* e *LEFTY1*, bem como os genes imprintados,

exibiram um padrão de metilação evolutivamente conservados nestes primatas que têm grandes vantagens como modelos para a biologia reprodutiva humana (LIN *et al.*, 2012).

Langenstroth-Röwer *et al.* (2016) revelaram que na região investigada do gene imprintado *H19* em camundongos e humanos adultos, este apresentava-se não metilado em células germinais em machos neonatais e é gradualmente metilado durante a maturação destas células (aos 4 meses: $45,0 \pm 14,7\%$, aos 8 meses: $81,5 \pm 1,9\%$, células germinativas adultas: $91,7 \pm 2,9\%$). Os níveis calculados de metilação do *H19* para camundongos adultos nas células testiculares permaneceram abaixo dos valores de metilação dos espermatozoides em humanos.

Wang *et al.* (2013) utilizando RNA de trofoblasto de híbridos de cavalo e burro, demonstraram diferenças genótípicas que permitiram a identificação da origem parental da maioria dos genes expressos. Desta maneira, foi identificado um grupo central de 15 genes imprintados, dos quais 10 são expressos paternalmente. Além disso, 78 genes candidatos ao *imprinting* identificados por sequenciamento de RNA também mostraram expressão paterna, e expressão de origem materna na placenta, mas não no feto, e a maioria não apresentou 100% de silenciamento do alelo imprintado, havendo variabilidade entre as amostras. Esta variabilidade resulta em uma assinatura epigenética única para cada placenta, que contribui para a variação do ambiente intra-uterino e, portanto, apresenta a oportunidade para que a seleção natural opere na origem da regulação. Tomadas em conjunto, estas características destacam a plasticidade do *imprinting* em mamíferos e a importância da placenta para o *imprinting* genômico. Monk *et al.* (2006) relataram que em mamíferos com gestação única frequente, como em humanos, pela ausência de competição possa haver uma explicação para o *imprinting* placentário.

As síndromes humanas de Prader-Willi e Angelman, levaram à identificação do gene imprintado *SNRPN* e *SNURF*. Outros genes imprintados presentes neste domínio foram notados, uma vez que os genes são frequentemente encontrados em clusters. Similarmente, o *H19* está localizado próximo ao *IGF2*, em humanos, e o segundo está implicado no desenvolvimento do tumor de Wilms e rabdomyosarcomas. Os genes anteriormente conhecidos com *PEG2* e *PEG4* revelaram-se *IGF2* e *SNRPN*, respectivamente. Outro gene imprintado, *MEG1* / *GRB10* no cromossomo 11 de camundongos, mostra a expressão do alelo materno tecido-específico e paterno em cérebro (ARNOUD *et al.*, 2003), e também afeta o crescimento embrionário através de sua interação com o receptor de insulina (*IGF1*)

Juntos, a inativação do cromossomo X (XCI) e o *imprinting* afetam a expressão de 5% a 10% dos genes no genoma do mamífero. De um ponto de vista funcional, as mutações dentro dessas regiões específicas poderiam ser facilmente elucidadas, já que muitas vezes são originadas por contribuições da cópia "silenciada" e poderiam, assim, causar graves defeitos de desenvolvimento (LEE e BARTOLOMEI, 2013). Nugent *et al.* (2015) mostraram que a feminização do cérebro é mantida pela supressão ativa da masculinização via metilação do DNA, que regula tanto o gene global como a expressão de isoformas específicas. O efeito primário dos esteróides gonadais na área pré-óptica, pode reduzir a atividade das enzimas DNA metiltransferases (Dnmt), responsáveis pela metilação do DNA, desta maneira interferindo na metilação do mesmo e permitindo a expressão epigenética de genes masculinizantes. Alterações no *imprinting* podem causar perda ou ganho de metilação e gerar modificações de expressão.

4.2.2 Metilação do DNA

O padrão de metilação do DNA é uma das modificações que contribui para o controle da expressão gênica (LEWIN *et al.*, 2001). A metilação ocorre nos mamíferos quando uma citosina do dinucleotídeo CpG recebe um radical metila no carbono 5, transformando em 5-metilcitosina (5mC), transferido da S-adenosilmetionina (SAM) através de uma reação enzimática catalisada por uma DNA metiltransferase (DNMT). SAM é um potente doador de grupo metil necessário nas reações de metilação do DNA (figura 10), sendo esta importante para o desenvolvimento celular, constituindo um mecanismo de silenciamento gênico que está relacionado à expressão de diversas doenças e síndromes (GUERRA-SHINOHARA, 2010).

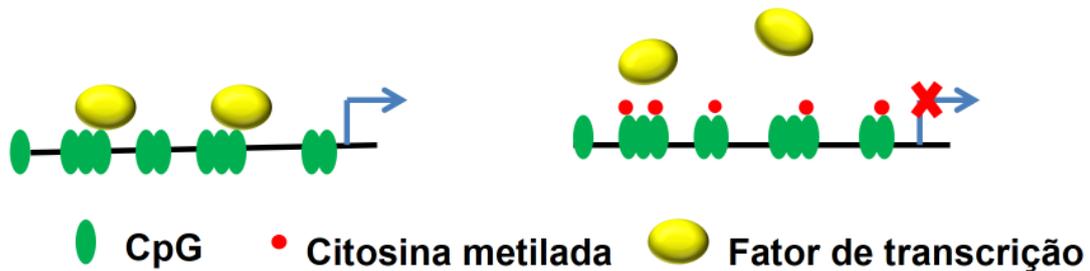


Figura 10: Metilação do DNA. Círculos vermelhos representam o radical metil na citosina impedindo a ligação de fatores de transcrição, seta azul representa a transcrição gênica. Ausência da metilação da citosina permite a transcrição gênica. Fonte: Adaptado, Cellular and Molecular Life Sciences (2002).

A metilação do DNA na posição 5 no anel do carbono da citosina em uma sequência dinucleotídica CpG em regiões promotoras gênicas, é um marcador epigenético essencial para o silenciamento de genes de transcrição (SHARIF *et al.*, 2007). Os locais de grande concentração de dinucleotídeo CpG são chamadas de ilhas CpG (CGI), podendo estar presentes nas regiões diferencialmente metiladas dos alelos materno e paterno (MARQUES *et al.*, 2007). CGI é definida classicamente como um local com mais de 200 pb (pares de bases), contendo pares CG > 50%, em que a relação de conteúdo de CG observado/esperado é > 0,6 em relação ao restante do genoma (ARNOUD *et al.* 2003; COURT *et al.*, 2014). CGI podem cobrir aproximadamente 0,7% do genoma humano, contendo 7% dos dinucleotídeos CpG. A análise computacional de ocorrências de CpG e distribuições de locais de restrição no genomas de mamíferos sugere ainda que haja uma substancial proporção de ilhas de CpG metiladas em locais de tecidos alterados (FAZZARI e GREALLY, 2004). As ilhas de CpG geralmente são encontradas nas regiões promotoras dos genes, indicando a relevância desse mecanismo na manutenção do funcionamento celular. A metilação no promotor resulta na inativação da transcrição do gene (COURT *et al.*, 2014).

O padrão de metilação do DNA de um indivíduo é tecido específico e mantêm-se ao longo da vida (BIRD, 2002; STRICHMAN-ALMASHANU *et al.*, 2002). É um dos processos que melhor caracteriza a alteração do fenótipo, mas que não está associado a mudanças na sequência de DNA (ZHAO e Li, 2009).

A extensão da metilação é controlada por uma sequência específica de DNA chamada Região Controladora de *Imprinting* (ICR). O efeito da ICR é regular a estrutura e a metilação da cromatina e se estende por centenas de kilobases de DNA adjacentes (GREALLY et al., 2000). Estudos recentes fornecem ideias para a ação de desenvolvimento restrito das ICR. Em diversos domínios de *imprinting*, a ICR expressa um longo ncRNA (RNA não codificante) que medeia a repressão da cromatina, em outros domínios de *imprinting* altera a estruturação da cromatina que aumenta, ou até impede, a transcrição final dos genes (SANLI e FEIL, 2015).

No núcleo das células de mamíferos o silenciamento gênico é estável, mantido de maneira hereditária podendo ser correlacionado a regiões promotoras de metilação do DNA (RICHARDSON, 2003). A maioria do genoma tem predominância de regiões hipermetiladas (HiperMR) não passíveis de transcrição e poucas regiões de baixa proporção de metilação que são chamadas de regiões hipometiladas (HipoMR) (SONG et al., 2013). Os domínios parcialmente metilados (PMDs) são grandes regiões do genoma que mostram metilação parcial observada em linhagens de células germinativas e células cancerosas. Já as regiões diferencialmente metiladas (DMR, do inglês “*Differentially Methylated Regions*”) são aquelas onde um dos alelos parentais é diferencialmente metilado, ou seja, um alelo é expresso e o outro parental é silenciado (metilado) apresentando um padrão de hemimetilação, desta maneira podemos ter referência de uma área que possivelmente sofra *imprinting*. Uma região hemimetilada pode também ser resultado de expressão bialélica onde haja transcrição parcial de cada um dos alelos (WOODFINE et al., 2011). DMR podem coincidir com regiões promotoras e ilhas CpG, podendo ser indicativo de genes preditos, ou que possivelmente sofram *imprinting* (SONG et al., 2013).

Regiões diferencialmente metiladas podem ser sub-classificadas em linhagem germinativa e somática. DMR germinais são sítios com diferenças de estados de metilação entre o espermatozoide e o óvulo. Estas diferenças são mantidas pós-fertilização. Nas DMR somáticas, a metilação do DNA ainda não é de origem parental específica, mas é adquirida após a fertilização, num evento chamado *imprinting de novo*. Uma vez estabelecidas as marcas de metilação do DNA, estas podem ser capazes de suportar eventos de metilação (ambiental, nutricional por exemplo) do DNA, e reprogramação do genoma durante a diferenciação dos tecidos. O padrão diferenciado de metilação em genes que sofrem *imprinting* mantém-se durante toda vida, contudo na

formação gamética há ampla reprogramação de acordo com o sexo gonadal da linha germinal. Esta funcionalidade robusta de manutenção da metilação do DNA em tecidos somáticos está relacionada à saúde epigenética global da célula (EDWARDS e FERGUSON-SMITH, 2007; WOODFINE *et al.*, 2011).

Segundo BARLOW (2011), em cinco aglomerados de genes por ele estudados *IGF2R*, *KCNQ1*, *GNAS* e *PWS*, a DMR gamética tem um perfil de expressão materna adquirida na oogênese, ao passo que em outros dois aglomerados (*IGF2* e *DLK1*), o perfil de expressão paterna é adquirido durante a espermatogênese. Nestes exemplos, a DMR gamética pode controlar a totalidade ou parte do aglomerado de genes.

Em seu estudo Pervjakova *et al.* (2016) compararam o estado de metilação do DNA de genes que sofrem *imprinting*, e ICR que abrigam DMR em 18 tecidos somáticos de humanos. Demonstraram que os genes marcados e as DMR da ICR mantêm padrões de metilação caracterizados por níveis intermediários de metilação nos tecidos somáticos, que são preferidos em uma região específica da região promotora, localizada a 200 a 1.500 pares de bases (pb) do local de início da transcrição. Esta metilação intermediária está em acordo com a expressão gênica de um único alelo não metilado e com o silenciamento de um alelo parental recíproco através da metilação do DNA. As únicas exceções foram observadas para DMR de genes placenta específicos, que mostraram baixos níveis de metilação, sugerindo que estes genes podem escapar da regulação epigenética em tecidos somáticos extraembrionários.

A metilação do DNA é primordial para que ocorra o desenvolvimento embrionário, envolvendo os processos de metilação *de novo*, metilação de manutenção e desmetilação (NEWELL- PRICE *et al.*, 2000).

Atualmente, cerca de 100 genes humanos são conhecidos por serem sujeitos ao *imprinting* genômico e muitos outros são preditos a essa marca epigenética (JIRTLE, 2017). Cada agrupamento de *imprinting* possui pelo menos uma DMR, onde a metilação do DNA está presente em um alelo parental (EDWARDS e FERGUSON-SMITH, 2007).

5.0 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

5.1.1. Licença Ambiental

O manejo em cativeiro dos animais e as coletas foram realizadas sob os licenciamentos do Instituto Brasileiro Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio nº. 33965-2) e do Instituto Brasileiro do Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (CGEF nº. AM3301.8101/2013-RJ) outorgados ao Prof. Dr. Carlos Ramon Ruiz Miranda, Coordenador Geral do Setor de Estudos em Etologia, Reintrodução e Conservação de Animais Selvagens (SERCAS), e colaborador deste estudo. A colônia de saguis foi criada como parte de um programa de controle de espécies invasoras na zona industrial de propriedade da companhia brasileira de exploração de petróleo TRANSPETRO, localizada no Estado do Rio de Janeiro, em concordância com as recomendações do ICMBio e do Manual de Cuidados e Uso de Animais em Laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

5.2 *Procedência dos Animais*

Todos os saguis pertenciam a uma mesma colônia em cativeiro do SERCAS, e oriundos da Ilha D'Água, na Bahia de Guanabara da cidade do Rio de Janeiro – RJ (figura 11).



Figura 11: *Callithrix spp.* em habitat natural. Fonte: MIRANDA, C.R.R. (2017).

5.3 Tipo de estudo

O presente estudo caracteriza-se como descritivo, de pesquisa básica, em genética molecular, que utilizou amostras de sangue coletadas para exames de rotina para avaliação física acordo com a necessidade e para a permanência dos animais saudáveis, e de tecidos remanescentes de necropsia de saguis da colônia de cativeiro do Setor de Estudos em Etologia, Reintrodução e Conservação de Animais Selvagens (SERCAS).

5.4 Delineamento

Das amostras biológicas foram extraídos DNA genômico e RNA total. O perfil de metilação de DNA em *loci* específicos (candidatas DMR- cDMR) foi determinado pelo método indireto de digestão enzimática sensível à metilação (DESM) associada à PCR quantitativa fluorescente e análise dos produtos de amplificação por eletroforese capilar de alta resolução e origem alélica da metilação. O padrão de expressão transcricional dos genes relacionados às cDMR foi determinado utilizando o método de sequenciamento de base única para polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) informativos pela técnica da PCR quantitativa fluorescente e análise dos produtos de amplificação por eletroforese capilar de alta resolução.

5.5 Material Biológico

Para a determinação do perfil de metilação das cDMR alvos deste estudo, foram genotipadas 50 amostras biológicas pertencentes a 31 animais do biorrepositório NUDIM/SERCAS/LMPA, isolados de células de sangue total e outros tecidos corporais.

Os animais foram anestesiados por médico veterinário responsável pelos procedimentos no SERCAS com xilazina a 2%¹ dose de 2,5mg/kg, diazepam (5mg/ml)² dose de 1,25mg/kg e cetamina a 5%³ 12,5mg/kg e seguido de teste de nível analgésico através de frequência cardíaca, respiratória, reflexos corneais, palpebrais e interdigital, para evitar qualquer desconforto ao animal. Em caso de eutanásia, após anestesia profunda do animal este recebeu através de injeção intravenosa cloreto de potássio 19,1%⁴ em volume adequado à parada cardíaca indolor ao animal. Nenhum animal foi anestesiado ou eutanasiado para este projeto.

1 Rompun-Bayer.

2 Diazepam solução injetável (ampola 2 ml) Teuto®.

3 Frasco de 10 ml, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

4 Isofarma, Indústria Farmacêutica LTDA.

Todas as amostras teciduais foram coletadas de cadáveres, em necropsia, realizada no laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), ou quando fluido (sangue) os animais foram submetidos à anestesia para procedimentos de rotina do SERCAS, à conveniência do mesmo. Nenhum animal foi eutanasiado para obtenção de tecidos.

O sangue coletado foi transferido para tubos estéreis contendo heparina para estudo de citogenética e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para extração de DNA e RNA, ambos mantidos sob-refrigeração a 4°C até o momento da experimentação. O tubo de EDTA contendo sangue do espécime foi, em até 24h, processado para remoção de leucócitos com técnica utilizando *Ficoll® Paque Plus*⁵. Em 10 ml de solução tampão foi adicionado 200µl de PBS (soro fetal bovino). Cerca de 2 a 3 ml de sangue foram diluídos em mesmo volume de solução de PBS. Em novo frasco previamente identificado foi adicionado 3 ml em *Ficoll* e gentilmente a solução sangue+PBS foi adicionada para que não houvesse mistura. Foi centrifugado a 1.400 rpm por 30 minutos. Foi removido o plasma com células monucleares de periferia do sangue (PBMC) e colocado em novo frasco previamente identificado e adicionado três vezes o volume de solução de PBS. Foi novamente centrifugado. Em seguida, a fase retida, contendo leucócitos, foi transferida para novo tubo contendo 100µL de *RNAlater*⁶™, solução que impede a degradação de RNA e acondicionado em freezer -70°C.

Para coleta dos tecidos de cada animal foram utilizados materiais cirúrgicos e placas de Petri estéreis individualizados. Todos os participantes presentes estavam paramentados com máscara, touca, luvas e jaleco para evitar contaminação da amostra.

Os tecidos foram escolhidos com base na existência de dados prévios de porcentagem quimerismo na literatura (ROSS *et al.*, 2007) e conveniência por presença nos cadáveres. Foram coletados (quando possível): fígado, coração, pelos, pulmão, rim, adrenal, gônada, útero, intestino, pele pilosa e glabra, músculo peitoral e abdominal, gordura visceral, medula óssea, pâncreas, olho, língua, unha com sangue e sem sangue, tecido encefálico e medular espinhal (figura 12). Tecidos da figura foram os utilizados para as análises, pois eram pouco quiméricos. Em seguida as amostras foram lavadas em PBS ou soro fisiológico estéril, para remoção de sangue do tecido, a fim de evitar

5 GE Healthcare Life Sciences "Ficoll-Paque PLUS"

6 Life Technologies™

contaminação. Nem todos os tecidos foram utilizados na experimentação, pois eram considerados quiméricos ou a concentração de DNA não foi satisfatória para as análises de digestão enzimática. Imediatamente após a coleta, cada fragmento de tecido foi imerso em *RNAlater*, em tubos individuais identificados. O tamanho dos fragmentos foi de aproximadamente 4 mm de diâmetro, com o propósito de permitir a impregnação eficiente do *RNAlater* e evitar degradação do RNA a ser extraído da amostra. Para a mesma finalidade, os tubos contendo as amostras foram imediatamente levados ao freezer -70°C , onde permaneceram até a extração dos ácidos nucleicos.

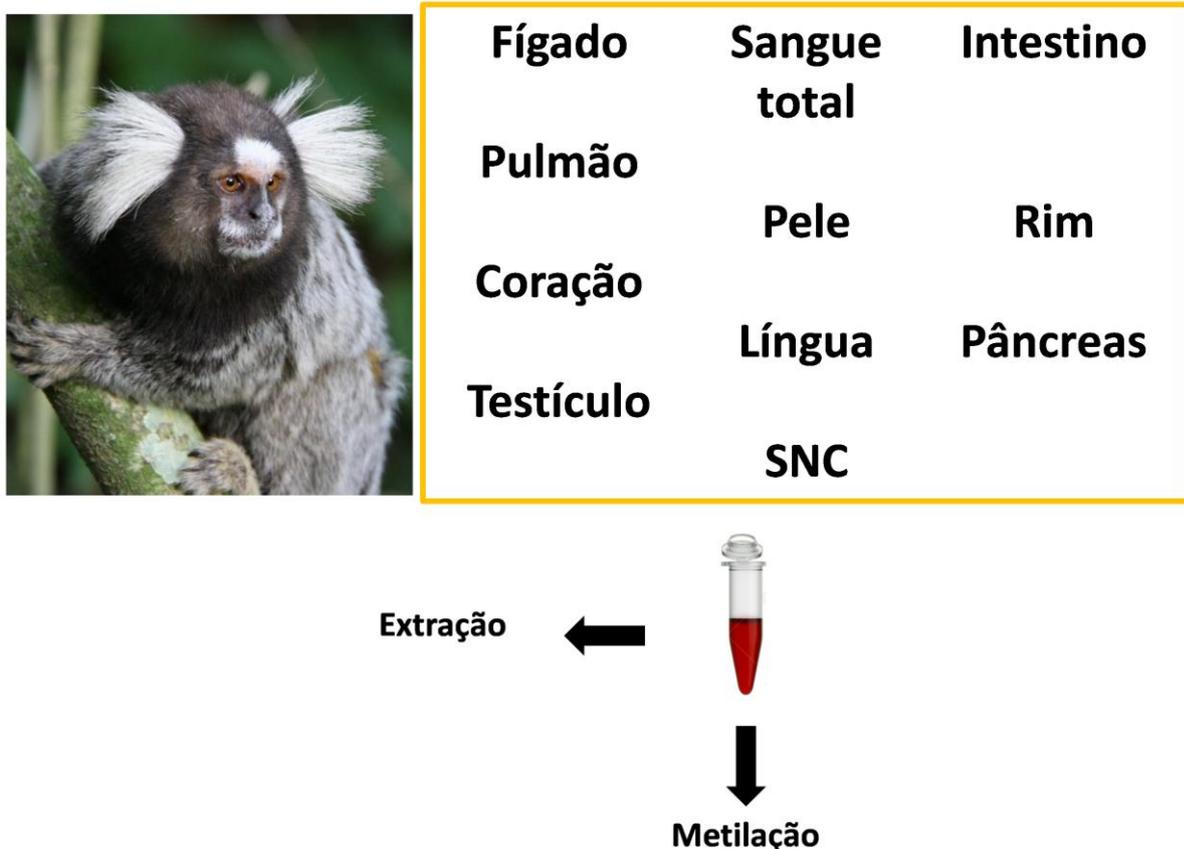


Figura 12: *Callithrix spp.*, fonte dos tecidos coletados. Após extração de DNA, estes foram utilizados para examinar padrões de metilação específicos de tecidos. Fonte: (2016).

Os resíduos foram separados para esterilização anterior ao descarte dos mesmos, bem como todo o material cirúrgico foi lavado e reesterilizado.

5.6 Extração de DNA e RNA

As amostras biológicas de sangue foram submetidas ao método de extração do DNA genômico utilizando o kit de extração e purificação de DNA genômico⁷. Todas as amostras extraídas foram quantificadas⁸ e estocadas a -20°C.

Os tecidos coletados foram retirados do *RNA Later*TM e foi adicionado 1ml de trizol. Para extração do RNA o tecido foi macerado vigorosamente com pistilo, homogeneizado e incubado por 5 minutos (sucção com a pipeta no caso do PBMC); foi adicionado 200µl de clorofórmio para 1 ml de Trizol^{®9} e agitado vigorosamente por 15 segundos, em seguida foi incubado por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente centrifugado¹⁰ a 12.000g/15 minutos a 4°C. Foi removida a fase aquosa em novo tubo estéril identificado e reservada à parte em gelo, o restante foi conservado no mesmo tubo para extração à posterior de DNA (fenol). Foi adicionado a este novo tubo 500µl de isopropanol e homogeneizado (por sucção). Foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e foi centrifugado a 12.000g/10 minutos por 4°C. O líquido foi removido e o pellet observado foi conservado. Este foi lavado com 1 ml de etanol à 75% e centrifugado à 7.500g/5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão em 35 µl de água ultrapura e estocado à -20°C.

Para extração do DNA o material conservado citado acima recebeu 300µl de etanol 100%, foi homogeneizado e centrifugado a 2.000g/5 minutos a 4°C. Foi removido o fenol-etanol, e o pellet formado foi lavado com 1 ml de citrato de sódio e etanol (0,1M de citrato em 10% de etanol) e retirou-se o tecido. Este pellet foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, invertendo gentilmente e ocasionalmente para homogeneização. Foi centrifugado a 2.000g/5 minutos por 4°C e descartado o sobrenadante, preservando o pellet. Foi adicionado 1,5 ml de etanol 75%, e centrifugado à 2.000g/5 minutos por 4°C,

7 Illustra blood genomicPrep, GE Healthcare, UKTM.

8 Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Thermo Fisher ScientificTM).

