

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI**

**Análise *multilocus* da metilação do DNA em genes regulados por  
*imprinting* genômico em clones bovinos**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**FEVEREIRO 2018**

**PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI**

**Análise *multilocus* da metilação do DNA em genes regulados por  
*imprinting* genômico em clones bovinos**

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

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere**

**Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO 2018**

**PAULA MAGNELLI MANGIAVACCHI**

**Análise multilocus da metilação do DNA em genes regulados por  
*imprinting* genômico em clones bovinos**

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

**Aprovada em 23 de Fevereiro de 2018**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Filipe Machado Brum - UEMG**

---

**Prof. Dr. Ângelo José Burla-Dias - UENF**

---

**Prof. Dr. Maurício Franco Machaim - EMBRAPA**

---

**Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios – UENF (Coorientador)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere – UENF (Orientadora)**

***Dedico essa tese e toda a minha trajetória acadêmica a minha mãe e vó  
Dalva (in memoriam), que são meus exemplos de vida!***

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ser um amparo de fé e esperança!

À minha mãe e vó Dalva (*in memoriam*) que sempre foram meus exemplos de superação, dedicação e persistência. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao Kayan, que nos últimos 7 anos fez parte de todo o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pelo companheirismo, incentivo e amor.

Às minhas irmãs, Bianca e Karla, pela amizade, apoio e conselhos.

Ao Professor Álvaro F. Lopes Rios que me ensinou muito nesses 8 anos de laboratório. Obrigada pela paciência, orientação e fé em mim. E à Professora Maria Clara Caldas Bussiere que me aceitou de braços abertos durante o mestrado e o doutorado. Obrigada pela confiança!

Ao colaborador Dr. Rodolfo Rumpf, e a empresa GENEAL, que me forneceu as amostras para que eu pudesse realizar o meu projeto.

Aos Professores Ângelo José Burla-Dias, Filipe Machado Brum e Maurício Franco Machaim por terem aceitado participar da banca de defesa.

À Carla Soares Reis, funcionária da GENEAL, que me ajudou em muitos momentos durante o processo de realização dos artigos da tese.

A minha amiga e irmã de alma, Ludmilla Dellatorre, que se faz presente sem precisar estar no mesmo continente. Nossa sintonia e amizade me faz ser uma pessoa mais forte.

À Mariana, que é uma grande amiga que o laboratório me deu. Obrigada por esses 7 anos de amizade, de confiança, sintonia na hora dos experimentos e na hora de escrever os artigos!

À Priscila, que foi uma ótima companheira de trabalho e de incansáveis esperas pela PCR. Obrigada pela amizade e ajuda durante todo esse processo.

Aos amigos feitos no LRMGA (Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal), em especial ao Valter, que foi um presente que a pós graduação me deu. Obrigada pela amizade, parça!

As minhas amigas de infância: Camille, Stéphanie, Tais e Vanessa, pelos 22 anos de amizade, por terem crescido comigo e por todos os momentos e fases vividos.

Ao Rainer (Bibi) e Vinícius (Vp) pela amizade, amor e momentos engraçados em todos esses anos.

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

**A persistência é o caminho do êxito**

*Charles Chaplin*

## RESUMO

O mecanismo epigenético de *imprinting* genômico exerce um papel fundamental durante o desenvolvimento placentário, embrionário e comportamental de mamíferos. Os genes regulados por *imprinting* genômico são caracterizados pela expressão monoalélica parental específica, sendo esta controlada por fatores regulatórios, como a metilação do DNA. Muitos dos genes de *imprinting* genômico já foram molecularmente identificados em diferentes espécies, como humanos e camundongos. Entretanto, esses genes são pouco caracterizados em ruminantes. Nas últimas décadas, com o avanço do uso das tecnologias de reprodução assistida (ART), como fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem, tem sido detectada a perda no padrão de *imprinting* (LOI, *Loss Of Imprinting*) nas progênes derivadas de ART. Visto que os genes de *imprinting* genômico estão dispostos em *cluster* ao longo do genoma, observa-se alterações multilocus devido a utilização de ART. A consequência da LOI é o surgimento de síndromes, já descritas em humanos e bovinos. Embora a etiologia da *Large Offspring Syndrome* (LOS) / *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS), em bovinos, e a Beckwith-Wiedemann (SBW), em humanos, sejam relacionadas molecular e fenotipicamente, poucos estudos demonstram a associação da LOS/AOS com múltiplas alterações nos genes de *imprinting*. Entre os principais genes estudados na LOS/AOS, em bovinos, estão o *H19*, o *KCNQ1OT1* e o *PEG1/MEST*. Recentemente foi observada a presença de um transcrito antisense ao *PEG1/MEST*, denominado *MESTIT1*, que aparentemente possui função regulatória do gene *PEG1/MEST*. Em vista disso, o presente estudo foi dividido em quatro partes, sendo que a primeira parte visa uma revisão sistemática sobre os estudos multilocus feitos na LOS/AOS, em bovinos, comparando com a SBW, em humanos; já a segunda parte corresponde a realização da análise do padrão de metilação do DNA em amostras de fígado e coração de clones bovinos no gene *PEG1/MEST*; complementada pela terceira parte que visou a avaliação da presença de transcrito antisense *MESTIT1* em amostras de fígado de clones e tecidos de fígado e cérebro nos animais de reprodução natural; na quarta, e última, parte foi realizada a análise do padrão de metilação do DNA nas regiões controladoras de *imprinting* dos genes *H19* e *KCNQ1OT1* em amostras de fígado e coração de clones bovinos.

**Palavras-chave:** *imprinting* genômico, *Large Offspring Syndrome*, *multilocus*

## ABSTRACT

The epigenetic mechanism of genomic imprinting plays a fundamental role during the placental, embryonic and behavioral development of mammals. Genes regulated by genomic imprinting are characterized by specific parental monoallelic expression, which is controlled by regulatory factors such as DNA methylation. Many of the genomic imprinting genes have already been molecularly identified in different species, such as humans and mice. However, these genes are poorly characterized in ruminants. In the last decades, with the use of assisted reproduction technologies (ART), such as in vitro fertilization (IVF) and cloning, loss of imprinting (LOI) has been detected in progenies derived from ART. Since genomic imprinting genes are clustered along the genome, multilocus changes are observed due to the use of ART. The consequence of LOI is the emergence of syndromes, already described in humans and cattle. Although the etiology of Large Offspring Syndrome (LOS)/Abnormal Offspring Syndrome (AOS) in cattle, and Beckwith-Wiedemann (BWS) in humans, are molecularly and phenotypically related, few studies demonstrate the association of LOS/AOS with multiple changes in imprinting genes. Among the major genes studied in LOS/AOS in cattle are *H19*, *KCNQ1OT1* and *PEG1/MEST*. Recently the presence of an antisense transcript to *PEG1/MEST*, denominated *MESTIT1*, in which apparently has regulating function of the gene *PEG1* has been observed. Thus, the present study was divided in four parts, in which the first part aims at a systematic review on multilocus studies made in LOS/AOS, in cattle, comparing with BWS in humans. The second part was the analysis of the DNA methylation pattern in liver and heart samples of bovine clones in the *PEG1* gene, complemented by the third part that aimed to evaluate the presence of antisense transcript *MESTIT1* in liver samples from clones and liver and brain tissues in natural breeding animals. The fourth and last part was made analysis of the methylation pattern of DNA imprinting regions of the *H19* and *KCNQ1OT1* genes in liver and heart samples from bovine clones.