9 Thermo Fisher Scientific[®]

10 Centrifuga para laboratório - MIKRO 200/200R

descartado o sobrenadante e foi ressuspenso em 100-200µl NaOH (8mM NaOH/0,2-0,3mg/ml). Estocou-se à - 20°C.

Alguns tecidos foram extraídos em kit¹¹ segundo recomendações do fabricante, pois o trizol inibiu a atividade das enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM) utilizadas nos ensaios.

5.7 Quantificação do DNA e RNA genômico

Foi utilizado 1µl do DNA ou RNA extraídos para quantificação direta utilizando o espectrofotômetro¹² com o comprimento de onda seguindo a razão de 260/280 nm.

5.8 Análises *In Silico*

5.8.1 Seleção das candidatas a regiões diferencialmente metiladas

Foi compilado um repertório atualizado de DMR descritas no genoma humano por meio da leitura de artigos científicos filtrados em plataformas online, tais como ISIWeb of Knowledge, PubMed, utilizando combinações dos termos “DMR”, “*imprinting*” “*Differentially Methylated Region*”, “hemimethylation” and ‘human’. A relação de DMR foi confrontada com as listas de DMR disponíveis nas plataformas online GeneImprint (<http://www.geneimprint.com/>) (KILLIAN *et al.*, 2000) e MetalImprint (<http://202.97.205.76:8080/MetalImprint/>) (WU *et al.*, 2013). As coordenadas físicas das DMR informadas nos artigos foram conferidas na plataforma computacional UCSC Genome *browser* utilizando a interface gráfica do genoma de referência GRCh37/hg19 (NC_ 000015.9). A ocorrência de CGI nas DMR e o padrão esperado de

¹¹ Flexigene DNA kit 250-Qiagen.

¹² NanoDrop 2000c™-Thermo Scientific.

hemimetilação nas DMR foram validadas na mesma plataforma utilizando os estudos de CGI (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987) e sequenciamento de DNA tratado com bissulfito em diferentes tecidos (HODGES *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2013). Estas posições físicas baseadas em Okae *et al.* (2014) foram empregadas para identificar as coordenadas físicas de regiões ortólogas no genoma de referência do *C. jacchus* WUGSC 3.2/calJac3 (NC_013901.1) utilizando a ferramenta de conversão de coordenadas da plataforma UCSC. A porcentagem da identidade posicional das regiões ortólogas e a manutenção das CGI foram determinadas utilizando a ferramenta de conversão do genoma humano para genoma de referência de sagui na plataforma UCSC. As regiões ortólogas assim identificadas no genoma do *Callithrix* foram denominadas para efeito deste estudo de “DMR candidatas” (cDMR). Considerando que o estado de metilação nessas regiões foi avaliado pontualmente, isto é, para dinucleotídeos CpG específicos contidos em sítios para enzimas de restrição susceptíveis a metilação, as candidatas DMR apresentaram pelo menos um desses sítios.

As respectivas sequências de DNA em formato FASTA foram recuperadas utilizando a ferramenta de visualização interativa da plataforma UCSC. As informações sobre a espécie foram obtidas na plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=callithrix>), dando ênfase aos genes envolvidos no crescimento corporal, reprodução, funções comportamentais (*SNRPN*, *SNURF*, *GRB10*, *IGF2* e *IGF2R*).

5.8.2 Identificação de polimorfismos nas candidatas a regiões diferencialmente metiladas

Para a determinação do perfil alélico da metilação das cDMR, foram selecionados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), contudo não haviam características como MAF (frequência do segundo menor alelo) para auxiliar na escolha, apenas a sequência dos supostos SNP depositados no banco de dados do NCBI. Para metilação foram desenhados iniciadores, com base em anotações disponíveis nos bancos de dados *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>, acessado março a setembro de 2016) e *dbSNP Short Genetic Variations* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, acessado em março a setembro de 2016) (figura 13).



Figura 13: Mapa cromossômico da DMR no gene *SNRPN* em humanos. Aspectos característicos utilizados para identificar as coordenadas de regiões ortólogas no genoma de referência do *Callithrix jacchus* (WUGSC 3.2/calJac3) utilizando a ferramenta de correlação de coordenadas da plataforma UCSC. A região em realce na cor azul corresponde a ilha CpG conservada. Imagem capturada da plataforma de visualização da UCSC Genome Browser (2016).

5.9 Desenho de iniciadores para os alvos selecionados

Para o desenho de iniciadores, inéditos e específicos para a espécie (figura 14 e tabelas 1, 2 e 3), foram utilizados os programas livres e online: *OligoPerfect*^{TM13} e o *OligoCalc*^{TM14}. Os iniciadores para metilação e minissequenciamento foram sintetizados pela *GenOne, USA*, com a fluorescência 6-FAMTM. Para avaliar a complementaridade específica de cada par de iniciadores as regiões flangeadoras dos marcadores de interesse, foi utilizada a ferramenta *online* iPCR – UCSC¹⁵.

```
>calJac3 dna range=chr6:906957-907258
TCCTTATGGTGGCTGGTTTGTAACTGGGGATTTGTACTCCTCCAGCAACAGCCAGAGGTGGCAG
AGACCTGTCACTCATCCCTGAGTGCTTCCTGCGCAAGCGCAGTTGTTGACCTACTGCGGCCCATGAATGC
GGCCCATGAATGCGATCCTCCTGCTGCAGACCACGCCACCAGGGCGGGCCTCACCCTGCAGCTGAG
CTCAGAGCTTCCGTGGATTTTGGGAGGCAAGGTCAGCTGCCCCCTGCCCTCCTTCTGGGGCTATTTGA
GGAAATGCGGTCCTTTCCATAA

NC_013901.1

>hg19 dna range=chr15:25068631-25068918
TCATTATGGTGGCTGGTTTGGAACTGGGGTACTTTGTACTCCTCCAGCAACAGCCAGAGGTGGCAG
AGAGCTGTCACTCATCCCTGGGTGCCTCCTGCGCAAGCGCAGTTGTCTCCTGCGCCGACCTCGAATGCG
GTCTCCTGTGCAGACCAGCCACCAAGGGCTGGCCGCGAGCCACTGTAGCTGAGCTCAGAGCCTTCTG
TGTGGTTTGGCGGGGCAAGGTCAGCTGCCCCCTGCCCTCTCTGCGGCTATTTGAGGAATGCGGCCTTT
TTGCATAA

NC_000015.9

calJac3_dna      TCCTTATGGTGGCTGGTTTGTAACTGGGGATTTGTACTCCTCCAGCAACAGCCA
hg19_dna         TCATTATGGTGGCTGGTTTGGAACTGGGGTACTTTGTACTCCTCCAGCAACAGCCA
** ***** *

calJac3_dna      GAGGTGGCAGAGACCTGTCACTCATCCCTGAGTGCTTCCTGCGCAAGCGCAGTTGTGAC
hg19_dna         GAGGTGGCAGAGAGCTGTCACTCATCCCTGGGTGCCTCCTGCGCAAGCGCAGTTGT---C
** ***** *

calJac3_dna      CTACTGCGGCCCATGAATGCGGCCCATGAATGCGATCCTCCTGCTGCAGACCAGCCAC
hg19_dna         CTCTGCGCC-----GACCTCGAATGCGGTCCTCCTGCTGCAGACCAGCCAC
** ***** *

calJac3_dna      CGAGGGCGGGCCTCACCCTGCAGCTGAGCTCAGAGCTTCCGTGGATTTGCGGAGGC
hg19_dna         CAAGGGCTGGCCGAGCCACTGTAGCTGAGCTCAGAGCCTTCTGTGTGGTTTGGCGGGC
* ***** *

calJac3_dna      AAGGTCAGCTGCCCCCTGCCCTCCTCTGCGGCTATTTGAGGAATGCGGTCCTTTTGCAT
hg19_dna         AAGGTCAGCTGCCCCCTGCCCTCCTCTGCGGCTATTTGAGGAATGCGGTCCTTTTGCAT
** ***** *

calJac3_dna      AA
hg19_dna         AA
**
```

Figura 14: Sequência do produto de amplificação *in silico* para alvos candidatos. Em realce amarelo a localização física das sequências no genoma primário de referência. Em realce vermelho e roxo, as sequências dos iniciadores sentido e anti-sentido, respectivamente. O par de iniciadores utilizado gerou *in silico* um único fragmento, e o programa utilizado foi o iPCR do *browser* da UCSC. Blast sequência humano e sagui. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

13 Designer da InvitrogenTM (<http://www.invitrogen.com/>)

14 Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>).

15 *In silico* PCR University of California Santa Cruz, USA – <http://www.genome.ucsc.edu>.

Tabela 1: Iniciadores para caracterização e validação de polimorfismos em cDMR em *Callithrix* spp.

Gene/DMR	SNP	Iniciador DMR Sentido	Iniciador DMR Antisentido	Coordenadas Físicas
<i>SNRPN</i>	rs489352592	TCCTTATGGTTGCCTGGTTT	TTATGGAAAAGGACCGCATT	chr6:906957+907258
	rs492911296			
	rs499069717			
<i>GRB10</i>	rs492967672	AACGCGCTAGCACAGAAAG	GGTCCTGGGATTCCTGTTGT	chr8:17739417+17739673
	rs498064258			
<i>IGF2</i>	rs483704435	CACGACATCCTTCTGCTTT	CACTCACCTCTCTGGGGTTG	chr11:128288045+128288313
	rs487851589			
	rs494701010			
<i>IGF2R</i>	rs486869517	CAGCCTTCCTACCCTTGT	CTGGACAGCTCCCCAAGTT	chr4:161121651+161121920
	rs492637213			
<i>SNURF</i>	rs497159410	CCTCCACCTGTTTCATTCC	CAGGCTGGCTCTTGAGAGAA	chr6:1020676+1020943

Tabela 2: Iniciadores desenhados para minissequenciamento de base única para validação de cDMR em *Callithrix* spp.

Gene/DMR	SNP	Iniciador de Minissequenciamento
<i>SNRPN</i>	rs489352592	GAGCTCAGAGCTTCCGTGG
	rs492911296	RC-GCAGCTGACCTTGCCCTCCGCAAAAT
	rs499069717	RC-ttttCAGCTGACCTTGCCCTCCGCAAAATC
<i>GRB10</i>	rs492967672	RC-ttttttttCCCCTGGGCGCACACTGGCGGCGGC
	rs498064258	RC-ttttttttttGCCGCTCCCCGGCCACAACAATCCT
<i>IGF2</i>	rs483704435	TtttttttttttAGTCCAGTCTGAGGTGAGCTGCTG
	rs487851589	RC-ttttttttttttttttttGGCTGTGGGGCAGGCTGGGCACGGG
	rs494701010	RC-ttttttttttttttttttGCTCACCTCAGGACTGGACTCTGGC
<i>IGF2R</i>	rs486869517	TtttttttttttttttttttCCTCGCGCCCTCCTGCACCATGCAC
	rs492637213	TtttttttttttttttttttGGCGCCCTTCGCGCCCTCCTGCACC
<i>SNURF</i>	rs497159410	TtttttttttttttttttttCGGCGGCGGGCGGAGTCTGCGCA

Tabela 3: Sequências dos polimorfismos validados por DESM e minissequenciamento em *Callithrix* spp.

Gene/DMR	SNP	Sequência Anterior	Alelos	Sequência Posterior
<i>SNRPN</i>	rs489352592	CAGCTGAGCTCAGAGCTTTCCGTGG	[A/G]	TTTTGCGGAGGCAAGGTCAGCTGCC
	rs492911296	GCAGCTGAGCTCAGAGCTTTCCGTG	[A/G]	ATTTTGGGAGGCAAGGTCAGCTGC
	rs499069717	TGCAGCTGAGCTCAGAGCTTTCCGT	[C/G]	GATTTTGGGAGGCAAGGTCAGCTG
<i>GRB10</i>	rs492967672	CCATCCGGGCGAGGGTGGGATGCCG	[C/T]	GCCGCCGCCAGTGTGCGCCAGGGG
	rs498064258	TGCCCGGAGGCCCTCCGTGGAGCC	[A/G]	GCCGCTCCCCGGCCACAACAATCCT
<i>IGF2</i>	rs483704435	AGTCCAGTCTGAGGTGAGCTGCTG	[C/T]	GGCCTGTGGCCAGACGAGCCAGC
	rs487851589	GGGGCTCCGAACCACTGCCAGCCCA	[C/G]	CCCGTGCCAGCCTGCCCCACAGCC
<i>IGF2R</i>	rs486869517	CTTCGCGCCCTCCTGCACCATGCAC	[C/T]	CTGCATGCCCGTGCCTGCTGCA
	rs492637213	GGCGCCCTTCGCGCCCTCCTGCACC	[A/C]	TGCACTCTGCATGCCCGTGCCT
<i>SNURF</i>	rs497159410	CGGCGGCGGCGGAGTCTTGCGCA	[C/G]	AGTGGAGCGGCCCGGAGGATGTCT

5.10 Análises *In Vitro*

5.10.1 PCR multiplex

Para a técnica de PCR, foram utilizados iniciadores de metilação confeccionados com marcações de fluorescência. Os iniciadores sentido para os cinco *loci* analisados foram modificados com as marcações 6-FAM™ (Applied Biosystems™), os anti-sentido sem fluorescência. As reações de amplificação para DESM (digestão enzimática sensível a metilação) foram realizadas em quatro ensaios multiplex, preparados em um volume de 12,5µL sob a seguinte formulação: PCR mix 5 µL (0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂), 3µL de betaína 5mM, 0,2U de Taq DNA polimerase¹⁶. Todos os iniciadores foram aliquotados para perfazer uma solução a 20 pmol/µL. Para o ensaio um, foi utilizada a seguinte concentração de iniciadores: 0,3µL dos pares de iniciadores de controle positivo (CJ13S10557321F/CJ13S10557321R), 0,15µL negativo (CJ21S43674900F/CJ21S43674900R) e 3µL de iniciadores para a cDMR, *SNRPN*. Ensaio dois: 0,5µL dos pares de iniciadores de controle positivo e negativo, e 1,5 µL de iniciadores para a cDMR, *SNURF* (CJ6S1020676F/CJ6S1020676R). Ensaio três: 0,5µL

¹⁶ JumpStart™ Taq DNA Polymerase without MgCl₂ | Sigma-Aldrich

dos pares de iniciadores de controle positivo e negativo e 1,5µL do par de iniciadores para a cDMR, *IGF2* (CJ11S128288045F/CJ11S128288045R). Para o ensaio quatro: 0,25µL dos pares de iniciadores de controle positivo e negativo e 2µL do par de iniciadores para cDMR, *IGF2R* (CJ4S161121651F/CJ4S161121651R). Para a cDMR *GRB10* não foi possível realizar a amplificação em triplex para a análise de metilação após sucessivas tentativas com gradientes de temperatura, betaína, concentração de primers e magnésio. As reações foram realizadas nos termocicladores¹⁷, sob o seguinte ciclo térmico: (a) 95°C por 11 minutos, (b) 38 ciclos à 94°C por um minuto, 58°C (*IGF2R*), 60 °C (*IGF2/SNURF*), 63 °C (*SNRPN*) por um minuto, 72°C por um minuto, e (c) 72°C por 10 minutos.

Alíquotas de 0,6 µL do produto de amplificação foram adicionadas a uma mistura contendo 9,35 µL de formamida¹⁸ e 0,1 µL do peso molecular¹⁹ e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma ABI 310²⁰. Os perfis gerados para os marcadores destes ensaios foram observados na plataforma apropriada²¹.

5.10.2 Determinação do estado de metilação nas candidatas DMR

O ensaio de digestão enzimática sensível à metilação associado à PCR quantitativa fluorescente (DESM-PCR) foi utilizado para demonstrar as possíveis regiões hemimetiladas escolhidas como alvos. Os iniciadores sentido foram marcados com o fluorocromo FAMTM. O ensaio triplex foi composto por: i) um par de iniciadores que amplifica uma região desmetilada de acordo com o *browser* da UCSC. Esta região foi determinada para este ensaio como controle positivo (CP) para a digestão sensível a metilação, possivelmente desmetilada em todos os tecidos utilizados no ensaio, contendo diferentes sítios para enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM), abrangendo 218pb ortóloga ao gene *ESCO2*; ii) um segundo par de iniciadores que amplifica uma região que não possui sítios para ERSM, utilizado como controle negativo (CN) da digestão enzimática, com 312pb sem sítios de restrição para as enzimas HpaII, HhaI,

17 © 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (Applied Biosystems™)

18 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™)

19 GeneScan™ 500LIZ® Size Standard (Applied 35 Biosystems™)

20 Applied Biosystems™

21 GeneMapper ID v3.2.

BstUI; iii) um terceiro par de iniciadores para a cDMR de pares de bases de tamanhos variados (*SNRPN* 302pb, *SNURF* 250pb, *IGF2* 264pb, *IGF2R* 261pb).

O percentual de metilação da região analisada foi inferido através da razão calculada pela fórmula descrita por SILVA *et al.* (2016) (figura 15) entre os fragmentos alvo (DMR) e controle negativo (CN) antes e após digestão enzimática. Neste contexto razões <0,30 caracterizam perfis de hipometilação, enquanto razões >0,70 caracterizam perfis de hipermetilação. Perfis de hemimetilação são caracterizados por razões >0,30-0,70<.

$$\% \text{ Meth} = \left\{ \frac{\left[\frac{C - (C * f)}{C - (C * f) + D + (D * f)} \right]}{\left[\frac{D + (D * f)}{C - (C * f) + D + (D * f)} \right]} \right\} \times 100$$

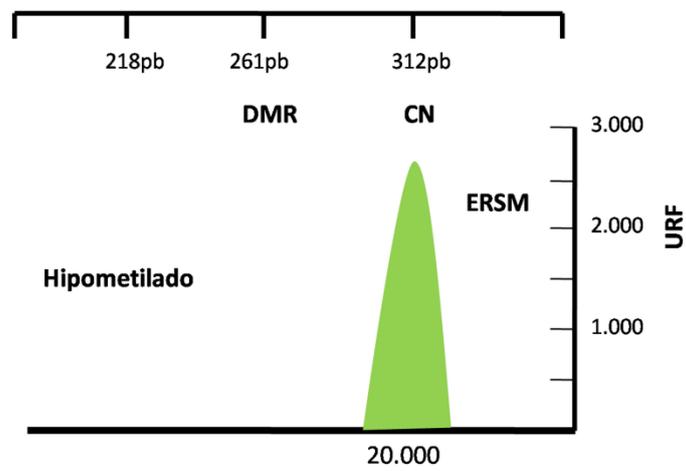
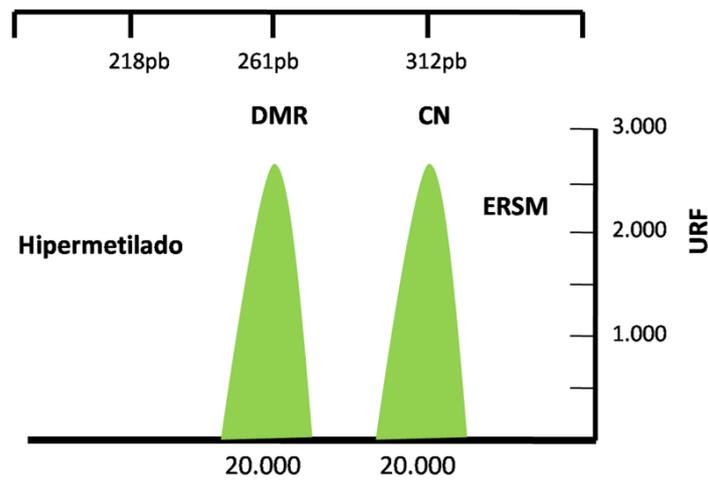
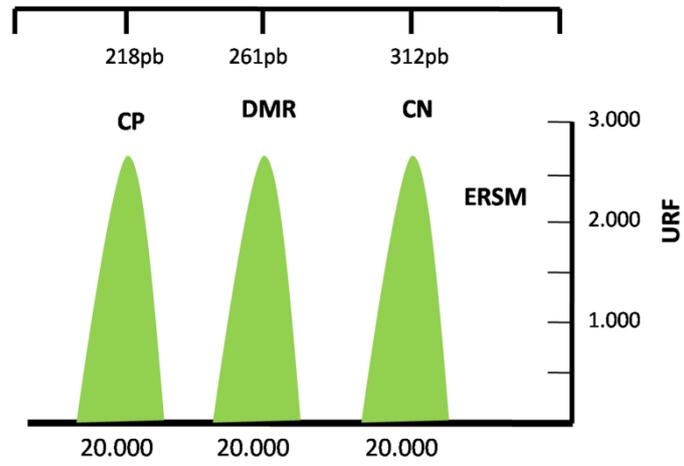
$$f = \left[\frac{(A * 100)}{(A + B)} - 50 \right] \times 0.02$$

Figura 15: Fórmula utilizada para cálculo da metilação, empregando as áreas dos picos. Onde C é o valor da área sob o pico do produto de amplificação relativo à CGI consultado a partir da amostra de DNA digerida com enzima de restrição; D é a área sob o pico do produto sem sítios de restrição (alvo negativo) a partir da amostra de DNA digerida com enzima de restrição; D é a área sob o pico do alvo negativo a partir da amostra de DNA digerido com enzimas de restrição e fAB é o fator de correção que explica a falta de simetria e desequilíbrio observado entre a área sob o pico para o produto da CGI (A) e o alvo negativo (B), obtido a partir da amostra de DNA não digerida. Fonte: SILVA, A.F.A. *et al.* (2016).

Reações DESM (figura 16) foram preparadas em volume final de 20 µL, contendo aproximadamente 400 ng de DNA, tampão 1X²², e 5U de HpaII, HhaI ou BstUI²³ as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 80°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 3 µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por PCR. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5 µL, como já descrito acima.

²² CutSmart® (New England Biolabs)

²³ CutSmart® (New England Biolabs)



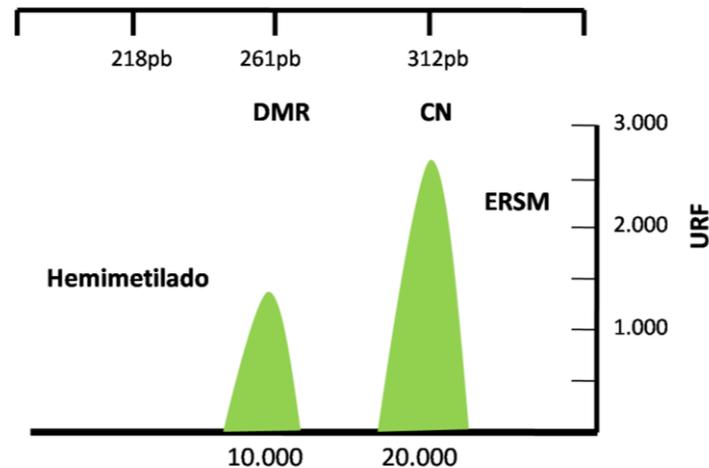


Figura 16: Ensaio de estado de metilação pontual nas cDMR. Esquema do eletroferograma representativo do ensaio triplex. Antes da digestão com enzima de restrição sensível à metilação (ERSM), controle positivo (CP), DMR candidata e controle negativo (CN) (A). Após a digestão com ERSM mostrando um perfil de hipermetilação (B), hipometilação (C) e hemimetilação (D). Fonte: Arquivo pessoal (2017).

5.10.3 Validação da metilação alelo-específica nas candidatas DMR

Para validar a região hemimetilada como uma DMR foi utilizada uma digestão com enzima de restrição HpaII (HhaI/BstUI) (YAMADA *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2006) que atuam apenas em sítios desmetilados. Para diferenciar os alelos parentais, após a digestão enzimática acima demonstrada, foi realizado SNaPshot^{TM24} de SNP informativos nas cDMR. Este ensaio permitiu a genotipagem de diferentes SNP na mesma DMR, determinando se a hemimetilação é alelo-específica (figura 17).

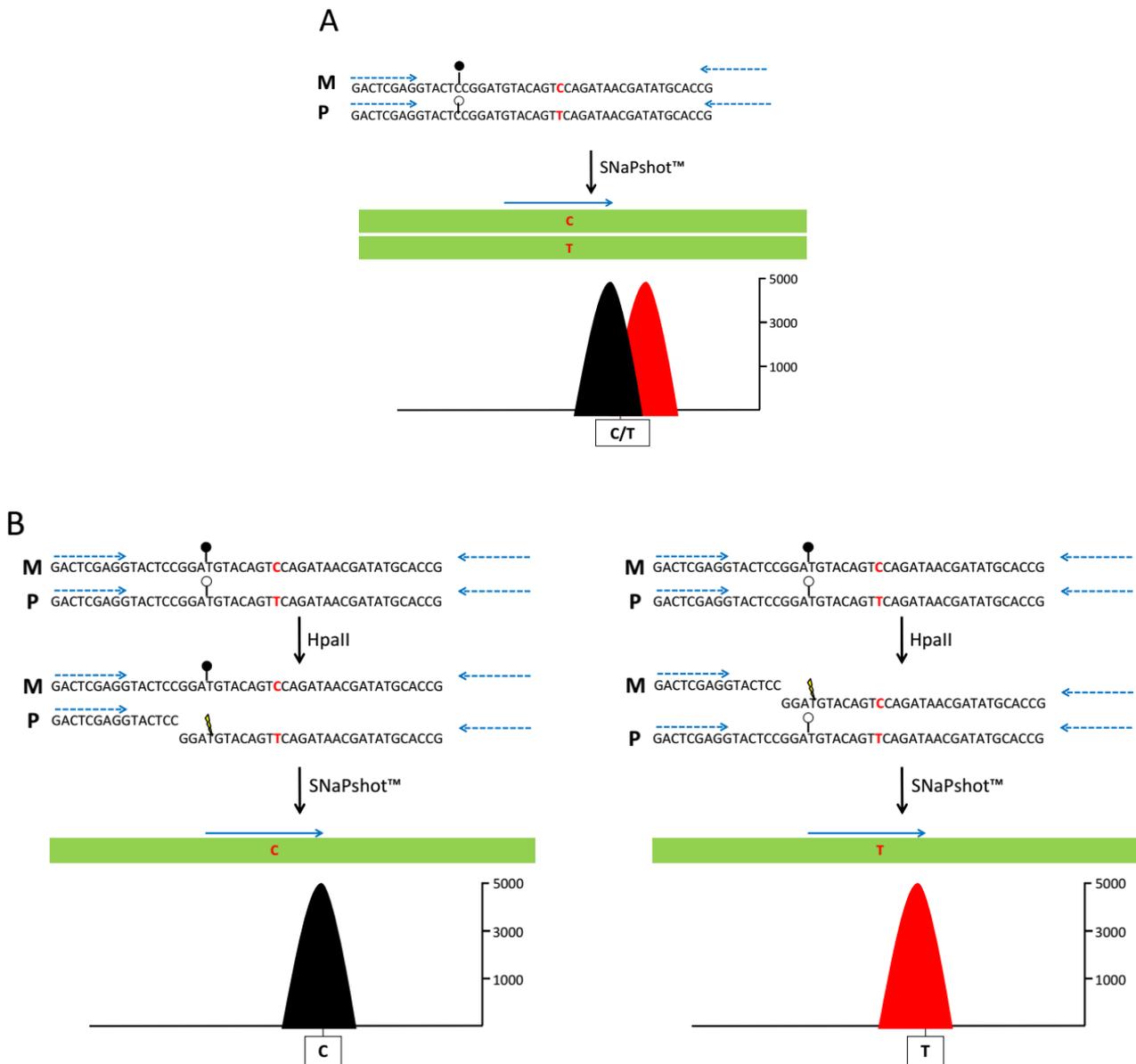


Figura 17: Ensaio para validação da metilação alelo-específica. Representação esquemática dos loci hipometilados, hipermetilados. (A) Se ambos estiverem hipometilados após a digestão, ambos alelos serão visualizados; (B) Se um alelo estiver hipermetilado e o outro alelo hipometilado, apenas um dos alelos será observado após a digestão. Adaptado de MACHADO, F.B. (2014)

5.11 Minissequenciamento de SNP por SnapShot

Para determinação do perfil alélico, os fragmentos gerados na PCR realizada com os primers em multiplex de quatro alvos foram tratados com kit SNaPshot purificados, com *ExoSAP-IT USB*, uma mistura das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina. Foram utilizados 5 µL dos produtos de amplificação e a estes foram adicionados 2 µL de *ExoSAP-IT*. As reações foram realizadas no termociclador sob a condição: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. As reações de purificação foram realizadas em multiplex dos quatro alvos, sendo oito SNP, dois do alvo *GRB10*, três do alvo *IGF2*, dois do *IGF2R* e um do alvo *SNURF*. Para o quinto alvo *SNRPN*, não foi possível identificar os polimorfismos, mesmo quando realizada análise separadamente. As reações foram realizadas em um volume final de 5 µL (2 µL do produto da purificação com *ExoSAP-IT*, 0,4 µM de cada iniciador de minissequenciamento, *SNaPshot™ reaction mix 1X*). As reações multiplex com o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (a) 96°C por 10 segundos, (b) 50°C por 5 segundos e (c) 60°C por 30 segundos. Ao término foi realizada outra etapa de purificação com a enzima fosfatase alcalina²⁵ aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP™*, e as reações de purificação na condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos. O produto purificado, 0,5 µL, foi misturado a 9,35 µL de formamida e 0,1 µL do peso molecular²⁶ e submetidas à eletroforese em capilar.

No minissequenciamento estão presentes apenas didesoxiribonucleotídeos (ddNTPs) para a DNA polimerase. Quando é inserido um único ddNTP a reação é finalizada. O iniciador deve parear apostro ao SNP que se deseja genotipar. Os ddNTPs são marcados com diferentes fluorocromos que diferenciam os genótipos (figura 18). Posteriormente, a mistura da reação foi incubada a 37°C por uma hora²⁷. A enzima fosfatase alcalina remove do fosfato 5' e assim altera a migração dos ddNTPs fluorescentes não incorporados, inibindo sua interposição no eletroferograma.

²⁵ FastAP™ Thermo Scientific™

²⁶ GeneScan™ 120LIZ® Size Standard (Applied Biosystems™)

²⁷ Shrimp Alkaline Phosphatase-SAP (Promega).



Figura 18: Representação da inserção do ddNTP marcado com fluorocromo em SnapShot. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

5.12 Eletroforese capilar para caracterização de alelos

Aos produtos de amplificação foram adicionados formamida²⁸ e os padrões de massa molecular²⁹, em reação já descrita. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese capilar com o polímero POP₄ (contendo 4-6% de acrilamida), utilizando plataforma específica³⁰. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GeneScanTM e GenotyperTM³¹. Os alelos que foram amplificados por minissequenciamento foram observados pela diferença de fluorescência entre os fluorocromos os quais foram inseridos em cada par: 6-FAMTM (azul), VIC[®] (preto), PETTM (vermelho) e NEDTM (verde)³². Mesmo possuindo amplicons de mesmos pares de bases, os heterozigotos foram identificados pela migração diferencial dos fluorocromos (figura 19).

²⁸ Hi-Di Formamida, Applied Biosystems

²⁹ GeneScan 120, marcados com o fluorocromo LIZTM (fluorescência laranja), Applied Biosystems.

³⁰ ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer

³¹ Applied Biosystems.

³² Applied Biosystems.

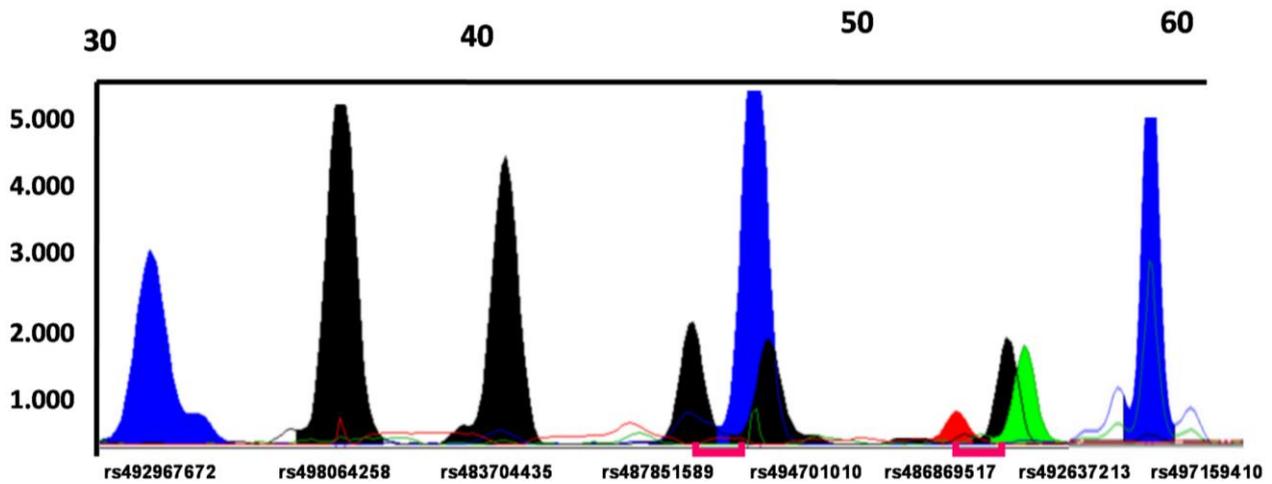


Figura 19: Eletroferograma ilustrativo dos polimorfismos de metilação para as cDMR. *GRB10* (rs492967672, rs498064258), *IGF2* (rs483704435, rs487851589, rs494701010), *IGF2R* (rs486869517, rs492637213), *SNURF* (rs497159410) em sangue de *C. jacchus*. Picos de cor azul indicam alelo G, preta indica alelo C, cor vermelha alelo T e cor verde indica alelo A. Chave rosa indica heterozigoto para o polimorfismo. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Construção de blocos sintênicos entre *Callithrix jacchus* (C. J.) e *Homo Sapiens* (HS) para mapeamento dos genes de interesse

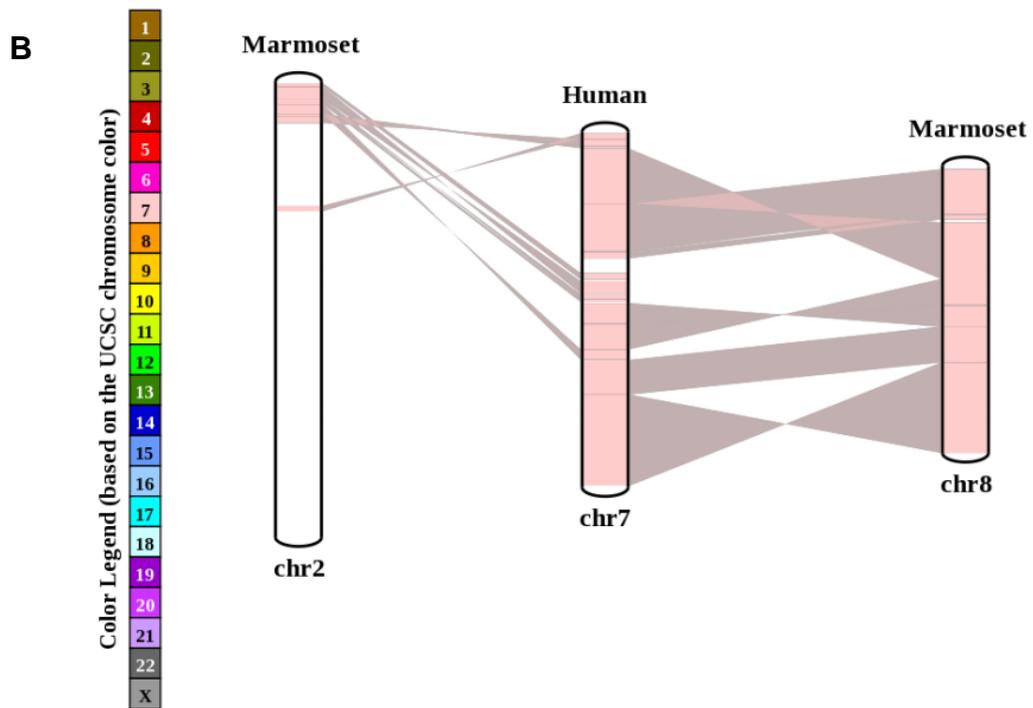
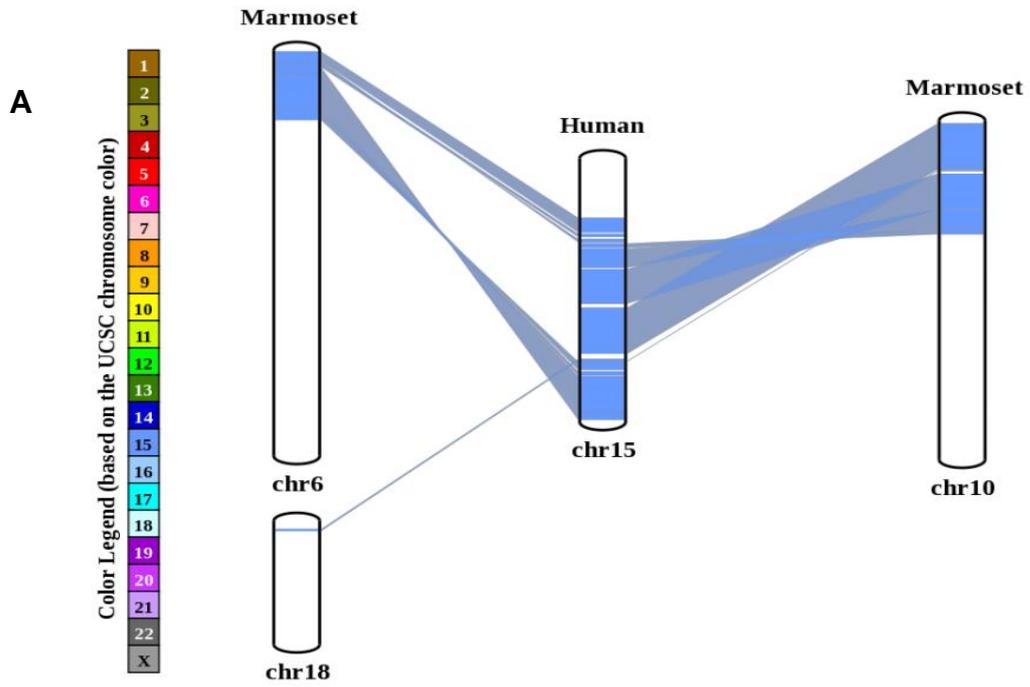
Utilizando as plataformas Ensemble Genome Browser e Synteny Portal foram caracterizadas regiões ortólogas e sintênicas entre os cromossomos humano e do sagui (figura 20). A identidade posicional, e a extensão da conservação das regiões estudadas foram delineadas e mapeadas. Observa-se que o *Callithrix* apresenta o mesmo número de cromossomos que o humano, 22 pares de autossomos e um par sexual, destes, seis apresentam associação completa no sagui, HS/CJ: 6/4, 7/8, 12/9, 11/11, 8/16, 15/Y. Os demais apresentam associação sintênica em blocos com rearranjos em dois ou mais cromossomos, a exemplo do cromossomo um do *Callithrix* que compreende fragmentos dos cromossomos 13, 9 e 22 humanos, respectivamente. Nota-se que todos os cromossomos apresentam associação entre as espécies comparadas, inferindo proximidade filogenética entre os mesmos. A figura 22 também indica o posicionamento das cDMR alvo nos cromossomos do sagui. Stanyon *et al.* (2000) revelaram que a associação de homólogos de Macacos do Novo Mundo (MNM) a cromossomos humanos (MNM/HS): 3/21, 8/18, 10/16 e 14/15 estão presentes nas famílias *Atelidae* e *Cebidae* e em outros *Platyrrhini*, indicando que são traços ancestrais, de acordo com o cariótipos *Platyrrhini*, mas não presentes no gênero *Callithrix*.

Podemos observar na figura 20, as letras A, B, C, D representam as sintenias entre os cromossomos humano e do sagui. Nota-se que quase totalitariamente os cromossomos estão rearranjados em blocos sintênicos, divididos em um ou dois cromossomos. As análises genômicas comparativas entre primatas oferecem um potencial considerável para deliberar e compreender os processos que moldaram e transformaram o genoma humano. Entretanto, a taxonomia dos primatas é complexa e por vezes controversa, com a consonância hierárquica evolucionária das espécies de primatas existentes. A filogenia auxilia a elucidar pontos obscuros e fornece novos dados na evolução. Esmiuçar a filogenia configura uma estrutura sólida para novas descrições

de diversos padrões de evolução do genoma entre linhagens de primatas. Essas percepções são essenciais na investigação genômica comparativa, da adaptação e seleção imposta aos seres humanos e entre os primatas (PERELMAN *et al.*, 2011).

A partir do ancestral comum, as diferentes linhagens de *Platyrrhini*, passaram por rearranjos cromossômicos que ora aumentaram, pela ocorrência de fissões cromossômicas, ora diminuíram o número diplóide, por meio de fusões. Notamos que os cromossomos com uma morfologia idêntica entre as espécies estejam provavelmente presentes no suposto ancestral comum. Quando comparado o gênero *Cebu* (parvorder *Platyrrhini*) com *Homo* (*Catharrine*), estes apresentam o cromossomo dez em homologia ao cromossomo 20 respectivamente (RICHARD *et al.*, 1996), logo, em *Callithrix* podemos notar que houve rearranjo cromossômico, pois este apresenta o cromossomo dez em homologia com o de mesmo posicionamento em humano e uma extensa parte com o 14 desta mesma espécie.

García *et al.* (2002), demonstraram que o número de rearranjos e a distância filogenética não são sempre correlacionadas. Essa também foi a conclusão quando as espécies humana e gibão foram confrontados (KOEHLER *et al.*, 1995). No entanto, pouco se sabe sobre os genomas das espécies de primatas, uma situação aguçada pela escassez de dados moleculares necessários para determinar as características ainda persistentes entre estes e os seres humanos. Perelman *et al.* (2011) sequenciou 54 regiões de genes a partir de amostras de DNA representando 90% da diversidade presente em primatas vivos. Através de uma análise filogenética determinou a origem, evolução, padrões de especiação e características únicas na divergência do genoma entre linhagens de primatas.



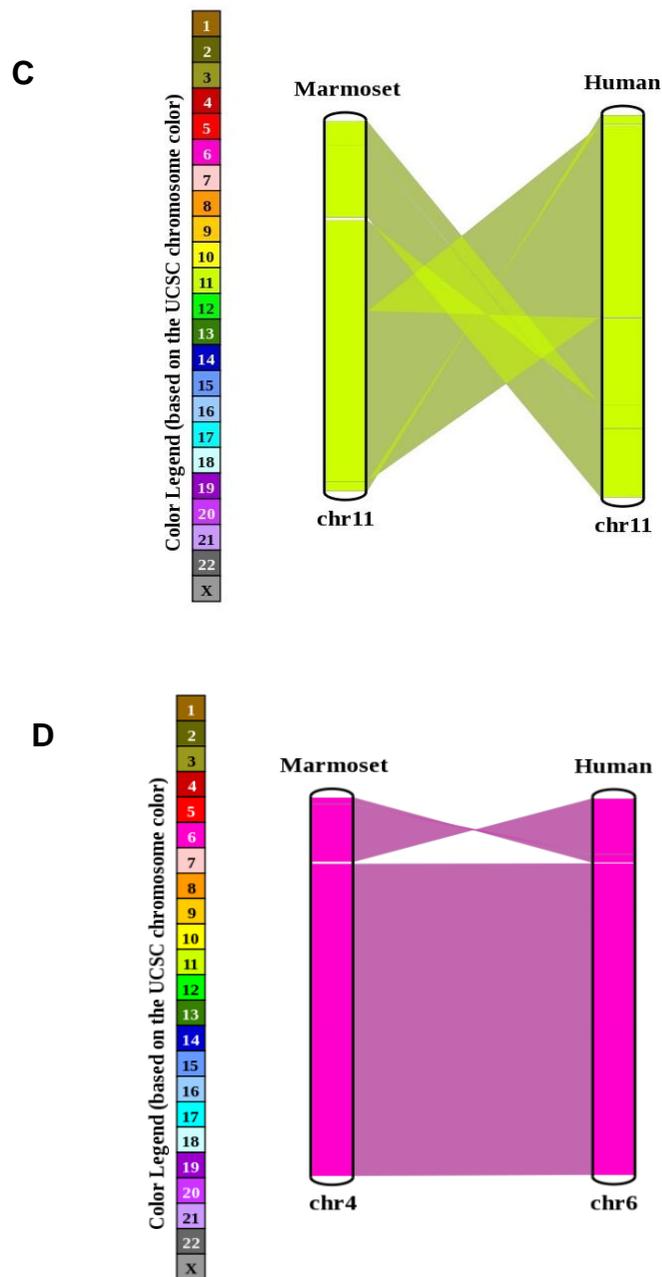


Figura 20: Relações sintênicas entre *Homo sapiens* e *Callithrix jacchus* para os cromossomos que contém os genes de interesse. (A) Cromossomo humano (CrHS) 15 composto pelos cromossomo do *Callithrix jacchus* (CrCj) 6, 10 e 18; (B) (CrHS/CrCj) 7/8 e 2; (C) (CrHS/CrCj) 11/11; (CrHS/CrCj) 6/4. Resolução de 150.000pb. Fonte: <http://bioinfo.konkuk.ac.kr>. Synteny Browser (2017).

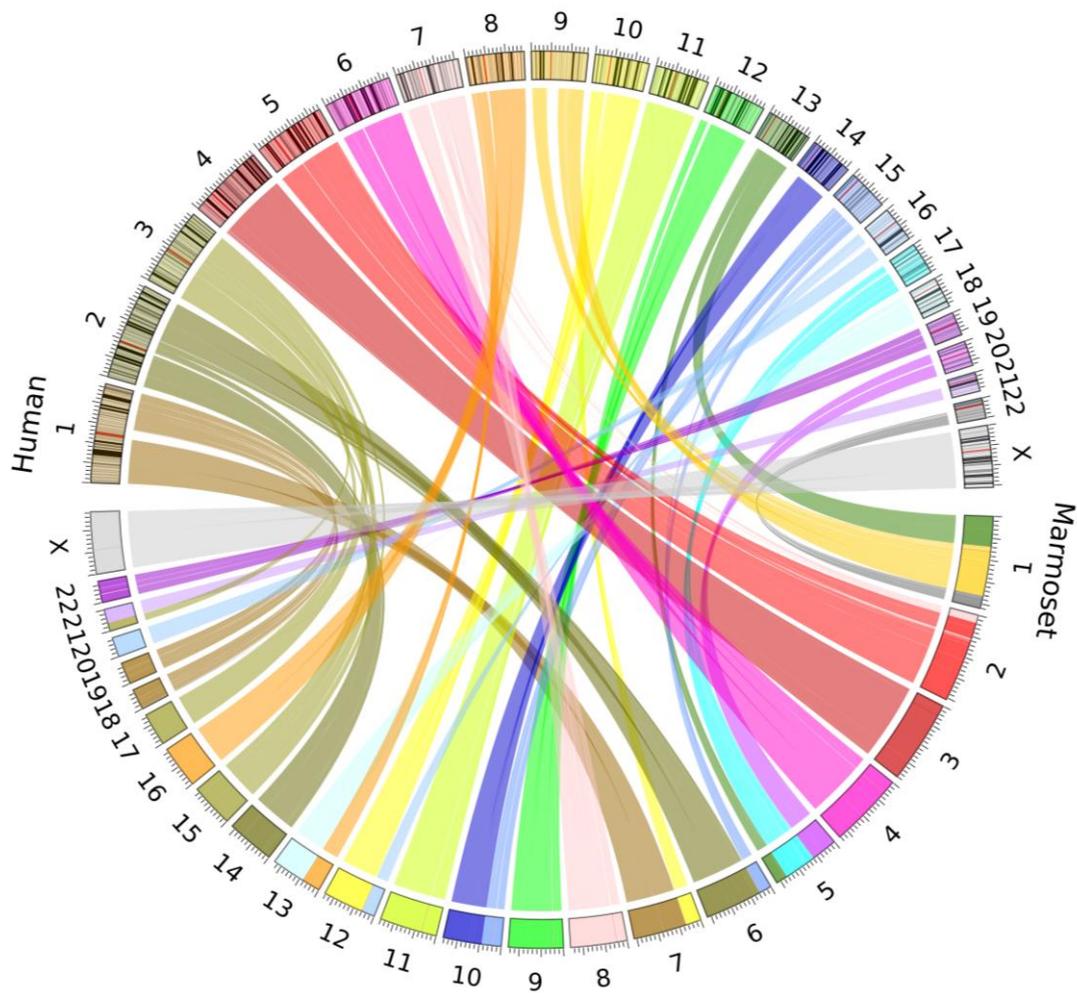


Figura 21: Representação da homologia sintênica entre cromossomos de *Callithrix* (sagui) e *Homo sapiens* (humano), baseado na plataforma SynBuilder. Feixes partem dos cromossomos de uma espécie e se ligam aos cromossomos da outra espécie, feixes de mesma cor representam homologia entre os cromossomos. Resolução de 150.000pb. Fonte: <http://bioinfo.konkuk.ac.kr>. Synteny Circus (2017).