**Key-words:** genomic imprinting, Large Offspring Syndrome, multilocus



## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	1

### CAPÍTULO I

<b>Análise multilocus das síndromes Beckwith-Wiedemann e <i>Large Offspring Syndrome</i>: uma breve revisão.....</b>	<b>4</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>9</b>
I.I Imprinting Genômico.....	9
I.II Fatores de regulação <i>cis</i> nos genes de <i>imprinting</i> .....	11
I.III Influência do uso de tecnologias da reprodução nos status epigenético de regulação do mecanismo de <i>imprinting</i> genômico.....	14
I.IV Síndrome de Beckwith-Wiedemann.....	17
I.IV.I Características clínicas.....	17
I.IV.II Características moleculares.....	18
I.V Utilização da <i>Large Offspring Syndrome</i> (LOS) como modelo para Síndrome de Beckwith-Wiedemann.....	21
<b>II. Metodologia.....</b>	<b>23</b>
<b>III. Resultados.....</b>	<b>24</b>
III.I Perfil multilocus da metilação do DNA.....	24
III.II Perfil multilocus do padrão de expressão.....	30
<b>IV. Conclusão.....</b>	<b>35</b>
<b>V. Referências.....</b>	<b>36</b>

### CAPÍTULO II

<b>Metilação anormal de <i>Peg1/MEST</i>-DMR em modelo bovino de transferência nuclear de célula somática.....</b>	<b>45</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>46</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>48</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>50</b>
<b>II. Metodologia.....</b>	<b>55</b>
II.I Material biológico.....	55
II.II Características clínicas dos clones.....	55
II.III Protocolo de transferência nuclear de célula somática.....	58
II.IV Desenho de “ <i>primers</i> ” .....	58
II.V Extração de DNA e ensaio de MSRED-qPCR (Modified Sensitive Restriction Enzyme Digestion – Quantitative PCR) .....	59
II.VI Análise estatística.....	59
<b>III. Resultados.....</b>	<b>61</b>
III.I Níveis de metilação do DNA nas regiões <i>KvDMR1</i> , <i>H19DMR</i> e <i>PEG1/MESTDMR</i> .....	61

III.II Análise de alteração multilocus nas DMRs.....	64
<b>IV. Discussão.....</b>	<b>67</b>
<b>V. Conclusão .....</b>	<b>72</b>
<b>VI. Referências.....</b>	<b>73</b>

### CAPÍTULO III

<b>Identificação do transcrito antisense do gene <i>PEG1/MEST</i>, <i>MESTIT1</i>, em bovinos.....</b>	<b>80</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>81</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>82</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>83</b>
<b>II. Metodologia.....</b>	<b>86</b>
II.I Amostras.....	86
II.II Protocolo de transferência nuclear de célula somática.....	86
II.III Análise da presença de transcritos na região homóloga de <i>MESTIT1</i> bovino utilizando bancos de dados de RNA-seq públicos.....	87
II.IV Desenho dos primers.....	88
II.V Extração de RNA.....	88
II.VI Transcrição reversa fita específica e PCR quantitativo (RT-qPCR)..	89
II.VII Reação de Cadeia de Polimerase – PCR.....	89
II.VIII Real Time PCR – Quantitative PCR (qPCR).....	90
<b>III. Resultados.....</b>	<b>91</b>
III.I Análise <i>in silico</i> da presença de transcritos na região homóloga do gene <i>MESTIT1</i> humano em bovinos.....	91
III.II Detecção de transcritos <i>MESTIT1</i> bovino.....	93
<b>IV. Discussão.....</b>	<b>95</b>
<b>V. Conclusão .....</b>	<b>97</b>
<b>VI. Referências.....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

## INTRODUÇÃO

O uso das tecnologias de reprodução assistida (ART) tem aumentado nos últimos anos. Desde o surgimento das ARTs, principalmente a fertilização *in vitro*, a incidência de casais que utilizam essa biotécnica cresceu significativamente. Aproximadamente 3% dos nascimentos em países desenvolvidos são provenientes do uso de ARTs. Na esfera da medicina veterinária, especialmente em animais domésticos, o uso de biotecnologias da reprodução, como a fertilização *in vitro* e a transferência nuclear de célula somática (SCNT) têm sido utilizados para estudos de melhoramento genético e até para conservação da espécie (EROGLU; PH; LAYMAN, 2012).

Porém, embora essas ARTs sejam de grande valia para o tratamento da infertilidade e até para o melhoramento genético animal, estudos desde 2002 demonstram o surgimento de síndromes no nascimento das proles (EROGLU; PH; LAYMAN, 2012). Muitos estudos demonstram que alterações epigenéticas decorrentes do uso de ARTs podem estar associadas desde a complicações durante a gestação (complicações na formação da placenta), até ao surgimento de má formações, aberrações cromossomais e falhas no desenvolvimento embrionário (ILIADOU; JANSON; CNATTINGIUS, 2011).

Isso decorre do uso tecnologias de reprodução que se justapõe a estágios iniciais do desenvolvimento, desde a manipulação dos gametas até o cultivo do embrião. Diversos componentes nos meios de cultura de gametas e de embriões *in vitro* (como soro fetal bovino) têm sido associados ao aparecimento de alterações epigenéticas, denominado epimutações (AMOAKO; NAFEE; OLA, 2017; KOHDA; ISHINO, 2012).

As primeiras alterações dos componentes do cultivo *in vitro* nos mecanismos epigenéticos, como o *imprinting* genômico em ruminantes, foram observadas no início dos anos 2000 (YOUNG et al., 2003). A perda do padrão de *imprinting* genômico (LOI, *Loss Of Imprinting*) é bem relatado em muitas espécies provenientes de tecnologias de reprodução assistida, como humanos, camundongos e bovinos (GUTIERREZ-ADAN; WHITE.; SOOM, 2015). A LOI está relacionada as alterações no desenvolvimento embrionário e placentário, surgimento de tumores, câncer e doenças neuropsiquiátricas, visto que os genes regulados por *imprinting* tem função primordial no início do desenvolvimento

embrionário (EGGERMANN et al., 2015; MACKAY et al., 2015; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

A perda de *imprinting* pode ocorrer principalmente devido a alterações no padrão de metilação do DNA desses genes, no qual ocorre ganho (GOM) ou perda (LOM) de metilação (POPLINSKI et al., 2010; UYAR; SELI, 2014). Nas tecnologias de reprodução, a LOI pode ocorrer tanto a nível de manipulação dos gametas (como hiperestimulação e maturação do oócito), quanto nos embriões já formados (HIURA et al., 2012; ZHENG et al., 2011). Portanto, qualquer etapa do processo de reprodução assistida pode causar distúrbios no processo normal de *imprinting* (MANIPALVIRATN; DECHERNEY; SEGARS, 2011).

Apesar da espécie bovina ser uma das mais utilizadas para o desenvolvimento de ARTs, estudos de *imprinting* em bovino ainda permanecem pouco elucidados, se comparado com outras espécies, como humanos e camundongos (ROBBINS et al., 2012). Isto pode ser um indício de que clones bovinos conseguem tolerar maiores alterações no estágio fetal, no qual pode proporcionar uma alta eficiência na clonagem bovina. Entretanto, essas alterações tornam o clone mais fraco e a mudança ambiental pós natal induz um estresse a progênie recém-nascida causando a morte dele poucos dias após o nascimento (ZHANG et al., 2004).

As consequências da LOI são geralmente manifestadas após nascimento, com o aparecimento de síndromes, como a Beckwith-Wiedemann (SBW), em humanos e a *Large Offspring Syndrome/Abnormal Offspring Syndrome* (LOS/AOS), em bovinos. Ambas síndromes possuem características fenotípicas e moleculares similares (CHEN et al., 2017). A LOS/AOS, em ruminantes, é observada principalmente em animais gerados por transferência nuclear, devido à perda do padrão de *imprinting* e a falhas da reprogramação epigenética (CHEN et al., 2013).

A nível molecular, a alteração de alguns genes de *imprinting* já são bem descritos nestas síndromes, como os genes *H19/IGF2* e *KCNQ1OT1*. Na síndrome SBW, a maioria dos pacientes (50-60%) apresentam hipometilação da ICR (região de controle de *imprinting*) do gene *KCNQ1OT1* (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBURG, 2010). As mesmas características também já foram observadas em clones bovinos provenientes de SCNT (CHEN et al., 2013).

Porém, estudos recentes demonstram que as alterações de metilação do DNA e de expressão nos genes de *imprinting* não são eventos isolados, ocorrendo em diversos *loci*, caracterizando-o como evento multilocus (AZZI et al., 2010). Muitos genes já foram relatados com alterações nessas síndromes, como *PLAGL1*, *GRB10*, *SNRPN*, *PEG1/MEST*, e outros (CHEN et al., 2015).

Devido as similaridades das síndromes Beckwith-Wiedemann e da LOS/AOS em bovinos, e pela impossibilidade de se fazer pesquisas com embriões humanos manipulados *in vitro*, a espécie bovina pode ser utilizada como modelo de desenvolvimento, para estudos de epimutações multilocus (ROBBINS et al., 2012). Portanto, sabendo-se que existem poucas informações na literatura sobre alterações multilocus em bovinos, o presente estudo realizou uma revisão sistemática sobre eventos multilocus nas síndromes BWS comparando-as com as ocorridas na LOS/AOS. Assim como estudou os padrões de metilação do DNA nos genes de imprinting *H19*, *KCNQ1OT1* e *PEG1/MEST* nos clones bovinos que não sobreviveram após nascimento e caracterizou o transcrito antisense do *PEG1*, denominado *MESTIT1* nas mesmas amostras de clones e em animais de reprodução natural, sendo este o primeiro relato do transcrito *MESTIT1* em bovinos.