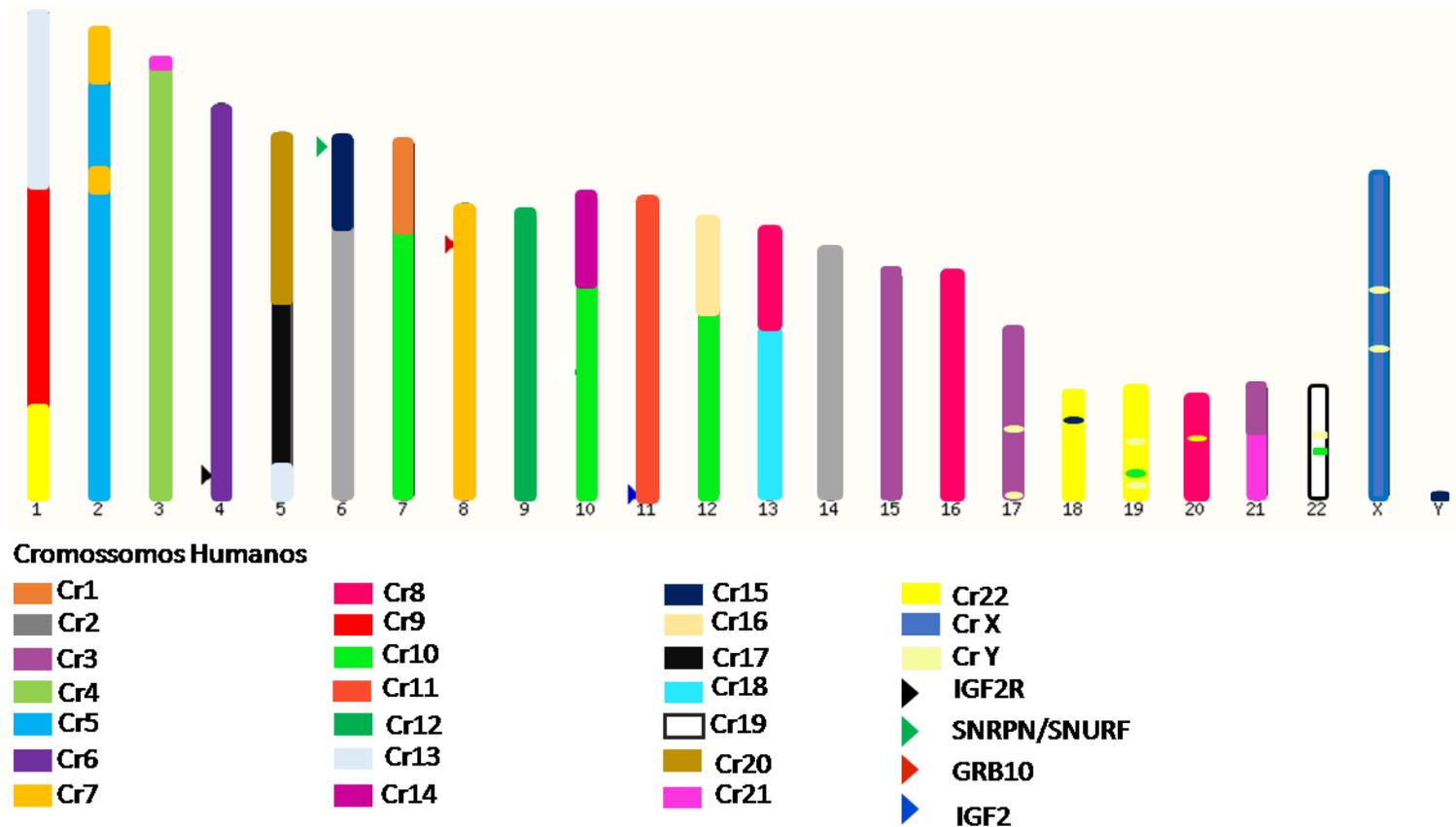


Figura 22: Mapa de sintenia entre cromossomos de *Callithrix jacchus* e *Homo sapiens*, baseado na plataforma *Ensemble Genome browser*. Cores iguais representam homologia entre os cromossomos das duas espécies. Setas: preta indica posição física da cDMR *IGF2R*, seta verde indica cDMR *SNRPN* e *SNURF*; vermelha indica cDMR *GRB10*; azul indica cDMR *IGF2*. Fonte: arquivo pessoal (2017).

6.2 Análise comparativa das coordenadas físicas migradas de regiões diferencialmente metiladas de *Homo sapiens para Callithrix jacchus* e *Homo sapiens para Pan troglodytes*

Visando fornecer evidências quanto à predição de cDMR em *Callithrix*, foram selecionadas cinco regiões como alvos do estudo. *SNRPN*, *SNURF* e *IGF2* sofrem *imprinting* materno em humanos (BUITING, 2010; HE *et al.*, 2013) e *GRB10* é imprintado isoforma e tecido específico, com *imprinting* materno no cérebro (ARNAUD *et al.*, 2003) e *imprinting* paterno em trofoblasto (BLAGITKO *et al.*, 2000). *IGF2R* em humano não é um gene de expressão alelo específica em tecidos somáticos adultos, mas é marcado em alguns estágios da placenta (CHEONG *et al.*, 2015). As DMR escolhidas como referencial para o encontro das cDMR em saguis, foram selecionadas pela sua importância biológica, estas relacionadas à reprodução, crescimento e comportamento, níveis e relevância dos tecidos em que os genes são expressos.

O uso de ferramentas de bioinformática para analisar e perfilar os dados de metilação do DNA no sangue e nos tecidos em humanos e animais usando plataformas de matriz bem estabelecidas, tem baixo custo e pode acelerar a pesquisa do epigenoma, direcionando-a e proporcionando maior solidez para a comprovação e identificação de biomarcadores no sagui (HAYASHI-UEDA *et al.*, 2017). Em seu estudo, Hayashi-Ueda e colaboradores (2017), encontraram fortes correlações entre os dados de metilação de humanos e saguis, mas apenas 10% das probes humanas eram utilizáveis em *Callithrix*. Assim como neste estudo, utilizamos os mapeamentos disponíveis em plataformas públicas para determinação das áreas a serem investigadas.

A porcentagem de identidade posicional, a extensão da semelhança entre as regiões ortólogas e a manutenção das CGI foram determinadas utilizando ferramenta de conversão do genoma humano para o genoma de referência do sagui (*Callithrix jacchus*) na plataforma da UCSC *Genome browser*. As análises *in silico* das posições físicas ortólogas, demonstraram que, quando comparadas as posições físicas das DMR humanas descritas por O'Docherty *et al.* (2014), OKae *et al.* (2014) no *browser* do genoma humano de fevereiro de 2009 (GRCh37/hg19) com *browser* do genoma do chimpanzé (*Pan troglodyte*) de fevereiro de 2011 (CSAC 2.1.4/panTro4) e do sagui

(*Callithrix jacchus*) de março de 2009 (WUGSC 3.2/calJac3) (tabela 4), há grande conservação das sequências genômicas das regiões diferencialmente metiladas do chimpanzé em relação ao humano apresentando média de 96,12% de correlação posicional (figura 23), enquanto comparativamente o sagui apresenta semelhança média de 92,55% (figura 24), consideradas ainda bastante conservadas, visto que a distância evolutiva é bem maior desta espécie de primata para os humanos em relação a primeira citada. Respostas biológicas e consequências da divergência do *imprinting* genômico são difíceis de extrapolar entre espécies, portanto o modelo animal aplicado deve ser filogeneticamente mais próximo ao humano. Taxonomicamente, o sagui (*Callithrix jacchus*) e o humano (*Homo sapiens*) compartilham a mesma origem até a sua infra ordem *Simiiformes*, diferindo a partir desta; o homem integrando a parvorder *Catharrini* superfamília *Hominoidea* e o sagui a parvorder *Platyrrhini*, família *Callithrichidae* (BENSON *et al.*, 2009). A parvorder *Catharrini* (origem do homem e chimpanzé) divergiu evolutivamente da *Platyrrhini* (origem do sagui) há 43 milhões de anos. O gênero *Callithrix* surgiu há aproximadamente 2,5 milhões de anos (PERELMAN *et al.*, 2011), neste há raro relato de regiões diferencialmente metiladas, e genes que podem sofrer *imprinting* (expressão monoalélica) e pouco se sabe sobre epigenética, visto o sequenciamento recente (CHEONG *et al.*, 2015; KANBER *et al.*, 2013; WORLEY *et al.*, 2014).

Tabela 4: Posição física das DMR humanas para os genes de interesse, posição ortóloga em *Callithrix spp.* e de ilhas CpG.

Gene/DMR	Posição Física DMR Humana	Conversão <i>Callithrix spp.</i>	P.física Ilha CpG
<i>SNRPN</i>	chr15:25068564-25069481	chr6:906890-907820	Ilha crítica
<i>SNURF</i>	chr15:25200004-25201976	chr6:1020694-1022565	chr6:1020694-1022066
<i>GRB10</i>	chr7:50,848,726-50,851,312	chr8:17737479-17740073	chr8:17738687-17739937
<i>IGF2</i>	chr11:2168333-2169768	chr11:128287329-128288742	Ilha crítica
<i>IGF2R</i>	chr6:160,426,558-160,427,561	chr4:161121053-161122105	chr4:161121280-161122038

As buscas pelas regiões através de coordenadas migradas do humano possibilitaram o mapeamento de regiões em *C. jacchus* ainda não estudadas. Baseados nestas, os iniciadores foram confeccionados, para os controles positivo, negativo e alvos.

Utilizando seções customizadas criadas na plataforma UCSC *G. browser*, foram verificados o grau de identificação posicional das sequências gênicas empregando a

ferramenta de conversão de coordenadas, e foram caracterizadas posicionalmente as regiões diferencialmente metiladas das espécies *Homo sapiens*, e as cDMR do *Callithrix spp.* e *Pan troglodytes* (figuras 23 e 24). As barras de cor rosa representam identificação abaixo de 60%, verde escura entre 60% e 70%, laranja 70 e 80%, preta entre 75 e 80%, roxa entre 80 a 85%, azul entre 85% e 90%, verde entre 90% e 95% e barras amarelas quando a identificação ultrapassa 95% entre as sequências genômicas correlacionadas.

Comparando as sequências gênicas das cDMR alvo entre as espécies de primatas não humanos (PNH) com a espécie humana, nota-se que entre *Homo sapiens* e *Pan troglodytes* há maior semelhança posicional do que quando comparado *Homo* e *Callithrix*. Ressalta-se que a proximidade entre as duas primeiras espécies é muito elevada, estando na mesma subfamília *Homininae*, divergindo apenas no gênero. Como citado anteriormente, o *Callithrix* e o humano compartilham a mesma origem até a sua infra ordem *Simiiformes* (BENSON *et al.*, 2009), estando evolutivamente mais distante que o chimpanzé do humano, e por isso quando comparadas a identificação posicional das sequências genômicas pertencentes as DMR humanas e correlacionadas as sequências destas duas espécies de PNH na plataforma da UCSC, observa-se que a proporção de reconhecimento acima de 95% é reduzida no *Callithrix*, demonstrada na figura 24 pela cor amarela das barras. O sagui apresenta identificação acima de 95% nas cDMR *SNRPN* e *GRB10*. No alvo *IGF2* apresenta barra verde indicando entre 90 e 95% de identificação posicional; a DMR *SNURF* mostra-se em barra azul indicando entre 85% e 90%, já o alvo *IGF2R* apresenta barra rosa sugerindo reconhecimento posicional abaixo de 60%. No chimpanzé, quatro das cDMR alvo apresentam-se com identificação posicional acima de 95%, *SNRPN*, *GRB10*, *IGF2* e *IGF2R*. *SNURF* apresenta-se com a coloração em barra verde indicando entre 90 a 95%.

A maior discrepância encontrada entre as sequências analisadas de *Callithrix* e *Homo* refere-se a DMR *IGF2R*. Segundo Monk *et al.* (2006), o gene *IGF2R* no camundongo contém duas DMR: uma na linha germinal na região do íntron 2 e a DMR somática na região promotora gênica com presença de ilha CpG do gene *IGF2R* (STOGER *et al.*, 1993). A DMR *IGF2R* germinal encontrada em humanos também se faz presente na *Macaca fascicularis*, estando preferencialmente hemimetilados em músculo, placenta e cordão umbilical, segundo Cheong *et al.* (2015). Neste PNH a metilação parece ter características que são intermediárias entre humano e camundongo. O

receptor de *IGF2* (*IGF2R*) abrange 15 domínios extracelulares que se ligam ao *IGF2*. O *IGF2R* regula supressão tumoral, sinalização, o crescimento e desenvolvimento placentário. O *IGF2* está envolvido no fenótipo de crescimento, enquanto que o *IGF2R* limita normalmente a biodisponibilidade de recursos oferecidos ao concepto, assim o estímulo negativo ou positivo ao *IGF2R* resulta num crescimento aumentado e reduzido, respectivamente (REZGUI *et al.*, 2009). Está claro que a *IGF2R* DMR encontrada em humanos também está presente na *Macaca fascicularis* (CHEONG *et al.*, 2015). Por conseguinte, parece que o *IGF2R* é imprintado, nesta espécie de primatas do velho mundo, em tecidos iniciais placentários. No *locus IGF2R*, ocorre uma ruptura sintênica entre humanos e macacos. Um mapeamento genômico comparativo adicional pode destacar características que contribuam para a regulação do *imprinting* na espécie.

Tal como em seres humanos e camundongos, *IGF2R* e *H19* compreendem DMR em ovelhas. No tecido de língua de 12 de 13 cordeiros clonados e analisados no estudo de Young *et al.* (2003), a DMR no segundo íntron de *IGF2R* apresentou níveis fortemente reduzidos de metilação do DNA. Verificou-se que a DMR localizada anterior ao gene *H19* de ovino estava organizada de forma semelhante em seres humanos e camundongos.

Cheong *et al.* (2015) relataram que em *M. fascicularis* nas DMR em *H19*, *KCNQ1*, *IGF2R* e *SNRPN* houve *imprinting* na linha germinal. Outros *loci* maternalmente imprintados examinados neste primata mostraram perfis de expressão mais conservados que os seus homólogos humanos e no camundongo. O cluster *SNRPN* inclui genes envolvidos no desenvolvimento neurológico e cognitivo podendo estar relacionados a doenças causadas por defeitos de *imprinting* nessa região (KNOLL *et al.*, 1989). Como em humano e no camundongo, o cluster do *SNRPN* é conhecido por serem genes paternalmente expressos, e em *Macaca fascicularis* são preferencialmente imprintados em tecidos somáticos incluindo cerebelo (CHEONG *et al.*, 2015).

Estima-se que a metilação diferencial nas regiões promotoras represente apenas uma pequena parte nas diferenças de expressão gênica entre as espécies de PNH. Existem relativamente poucos estudos comparando padrões de metilação de genes específicos em córtices de primatas. Os padrões de metilação do gene imprintado *MEST* são altamente conservados em humanos, chimpanzés, macacos do velho mundo, em macaco rhesus, e macacos do novo mundo (saguís) que divergiram há milhões anos dos humanos (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

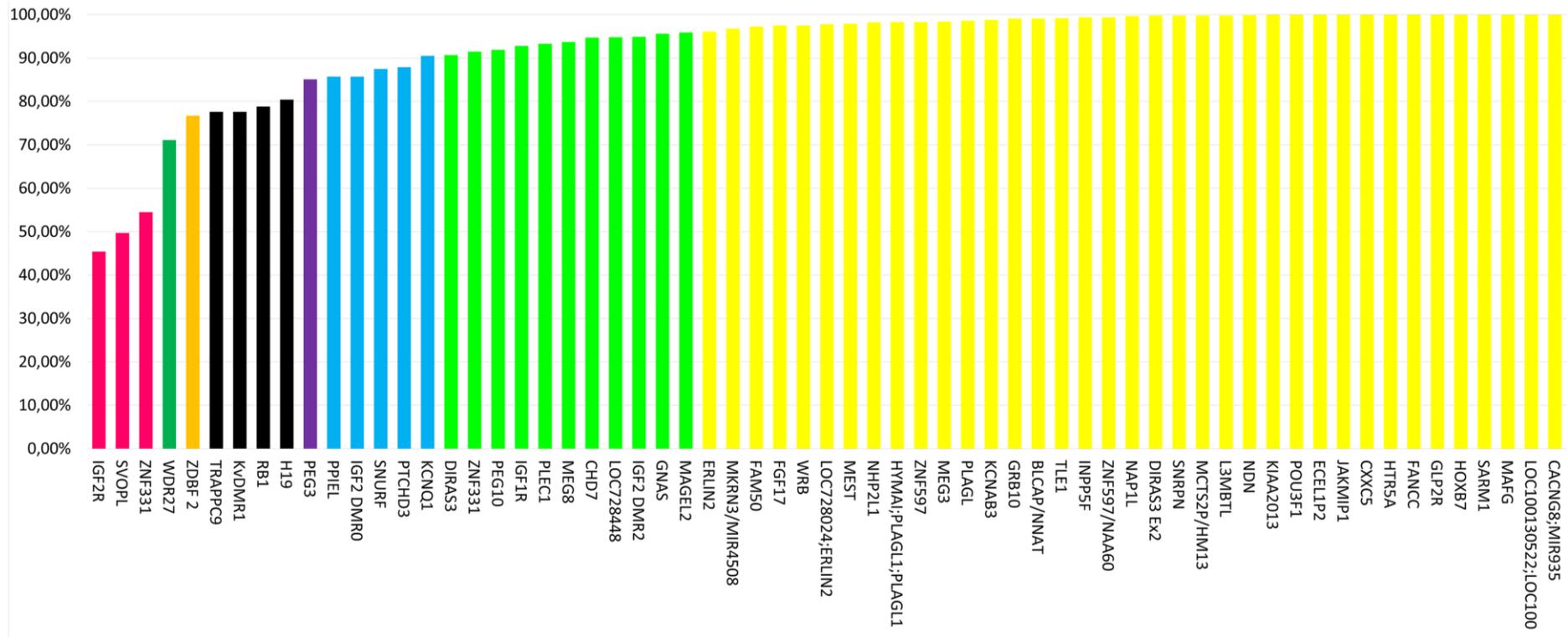


Figura 23: Correlação entre as coordenadas físicas referentes a DMR no genoma do humano (*Homo sapiens*) em relação ao genoma sagui (*Callithrix jacchus*). Barras amarelas representam identidade posicional acima de 95% na sequência analisada, verde entre 90% e 95%, azul entre 85% e 90%, roxo entre 80 a 85%, preto entre 75 e 80%, laranja 70 e 80%, verde escuro 60% e 70%, abaixo de 60% rosa.

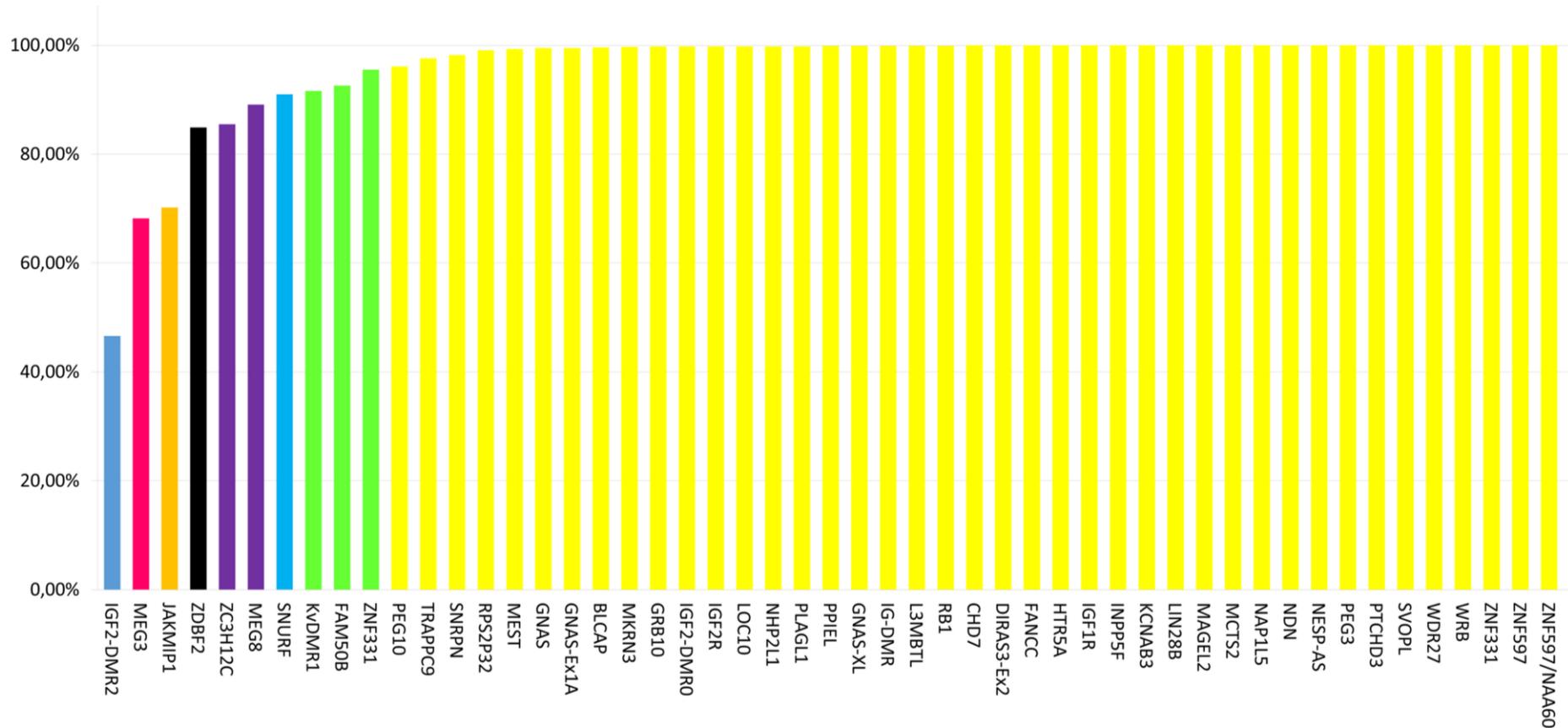


Figura 24: Correlação entre as coordenadas físicas referentes a DMR no genoma do humano (*Homo sapiens*) em relação ao genoma chimpanzé (*Pan troglodytes*). Barras amarelas representam identidade posicional acima de 95% na sequência analisada, verde entre 90% e 95%, azul entre 85% e 90%, roxo entre 80 a 85%, preto entre 75 e 80%, laranja 70 e 80%, verde escuro 60% e 70%, abaixo de 60% rosa.

6.3 Análise comparativa *in silico* das marcas epigenéticas nas candidatas a DMR a partir de coordenadas físicas migradas de regiões diferencialmente metiladas do *Homo sapiens* para *Callithrix jacchus* utilizando UCSC browser

Na primeira seção, as marcas epigenéticas das cDMR alvo foram determinadas através de dados de estudos de metilomas humanos disponíveis na plataforma UCSC. O sequenciamento de DNA montado pela Universidade de Washington St. Louis (Missouri, EUA), está disponível através de NCBI *GenBank* e tornou-se muito útil neste trabalho. O genoma do sagui foi sequenciado usando DNA a partir de um exemplar fêmea (com base de dados de 10 genomas ao todo), presumiu uma cobertura de 95% de todo o DNA (WORLEY *et al.*, 2014), e SATO (2015) ampliou essa montagem com um ressequenciamento do genoma de *C. jacchus* que foram criados no Instituto Central de Animais Experimentais (CIEA) no Japão. Foram obtidos 181 Gpb de alta qualidade.

Nesta análise *in silico* integrada das seções de metiloma humano e do sagui na plataforma da UCSC, havia presença de ilha CpG, confirmada através da plataforma Database of CpG Island (<http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/>), que corroborassem com os padrões preditos para as cDMR. Segundo O'Docherty *et al.* (2014), Okae *et al.* (2014), as DMR humanas e as ilhas críticas descritas encontravam-se nestas áreas e o grau de identificação posicional entre as sequências adotadas eram muito próximas a 100%, contudo em *Callithrix* o genoma ainda não está completamente concluído, apresentando lacunas as quais não foram preenchidas, como descrição de DMR e genes na espécie (WORLEY *et al.*, 2014).



Figura 25: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene *SNRPN*. Imagens customizadas no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Porção superior da figura representada por ideograma do cromossomo 15 humano, posição física da DMR em destaque, a barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição física sobre o cromossomo. Em azul os transcritos do gene *SNRPN* em humanos. Na porção mediana as barras em vermelho representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação varia de 0 a 100% de metilação nos traços verticais. Para efeitos comparativos foram incluídos 11 estudos metilomas do banco de dados disponíveis. Na porção inferior visualiza-se o ideograma do cromossomo seis em *C. jacchus*, a barra vermelha sobre indica a posição física da DMR na espécie. Em azul transcritos em outras espécies. Janela de 40Kb para visualização.

A candidata DMR *SNRPN* apresentou a maior porcentagem de identificação posicional de 99,8% entre as coordenadas das sequências genômicas, em relação ao humano. A posição física correspondente no humano apresenta éxon e hemimetilação (observada no *browser* UCSC) nos tecidos escolhidos, alguns dos quais estão presentes em nossas análises.

O gene *SNRPN* controlado pela DMR de mesmo nome em humanos, em camundongo, mapeia uma região na parte central do cromossomo 7 que é sintênica para a região no cromossomo humano 15q11-q13, relacionada as síndromes de Prader-Willi / Angelman (PWS-AS) (SHEMER *et al.*, 1997). Em sagui, esta região é conservada e encontra-se no cromossomo 6. Dois dos mais complexos genes em humanos estão na região, *SNRPN-SNURF*, ao observarmos a figura 25 notamos que a região de DMR selecionada para este estudo no UCSC Genome *browser* em humano (GRCh37/hg19), baseada em O'Docherty *et al.* (2014), OKae *et al.* (2014), encontra-se neste segmento, onde ocorrem deleções e alterações que desencadeiam as síndromes acima citadas, sendo relevante seu estudo pois a identificação correta da região pode auxiliar em pesquisas biomédicas para humanos. O gene original apresenta 10 éxons que codificam 2 proteínas diferentes. De 1 ao 3, apresenta-se o gene *SNURF* que codifica um pequeno peptídeo de função ainda não completamente elucidada (GRAY *et al.*, 1999).

O gene *SNRPN* no camundongo, tal como o seu homólogo humano, é imprintado e paternalmente expresso, principalmente no cérebro. O gene apresenta região maternalmente metilada na extremidade 5' (DMR1), e na região da extremidade 3' do gene (DMR2) que é preferencialmente metilada no alelo paterno. No camundongo este padrão de metilação é apagado com 12,5 dias pós fertilização, e é restabelecido na oogênese (DMR1) e na espermatogênese (DMR2). Esta metilação alelo-específica vem dos gametas, apresentando uma grande estabilidade, pois escapam da onda de desmetilação pós-zigótica em camundongos, metilação *de novo*, e se mantêm em tecidos autossômicos (SHEMER *et al.*, 1997).



Figura 26: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene *SNURF*. Imagens customizadas no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Porção superior da figura representada por ideograma do cromossomo 15 humano, posição física da DMR em destaque, a barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição física sobre o cromossomo. Em cor verde representação da ilha CpG. Em azul os transcritos do gene *SNURF* em humanos. Na porção mediana as barras em vermelho representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação varia de 0 a 100% de metilação nos traços verticais. Para efeitos comparativos foram incluídos 11 estudos metilomas do banco de dados disponíveis. Na porção inferior visualiza-se o ideograma do cromossomo seis em *C. jacchus*, a barra vermelha sobre indica a posição física da DMR na espécie. Em cor verde representação da ilha CpG. Em vermelho isoformas transcritas na espécie *C. jacchus*. Em azul transcritos em outras espécies. Janela de 40Kb para visualização.

A DMR *SNURF* segundo OKae *et al.* (2014) encontra-se em humanos no braço longo do cromossomo 15, e sua região física correspondente no sagui encontra-se no braço curto do cromossomo 6, próxima uma das regiões da DMR *SNRPN*.

Paoloni-Giacobino *et al.* (2007) analisaram três regiões diferencialmente metiladas *SNRPN/SNURF*, *KCNQ1* e *IGF2R* em primatas não humanos e observaram que foram mantidas evolutivamente com conteúdo elevado de dinucleotídeos CpG, consistentes com a definição de ilha CpG. Os alelos maternos nestas DMR são hipermetilados em todos os momentos, exceto nos estágios iniciais das células germinativas, e os alelos paternos estão sempre desmetilados. Estas observações são consistentes com uma função específica dos dinucleotídeos CpG dentro das sequências que os definem como sinais de *imprinting*, ou simplesmente proporcionam uma marca epigenética hereditária. Em ambos os casos, a densidade de dinucleotídeos CpG incorporados é provavelmente importante. O elevado teor de dinucleotídeos de CpG *SNURF/SNRPN*, *KCNQ1* e *IGF2R* não pode explicar sozinho o fenótipo de *imprinting* das DMR, uma vez que a grande maioria das ilhas CpG não está relacionada a *imprinting*. Boffelli *et al.* (2003) observaram que as comparações de sequências primárias para descobrir similaridade entre mamíferos, bem como, elementos funcionais específicos de primatas no genoma humano, são inatingíveis através da avaliação de espécies evolutivamente mais distantes, por isso quanto mais próximos filogeneticamente estiverem as espécies utilizadas em estudos comparativos ou por extrapolação alométrica, mais fidedigno será o resultado obtido.

Embora as sequências sofram deleção e adição durante a evolução (provavelmente através de trocas desiguais durante a meiose), o tamanho das regiões em domínios diferencialmente metilados (DMD) pode permanecer estável durante a evolução dos mamíferos. Além disso, DMR apresentam um alto teor de CpG. Estas observações sugerem que uma característica ou características estruturais e as marcas de *imprinting* sejam também conservadas (Paoloni-Giacobino *et al.*, 2007).

Os alinhamentos das sequências de primatas mostram um elevado grau de conservação do conteúdo e posição de CpG. A baixa similaridade das sequências entre DMD de camundongos e humanos no mesmo gene/DMR torna difícil estimar um grau de analogia das sequências. Entre primatas, as taxas médias de divergência de sequências STR nas DMR *SNRPN/SNURF*, *KCNQ1* e *IGF2R*, estudadas por Paoloni-Giacobino *et al.* (2007) e colaboradores foram semelhantes para humano versus chimpanzé (1,9%), humano versus gorila (1,1%) e humano versus orangotango (7,7%). Nas figuras 23 e 24, podemos observar a conservação das DMR entre *Homo sapiens versus Callithrix* e *Homo sapiens versus Pan troglodytes*, o grau de conservação bastante elevado entre as

espécies corrobora os achados de Paoloni-Giacobino *et al.* (2007). Considerando os dados de especiação do orangotango de aproximadamente 12 a 16 milhões de anos atrás, tem-se uma estimativa de 4,6 a 6,2 milhões de anos para a divergência *Homo-Pan* e uma estimativa de 6,2 a 8,4 milhões de anos para a data de especiação do gorila, sugerindo que a linhagem ramificada do gorila fora a 1,6 a 2,2 milhões de anos mais cedo do que a divergência homem-chimpanzé (CHEN e LI, 2001).

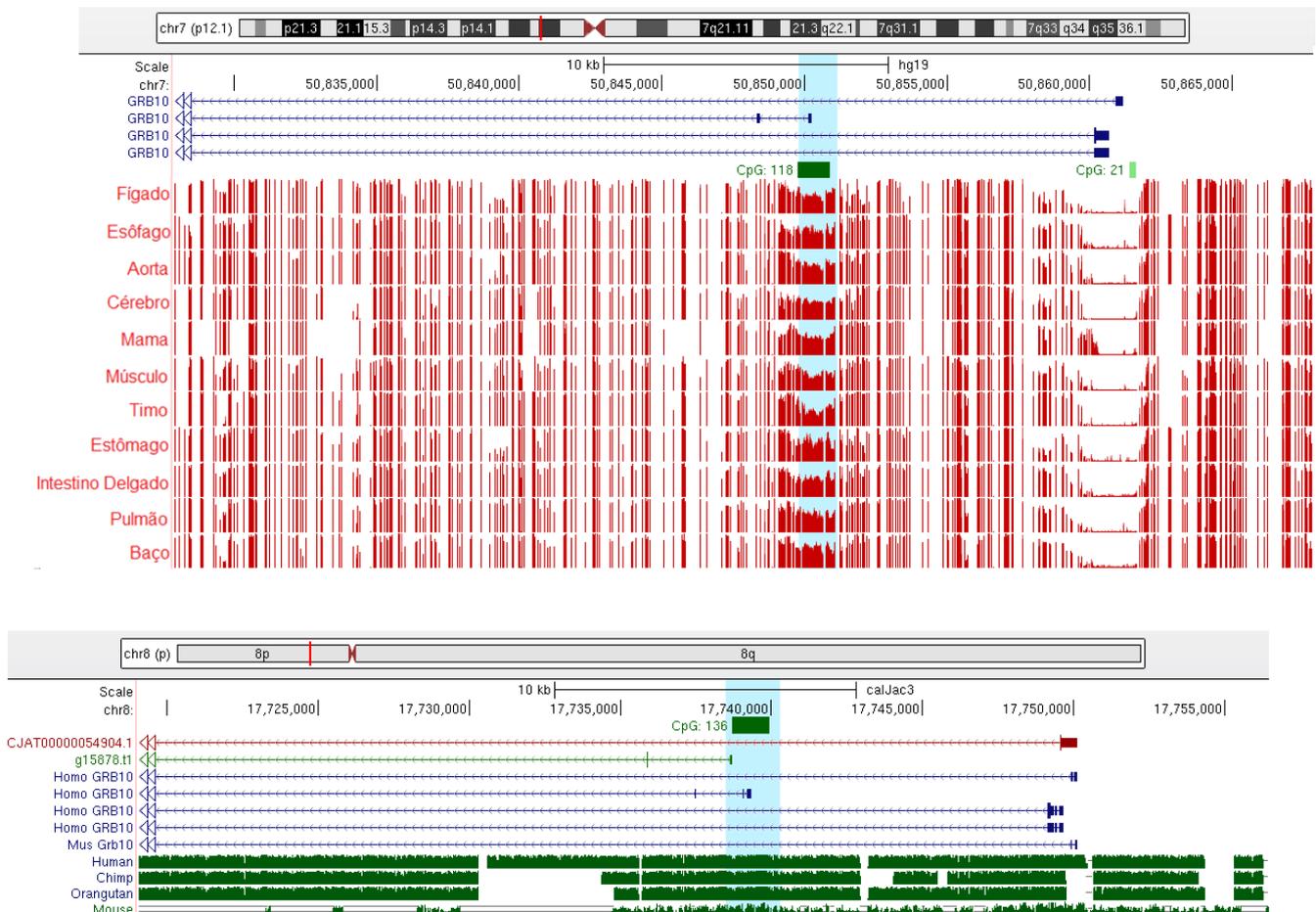


Figura 27: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene *GRB10*. Imagens customizadas no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Porção superior da figura representada por ideograma do cromossomo sete humano, posição física da DMR em destaque, a barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição física sobre o cromossomo. Em cor verde representação da ilha CpG. Em azul os transcritos do gene *GRB10* em humanos. Na porção mediana as barras em vermelho representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação varia de 0 a 100% de metilação nos traços verticais. Para efeitos comparativos foram incluídos 11 estudos metilomas do banco de dados disponíveis. Na porção inferior visualiza-se o ideograma do cromossomo sete em *C. jacchus*, a barra vermelha sobre indica a posição física da DMR na espécie. Em cor verde representação

da ilha CpG. Em vermelho isoforma transcrita na espécie *C. jacchus*. Em azul transcritos em outras espécies. Janela de 40Kb para visualização.

A região diferencialmente metilada em humanos correspondente a *GRB10* DMR encontra-se no braço curto do cromossomo 7 humano. Apresenta ilha CpG bem definida, mantida no *Callithrix*, com presença de 11 isoformas sentido 3'-5'; sob a ilha CpG encontram-se dois éxons (figura 27). No sagui a região correspondente apresenta um íntron no mesmo sentido do humano.

No camundongo, *GRB10* é um gene imprintado com expressão materna. Em contraste, o *GRB10* humano é expresso bialelicamente na maioria dos tecidos, com exceção da expressão materna de uma isoforma no músculo e expressão paterna no cérebro (ARNAUD *et al.*, 2003). No cérebro fetal, a maioria das variantes do gene *GRB10* são transcritas exclusivamente a partir do alelo paterno, no camundongo, este gene é transcrito exclusivamente a partir do alelo materno (BLAGITKO *et al.*, 2000), logo a proximidade do sagui em relação ao humano e seu córtex desenvolvido permite estudos mais aprofundados do cérebro e inferências relacionadas ao comportamento (OKANO e MITRA, 2015). A expressão monoalélica neste tecido não é acompanhada por metilação específica do alelo da ilha CpG 5'. No músculo esquelético, uma das isoforma do *GRB10*, gama 1, é expressa a partir do alelo materno, enquanto que em muitos outros tecidos fetais, todas as variantes do *GRB10* em humanos são transcritas a partir de ambos os alelos parentais (BLAGITKO *et al.*, 2000).

A DMR *GRB10* aparentemente não controla *clusters* de genes imprintados em humanos. Consequentemente, espera-se que os elementos que controlam a sua marca residam dentro dos genes ou em proximidade imediata (ARNOUD *et al.*, 2003). Arnoud *et al.* (2003) compararam a organização genômica da DMR *GRB10* humana e *GRB10* de camundongo, com particular ênfase numa região de 20 kb que circundam os locais de início de transcrição, através do alinhamento das sequências genômicas. Dentro desta região existem dois domínios de similaridade de sequência, domínio 1 e 2, separados por uma região menos conservada. Os domínios 1 e 2 contêm, cada um, ilhas CpG tanto em sequências humanas como em camundongos. Em saguis também são notadas duas ilhas, uma em região intrônica e uma segunda em região exônica. Não existem outras ilhas CpG dentro dos genes humano e do camundongo, ou na sua proximidade, indicando que estas ilhas CpG identificadas são locais prováveis para controle de expressão. OKae

et al. (2014), indicaram apenas uma DMR em humanos, local utilizado como modelo para conversão da sequência em saguis neste estudo (tabela 4).

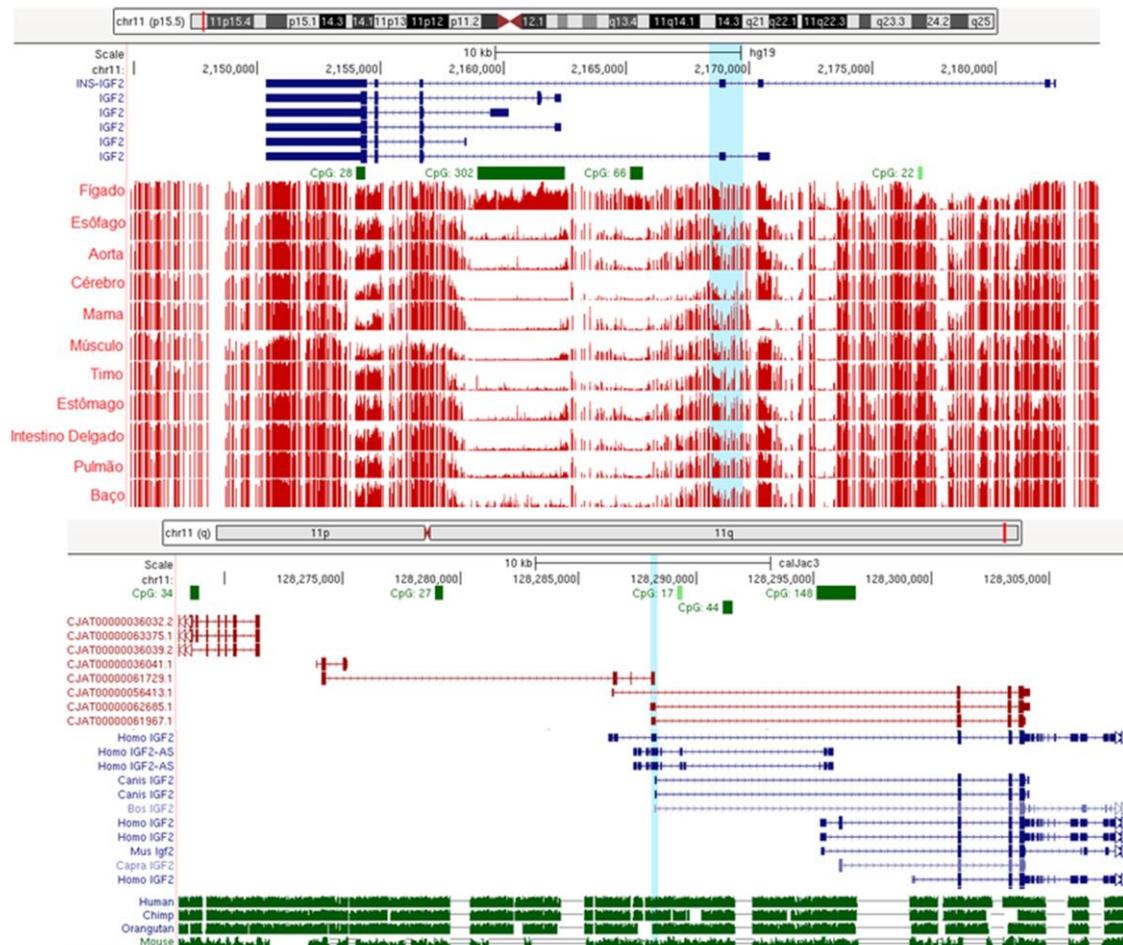


Figura 28: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene *IGF2*. Imagens customizadas no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Porção superior da figura representada por ideograma do cromossomo 11 humano, posição física da DMR em destaque, a barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição física sobre o cromossomo. Em azul os transcritos do gene *IGF2* em humanos. Na porção mediana as barras em vermelho representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação varia de 0 a 100% de metilação nos traços verticais. Para efeitos comparativos foram incluídos 11 estudos metilomas do banco de dados disponíveis. Na porção inferior visualiza-se o ideograma do cromossomo 11 em *C. jacchus*, a barra vermelha sobre indica a posição física da DMR na espécie. Em cor verde representação da ilha CpG. Em vermelho isoformas transcritas na espécie *C. jacchus*. Em azul transcritos em outras espécies. Janela de 40Kb para visualização.

Quando comparadas às *IGF2* DMR0 humana e do sagui não notamos ilha CpG em ambas, em *Callithrix* a cDMR encontra-se no braço longo do cromossomo 11 e em humanos no braço curto.

Em camundongos no cromossomo paterno, a *IGF2* DMR é metilada, os “enhancers” conseguem atingir o promotor do *IGF2* levando-o à sua expressão. Já no cromossomo materno a região não é metilada, bloqueando o acesso dos “enhancers” que ativariam o *IGF2*. A DMR0 sobrepõe-se a um promotor placenta-específico do *IGF2* sendo metilado somente no alelo materno (CHAO e D'AMORE, 2008). Em oócitos de vacas Nelore, foram encontradas diferenças na metilação da última DMR do gene *IGF2* (FAGUNDES, 2009). De acordo com He *et al.* (2013) o nível de metilação em *IGF2* DMR foi negativamente correlacionada com o peso ao nascer na gravidez normal, estes resultados implicam em que *IGF2* regula o crescimento fetal, mas o padrão regulatório é perturbado em gestações patológicas. A manutenção das características das DMR entre primatas infere que o elo filogenético seja perpetuado, assim como as marcas epigenéticas (KANBER *et al.*, 2013).

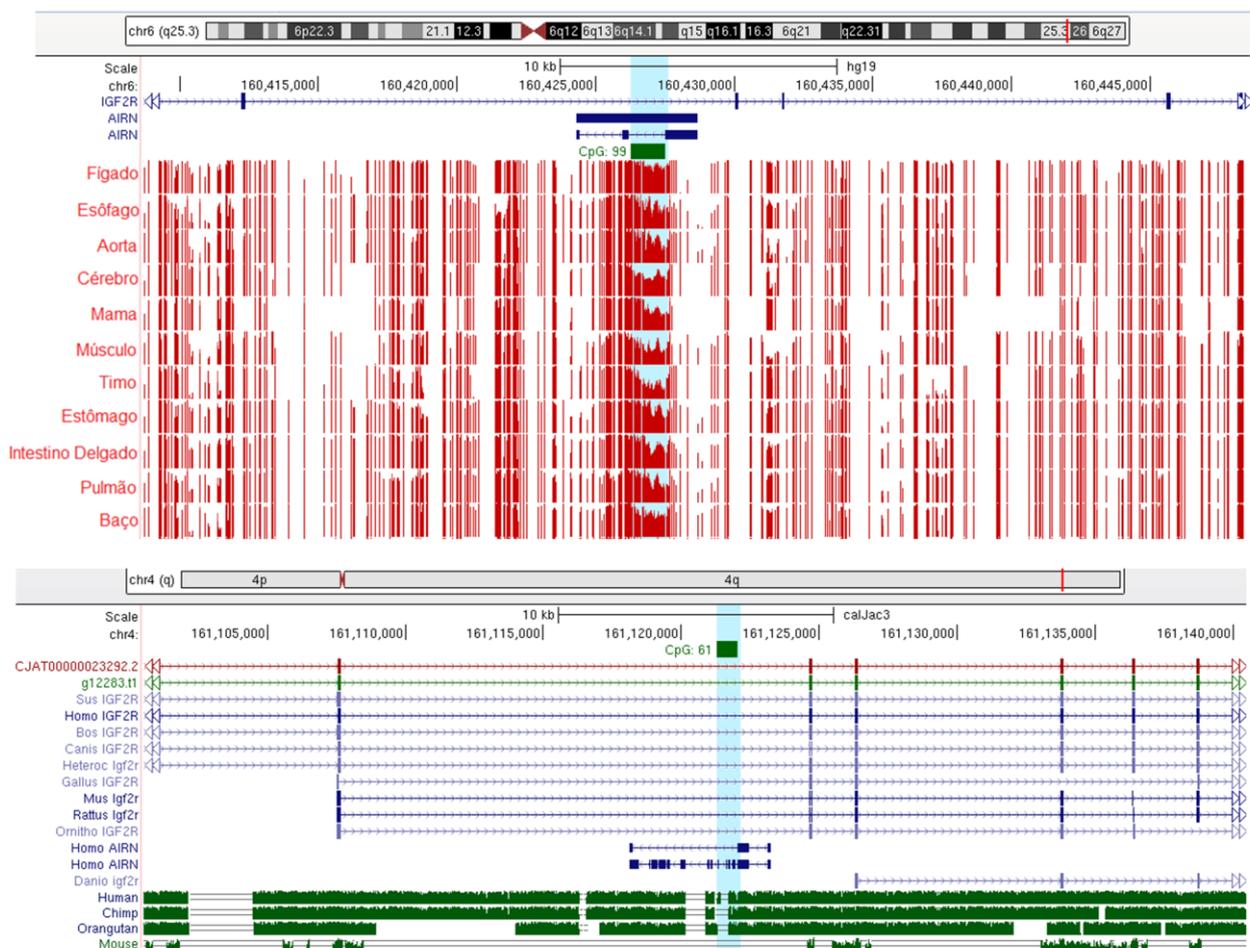


Figura 29: Visualização das marcas epigenéticas na região candidata DMR relacionada ao gene *IGF2R*. Imagens customizadas no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Porção superior da figura representada por ideograma do cromossomo seis humano, posição física da DMR em destaque, a barra em vermelho sobre o

ideograma indica a posição física sobre o cromossomo. Em cor verde representação da ilha CpG. Em azul os transcritos do gene *IGF2R* em humanos. Na porção mediana as barras em vermelho representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação varia de 0 a 100% de metilação nos traços verticais. Para efeitos comparativos foram incluídos 11 estudos metilomas do banco de dados disponíveis. Na porção inferior visualiza-se o ideograma do cromossomo quatro em *C. jacchus*, a barra vermelha sobre indica a posição física da DMR na espécie. Em cor verde representação da ilha CpG. Em vermelho isoforma transcrita na espécie *C. jacchus*. Em azul transcritos em outras espécies. Janela de 40Kb para visualização.