## CAPÍTULO I

### **Análise multilocus das síndromes Beckwith-Wiedemann e Large Offspring Syndrome: uma breve revisão**

Paula Magnelli Mangiavacchi,<sup>a</sup> Maria Clara Caldas-Bussiere,<sup>a</sup> Mariana da Silva Mendonça,<sup>c</sup> Álvaro Fabrício Lopes Rios,<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal - LRMGA. Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuárias - CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Biotecnologia - LBT. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia do Reconhecer – LBR. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

## Resumo

A fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência nuclear de célula somática (SCNT) são tecnologias da reprodução assistida (ART) comumente utilizadas em diferentes espécies, como humanos e bovinos. Atualmente, apesar dos avanços nessas tecnologias, muitas não geram embriões saudáveis, aumentando a probabilidade do surgimento de síndromes. A síndrome *Large Offspring Syndrome* (LOS)/*Abnormal Offspring Syndrome* (AOS) apresenta características como hipercrecimento, má formação de órgãos, defeitos esqueléticos e placentários, sendo estes bem evidentes. Em humanos, a síndrome Beckwith-Wiedemann (SBW) apresenta características fenotípicas similares as encontradas na LOS/AOS. Embora a eficiência dessas tecnologias ainda seja baixa, aproximadamente 50% dos embriões bovinos transferidos estabelecem-se e se mantêm até o final da gestação. O sucesso das tecnologias de reprodução é definido pela capacidade do embrião transferido produzir uma progênie saudável e para tal deve-se acompanhar a morfologia do embrião durante o desenvolvimento. Contudo, estudos relatam que tecnologias da reprodução têm seu sucesso comprometido devido a falhas moleculares. Portanto, embora a morfologia não se altere durante o desenvolvimento, mudanças moleculares conduzem a uma baixa taxa de eficiência. Os genes regulados por *imprinting* genômico têm como característica a expressão monoalélica parental específica, sendo associado com o desenvolvimento embrionário e comportamental de mamíferos. Estes genes possuem este padrão de expressão monoalélico devido as marcas epigenéticas, como a metilação do DNA, que são regulados através da região de controle de *imprinting* (ICR). Alterações no padrão de *imprinting* desses genes acarretam na perda de *imprinting* (LOI) devido ao ganho (GOM) ou perda (LOM) de metilação, induzindo o surgimento dessas síndromes provenientes de ART. Embora muitos estudos já tenham relatado alterações *loci* específico nessas síndromes, como o quadro de hipometilação na ICR2 (*KvDMR1*) nas síndromes SBW e LOS/AOS, estudos recentes comprovam que o evento de perda de *imprinting* ocorre em diferentes *loci* ao mesmo tempo, considerando-o como evento multilocus. Apesar da espécie bovina poder ser utilizada como modelo de desenvolvimento para síndromes humanas, existem poucas informações sobre os genes de *imprinting* bovino na literatura. Em vista disso, foi realizada uma revisão sistemática sobre

todos os eventos de LOI em caráter multilocus já descritos na síndrome humana SBW, e na LOS/AOS, em bovinos, com o intuito de comparar em quais genes regulados por *imprinting* genômico ocorrem as maiores alterações do padrão de metilação do DNA e de expressão.

**Palavras-chave:** *imprinting* genômico, *Large Offspring Syndrome*, defeito de metilação multilocus, Beckwith-Wiedemann



**Abstract**

In vitro fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) are assisted reproduction technologies (ART) commonly used in different species, such as humans and cattle. Currently, despite advances in these technologies, many do not generate healthy embryos, increasing the chance of the onset of syndromes. Large Offspring Syndrome (LOS)/Abnormal Offspring Syndrome (AOS) has features such as hypergrowth, malformation of organs, skeletal and placental defects, which are very evident. In humans, Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) have phenotypic characteristics similar to those found in LOS/AOS. Although the efficiency of these technologies is still low, approximately 50% of the transferred bovine embryos are established and maintained until the end of gestation. The success of reproduction technologies is defined by the ability of the transferred embryo to produce a healthy progeny and to this must accompany the morphology of the embryo during development. However, studies report that reproduction technologies have been compromised because of molecular failures. Therefore, although the morphology does not change during development, molecular changes lead to a low efficiency rate. The genes regulated by genomic imprinting have parental monoallelic expression specific, being associated with the embryonic and behavioral development of mammals. These genes possess this monoallelic expression pattern due to epigenetic marks, such as DNA methylation, in which they are regulated through the imprinting control region (ICR). Changes in the imprinting pattern of these genes lead to loss of imprinting (LOI) due to gain (GOM) or loss (LOM) of methylation, inducing the emergence of these syndromes from ART. Although many studies have reported specific loci alterations in these syndromes, such as hypomethylation in ICR2 (*KvDMR1*) in the BWS and LOS/AOS syndromes, recent studies have shown that the event of loss of imprinting occurs at different loci at the same time, named multilocus event. Although the bovine species can be used as a developmental model for human syndromes, there is little information on bovine imprinting genes in the literature. In this study, we performed a systematic review of all the multilocus LOI events described in the human BWS syndrome and the LOS / AOS in cattle, in order to compare in which genes regulated by genomic imprinting occur the largest changes in the pattern of DNA methylation and expression.

**Key words:** genomic imprinting, Large Offspring Syndrome, methylation defects multilocus, Beckwith-Wiedemann

## I. Introdução

### I.1 *Imprinting* genômico

Em mamíferos, as células diploides apresentam um conjunto de genes no qual são expressos somente por um dos alelos parentais. A esse mecanismo denominamos de *imprinting* genômico. Os alelos desses genes podem ser silenciados em diferentes fases do desenvolvimento gamético, ou seja, na oogênese ou na espermatogênese (HORSTHEMKE, 2014).

Assim sendo, toda célula diploide possui duas cópias parentais de todos os genes, dentre esses, os genes regulados por *imprinting* vão expressar somente a cópia parental ativa. No entanto, os genes que não são regulados por esses mecanismos têm sua expressão proveniente de ambas cópias parentais (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014). Informações obtidas no banco de dados *geneimprinting* (<http://www.geneimprint.com/>) e estudos da literatura científica recente demonstram que cerca de 100 genes humanos que são regulados pelo mecanismo de *imprinting* genômico estão descritos (KANEDA, 2011; WEAVER; BARTOLOMEI, 2013). Contudo, em bovinos estima-se que aproximadamente 25 genes estão retratados (MAGEE et al., 2014; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). Estes genes estão distribuídos de maneira uniforme em todos os cromossomos de ambas espécies.

Os genes de *imprinting* encontram-se posicionados em *clusters* ao longo do genoma e são regulados por elementos do DNA chamados de região de controle de *imprinting* (ICR). Portanto, as ICRs são regiões do DNA que regulam a expressão dos genes de *imprinting* que se encontram em uma mesma região, podendo regular de 3 a 12 genes (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014; LAMBERTINI, 2014). As ICRs abrigam regiões diferencialmente metiladas (DMRs), esse padrão de metilação diferencial dentro da ICR deve ser apagado e restabelecido a cada geração de células primordiais germinativas, para que o ciclo de estabelecimento das marcas epigenéticas parentais específicas seja mantido (MAGEE et al., 2014).

A fase de surgimento da DMR, durante o desenvolvimento, também afeta sua função no padrão de *imprinting*, pois uma DMR gamética é capaz de designar o padrão de *imprinting*. Porém, uma DMR somática somente tem função de manutenção do padrão de silenciamento do gene (BARLOW;

BARTOLOMEI, 2014), ou seja, quando há deleção de uma DMR gamética, esta causa a perda de *imprinting* de diversos genes dentro do *cluster*. Porém, a perda de uma DMR somática pode afetar somente a expressão de um gene de *imprinting* dentro do *cluster*, sendo que o padrão de *imprinting* dos outros genes do *cluster* continua preservado (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014; CONSTÂNCIA et al., 2000; WILLIAMSON et al., 2006).

Estas regiões também apresentam padrões parentais específicos de outras marcas epigenéticas, além da metilação do DNA, como por exemplo, as modificações de histonas e a presença de longos RNAs não codificantes de proteínas (*long noncoding RNAs* - lncRNAs). Esses lncRNAs, geralmente, estão associados com fatores de regulação *cis* dos genes no *cluster* (AZZI et al., 2009; BARLOW; BARTOLOMEI, 2014; EGGERMANN; EGGERMANN; SCHÖNHERR, 2008; LAMBERTINI, 2014). A presença dos lncRNAs tem função importante no silenciamento parental de alelos nos *clusters* de genes regulados por *imprinting* genômico. Um exemplo desse mecanismo ocorre quando a metilação do DNA se sobrepõe ao promotor de longo ncRNA, induzindo a regulação gênica, como é o caso no *locus* da *KCNQ1OT1*. Em adição, a metilação do DNA age como repressor gênico de um dos alelos, assim como algumas modificações de histonas (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014).

Em adição, a ação das marcas epigenéticas, participam da regulação da transcrição dos genes de *imprinting* uma grande variedade de elementos regulatórios, como os *enhancers*, os insuladores, e outros; para induzir a expressão parental específica em outros genes (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014).

O estabelecimento e manutenção da metilação do DNA alélico específico nas ICRs é um mecanismo complexo, que envolve muitos fatores de transcrição regulatório e interferência de fatores ambientais (AZZI et al., 2009). Uma vez que o padrão de *imprinting* é designado durante a formação dos gametas, esse padrão permanece durante toda a embriogênese e nos tecidos adultos, até a nova formação das células gaméticas (WEAVER; BARTOLOMEI, 2013).

Diferentemente das marcas dos outros *loci*, as epigenéticas dos genes de *imprinting* genômico possuem características peculiares. Durante o início da fertilização, o genoma passa por uma reprogramação epigenética no qual todas as suas marcas são apagadas para garantir a totipotência do embrião. No

entanto, os genes de *imprinting* escapam dessa onda de reprogramação através da ação de fatores que agem em *cis* e *trans*, suportando a hipótese de que esses genes são fundamentais no início do desenvolvimento embrionário (LAMBERTINI, 2014; PARK et al., 2012).

Os genes de *imprinting* estão associados com o desenvolvimento embrionário e placentário, assim como regulam o metabolismo e fisiologia no período inicial pós natal (BRESSAN et al., 2009; KANEDA, 2011; LAMBERTINI, 2014). Alterações no padrão de expressão dos genes de *imprinting* podem afetar a restrição do crescimento fetal, o peso ao nascer, características comportamentais, estando associado dessa forma ao surgimento de doenças, como diabetes melitus neonatal, síndromes metabólicas e obesidade (LAMBERTINI et al., 2012; MARSIT et al., 2013).

Desse modo, o mecanismo de *imprinting* genômico utiliza a maquinaria celular e epigenética para regular o padrão de expressão parental específico dos genes de *imprinting*, embora ainda existam poucas informações sobre como esses mecanismos interagem dentro do *cluster* gênico.

## **I.II Fatores de regulação *cis* nos genes de *imprinting***

Diversos estudos têm demonstrado que a metilação do DNA não é o mecanismo exclusivo de regulação do padrão de *imprinting* genômico e as modificações de histonas e os ncRNAs também apresentam um papel fundamental durante o estabelecimento, manutenção e apagamento do padrão dos genes de *imprinting*. Logo após a descoberta do mecanismo de *imprinting* genômico, a marca de metilação do DNA ficou conhecida como responsável sobre o seu padrão devido a sua função de repressão gênica. Contudo, a partir da década de 2000 foi observado o papel de regulação dos lncRNA e das modificações covalentes de histonas sob o mecanismo de *imprinting* (FERGUSON-SMITH, 2011; KANEDA, 2011).

A metilação do DNA é estabelecida e mantida por meio da ação de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMT). Essas são divididas em dois grandes grupos, DNMT3A/B/L e DNMT1, sendo requeridas para estabelecimento (metilação *de novo*) e manutenção da metilação do DNA, respectivamente

(BRANCO; ODA; REIK, 2008). A metilação do DNA é relacionada classicamente a repressão gênica (KANEDA, 2011; LI; SASAKI, 2011; SANLI; FEIL, 2015)

Já as modificações covalentes de histonas são capazes de reprimir e ativar genes por meio da metilação, acetilação, ubiquitinação e fosforilação de sequências regulatórias dos mesmos (ZHANG et al., 2015). Algumas marcas em histonas podem contribuir para a regulação parental específica dos genes de *imprinting*, em resposta as marcas presentes nas DMRs gaméticas. Essas marcas podem agir na ativação ou silenciamento das regiões que ancoram *clusters* de genes regulados por *imprinting* genômico (JOHN; LEFEBVRE, 2011). Como exemplo, a trimetilação do resíduo de lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) que impede que os radicais metil sejam adicionados ao DNA. Por outro lado, a demetilação da H3K4 é necessário para a metilação *de novo* de algumas ICRs (HENCKEL et al., 2012; MONK, 2015; SANLI; FEIL, 2015). A lisina demetilase H3K4, KDM1B, tem sido relacionada em diferentes estudos à função de estabelecimento do *imprinting* materno em algumas DMRs, como no genes *PEG1/MEST* e *GRB10* (LI; SASAKI, 2011). Já as proteínas do grupo polycomb são capazes de regular genes expressos maternalmente (KANEDA, 2011; MAGER et al., 2003).

A metilação do DNA e modificação de histonas são capazes de interagir entre si, tendo em vista que a DNMT3L entra em contato com a H3K4 e recruta radicais metil para o alelo que será silenciado no *locus* regulado por *imprinting* (CHENG, 2014; SANLI; FEIL, 2015).

Dependendo do nível de metilação do DNA, as DMRs sofrem adição de diferentes marcas de histonas, como a trimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9me3) e a trimetilação da lisina 20 na histona 4 (H4K20me3) são recrutadas nas DMRs metiladas; e as marcas de trimetilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4me3) que estão presentes nas DMRs não metiladas (HENCKEL et al., 2012; LI; SASAKI, 2011). Alguns estudos já demonstraram que as modificações de histonas H4R3me2s (dimetilação simétrica da arginina 3 na histona 4), H3K64me3 (trimetilação da lisina 64 na histona 3), e H4K20me3 (trimetilação da lisina 20 na histona 4) são marcas repressivas em alelos metilados nos genes de *imprinting*. Sendo assim, as modificações de histonas podem contribuir para o padrão de *imprinting* juntamente com as outras marcas epigenéticas (GIRARDOT; FEIL; LLÈRES, 2013; PANNETIER; FEIL, 2007).

De maneira similar, outras proteínas são recrutadas para manutenção da marca de *imprinting* no início da fertilização, como é o caso da PGC7/Stella que está associada com manutenção de metilação do DNA em muitas ICRs maternas durante a reprogramação epigenética no início da embriogênese (WOSSIDLO et al., 2011). PGC7/Stella consegue recrutar a marca de H3K9me2 para o alelo metilado (NAKAMURA et al., 2012). Outra proteína, a ZFP57, é recrutada em embriões para manutenção da metilação do DNA em muitas DMRs gaméticas (QUENNEVILLE et al., 2011). Outras proteínas também têm participação na manutenção de metilação do DNA nas ICRs, como a MBD3 e a RBBP1, sendo esta última, capaz de recrutar modificações de histonas (GONG et al., 2012; MA et al., 2010).

Todavia, algumas proteínas e modificações de histonas são requeridas para a manutenção dos alelos não metilados nas ICRs. A ação dessas proteínas e marcas epigenéticas são essenciais para a proteção das DMRs não metiladas no processo de metilação *de novo*, após a onda de reprogramação epigenética na embriogênese (PROUDHON et al., 2012; SANLI; FEIL, 2015). Proteínas como ZFP42 e CTCF são de grande importância durante esse processo, assim como as modificações de histonas H3ac, H4ac, H3K4me2 e H3K4me3 (DELAVAL et al., 2007; KIM et al., 2011).

Em algumas ICRs, a regulação do padrão de *imprinting* ocorre com ajuda dos ncRNAs, especialmente os lncRNAs. De acordo com sua localização no genoma, os lncRNAs podem ser transcritos de regiões intergênicas, intrônicas, de *enhancers*, podendo também estar expresso em orientação antisense a outros genes (KANDURI, 2015). A ação dos longos ncRNA sob os genes de *imprinting* ainda não está muito esclarecida, embora estes genes possam estar relacionados a ambos, repressão ou ativação gênica.