A DMR do gene *IGF2R* em humanos encontra-se no braço longo do cromossomo 6 e em *Callithrix* no braço longo do cromossomo 4. Apresenta ilha CpG bem definida em humanos, a qual é conservada no sagui. A DMR *IGF2R* é de origem gamética e a metilação é paterna em humanos. O gene *IGF2R* não é imprintado em humanos, mas é em camundongo e marsupiais (KILLIAN *et al.*, 2000) e preferencialmente em *M. fascicularis* (CHEONG *et al.*, 2015).

Visando investigar os perfis de metilação nas regiões alvo acima descritas, foram elaborados dois ensaios de Digestão Enzimática Sensível à Metilação (DESM) associada a PCR quantitativa por fluorescência (QF-PCR) de acordo com a metodologia. Os iniciadores são inéditos para *Callithrix* e desenhados para este estudo, visto que não existem na literatura primers para estes alvos (tabelas 1 e 2). Os iniciadores foram delineados a partir dos dados da sequência do DNA em cada região selecionada (tabela 4). Assim também Fujimoto *et al.* (2005) produziram seus arquétipos de iniciadores para amplificar regiões polimórficas nos genes *SNRPN*, *NDN*, *H19* e *IGF2* em macaco rhesus baseando-se em sequências humanas.

6.4. Validações das áreas candidatas a regiões diferencialmente metiladas em *Callithrix spp.*

Apesar dos recentes avanços no conhecimento da epigenética, há uma limitação na extrapolação feita através do modelo experimental de *imprinting* para humanos, o camundongo, que apresenta em comum apenas 30% dos seus genes (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014). É notório que a ausência de protótipos viáveis para estudos biomédicos, dificulta o entendimento de vários aspectos relacionados à biologia. Primatas

neotropicais têm sido amplamente utilizados em pesquisas na área da saúde (TARDIF *et al.*, 2003) e o emprego de saguis em epigenética é promissor. Após o sequenciamento realizado em 2014 por Worley *et al.* foi possível identificar regiões ortólogas entre as sequências de humanos e saguis, e assim um novo horizonte foi admitido. As regiões diferencialmente metiladas e genes imprintados nesta espécie são lacunas ainda não exploradas e que possibilitarão uma compreensão mais aprofundada de aspectos únicos da espécie que poderão ser correlacionados com humanos.

Neste ensaio caracterizamos o perfil de metilação nas regiões por nós almejadas como cDMR baseadas nas posições físicas das DMR no genoma humano. Todos os ensaios foram customizados para os alvos, e os achados são inéditos para a espécie.

No experimento de digestão enzimática toma-se um controle sem utilizar enzimas de digestão (não digerido, ND) e o tratado com enzimas de digestão. Abaixo nas figuras 31 e 32, podemos observar exemplos dos ensaios. Em todas as amostras houve completa digestão provando que o sítio inferido para *Callithrix spp.* corresponde a uma região hipometilada do do gene *ESCOS2*, validando a análise e determinando um alvo para futuros ensaios.

Mediante comunicação pessoal, foram obtidos dados de análise paralela, provenientes de oito marcadores microssatélites nas mesmas amostras (figura 30). Foram utilizados DNA originários de animais não quiméricos (onde foram observados um ou dois alelos apenas), a fim de evitar quaisquer interferências no estudo, principalmente em análises complementares de polimorfismos. O microquimerismo para a análise de metilação no ensaio DESM é irrelevante porque a origem parental não teria um impacto na metilação do DNA (ROSS *et al.*, 2007), contudo para minissequenciamento haveria interferência e permanência de alelos após a digestão enzimática.

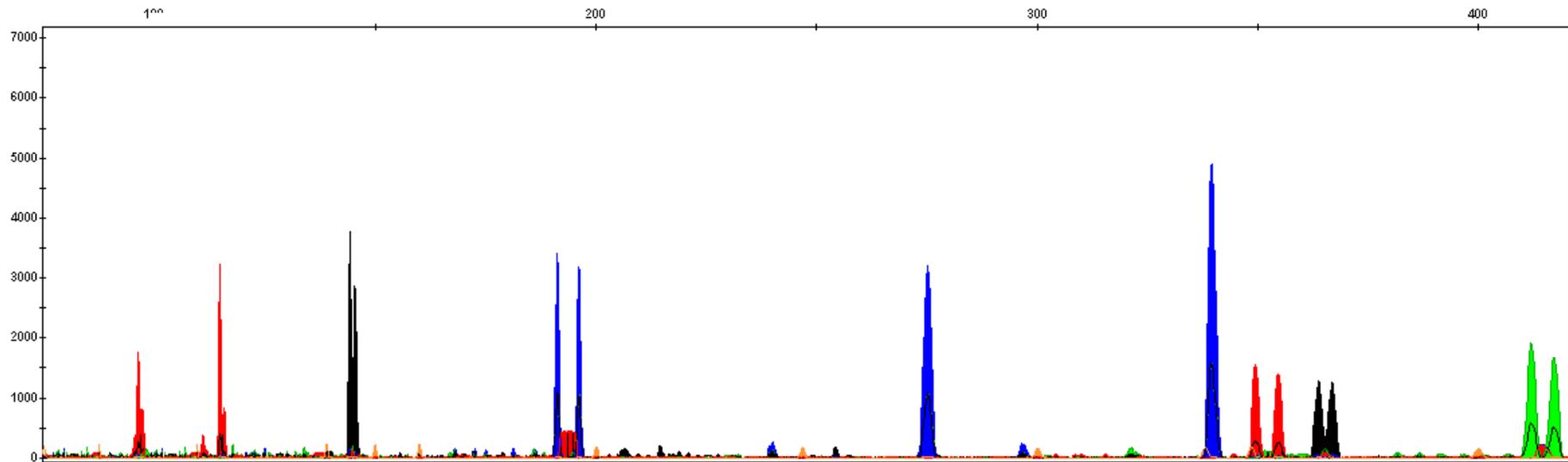


Figura 30: Eletroferograma do perfil de amplificação de marcadores STR em amostra de tecido sanguíneo de *Callithrix spp.*.
Fonte: OLIVEIRA, D.S.L., (2017).

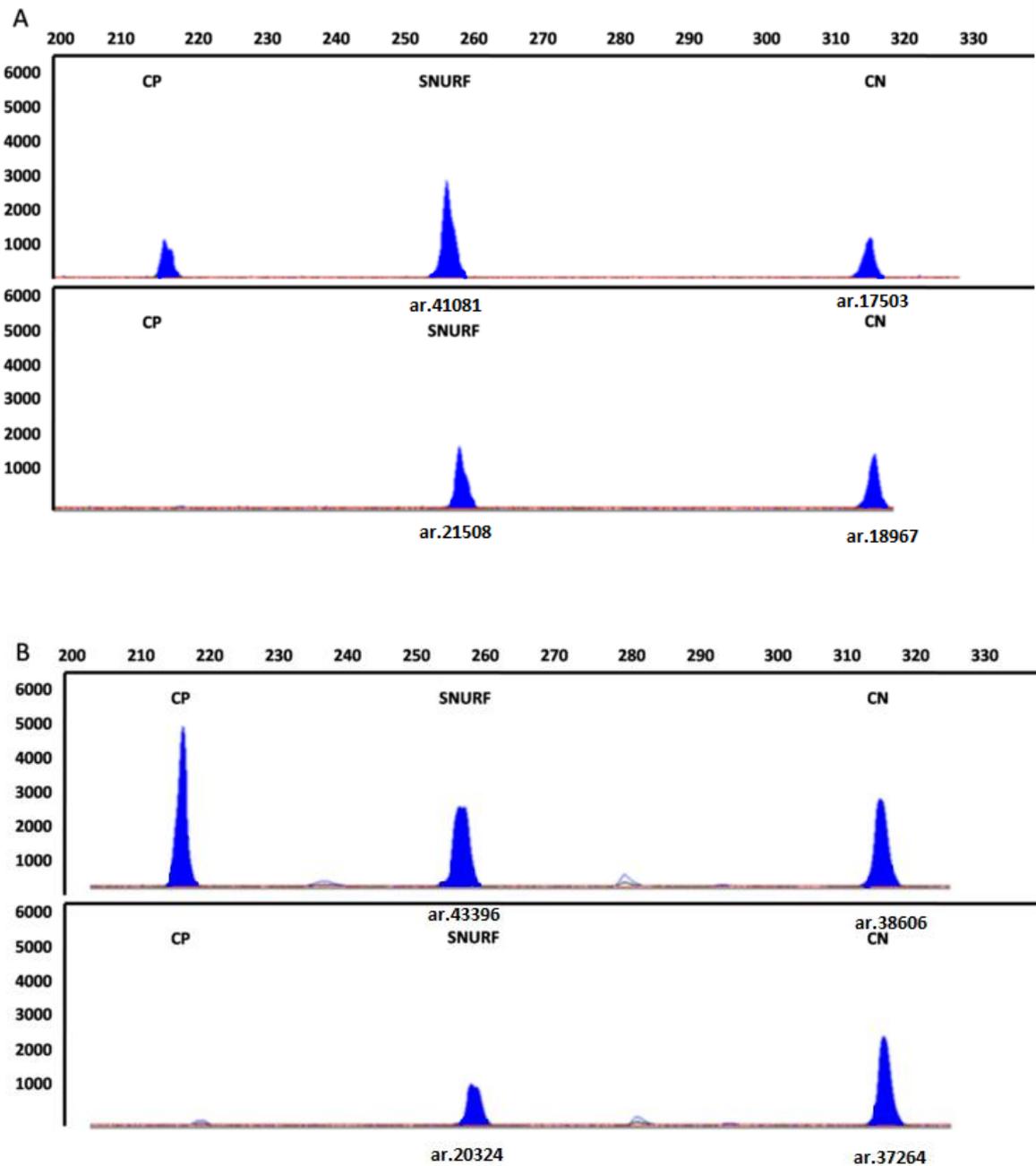


Figura 31: Eletroferogramas do perfil de metilação em tecidos de *Callithrix spp.* para a cDMR *SNURF*. Parte superior das figuras representa o ensaio pré-tratamento e porção inferior tratado com ERSM HpaII. CP- controle positivo; CN-controle negativo. Eixo X: pares de bases; Eixo Y: altura do pico. A) Digestão de DNA proveniente de amostra de tecido sanguíneo; B) Digestão de DNA proveniente de amostra de tecido intestinal. Ar: área do pico.

Em *Callithrix* relatos sobre regiões diferencialmente metiladas são escassos, por isso estes novos achados são de suma importância para compreensão da espécie, visto

que o estado de metilação é espécie-específica. Lin *et al.* (2012) observaram em seu estudo que *C. jacchus* exibiram em suas células espermatogênicas um estado de metilação oposto ao exibido em ratos, e evolutivamente manteve o padrão de metilação conservados em relação a humanos, reafirmando que o modelo por nós proposto de *imprinting* é robusto.

Encontramos para a cDMR *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R* em tecido sanguíneo, o percentual médio de metilação entre os sítios CpG de 59,96% com desvio padrão 11,34% (mediana 59,54%), 61,96% com desvio de 30,11% (mediana 50,87%) e 56,53% com desvio padrão de 32,4% (mediana 45,17%), correspondendo a três regiões hemimetiladas em *Callithrix*. Por sua vez a mediana obtida foi de 50,74% entre os sangues de todos os alvos, valores de mediana são mais fidedignos, pois é uma medida com importância central na estatística robusta. Em relação à média, que é extremamente utilizada para expressar valores, a mediana e pode dar uma ideia melhor de um valor típico porque não é tão distorcida por valores extremamente altos ou baixos (KRZYWINSKI e ALTMAN, 2013). Kanber *et al.* (2013) relataram que a média de metilação foi de cerca de 60% em várias espécies de primatas na DMR do gene *RB1* em sangue (humanos, chimpanzé, rhesus, sagui e galago) exceto no orangotango, que apresentou metilação diferenciada em alguns sítios CpG enquanto regiões adjacentes foram altamente metiladas, a média por nós encontrada foi de 64,3% com desvio padrão de 41,08% corroborando os achados de Kanber *et al.* (2013). A separação dos alelos do orangotango revelou que um alelo é completamente metilado, enquanto que o outro é 56% metilado, e não encontraram nenhuma explicação porque o orangotango mostra metilação diferencial apenas em determinados sítios CpG. Nos diferentes tecidos testados para cada alvo estudado houve presença de alterações no perfil de metilação, mas a média e mediana não variaram muito dos valores obtidos na metilação dos sangues para os alvos, 67,6% com desvio padrão de 42,47% e 58,7% respectivamente, apesar de haver diferenças entre os tecidos. Em humanos os tecidos numa DMR obedecem ao mesmo perfil hemimetilado encontrado no sangue, contudo a análise é bastante pontual e pode haver discrepância se no local dos tecidos as CpG estiverem mais ou menos metiladas ao acaso, visto que é considerado o menor valor no grupo de CpG analisadas. Pode também ser considerado que haja variação polimórfica em diferentes tecidos, como na placenta, segundo Monk *et al.* (2006), em *IGF2R*, o que representaria um achado para a espécie.

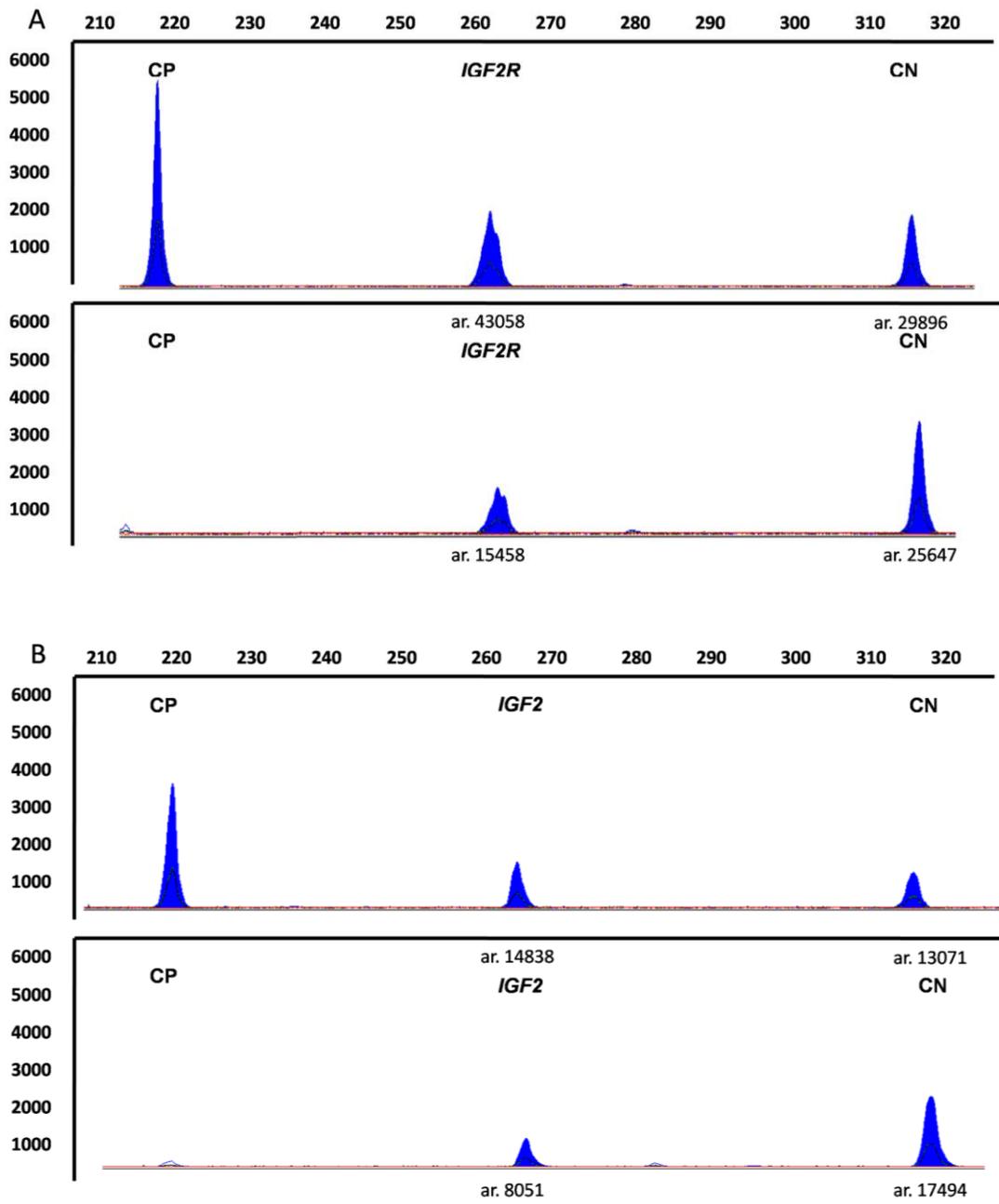
A exemplo, o tecido pulmonar nas DMR *SNURF* e *IGF2*, nos animais testados, se apresentou hemimetilado, enquanto o tecido hepático apresentou grande variação. Acredita-se que o método de extração possa acrescentar nestas variações e o próprio parênquima tecidual, mais fibroso/denso ou menos, pois o DNA proveniente dos tecidos pode conter mais proteína e sua relação DNA/proteína (densidade óptica) influenciar na reação. A absorvância no ultravioleta pode ser utilizada para verificar a pureza da extração do DNA. Para uma amostra pura, a taxa de absorvância em 260 nm e em 280 nm (A_{260}/A_{280}) é 1,8. Uma taxa $<1,8$ indica que a amostra está contaminada com proteínas ou solventes orgânicos como fenol (DHALIWAL, 2013). Com esta finalidade foram realizadas várias purificações do DNA. Foi visto durante as análises, que o método de extração influencia diretamente no ensaio, uma vez que o trizol e vários kits utilizados não permitiram a digestão tecidual por ERSM. A diferença entre os kits se dá pelos seus constituintes, onde pudemos observar que as extrações com solventes orgânicos limitaram a técnica. O sangue parece ser uma amostra mais homogênea, onde se permite uma análise mais acurada.

Figura 32: Estados de metilação determinados pelo ensaio com ERSM de amostras sanguíneas de *C. jacchus* para as cDMR.

Amostras	Alvo	Tecidos	Área do alvo		Área CN		% de Metilação
			não tratado	não tratado	Área alvo tratado	Área CN tratado	
1324	SNURF	Sangue	111248	52357	79507	75853	49,33
1321	SNURF	Sangue	102479	41939	40438	23874	69,31
1311	SNURF	Sangue	41081	17503	21508	18967	48,31
1087	SNURF	Sangue	12449	11304	9548	3599	240
1337	SNURF	Sangue	58200	36494	49000	41896	73,33
1576	SNURF	Sangue	78461	25087	46855	25161	59,54
1086	IGF2	Sangue	14115	16356	22094	23880	107
1087	IGF2	Sangue	5066	43545	2227	48797	39,22
1311	IGF2	Sangue	52156	25002	33483	35532	45,17
1321	IGF2	Sangue	55413	68215	70813	74640	116,79
1756	IGF2	Sangue	86209	42053	58137	70304	40,33
33	IGF2	Sangue	24999	25849	14220	28784	51
1336	IGF2	Sangue	41964	31851	122208	68698	135,02
1291	IGF2	Sangue	51611	28587	114588	118505	53,55
1295	IGF2	Sangue	13432	5649	52214	40107	54,75
35	IGF2	Sangue	44775	50042	25692	45576	63
28	IGF2	Sangue	53436	66115	26838	108566	30,58
1293	IGF2	Sangue	65839	49348	38581	47821	60,47
1313	IGF2	Sangue	16143	22189	6355	17960	48,63
SIA 36	IGF2	Sangue	2841	25895	1309	26838	44,45
SIA 11	IGF2	Sangue	9214	11497	2129	5235	50,75
38	IGF2	Sangue	3343	5584	2255	8595	50,74
1322	IGF2R	Sangue	61716	113857	7544	88941	15,64
1321	IGF2R	Sangue	142476	99822	60000	80016	52,53
1320	IGF2R	Sangue	38462	32340	9554	40806	19,68
1294	IGF2R	Sangue	145244	105609	6836	22154	22,43
1093	IGF2R	Sangue	180000	84352	115763	123784	43,82
1336	IGF2R	Sangue	183700	93041	25758	32042	40,71
1757	IGF2R	Sangue	74765	35780	58137	70304	39,57
1575	IGF2R	Sangue	7115	7284	6913	7465	94
1331	IGF2R	Sangue	55413	68215	70813	74640	116,79
1311	IGF2R	Sangue	52156	25002	33483	35532	45,17
1087	IGF2R	Sangue	5066	43545	2227	48797	39,22
1086	IGF2R	Sangue	14115	16356	22094	23880	107,2
1314	IGF2R	Sangue	9612	63280	3251	45642	46,89
1313	IGF2R	Sangue	17856	23690	6355	17960	46,94
33	IGF2R	Sangue	11511	20885	3500	17831	35,61
35	IGF2R	Sangue	7296	21950	5784	16646	104,53

Figura 33: Estados de metilação determinados pelo ensaio com ERSM de amostras teciduais de *C. jacchus* para as cDMR *SNRPN*, *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R*.