Recentemente, estudos relataram a ação dos lncRNAs na regulação *trans* da expressão gênica (KANEKO et al., 2014; STELZER et al., 2014). Muitos lncRNAs são transcritos a partir de ICRs, como o *AIR* e *KCNQ1OT1*, que regulam os *clusters* de *imprinting* relacionados aos *IGF2R* e *KCNQ1*, respectivamente (KANEDA, 2011; MAGEE et al., 2014; MOHAMMAD et al., 2009). Os lncRNAs podem recrutar complexos proteicos associados as modificações de histonas de caráter repressivo, como as do grupo polycomb-2 (PRC2) para o *cluster* de *imprinting*, embora a forma como isto ocorre ainda não

esteja totalmente elucidada (NATOLI; ANDRAU, 2012; TERRANOVA et al., 2008).

Sabe-se hoje que falhas nesses mecanismos de manutenção e estabelecimento do padrão de *imprinting* constituem algumas das causas do surgimento de doenças em humanos e demais espécies de mamíferos. A perda de *imprinting* (*Loss of Imprinting* - LOI) pode ocorrer no início da gestação, durante o período preimplantacional (HORSTHEMKE, 2014; PETERS, 2014). Uma vez que a ICR sofre esse tipo alteração epigenética, o evento de LOI contribui para aparecimento de diferentes tipos de síndromes. Síndromes como a de Silver-Russel (SRS), Angelman (AS) e Beckwith-Wiedemann (SBW), em humanos, e *Large Offspring Syndrome* (LOS) / *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS) em bovinos, têm sido relacionadas com a ocorrência de LOI por ganho (GOM) e/ou perda (LOM) de metilação (CHEN et al., 2013; KAGAMI et al., 2015; HIRASAWA; FIEL, 2010)

### **I.III Influência do uso de tecnologias da reprodução nos *status* epigenético de regulação do mecanismo de *imprinting* genômico**

Nos últimos 40 anos, as biotecnologias aplicadas à reprodução como fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática (ICSI) e a transferência nuclear de células somáticas (SCNT) cresceram muito. Só no mundo ocidental, aproximadamente 4% da população utiliza a FIV e ICSI como meio de reprodução humana (AMOAKO; NAFEE; OLA, 2017; DE MOUZON et al., 2010). Porém, menos de 50% dos embriões de FIV conseguem alcançar a fase de blastocisto (BETTS; MADAN, 2008).

Estudos demonstram que protocolos de tecnologias de reprodução assistida induzem alterações epigenéticas nos genes regulados por *imprinting*. Nas diferentes biotecnologias, as etapas de manipulação celular, as fontes das células doadoras de núcleos, o protocolo de ativação nuclear e os diferentes meios de cultura podem sofrer efeitos negativos durante o desenvolvimento do embrião, contribuindo para a ocorrência de LOI e para o surgimento de diferentes síndromes na prole (AMOAKO; NAFEE; OLA, 2017; KHOSLA et al., 2001). Uma plausível explicação para tal efeito são os erros na reprogramação epigenética durante o desenvolvimento inicial do embrião. Muitos estudos na literatura



corroboram que o ambiente *in vitro* de manipulação causa alterações de expressão de mRNA e alterações nos padrões de *imprinting* genômico (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). Falhas no padrão de *imprinting* em clones constituem uma evidência de erros na reprogramação epigenética após fertilização (KANEDA; NAGAI, 2017).

É de conhecimento que o ambiente age por meio dos mecanismos epigenéticos que influenciam o desenvolvimento embrionário. Em modelos animais, estudos demonstram que o efeito do cultivo no desenvolvimento embrionário causa instabilidade molecular nos genes regulados por *imprinting* genômico, perda do padrão monoalélico de transcrição do mRNA e alterações na metilação do DNA (AMOAKO; NAFEE; OLA, 2017). Muitos estudos demonstram que ART aumenta significativamente o risco de surgimento de síndromes, associadas às alterações no crescimento uterino, defeitos na formação da placenta, a gestação prolongada, a morte súbita pós natal e dificuldades respiratórias (AZZI et al., 2009; BERTOLINI et al., 2002; KHOSLA et al., 2001). Portanto, os protocolos de reprodução que contribuem para o aparecimento de alterações epigenéticas afetam o processo de ativação gênica, a diferenciação celular e o consequente desenvolvimento do embrião (SANTOS; KUIJK; MACKLON, 2010; SHI; WU, 2009).

Entre todas as espécies em que se utilizou as tecnologias de reprodução, a espécie bovina é o melhor modelo animal para a técnica de transferência nuclear, pois apresenta a maior taxa de eficiência de transferência nuclear, além de apresentar alterações epigenéticas similares às que ocorrem no desenvolvimento embrionário humano (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2010; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014; YANG et al., 2005). A maior perda embrionária em bovinos provenientes de ART acontece, principalmente, no primeiro trimestre de prenhez e no período implantacional. Portanto, a expressão anormal de genes regulados por *imprinting* nesses estágios é crítica, afetando o desenvolvimento do embrião e comprometendo o sucesso da implantação (TVEDEN-NYBORG et al., 2008).

Embriões produzidos por transferência nuclear apresentam anomalias em diferentes fases de desenvolvimento embrionário assim como no período pós natal. Entretanto, essas anomalias não são transmitidas para a progênie desses

clones, o que constitui um indicativo de falhas epigenéticas (KANEDA; NAGAI, 2017).

Os distúrbios de *imprinting* (IDs) podem surgir devido às diferentes alterações no genoma e epigenoma, como: duplicações/deleções; dissomia uniparental (UPD); epimutações e mutações pontuais nos genes de *imprinting* (EGGERMANN et al., 2015b). Os IDs estão associadas a características clínicas como retardos no crescimento pré e pós-natal, hipercrescimento pós-natal, hipo e hiperglicemia neonatal, e alterações comportamentais. Recentemente foram relatados IDs com alterações no padrão de *imprinting* em múltiplos *loci*, caracterizados como defeitos de metilação multilocus (MLMD), surgindo um novo grupo de estudo denominado distúrbios de *imprinting* multilocus (MID) (AZZI et al., 2014; SOELLNER et al., 2015).

Devido aos MIDs, pacientes com uma determinada epimutação (como a hipometilação da ICR2 em pacientes SBW podem apresentar alterações em outros *loci* regulados por *imprinting* (EGGERMANN et al., 2015a, 2015b; MACKAY et al., 2015). Mais de 50% dos pacientes com MIDs apresentam epimutações na metilação do DNA devido às alterações nos fatores de regulação *cis* e *trans* (EGGERMANN et al., 2015a; UYAR; SELI, 2014). A maioria dos MIDs já detectados apresentam características clínicas e moleculares similares devido às epimutações em *loci* similares. Os primeiros estudos a detectarem MLMD em síndromes de IDs identificaram alterações em pelo menos 2 *loci* de *imprinting* na ID Diabetes Mellitus Neonatal Transiente (TNMD) e Beckwith-Wiedemann (ARIMA et al., 2005; MACKAY et al., 2006).

Hoje, os IDs mais conhecidos na espécie humana são as síndromes Beckwith-Wiedemann, Silver-Russell (SRS), Prader-Willi (PWS), Angelman (AS), Diabetes Mellitus Neonatal Transiente (TNMD) e na espécie bovina tem-se a *Large Offspring Syndrome (LOS)/Abnormal Offspring Syndrome (AOS)* (EGGERMANN et al., 2014; MACKAY et al., 2015; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). Recentemente muitos estudos tem comprovado a associação entre essas síndromes, especialmente a BWS, SRS e TNMD, com o evento MLMD (BAPLE et al., 2011; GRAFODATSKAYA; BASRAN; WEKSBURG, 2017).

Dado que muitos genes de *imprinting* não foram investigados mais detalhadamente, é possível que a MLMD afete mais pacientes do que o relatado

pela literatura, considerando também que o padrão de expressão desses genes é tecido específico (EGGERMANN et al., 2013).

Muitos genes já foram associados a esses eventos de falhas multilocus, como os genes *ATA3*, *IMPACT*, *L3MBTL*, *MAGEL2*, *MKRN3/ZNF127*, *PEG3*, *SNRPNR*, *UBE3A*, *ZAC1/PLAGL1*, *PEG1/MEST*, *GRB10*, *GNAS*; além dos mais bem descritos *H19/IGF2* e *KCNQ1OT1* (CHEN et al., 2015; EGGERMANN et al., 2013; MACKAY et al., 2015). A maioria das alterações no padrão de *imprinting* nesses genes deve-se a hipometilação, com exceção de alguns pacientes de Silver-Russell que apresentam um quadro de hipermetilação. Embora apresentem essa característica, ainda não se sabe qual a relevância funcional da perda e ganho de metilação nesses pacientes, ou seja, o que determina a frequência de certos fenótipos nessas síndromes (TURNER et al., 2010). Ainda que não se tenha conhecimento sobre a função particular de cada um desses genes, a alteração nos mesmos causa falhas no desenvolvimento embrionário, defeitos neurológicos e comportamentais e falhas no desenvolvimento pós natal (MACKAY et al., 2015; SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013).

O surgimento de alterações multilocus nos genes de *imprinting* nas espécies humana e bovina é um indicativo do quão complexo é o mecanismo de estabelecimento e manutenção do padrão de *imprinting*, sendo preciso ainda mais estudos para elucidação como estes ocorrem.

#### **I.IV Síndrome de Beckwith-Wiedemann**

##### **I.IV.I Características clínicas**

A Síndrome de Beckwith-Wiedemann é a síndrome de hipercrecimento mais conhecida na espécie humana. As características clínicas associadas a essa síndrome podem variar devido ao mosaicismo molecular predominante (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010).

As características fenotípicas dessa síndrome estão associadas com hipercrecimento, hemihiperplasia, aumento de risco de surgimento de tumores e defeitos na parede abdominal (BLIEK et al., 2009; EGGERMANN; EGGERMANN; SCHÖNHERR, 2008). Outras características clínicas são a organomegalia, macrossomia, macroglossia, hipoglicemia neonatal,

anormalidades renais e dimorfismo craniofacial (AZZI et al., 2014; EGGERMANN et al., 2015b; MACKAY et al., 2015; SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013).

A detecção e diagnóstico da síndrome é importante devido ao risco de formação de tumores como o tumor de Wilms, o hepatoblastoma e mesmo o neuroblastoma. O risco de uma criança com SBW apresentar algum tipo de tumor é de até 7,5% nos primeiros 8 anos de idade, sendo o risco estimado de surgir um tumor de até 21% durante a vida toda do paciente com SBW (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010; KUROIWA et al., 2009). Portanto, a verificação dos tumores é de extrema importância nesses pacientes independentemente da sua etiologia molecular. Porém, o diagnóstico clínico da síndrome pode ser dificultado devido ao mosaicismo molecular e à presença de casos com MLMD.

#### **I.IV.II Características moleculares**

A etiologia molecular da síndrome SBW é complexa, pois, envolve alteração de expressão e metilação de genes de *imprinting* localizados no cromossomo 11p15 humana. Portanto, o surgimento da SBW deve-se, em sua maioria (de 50-60%), às epimutações no *cluster* do cromossomo 11p15 (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010).

Dentro dessa região cromossomal existem duas ICRs que regulam dois domínios de genes regulados por *imprinting* genômico. A ICR1 contém os genes *H19* e *IGF2*, que são transcritos pelos alelos materno e paterno, respectivamente. O gene *IGF2* apresenta função de fator de crescimento, sendo altamente expresso em tumores. Já o gene *H19* age como supressor de tumor. A ICR1 é responsável pela expressão monoalélica parental específica de ambos, por meio da ação conjunta de insuladores e *enhancers*. Os pacientes com SBW podem apresentar GOM na ICR1, o que resulta na expressão bialélica do gene *IGF2*, atingindo cerca de 2 a 7% dos pacientes (DEMARS; GICQUEL, 2012; EGGERMANN; EGGERMANN; SCHÖNHERR, 2008).

Associados a ICR2 encontram-se aproximadamente 10 genes regulados por *imprinting* genômico. Alguns genes são associados a síndrome de SBW, como os genes *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *KCNQ1* (SOELLNER et al., 2015). O gene *KCNQ1OT1*, codifica um lncRNA, sendo expresso paternalmente, em

pacientes de SBW a hipometilação da ICR2 induz à expressão do alelo materno desse gene. Por ser um lncRNA, o *KCNQ1OT1* tem sido associado com a função regulatória de outros genes de *imprinting* no domínio da ICR2. A LOM na ICR2 ocorre em aproximadamente 50-60% dos pacientes com BWS (ENGEL et al., 2000; MACKAY et al., 2015). O gene *KCNQ1* é expresso maternalmente e a alteração no seu padrão de expressão já foi relacionada com uma maior incidência de tumores nos pacientes com SBW. E por fim, o gene *CDKN1C*, também expresso maternalmente, tem função de regulação da proliferação celular e sua alteração está associada a 10% dos casos de SBW (GIRARDOT; FEIL; LLÈRES, 2013).

Alterações moleculares envolvendo ambas ICRs também estão relacionadas aos casos de SBW. A dissomia uniparental paterna envolvendo as ICRs 1 e 2 é encontrada em até 20% dos pacientes (AZZI et al., 2009; EGGERMANN; EGGERMANN; SCHÖNHERR, 2008). Raramente (aproximadamente 1%) o surgimento da síndrome SBW está associado às duplicações de regiões do cromossomo 11p15 (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010; SASAKI et al., 2007; WEKSBERG; SHUMAN; BECKWITH, 2010).

A incidência dessa síndrome é de 1 a cada 15000 pessoas em casos de reprodução natural, sendo sua ocorrência maior em crianças provenientes de reprodução assistida, aumentando o risco da criança nascer com a síndrome em até nove vezes (DEBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003; HALLIDAY et al., 2004; WEKSBERG; SHUMAN; BECKWITH, 2010). Em casos de ART a epimutação predominante nas crianças portadoras de SBW também é a de perda de metilação da ICR2 (SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013).

Recentemente, estudos têm observado que aproximadamente 25% dos pacientes que apresentam LOM no gene *KCNQ1OT1* também sofrem alterações em outros *loci* de *imprinting*, como nos genes *PLAGL1* e *GNAS* (BLIEK et al., 2009; EGGERMANN et al., 2016; EGGERMANN; EGGERMANN; SCHÖNHERR, 2008; LIM et al., 2009). No final dos anos 2000, também foi demonstrada a presença da LOI em múltiplos *loci* de *imprinting* em pacientes SBW gerados tanto por reprodução natural quanto por reprodução assistida (ROSSIGNOL et al., 2006). A ocorrência de MLMD na SBW demonstra-se maior em pacientes provenientes de ART, sendo o *GNAS*, *PLAGL1*, *PEG1/MEST*,

*IGF2R* e *GRB10* os genes mais afetados (COURT et al., 2013; DOCHERTY et al., 2014; TEE et al., 2013).

O evento de MLMD nos casos de SBW pode ocorrer devido à alterações nos fatores *cis* e *trans*. Um estudo recente demonstrou que uma mutação em um gene que codifica um fator de transcrição, o *ZFP57*, que tem a função de manutenção do padrão de *imprinting* no período pós fertilização, estava envolvida no evento de MLMD (MACKAY et al., 2008). Do mesmo modo, mutações em outros genes, como o *NLPR2* e *NLPR7*, já foram associadas aos casos de SBW com epimutações em mais de 2 *loci* de *imprinting* (MEYER et al., 2009).

A incidência de certas características clínicas na Síndrome Beckwith-Wiedemann pode variar de paciente para paciente. Por exemplo, a maior ocorrência de tumores de Wilms nos pacientes deve-se à epimutações na ICR1, atingindo aproximadamente 5% dos pacientes com alteração na ICR2 (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010). Isso ocorre, pois, os mecanismos moleculares alterados podem ser diferentes em cada caso. Algumas alterações, como a dissomia uniparental, ocorrem somente na fase pós zigótica e induzem a uma maior variabilidade fenotípica em alguns pacientes que apresentam alterações de metilação multilocus nos genes regulados por *imprinting* (DEMARS; GICQUEL, 2012).

De maneira geral, as características clínicas dos pacientes de MLMD são reflexos dos distúrbios de metilação multilocus nos diferentes tecidos (SANCHEZ-DELGADO et al., 2016). Ainda que existam estudos sobre a MLMD na Síndrome de Beckwith-Wiedemann, poucos são os dados sobre a frequência com que esse evento multilocus ocorre e quais são os mecanismos envolvidos nele. Portanto, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre as alterações de metilação multilocus nos pacientes de BWS, especialmente naqueles provenientes de reprodução assistida.