Amostras	Alvo	Tecidos	Área do alvo		Área CN		% de Metilação
			não tratado	não tratado	Área alvo tratado	Área CN tratado	
1756	<i>SNRPN</i>	Língua	67236	29494	44608	21331	91,73
1756	<i>SNRPN</i>	Pulmão	29306	35742	49040	53184	112,45
1756	<i>SNRPN</i>	Testículo	111404	46128	50420	76653	27,23
1756	<i>SNRPN</i>	Intestino	20465	34144	50948	49365	172,19
1311	<i>SNURF</i>	Intestino	43396	38606	20324	37264	48,52
1311	<i>SNURF</i>	Pulmão	50833	49042	40713	51676	76
1311	<i>SNURF</i>	Língua	36311	36816	29555	51534	58,14
1311	<i>SNURF</i>	Ovário	28621	51945	26637	43061	112,36
1756	<i>SNURF</i>	Língua	128305	56499	51891	27853	82,03
1756	<i>SNURF</i>	Pele	41792	13873	33731	23551	47,54
1756	<i>SNURF</i>	Pulmão	47448	13278	23840	13799	48,34
1756	<i>SNURF</i>	SNC	12552	4185	8655	7136	40,43
1757	<i>SNURF</i>	Testículo	80262	87996	18607	79852	25,54
1757	<i>SNURF</i>	Intestino	48259	46977	76460	104994	70,88
1757	<i>SNURF</i>	Pulmão	66095	67994	64752	103894	64,11
1757	<i>SNURF</i>	Língua	38337	63391	35098	57294	101,29
1757	<i>SNURF</i>	SNC	24179	16159	19262	20641	62,36
1573	<i>SNURF</i>	Pulmão	26.483	24637	12409	22089	52,26
1573	<i>SNURF</i>	Fígado	13160	31464	26419	46064	137,1
1311	<i>SNURF</i>	Intestino	43396	38606	20324	37264	48,52
1311	<i>SNURF</i>	Pulmão	50833	49042	40713	51676	76
1311	<i>SNURF</i>	Língua	36311	36816	29555	51534	58,14
1311	<i>SNURF</i>	Ovário	28621	51945	26637	43061	112,36
1756	<i>SNURF</i>	Língua	128305	56499	51891	27853	82,03
1756	<i>SNURF</i>	Pele	41792	13873	33731	23551	47,54
1756	<i>SNURF</i>	Pulmão	47448	13278	23840	13799	48,34
1756	<i>SNURF</i>	SNC	12552	4185	8655	7136	40,43
1757	<i>SNURF</i>	Testículo	80262	87996	18607	79852	25,54
1757	<i>SNURF</i>	Intestino	48259	46977	76460	104994	70,88
1757	<i>SNURF</i>	Pulmão	66095	67994	64752	103894	64,11
1757	<i>SNURF</i>	Língua	38337	63391	35098	57294	101,29
1757	<i>SNURF</i>	SNC	24179	16159	19262	20641	62,36
1573	<i>SNURF</i>	Pulmão	26.483	24637	12409	22089	52,26
1573	<i>SNURF</i>	Fígado	13160	31464	26419	46064	137,1
1311	<i>IGF2</i>	Rim	35545	11160	9890	40288	7,7
1756	<i>IGF2</i>	SNC	3822	3531	5313	6807	72,1
1756	<i>IGF2</i>	Língua	33935	39930	20871	51109	48,05
1756	<i>IGF2</i>	Testículo	3980	17247	14200	32159	191
1756	<i>IGF2</i>	Pele	25292	33785	4886	21544	30,29
1756	<i>IGF2</i>	Pulmão	30410	31342	10609	32545	33,59
1756	<i>IGF2</i>	Rim	37856	32104	10191	38832	22,25
1757	<i>IGF2</i>	Testículo	10000	10394	31078	16240	198,9
1757	<i>IGF2</i>	Fígado	4586	5115	1481	6118	26,99
1757	<i>IGF2</i>	Pulmão	14838	13071	8051	17494	40,54
1311	<i>IGF2R</i>	Rim	32186	41362	7220	62352	14,88
1756	<i>IGF2R</i>	Língua	57845	54982	11815	73666	15,24
1756	<i>IGF2R</i>	Rim	43058	29896	15458	25647	41,84
1756	<i>IGF2R</i>	Pele	23426	27547	22309	43790	59,9
1756	<i>IGF2R</i>	Testículo	50181	72055	34676	78325	63,57
1756	<i>IGF2R</i>	Intestino	46017	61696	30938	63729	59,35
1756	<i>IGF2R</i>	Pulmão	59457	54745	14233	43073	30,42
1756	<i>IGF2R</i>	Pâncreas	26153	57189	28589	61583	101,51



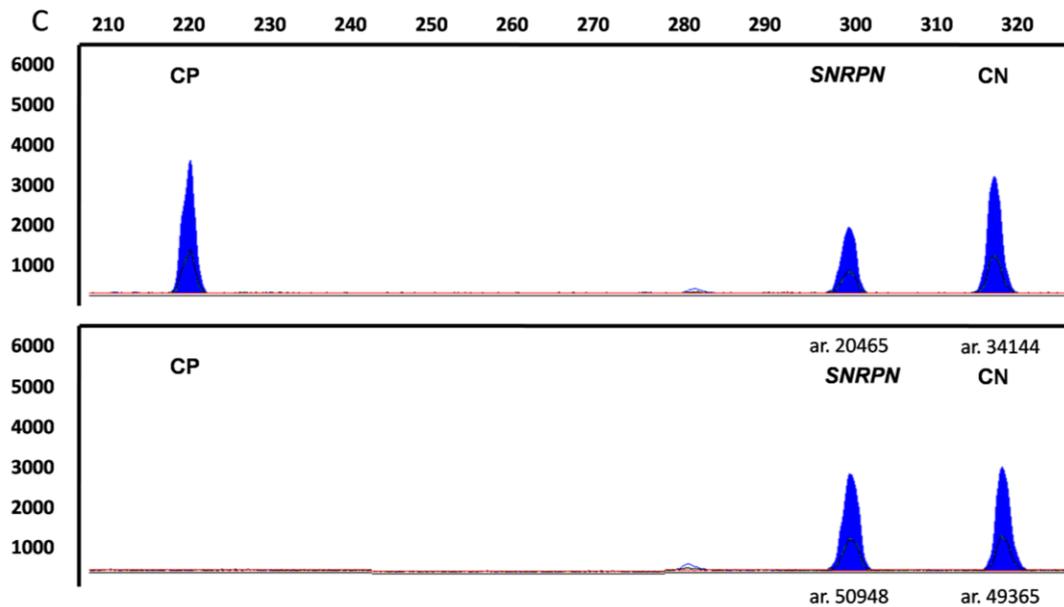


Figura 34: Eletroferogramas do perfil de metilação em diferentes tecidos de *Callithrix spp.* para as cDMR *IGF2R*, *IGF2* e *SNRPN*. Parte superior das figuras representam o ensaio pré-tratamento e porção inferior tratado com ERSM HpaII e HhaI. CP- controle positivo; CN-controle negativo. Eixo X: pares de bases; Eixo Y: altura do pico. A) Digestão de DNA proveniente de amostra de tecido renal; B) Digestão de DNA proveniente de amostra de tecido pulmonar; C) Digestão de DNA proveniente de amostra de tecido intestinal. ar: área do pico.

BARLOW (2011) observou que a DMR gamética *IGF2R* teria origem de metilação paterna em humanos, enquanto *IGF2*, o perfil de metilação encontrado era materno. Apesar de termos encontrado em sangue perfil hemimetilado, não podemos inferir a origem parental da metilação (figura 32). Killian *et al.* (2000) demonstraram que a DMR *IGF2R* está presente no camundongo, e que em gambás o gene *IGF2R* é imprintado, mas não em monotremados. Também observou que o receptor de *IGF2* não se liga a este, não estando relacionado ao crescimento intrauterino; marsupiais, portanto possivelmente desenvolveram um sistema de *imprinting* alternativo. Cheong *et al.* (2015) por sua vez notaram que em *Macaca fascicularis* esta metilação e *imprinting* eram preferenciais, indo contrariamente ao predito por Okano e Mitra (2014) que sugerem que nos genes *IGF2* e *IGF2R* houve perda do *imprinting* antes dos primatas. Neste estudo observamos que nos tecidos amplificados houve tendência a hemimetilação em *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R* em tecidos e em sangue a hemimetilação prevaleceu. Possivelmente a variação tecidual pode ter influenciado nas análises. Como o ensaio é bastante pontual das CpG e customizado, quaisquer interferências podem alterar o resultado.

Várias teorias têm sido propostas para elucidar a pressão evolutiva que resultou na formação dos genes imprintados (BARTOLOMEI e TILGHMAN, 1997). O modelo mais difundido sugere que a marca surgiu a partir da constatação de que *M6P/IGF2R* e *IGF2* são paternalmente e maternalmente silenciados, respectivamente. Haig e Graham (1991) propuseram que o *imprinting* genômico resultou de um “cabo de guerra” na tentativa de possibilitar o crescimento fetal sem exaurir os recursos maternos. Harris *et al.* (2014) notaram correlação positiva do eixo *GH/IGF*, genes ligados a reprodução, com possível relação com a gemelação na família *Callitrichidae*. As alterações presentes na espécie *C. jacchus* como miniaturização provavelmente proporcionaram um melhor enquadramento para passagem através da pelve materna, gerando menos casos de distocias. O gene *IGF2* regula o crescimento e a diferenciação celular em animais, assim como no crescimento da placenta (CHAO e D’AMORE, 2008). Esses benefícios adaptativos da reprodução geraram possibilidade de gestações múltiplas, reduzindo a mortalidade de neonatos, podendo ser uma nova percepção na medicina reprodutiva humana.

Em tecido adulto, os alelos maternos do gene *SNRPN* foram metilados em 99,7% dos dinucleotídeos CpG analisados, em contraste, apenas 10,5% de CpGs em alelos herdados paternalmente foram metilados (REINHART *et al.*, 2006). Contudo encontramos hipermetilação (figura 31) nos tecidos analisados na região ortóloga a DMR1 de humanos, indicando possivelmente não se tratar, nesta espécie, de uma DMR. Shemer *et al.* (1997) concluíram que *SNRPN* apresenta duas DMR, um domínio maternalmente metilado (DMR1) e um paternalmente metilado DMR2, sendo de origem gamética em humanos. A região neste estudo é ortóloga a 15 q11-q13 em humanos correspondente ao local de alterações nas Síndromes Prader–Willi e Angelman, a cDMR *SNURF* também relacionada as síndromes apresenta perfil hemimetilado assim como em humanos.

De acordo com Baran *et al.* (2015), a característica do estado hemimetilado nas DMR imprintadas conhecidas por si só não é uma marca epigenética suficiente para definir a expressão de genes monoalélicos, a exemplo a DMR *GRB10*, apresenta-se hemimetilada em todos os tecidos, contudo com expressão bialélica, exceto no cérebro onde apresenta expressão paterna. Há também DMR que aparentemente não controlam genes próximos, como a WRB DMR, e o gene de mesmo nome apresenta expressão bialélica nas isoformas estudadas por Silva *et al.* (2016).

6.5 Análise do minissequenciamento de base única em dados de metilação nas DMR

Paralelamente a análise de metilação das regiões DMR no sagui, foi realizado minissequenciamento de base única. Foi confeccionado um ensaio octaplex com iniciadores não marcados dos genes, para identificar indivíduos heterozigotos informativos no DNA. As regiões confirmadas como SNP por este estudo estão disponíveis através do NCBI e na tabela 3.

Tabela 5: Parâmetros populacionais em *C. jacchus* para os SNP utilizados no estudo.

	SNURF rs497159410	GRB10 rs492967672	GRB10 rs498064258	IGF2 rs483704435	IGF2 rs487851589	IGF2 rs494701010	IGF2R rs486869517	IGF2R rs492637213	Média
H _E	0,11	0	0	0	0,39	0,43	0,45	0,43	0,22
H _O	0,12	0	0	0	0,54	0,54	0,34	0,54	0,26
Alelo maior	G	G	C	C	C	C	T	A	
MAF	0,17	0	0	0	0,27	0,28	0,25	0,36	0,16
Alelo menor	C	G	C	C	G	T	C	C	
N	19	24	24	26	26	26	25	25	24,3

H_E-Heterozigose esperada;
H_O-Heterozigose observada;
MAF-Frequência do segundo alelo menor.
n-Número de animais.

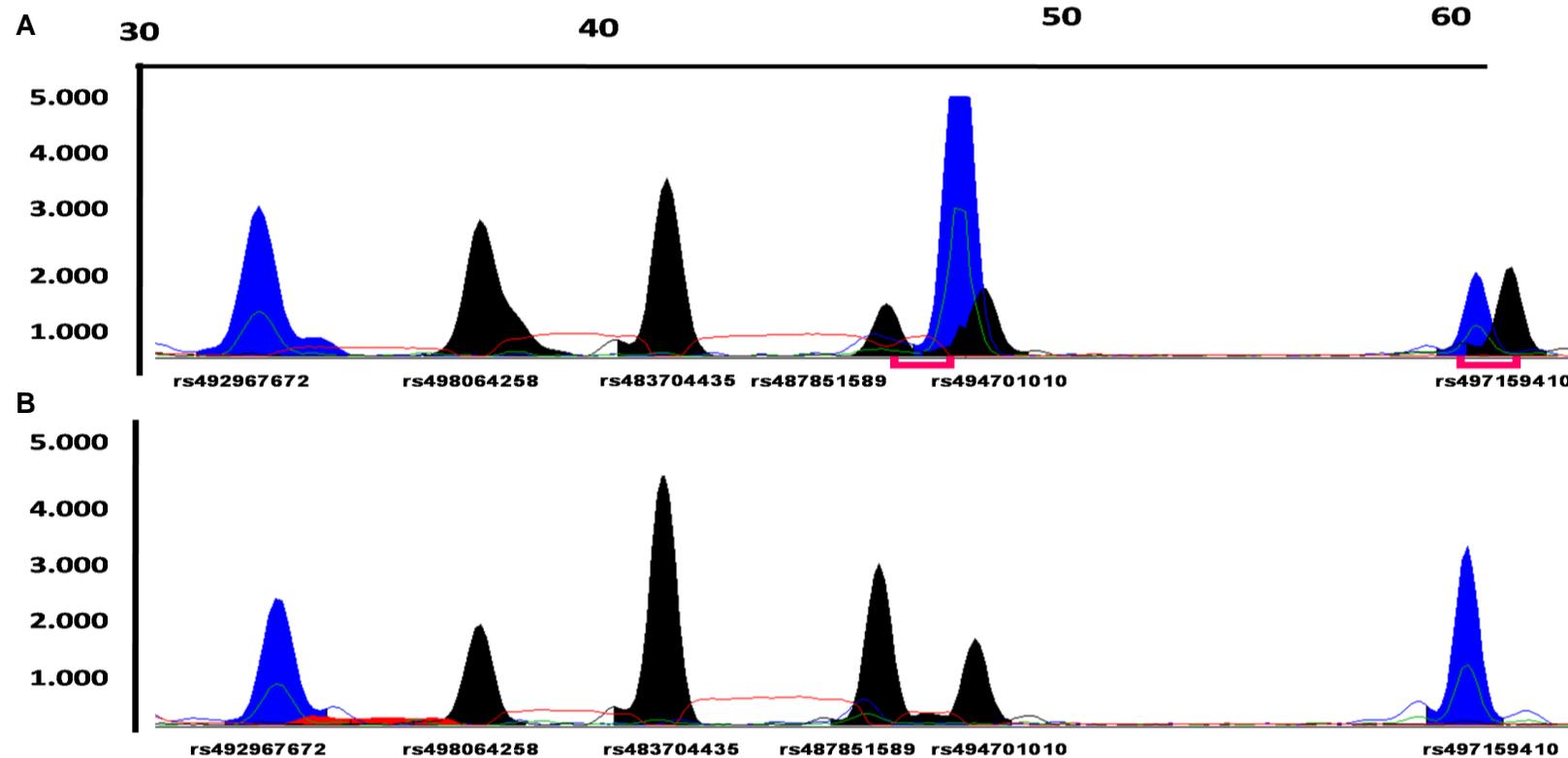


Figura 35: Eletroferogramas representativos do perfil amplificações de minissequenciamento de base única. Determinação do estado de metilação alelo-específico em três cDMR (*GRB10*, *IGF2*, *SNURF*), através da investigação dos polimorfismos digeridos por ERSM. A) Ensaio pré-tratamento com ERSM. B) Ensaio pós-tratamento com ERSM. A perda dos alelos rs487851589 (*IGF2*) e rs497159410 (*SNURF*) em B indica ausência de metilação em um dos alelos da DMR imprintada.

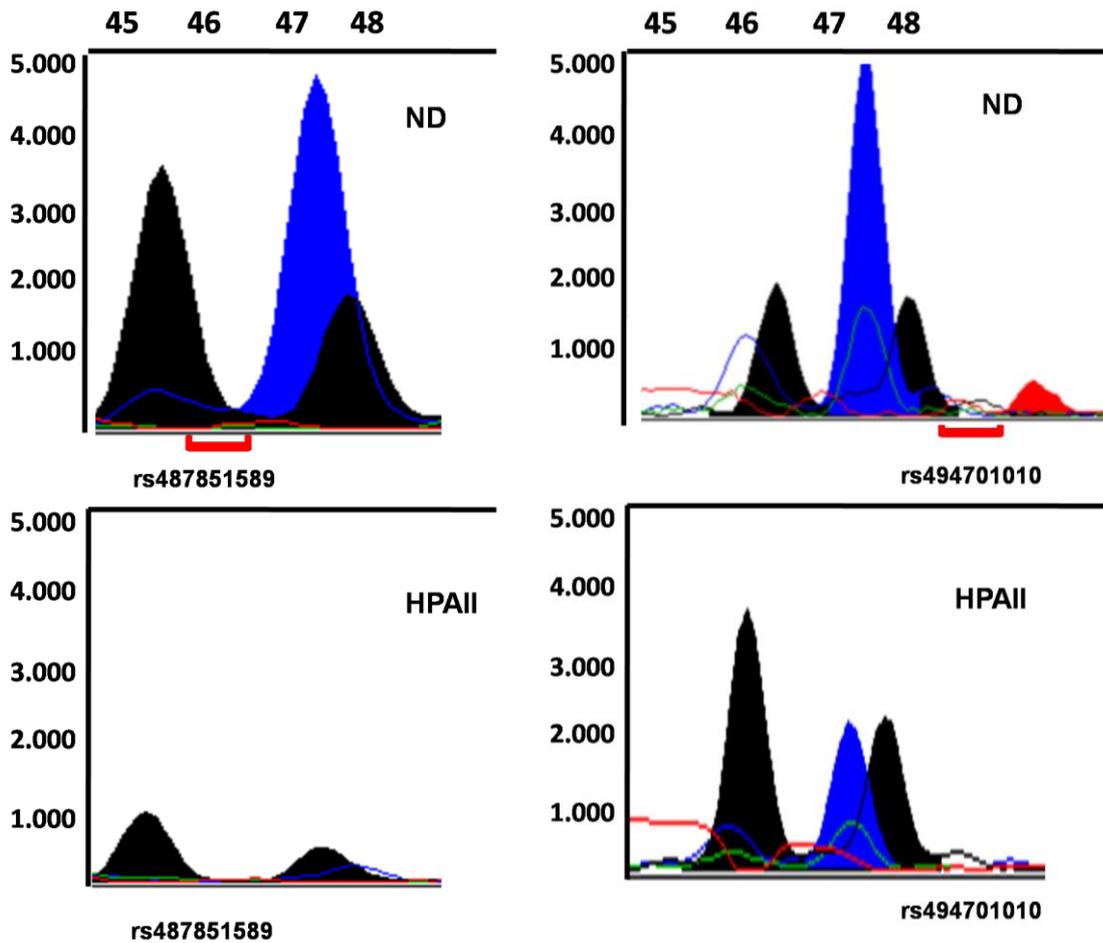


Figura 36: Eletroferogramas representativos do perfil de amplificações de minissequenciamento de base única. Determinação do estado de metilação alelo-específico em DMR, *IGF2*, através da investigação dos polimorfismo digerido por ERSM. Superior: ensaio pré-tratamento com ERSM. Inferior: Ensaio pós-tratamento com ERSM (HpaII). A perda dos alelos rs487851589 (*IGF2*) em B indica ausência de metilação em um dos alelos da DMR imprintada.

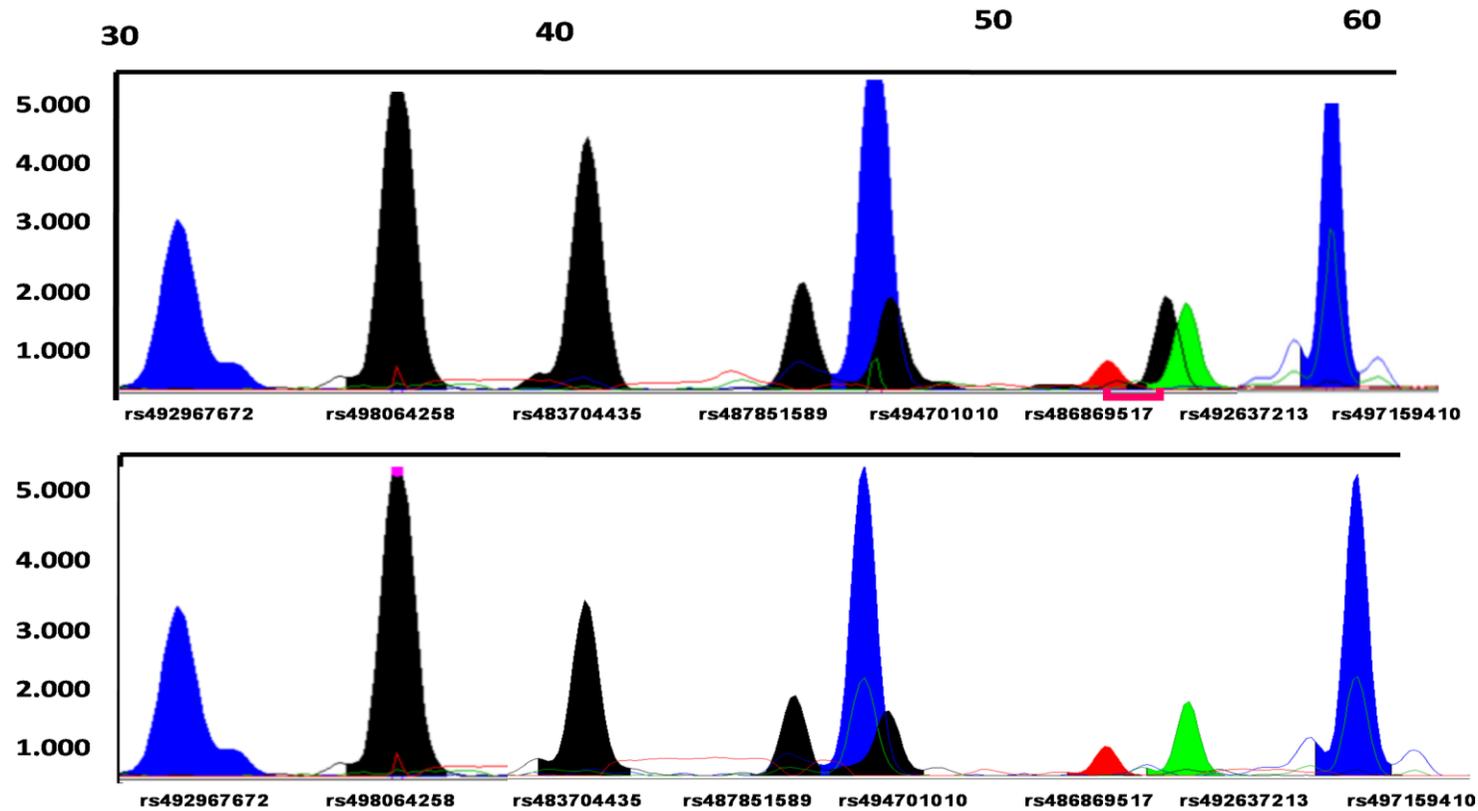


Figura 37: Eletroferogramas representativos do perfil de ampliações de minissequenciamento de base única. Determinação do estado de metilação alelo-específico em quatro cDMR (*GRB10*, *IGF2*, *IGF2R* e *SNURF*), através da investigação dos polimorfismos digeridos por ERSM. Superior: ensaio pré-tratamento com ERSM. Inferior: ensaio pós-tratamento com ERSM (HhaI). A perda do alelo rs486869517 (*IGF2R*) na figura inferior indica ausência de metilação em um dos alelos da DMR imprintada.

Depois de realizado minissequenciamento de base única, os dados obtidos foram tabulados e analisados em programa específico³³. Foi notado que a heterozigose esperada e observada eram muito próximas. H_O (heterozigose observada) é dada como a extensão observada de heterozigotos, em média por *locus*, enquanto H_E (heterozigose esperada) é conhecida como a diversidade, e é calculada como 1,0 menos a soma das frequências de genes ao quadrado $(1-(f_A+f_B)^2)$ (NEI, 1978). Malukiewicz *et al.*, (2016), encontrou 6.322 SNP em *C. jacchus* em cada *locus* RAD catalogado. A média de H_O foi de 0,31 e a H_E era de 0,31. Nós encontramos médias observadas 0,26 e esperadas 0,22 (tabela 5) em SNP para validar metilação nos genes alvos. Tivemos acesso aos dados brutos do experimento, cedidos gentilmente pela doutora Malukiewicz *et al.* (2016), mas nenhum dos nossos alvos estavam entre os SNP analisados pelos pesquisadores. As médias deste estudo apresentaram-se inferiores ao encontrado por Malukiewicz (comunicação pessoal), pois esta utilizou animais de diferentes regiões do Brasil e de outro país, Omaha, Recife, Muriaé, Goiânia, Brasília.

Em nosso estudo encontramos frequência do segundo menor alelo (MAF) de 0,16, próximo ao notado por Ferguson *et al.* (2007) que identificaram um total de 661 SNP em 20 macacos rhesus. O MAF dos SNP foi 0,12, com 281 SNP apresentando um $MAF \geq 0,2$ na população da amostra. Confrontamos a posição física dos SNP escolhidos com humanos, mas nenhum era ortólogo, assim como este autor não encontrou SNP comuns entre seres humanos e macacos rhesus.

Segundo Malukiewicz *et al.* (2016) a variação genômica encontrada utilizando duas espécies de calitriquídeos *C. jacchus* (6 animais) e *C. penicillata* (7 animais) pela aplicação de PE-RADseq foi discreta, contudo maior que a identificada previamente em 2014 (MALUKIEWICZ *et al.* 2014), foram identificados em média 5.180 SNP para *C. jacchus* e 7.463 SNP para *C. penicillata*, e 1.395 sítios de variação em ambas as espécies. Além disso, os autores determinaram que 106 locais apresentaram divergência relativa entre *C. jacchus* e *C. penicillata*. Em outro estudo Malukiewicz *et al.* (2015), baseado em microssatélites autossômicos de DNA mitocondrial, concluiu que a diversidade genética no grupo *C. jacchus* proveniente do estado do Rio de Janeiro é

33 PowerStats-Promega Corp.

pequena, os animais testados neste estudo são provenientes da mesma região testada pela autora.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) podem desempenhar um papel significativo tanto no estabelecimento da ascendência quanto na identificação de genes envolvidos em doenças. Os SNP também podem ser utilizados para identificar alelos que possam contribuir para as diferenças fenotípicas observadas nas populações (FERGUSON *et al.*, 2007).

A DMR *SNRPN*, com três SNP não pode ser validada neste ensaio uma vez que não foi possível identificar os alelos, mesmo quando amplificados separadamente. A cDMR *GRB10* com dois SNP, apresentou apenas indivíduos homocigotos. De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) (NEI, 1978), se uma população não sofrer mutações, se nenhum fator evolutivo atuasse sobre uma população que levasse a alterações nas frequências de seus alelos, estes permaneceriam inalterados ao longo das gerações. Neste estudo a população era pequena, a mesma pertencia a uma colônia em cativeiro onde os animais não sofriam pressões seletivas e o nível de endogamia poderia ser alto.

Satkoski *et al.* (2008) relatam que o número de polimorfismos atualmente identificado é demasiado pequeno em PNH, mesmo em rhesus que é o mais estudado, para a análise do genoma completo ou estudos de *locus* específico, e muito pouco destes *loci* foram informativos. Em seu estudo utilizaram 48 SNP para rastrear a amostra de DNA em rhesus, e confirmaram 60% como polimórficos. Enquanto Fujimoto *et al.* (2005) encontraram em sua análise sequencial de amplicons 32 SNP em rhesus indianos e chineses. As pesquisas em um pequeno número de organismos modelos experimentais têm tido um papel fundamental no avanço da nossa compreensão dos processos biológicos, pois em muitos aspectos da biologia os organismos são análogos.

7.0 CONCLUSÕES

- As regiões físicas ortólogas das DMR *SNURF*, *IGF2* e *IGF2R* humanas revelaram-se regiões diferencialmente metiladas em sagui, sendo estas imprintadas em tecido sanguíneo de *Callithrix spp.*, entretanto não se pode concluir a origem parental desta marca;
- A cDMR *SNRPN* encontra-se hipermetilada na espécie em questão, não sendo comprovada a hemimetilação;
- Os tecidos provenientes da espécie *C. jacchus* variaram quanto ao perfil médio de metilação, mas tenderam a hemimetilação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, S. *et al.* Germ cell dynamics in the testis of the postnatal common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 733-742, 2010.

ARDITO, G. *et al.* No correlation between chimerism and fertility in *Callithrix jacchus* (*Callithricidae*, Primates). **International Journal of Anthropology**, v. 10, n. 1, p. 15-19, 1995.

ARNAUD, P. Conserved methylation imprints in the human and mouse *GRB10* genes with divergent allelic expression suggests differential reading of the same mark. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 9, p. 1005-1019, 2003.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995, 168p.

BAQUET *et al.* Epigenetic processes in a tetraploid mammal. **Mammalian Genome**, v.19, p. 439–447, 2008.

BARAN, Y. *et al.* The landscape of genomic *imprinting* across diverse adult human tissues. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 927-936, 2015.

BARLOW, D. Genomic *Imprinting*: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 379-403, 2011.

BARLOW, D.; BARTOLOMEI, M. Genomic *Imprinting* in Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 2, p. 18382-18382, 2014.

BARTOLOMEI, M.S.; TILGHMAN, S.M. Genomic *imprinting* in mammals. **Annual Review of Genetics**, v.3, p. 493-525, 1997.

BENIRSCHKE, K. *et al.* Marrow Chimerism in Marmosets. **Science**, v. 138, n. 3539, p. 513-515, 1962.

BENSON, D. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 34-38, 2004.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BLAGITKO, N. *et al.* Human *GRB10* is *imprinted* and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 11, p. 1587-1595, 2000.

BOFFELLI, D. *et al.* Phylogenetic Shadowing of Primate Sequences to Find Functional Regions of the Human Genome. **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1391-1394, 2003.

BUITING, K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 154C, n. 3, p. 365-376, 2010.

CARRION, R.; PATTERSON, J. An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 357-362, 2012.

CHAO, W.; D'AMORE, P. *IGF2*: Epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111-120, 2008.

CHEN, F.; LI, W. Genomic Divergences between Humans and Other Hominoids and the Effective Population Size of the Common Ancestor of Humans and Chimpanzees. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 2, p. 444-456, 2001.

CHEONG, C.Y. *et al.* Germline and somatic *imprinting* in the nonhuman primate, p.1-13,

2015. highlights species differences in oocyte methylation. **Genome Research**, p.1-13, 2015.

CLARKE, J.M. The common marmoset, *Callithrix jacchus*. **ANZCCART News**, v.7, p.1-8, 1994.

COOPER, G.; SIDOW, A. Genomic regulatory regions: insights from comparative sequence analysis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 6, p. 604-610, 2003.

COURT, F. *et al.* Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human *imprinting* and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. **Genome Research**, v. 24, n. 4, p. 554-569, 2014.

DEERLIN, V. M.; VAN WILLIAMS, E. Assessment of Chimerism in the Setting of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. In: LEONARD, D.G.B. **Molecular pathology in clinical practice**. New York: Springer. p. 517-531, 2007.

DHALIWAL, A. Extraction and Purification. **Methods and Material**, v.3, p. 191, 2013.

EDWARDS, C.; FERGUSON-SMITH, A. Mechanisms regulating *imprinted* genes in clusters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 281-289, 2007.

EISENBERG, J. The Mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior. **Univers. of Chic. Press**. v.64, n.1, p. 188-189, 1981.

EISENBERG, J.F. Primate ecology and social organization. **Journal of Zoology**, v.183, p.1-39, 1977.

FAGUNDES, NADIA SIMARRO. **Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene *IGF2* em ovócitos e células do cumulus de vacas nelore.** 2009. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

FAULKES, G.C. *et al.* M.A.O.M. Genetic Structure Within and Among Populations of the Common Marmoset, *Callithrix jacchus*: Implications for Cooperative Breeding. In: FORD, S.M.; PORTER, L.M.; DAVIS, L.C. **The Smallest Anthropoids- The Marmoset/Callimico Radiation.** Springer: London. p. 103-117, 2009.

FAZZARI, M.; GREALLY, J. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 446-455, 2004.

FEINBERG, A.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-153, 2004.

FERGUSON, B. *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNP) distinguish Indian-origin and Chinese-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **BMC Genomics**, v.8, p. 43, 2007.

FERGUSON-SMITH, A. Genomic *imprinting*: the emergence of an epigenetic paradigm. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 8, p. 565-575, 2011.

FINBERG, H. The “twin peak” sign: reliable evidence of dichorionic twinning. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 11, n. 11, p. 571-577, 1992.

FUJIMOTO, A. *et al.* Development of a monkey model for the study of primate genomic *imprinting*. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 413-422, 2005.

FUKS, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 5, p. 490-495, 2005.

GARCÍA, F. *et al.* Chromosomal homologies between Cebus and Ateles (Primates) based on ZOO-FISH and G-banding comparisons. **American Journal of Primatology**, v. 57, n. 4, p. 177-188, 2002.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GRAY, T. *et al.* An *imprinted*, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5616-5621, 1999.

GREALLY, J. *et al.* Genetics of Childhood Disorders: XIII. Genomic *Imprinting*: The Indelible Mark of the Gamete. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 39, n. 4, p. 532-535, 2000.

GUERRA-SHINOHARA, E. *et al.* Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 5-6, p. 423-427, 2010.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic *imprinting* and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. **Cell**, v.64, p. 1045–1046, 1991.

HAIG, D. What is a marmoset? **American Journal of Primatology**, v. 49, n. 4, p. 285-296, 1999.

HALL, J.G. Genomic imprinting: review and relevance a human diseases. **American Journal Human Genetic**, v. 46, p. 857-873, 1990.

HAMILTON, W. D. **The genetical theory of social behavior I and II.** Journal of Theoretical Biology, v.7, p. 1–32, 1964.

HAMPTON, S. Germ cell chimerism in male marmosets. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 38, n. 2, p. 265-268, 1973.

HARRIS, R. *et al.* Evolutionary genetics and implications of small size and twinning in callitrichine primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1467-1472, 2013.

HAYASHI-UEDA, J. *et al.* Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Neuroscience Research**, 2017.

HE, J. *et al.* Methylation levels at *IGF2* and *GNAS* DMR in infants born to preeclamptic pregnancies. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 472, 2013.

HEARN, J. New world primates for research in human reproductive health. **American Journal of Primatology**, v. 34, n. 1, p. 11-17, 1994.

HODGES, E. *et al.* Directional DNA Methylation Changes and Complex Intermediate States Accompany Lineage Specificity in the Adult Hematopoietic Compartment. **Molecular Cell**, v. 44, n. 1, p. 17-28, 2011.

IUCN. Disponível em: <http://www.primatesg.org/primate_diversity_by_region>. Acesso em: 13 abr. 2016.

JIRTLE, R. Conferência Anual Internacional de Medicina. **Epigenetics**. Genomic *Imprinting*, and the Effect of Nutrition, 2014.

JIRTLE, R. L., **Geneimprint. Imprinted genes data bases.**

<Acesso: 05 de janeiro de 2017. <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>. Homo+sapiens.*imprinted-All* Copyright © 2012.

KANBER, D. *et al.* The Origin of the RB1 Imprint. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

KILLIAN, J. *et al.* M6P/*IGF2R* Imprinting Evolution in Mammals. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 707-716, 2000.

KNOLL, J. *et al.* Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. **American Journal of Medical Genetics**, v. 32, n. 2, p. 285-290, 1989.

KOEHLER, U. *et al.* Genomic reorganization and disrupted chromosomal synteny in the siamang (*Hylobates syndactylus*) revealed by fluorescence in situ hybridization. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 97, n. 1, p. 37-47, 1995.

KRZYWINSKI, M.; Altman, N. **Nature Methods**, v. 10, p. 809–810, 2013.

LANGENSTROTH-RÖWER, J.G. *et al.* De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained *in vitro*, **Epigenetics**, p. 1-42, 2016.

LEBEDEV, I.; SAZHENOVA, E. Epimutations of *imprinted* genes in the human genome: Classification, causes, association with hereditary pathology. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 10, p. 1176-1190, 2008.

LEE, J.T.; BARTOLOMEI, M.S. X-inactivation, *imprinting*, and long noncoding RNAs in health and disease. **Cell**, v.152, n.6,p. 1308-23, 2013.

LEWIN, B. *et al.* **Genes VII**. Tradução . 1. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2001.

LI, X. *et al.* A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. **Development Cell**, v. 15,p. 547–557, 2008.

LIN, Z. *et al.* Molecular signatures to define spermatogenic cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 597-609, 2012.

LEUTENEGGER, W. Maternal-Fetal Weight Relationships in Primates. **Folia Primatologica**, v. 20, n. 4, p. 280-293, 1973.

MACHADO, F.B. *et al.* 5meCpG Epigenetic Marks Neighboring a Primate-Conserved Core Promoter Short Tandem Repeat Indicate X-Chromosome Inactivation. **PLOS ONE**, v. 9, n.7, 2014.

MALUKIEWICZ, J. *et al.* Application of PE-RADSeq to the study of genomic diversity and divergence of two Brazilian marmoset species (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). **American Journal of Primatology**, v. 79, n. 2, 2016.

MALUKIEWICZ, J. *et al.* Hybridization effects and genetic diversity of the common and black-tufted marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) mitochondrial control region. **American Journal of Physical Anthropology**, v.155, p. 522-536, 2014.

MALUKIEWICZ, J. *et al.* Phylogeny of the jacchus group of *Callithrix* marmosets based on complete mitochondrial genomes. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 162, n. 1, p. 157-169, 2016.

MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. **Compendium. Médico**, v. 53, p. 383–392, 2003.

MARQUES, C.J. *et al.* Alteração transmissível do *imprinting* genômico em pacientes inférteis por oligozoospermia e axoospermia. **Arquivo Médico**, v. 21, n. 2, p. 41-45, 2007.

MARROIG, G. *et al.* Systematics and evolution of the jacchus group of marmosets (Platyrrhini). **American Journal of Physical Anthropology**, v. 123, n. 1, p. 11-22, 2003.

MARROIG, G.; CHEVERUD, J.M. Size and Shape in Callimico and Marmoset Skulls: Allometry and Heterochrony in the Morphological Evolution of Small Anthropoids. In: **The Smallest Anthropoids- The Marmoset/Callimico Radiation**. Tradução . 1. ed. [s.l.] Springer: London, 2009. p. 331-353.

MARTIN, R. Goeldi and the dwarfs: the evolutionary biology of the small New World monkeys. **Journal of Human Evolution**, v. 22, n. 4-5, p. 367-393, 1992.

MENDES, A.L.B. **Cooperação em Sagüis comuns *Callithrix jacchus*: condições e restrições** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Natal, RN, 2010. 124 p.

MONK, D. *et al.* Limited evolutionary conservation of *imprinting* in the human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6623-6628, 2006.

MOORE, H. *et al.* Early implantation stages in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **American Journal of Anatomy**, v. 172, n. 4, p. 265-278, 1985.

MORAIS, M.M.Jr. Os saguis (*Callithrix* spp., exleben, 1777) **exóticos invasores na baía do rio são joão, rio de janeiro: biologia populacional e padrão de distribuição em uma paisagem fragmentada**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF Campos dos Goytacazes – RJ, 2010, 89p.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **National Library of Medicine of the United States**. Rockville Pike, Bethesda MD, EUA, 2017.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.76. p. 379-390, 1978.

NEWELL-PRICE, J. *et al.* DNA Methylation and Silencing of Gene Expression. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 142-148, 2000.

NICHOLLS, R.D.; Knepper, J.L. Genome organization, function, and *imprinting* in Prader-Willi and Angelman syndromes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.2 p. 153–175, 2001.

NOWSHEEN, S. *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 213-222, 2014.

NOWSHEEN, S. *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer Letters**, p. 1-10, 2012.

NUGENT, B. *et al.* Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 5, p. 690-697, 2015.

O'DOHERTY, A. *et al.* Genomic *imprinting* effects on complex traits in domesticated animal species. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.

OKAE, H. *et al.* Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Dynamics during Early Human Development. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 12, 2014.

OKANO, H. *et al.* The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 336-340, 2012.

OKANO, H.; MITRA, P. Brain-mapping projects using the common marmoset, **Neuroscience Research**, v.93, p. 3-7, 2015.

OLIVEIRA *et al.* Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste São Carlos, SP 2007.** 43p.

PAOLONI-GIACOBINO, A. *et al.* Conserved features of *imprinted* differentially methylated domains. **Gene**, v. 399, n. 1, p. 33-45, 2007.

PERALTA, C.F.A. *et al.* História natural das gestações gemelares monocoriônicas diamnióticas com e sem transfusão feto-fetal. **Revista Brasileira Brasileira Ginecologia Obstetricia**, v.31, n.6, p. 273-8, 2009.

PERELMAN, P. *et al.* A Molecular Phylogeny of Living Primates. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 3, 2011.

PERVJAKOVA, N. *Imprinted* genes and *imprinting* control regions show predominant intermediate methylation in adult somatic tissues, **Epigenomics**, v. 8, n.6, p. 789–799, 2016.

POON, L.L.M. *et al.* Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 35-41, 2002.

RAVEENDRAN, M. *et al.* Polymorphic microsatellite loci for the common marmoset (*Callithrix jacchus*) designed using a cost- and time-efficient method. **American Journal of Primatology**, v. 70, n. 9, p. 906-910, 2008.

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

REINHART, B. *et al.* Specific Differentially Methylated Domain Sequences Direct the Maintenance of Methylation at *Imprinted* Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 22, p. 8347-8356, 2006.

REJDUCH, B. *et al.* 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 621-627, 2000.

REZGUI, D. *et al.* Structure and function of the human Gly1619Arg polymorphism of M6P//IGF2R domain 11 implicated in IGF2 dependent growth. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.42, p. 341-356, 2008.

RIBEIRO, M.M. Expressão gênica e metilação: causa ou consequência? **Agroforum**, v. 11, p. 9-14, 1997.

RICHARD, F. *et al.* Suggests a Complete Homology between Human and Capuchin Monkey (*Platyrrhini*). **Euchromatin Genomics**, v. 36, n. 3, p. 417-423, 1996.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Research Reviews**, v. 2, n. 3, p. 245-261, 2003.

ROA, I. *et al.* Placenta: Anatomía e Histología Comparada. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 4, p. 1490-1496, 2012.

ROSELINO, A. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 3, p. 187-203, 2008.

ROSS, C. *et al.* G. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6278-6282, 2007.

RUSH, L.J.; PLASS, C. Alterations of DNA in hematologic malignancies. **Cancer letters**, v. 185, p. 1–12, 2002.

RUTHERFORD, J.; TARDIF, S. Mother's little helper? The placenta and its role in intrauterine maternal investment in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: **The smallest**

anthropoids: The marmoset/callimico radiation. Tradução. 1. ed. Nova York: Springer Press, p. 301-329, 2009.

SATO, K. *et al.* Resequencing of the common marmoset genome improves genome assemblies and gene-coding sequence analysis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

SANCHEZ-MORGADO, J.M. *et al.* XY Female Marmoset (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v. 53, n. 5, 2003.

SANLI, I.; Feil, R. Chromatin mechanisms in the developmental control of *imprinted* gene expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.67, p. 139-47, 2015.

SATKOSKI, J. *et al.* Pyrosequencing as a method for SNP identification in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **BMC Genomics**, v. 9, p. 256, 2008.

SCHNEIDER, E. *et al.* Methylation and Expression Analyses of the 7q Autism Susceptibility Locus Genes MEST , COPG2, and TSGA14 in Human and Anthropoid Primate Cortices. **Cytogenetic Genome Research**, v.36, p. 278–287, 2012.

SHARIF, J. *et al.* The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. **Nature**, v.450, p. 908–912, 2007.

SHEMER, R. *et al.* Structure of the *imprinted* mouse *SNRPN* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 19, p. 10267-10272, 1997.

SILVA, A.F.A. *et al.* Trisomy 21 Alters DNA Methylation in Parent-of-Origin-Dependent and -Independent Manners. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

SILVA, L.P. *et al.* Retrospective analysis of 81 consecutive live born twins. **Revista Portuguesa de Pediatria**, v.19, p. 151-158, 1998.

SONG, Q. *et al.* A Reference Methylome Database and Analysis Pipeline to Facilitate Integrative and Comparative Epigenomics. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

STANYON, R. *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between the dusky titi and squirrel monkey. **American Journal of Primatology**, v. 50, n. 2, p. 95-107, 2000.

STOGER, R. *et al.* Maternal-specific methylation of the *imprinted* mouse *IGF2R* locus identifies the expressed locus as carrying the *imprinting* signal. **Cell**, v.73, p. 61–71, 1993.

STRICHMAN, A. *et al.* A Genome-Wide Screen for Normally Methylated Human CpG Islands That Can Identify Novel *Imprinted* Genes. **Genome Research**, v. 12, n. 4, p. 543–554, 2002.

SUDIK, R. Chimerism in a fertile woman with 46,XY karyotype and female phenotype. **Human Reproduction**, v.16, n.1, p. 56–58, 2001.

SURANI, M.A.H. *et al.* Development of reconstituted mouse eggs suggests *imprinting* of the genome during gametogenesis. **Nature**, v. 308, p. 548-550, 1984.

SURANI, M.A. Reprogramming of genomic function through epigenetic inheritance, **Nature**, v.414, p. 122-128, 2001.

SWEENEY, C.G. *et al.* Quantitative molecular assessment of chimerism across tissues in marmosets and tamarins. **BMC Genomics**, v. 13, p. 98, 2012.

TAMBURINI, B.; Tyler, J. Localized Histone Acetylation and Deacetylation Triggered by the Homologous Recombination Pathway of Double-Strand DNA Repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 12, p. 4903-4913, 2005.

TARDIF, S.D. **Parental behavior and evolution of alloparental care. In: Cooperative breeding in mammals.** Tradução. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

TARDIF, S.D. *et al.* Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v.53, n.4, p. 364-368, 2003.

TOKUNO, H. *et al.* Experimental Techniques for Neuroscience Research Using Common Marmosets. **Experimental Animals**, v. 61, n. 4, p. 389-397, 2012.

ÚBEDA, F.; GARDNER, A. A model for genomic *imprinting* in the social brain: juveniles. **Evolution**, v. 64, n. 9, p. 2587-2600, 2010.

VARDHMAN, K.; RAKYAN, S.B. Epigenetic variation and inheritance in mammals. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.16, n.6, p. 573–577, 2006.

WANG, X. *et al.* Paternally expressed genes predominate. **PNAS**, v.110, n. 26, p. 10705–10710, 2013.

WANG, Z. *et al.* Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the *imprinted IGF2/Mpr* gene. *Nature*, v. 372, n. 6505, p. 464-467, 1994.

WARD, J.M. *et al.* Twinning and Survivorship of Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 7-11, 2014.

WOODFINE, K. *et al.* Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. **Epigenetics & Chromatin**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011.

WORLEY *et al.* The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. **Nature Genetics**, v.46, n.8, p. 850-857, 2014.

WU, L. *et al.* Altered methylation of *IGF2* DMR0 is associated with neural tube defects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 380, n. 1-2, p. 33-42, 2013.

YAMADA, Y. *et al.* A Comprehensive Analysis of Allelic Methylation Status of CpG Islands on Human Chromosome 21q. **Genome Research**, v. 14, n. 2, p. 247-266, 2004.

YAMADA, Y. *et al.* A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 11q: Comparison with chromosome 21q. **DNA Sequence**, v. 17, n. 4, p. 300-306, 2006.

YOUNG, L.E. *et al.* Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetic**, v.27, p. 153–154, 2001.

YOUNG, L.E. *et al.* Conservation of *IGF2-H19* and *IGF2R* imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, v.120, n.120, p. 1433–1442, 2003.

ZHAO, S.M. *et al.* Perspective of DNA methylation in forensic genetics and new progress of its detection methods. **Fa Yi Xue Za Zhi.**, v. 25, n. 4, p. 290-295, 2009.

ZÜHLKE, U.; WEINBAUER, G. The Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) as a Model in Toxicology. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 123-127, 2003.