### **I.V Utilização da *Large Offspring Syndrome* (LOS) como modelo para Síndrome de Beckwith-Wiedemann**

O protocolo de transferência nuclear de célula somática (SCNT) e fertilização *in vitro* (FIV) tem sido muito utilizado em muitas espécies de animais domésticos (LEE et al., 2005; SHI et al., 2007). Embora essas técnicas sejam utilizadas em larga escala comercial, sua taxa de eficiência ainda é considerada baixa. Isso se deve a perda embrionária durante o início do desenvolvimento pós implantação induzindo à perda fetal, entre os dias 30 e 90. Da mesma maneira, falhas no desenvolvimento podem ocorrer no final da embriogênese possibilitando o nascimento da progênie, porém estes sobrevivem somente por algumas horas devido à má formação dos órgãos (HILL et al, 2000). Desse modo, a clonagem bovina está associada a altos índices de perda fetal durante a gestação (SMITH et al., 2012).

Embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentam anomalias morfológicas na progênie gerada, como alterações na placenta e no feto, associados a hipercrecimento. Essas alterações induzem ao aumento da perda da progênie e aumento da mortalidade perinatal (FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006).

Tais alterações ocorridas nos embriões bovinos podem predispor a ocorrência da LOS/AOS. É importante observar que as alterações de metilação do DNA nas DMRs gaméticas na LOS/AOS são similares às observadas na síndrome SBW humana (EL HAJJ; HAAF, 2013).

Assim como a síndrome SBW, a LOS/AOS é uma síndrome de hipercrecimento, com características clínicas de organomegalia, dificuldades respiratórias, deficiências imunológicas, aumento de morte fetal e neonatal, e má formação dos membros superiores e inferiores (TIAN, 2014).

Nos últimos anos, a utilização do modelo embrionário bovino tem sido proposta como um modelo de estudo para síndromes humanas relacionadas aos eventos de LOI (ROBBINS et al., 2012). Isso se deve às similaridades fenotípicas e ao desenvolvimento preimplantacional, como por exemplo, a ativação gênica, o metabolismo celular, a interação com o meio de cultura, entre outros (CHEN et al., 2013). Da mesma maneira, os genes de *imprinting* nessas duas espécies apresentam alta conservação. Contudo, embora a espécie bovina possa representar o modelo ideal para comparação ao humano, faltam estudos sobre

o padrão de alterações epigenéticas multilocus de genes de *imprinting* nessa espécie.

Portanto, existem algumas propriedades que permitem a utilização da síndrome bovina como modelo para a SBW humana, como: as similaridades clínicas entre as síndromes, o aumento de expressão de *IGF2* observado em clones com LOS (BLONDIN et al., 2000) e a alta homologia entre os genes de *imprinting* nas duas espécies. Tais similaridades não são observadas entre camundongo e humanos (MILLER et al., 2007). Outra similaridade entre as duas espécies está no fato do padrão de expressão e de alteração da metilação do DNA ser conservado nas duas síndromes, assim como outros parâmetros durante o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, o tempo de gestação e a quantidade de progênie gerada (ROBBINS et al., 2012).



## II. Metodologia

Para a revisão sistemática dos artigos relacionados a eventos de alteração de metilação do DNA e de expressão multilocus nos genes regulados por *imprinting* genômico nas síndromes SBW e LOS/AOS, foram feitas buscas no banco de dados do NCBI – PubMed (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Para tal foram escolhidas palavras e termos-chave para filtrar os artigos de interesse, como: "*multilocus methylation*", "*multilocus methylation defects*", "*multilocus imprinting*", "*MLID: multilocus imprinting disturbance*", "*MLMD*", "*multilocus imprinting disorders*", "*multilocus Beckwith-Wiedemann*", "*Large Offspring Syndrome*", "*Abnormal Offspring Syndrome*", "*multilocus imprinting cattle*", "*imprinting disorders*", "*multiple imprinting defects*", "*global loss of imprinting*", "*hypomethylation imprinted loci (HIL)*", "*loss of imprinting cattle*", "*bovine somatic cell nuclear transfer*".

Após a escolha dos termos para pesquisa dos artigos, foram selecionados somente os estudos que avaliaram no mínimo 3 genes regulados por *imprinting* genômico, independente da tecnologia de reprodução assistida utilizada em humanos, sendo estes considerados estudos de MLMDs. Em bovinos foram escolhidos os estudos com amostras de clones gerados por transferência nuclear. Em seguida, estes artigos foram divididos entre os de revisão e os de ensaios clínicos. Dos 65 artigos obtidos na pesquisa, 39 eram de ensaios clínicos (27 sobre humanos e 12 sobre bovinos), e 26 artigos de revisão sobre o tema.

### III. Resultados

#### III.I Perfil multilocus da metilação do DNA

O evento de MLMD pode ocorrer em regiões metiladas maternalmente ou paternalmente em um mesmo paciente. Isto indica que a LOI ocorre no período pós fertilização causando anormalidades na manutenção do perfil de *imprinting* dos genes. Porém, o grau de demetilação nos *loci* afetados nem sempre podem explicar o fenótipo característico dominante dessas síndromes em pacientes multilocus (AZZI et al., 2009).

A perda de metilação em diversos *loci* de *imprinting* sugerem um mosaicismos dos eventos de epimutação. Esse mosaico indica que os erros epigenéticos ocorrem após a fertilização, na segunda onda de reprogramação. O mecanismo envolvido nas falhas epigenéticas nos diferentes *loci* em pacientes multilocus são diferentes daqueles restritos a um *locus* somente (ROSSIGNOL et al., 2006).

Um dos pioneiros na área de investigação dos eventos multilocus em síndromes de *imprinting* foram ROSSIGNOL et al., (2006), que observaram o padrão de metilação em 4 genes de *imprinting* (*IGF2R*, *PEG1/MEST*, *H19* e *SNRPN*) em 40 pacientes com SBW e que já apresentavam LOM na região *KCNQ1OT1*. Dentre os pacientes, 11 foram concebidos por ART e 29 naturalmente. Após análise, foi observado que 3 dos 11 pacientes com SBW provenientes de ART apresentavam metilação anormal em pelo menos um outro *locus*. Somente o gene *PEG1/MEST* apresentou padrão normal de metilação nos pacientes SBW de ART. Dos pacientes SBW concebidos naturalmente, somente 7 (~24%) apresentaram metilação anormal em pelo menos um outro *locus* de *imprinting*. Embora alguns pacientes tenham apresentado evento multilocus, não houve diferença fenotípica entre os pacientes com alterações epigenéticas em um único *locus* e multilocus.

Já em 2009, AZZI et al. investigaram alterações multilocus nas síndromes humanas BWS e SRS. Os autores analisaram 7 genes regulados por *imprinting* genômico (*IGF2R*, *PEG1/MEST*, *KCNQ1OT1*, *PLAGL1/ZAC*, *SNRPN*, *DLK1-GTL2*, *H19* e *IGF2*). AZZI et al., (2009) foram primeiros ao notificar a presença de alteração multilocus em pacientes de BWS que já apresentavam LOM na ICR2. Na BWS, entre os pacientes que possuíam LOM na ICR2, 24% também

apresentaram LOM em um outro *loci* e 62.5% em outros 2 *loci* de *imprinting*, como nos genes *PLAGL1/ZAC*, *PEG1/MEST* e *SNRPN*. Somente a região *DLK1/GTL2* não apresentou epimutações nos pacientes com SBW. Embora tenha sido descrita a presença de alterações multilocus, não foram observadas diferenças nas características fenotípicas nos diferentes grupos de pacientes que apresentaram ou não características multilocus. Apesar de ter ocorrido características multilocus em muitos pacientes analisados, AZZI et al., (2009) não foi encontrada diferença significativa entre a ocorrência monolocus e multilocus em pacientes provenientes de ART.

Em uma análise com 149 pacientes com SBW, no qual 81 possuíam hipometilação na ICR2, BLIEK et al. (2009) analisaram o padrão de metilação do DNA em outras 11 DMRs. Essa análise mostrou que a hipometilação afeta vários *loci* de *imprinting*, sendo não somente restrita a ICR2, e que todas as DMRs alteradas apresentavam metilação materna. Foi encontrada hipometilação parcial e incompleta, sendo um indício da presença de mosaicismos de erro de *imprinting* pós formação do zigoto (BLIEK et al., 2009).

Da mesma forma, LIM et al., (2009) observaram pacientes com SBW provenientes de reprodução natural e de reprodução assistida. Dos 25 pacientes de ART (FIV e ICSI), 24 apresentavam LOM na ICR2 (96%), e os 87 pacientes gerados por reprodução natural, 100% possuíam LOM na ICR2. Ao analisar outros *loci* de *imprinting*, observou-se que no grupo de ART pelo menos 3 pacientes apresentaram LOM nos loci de *PEG1/MEST* e *SNRPN*. De maneira similar, no grupo de reprodução natural, notou-se LOM nos *loci* de *PEG1/MEST* e *PLAGL1/ZAC*. Entretanto, a frequência de LOM nos pacientes de ART (37.5%) foi significativamente maior do que nos pacientes provenientes de reprodução natural (6.4%).

Em contrapartida, a análise em pacientes MLMD de Silver-Russell e Beckwith-Wiedemann demonstrou que os pacientes que apresentavam LOM na ICR2, não apresentaram alteração em nenhum outro gene estudado (BEGEMANN et al., 2012). No mesmo ano, HIURA et al., (2012) analisaram 15 pacientes SBW. Deste grupo quase 50% dos pacientes apresentaram LOM na DMR associada ao gene *KCNQ1OT1*. Do total de pacientes avaliados, somente um era proveniente de ART (ICSI). Neste paciente foram observadas alterações de metilação multilocus nos genes *PEG1/MEST* (GOM) e *NESPAS* (LOM).

Ao avaliar somente pacientes SBW gerados por reprodução natural, 33% (14/42) apresentavam hipometilação na ICR2. Desse total, somente 3 pacientes também apresentaram hipermetilação no genes *GNAS/NESP*, e os demais tiveram hipometilação em outros genes analisados (*DIRAS3*, *GRB10*, *PEG1/MEST*, *PLAGL1*, e outros) (COURT et al., 2013).

Muitos estudos já demonstraram que pacientes com SBW gerados por reprodução assistida apresentam um quadro de alteração de metilação multilocus em pelo menos 3 *loci* de *imprinting*, quando já contém hipometilação da *KvDMR1*, com uma tendência maior a perda de metilação nas DMRs materna (DOCHERTY et al., 2014; EGGERMANN et al., 2014; MAEDA et al., 2014; POOLE et al., 2013; SANO et al., 2016; TEE et al., 2013; VALS et al., 2015) (Tabela 1).

Na espécie bovina, os primeiros estudos de alteração de metilação multilocus surgiram a partir do ano de 2011 com estudo de SU e colaboradores, no qual avaliou-se o nível de metilação em tecidos de fígado de bovinos gerados por transferência nuclear de célula somática (SCNT). Ao avaliar a metilação das DMRs, 3 genes de *imprinting* localizados no mesmo cluster (*GTL2-DMR*, *IG-DMR* e *DLK1-DMR*) em 2 clones que morreram logo após nascimento e 2 controles, observou-se que em ambos grupos de animais o padrão de hipermetilação foi predominante em todos os genes. Contudo, a amostra controle utilizada no estudo foi proveniente de fertilização *in vitro*, o que explicaria o padrão de hipermetilação similar ao encontrado nas amostras de SCNT (SU et al., 2011).

Em 2013, diferentemente do observado nos estudos de SBW, SHEN et al., (2013) ao analisarem metilação do DNA dos genes *H19*, *IGF2* e *XIST* de 6 clones, observaram um padrão de perda de metilação na ICR1 em diferentes tecidos (rim, coração, pulmão, e outros) (Tabela 1).

Até o presente momento, o grupo de pesquisa de Rocio Melissa Rivera da Universidade de Missouri (USA), apresentou os estudos mais completos sobre o evento de defeitos de metilação multilocus em clones bovinos. Nesses estudos observou-se um padrão de hipometilação em diversos *loci* de *imprinting* (*KCNQ10T1*, *H19/IGF2*, *CDKN1C*, *PLAGL1*, *SNRPN*) de maneira similar a descrita por outros trabalhos. Entretanto, os genes *PHLDA2*, *BEGAIN*, *DIRAS3*, *MAGEL2*, *NAP1L5*, *PEG3*, *NNAT*, *INPP5F* também demonstraram perda de

metilação em suas DMRs. Esse padrão de perda de *imprinting* foi observado nos tecidos de rim, músculo, cérebro, fígado, placenta e língua (CHEN et al., 2013, 2015) (Tabela 2).

**Tabela 1. Análise de defeitos de metilação do DNA multilocus (MLMDs) em pacientes de Beckwith-Wiedemann provenientes de 14 trabalhos publicados entre 2006-2016.**

Referências / Genes	KCNQ1OT1	H19	IGF2R	SNRPN	Peg1/MEST	PLAGL1/ZAC1	DLK1	GTL2/MEG3	GRB10	PEG3	GNAS	NESPAS	L3MTBL	DIRAS3	INPP5FV2	MCTS2	NAP1L5	NNAT	PEG10	ZNF597	FAM50B	
Rosignol et al (2006)	LOM		LOM	LOM	LOM																	
Azzi et al (2009)	LOM		LOM	LOM	LOM	LOM	LOM															
Bliek et al (2009)	LOM	na		LOM	LOM	LOM		LOM	na	na	LOM	LOM										
Lim et al (2009)	LOM			LOM	LOM	LOM	LOM															
Begemann et al (2012)	LOM	na	na		na	na		na	na													
Hiura et al (2012)	LOM				LOM							LOM										
Court et al (2013)	LOM		LOM		LOM	LOM		LOM	LOM	LOM	LOM		LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM
Poole et al (2013)	LOM				LOM	LOM					LOM											
Tee et al (2013)	LOM		LOM		LOM	LOM																
Docherty et al (2014)	LOM		LOM		LOM	LOM					LOM	LOM	LOM	LOM								LOM
Eggermann et al (2014)	LOM		LOM	LOM	LOM	LOM		LOM	LOM													
Maeda et al (2014)	LOM		LOM		LOM	LOM					GOM	LOM	LOM	LOM		GOM		LOM				LOM
Vals et al (2015)	LOM	na	LOM	na	na	LOM		na	na													
Sano et al (2016)	LOM			LOM	LOM	LOM					GOM			LOM								LOM

\*na = não alterado

Tabela 2. Análise de defeitos de metilação do DNA multilocus (MLMDs) em clones bovinos de SCNT entre 2011-2015

Genes	Rim	Fígado	Placenta	Músculo	Cérebro	Língua	Coração	Pulmão	Referência
BEGAIN	LOM								Chen et al (2015)
DIRAS3	LOM								Chen et al (2015)
DLK1		GOM							Su et al (2011)
GLT2		GOM							Su et al (2011)
H19	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM		LOM	LOM	Shen et al (2013)
IGF2	LOM	GOM			GOM		LOM	LOM	Shen et al (2013)
KCNQ1OT1	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	LOM	Chen et al (2013/2015)
MAGEL2	LOM								Chen et al (2015)
MEG3/GTL2		GOM							Su et al (2011)
NAP1L5	LOM								Chen et al (2015)
NNAT	LOM	LOM		LOM	LOM				Chen et al (2015)
PEG3	LOM								Chen et al (2015)
PLAGL1/ZAC	LOM								Chen et al (2015)
SNRPN/SNURF	LOM				LOM				Chen et al (2015)
XIST	LOM		GOM	GOM			LOM	LOM	Shen et al (2013)

### III.II Perfil multilocus do padrão de expressão

A expressão monoalélica parental, específica dos genes regulados por *imprinting*, tem papel crucial durante o desenvolvimento embrionário. Ela pode, portanto, ser utilizada como marcador genético da viabilidade do embrião (GUTIERREZ-ADAN; WHITE.; SOOM, 2015). A maioria dos genes regulados por *imprinting* possuem função em diversos processos biológicos, como no metabolismo, atuando como fatores de transcrição, como reguladores de ciclo celular, na apoptose entre outros processos (WRENZYCKI et al., 2004). Porém poucos estudos analisam esse parâmetro em pacientes SBW e LOS/AOS. Os poucos estudos de alteração multilocus de expressão estão baseados nas fases embrionárias e em gametas de bovinos, sendo que na síndrome SBW esse tipo de análise ainda é inexistente.

Os estudos de RUDDOCK et al., (2004) analisaram o perfil de expressão em embrião e oócitos bovinos provenientes de fertilização *in vitro* (FIV). Os genes de *imprinting* maternalmente e paternalmente expressos escolhidos foram: *DLK1*; *PEG1-MEST*; *NDN*; *NNAT*; *SGCE*; e *GRB10*; *GNAS*; *XIST* (relacionado a inativação do cromossomo X), respectivamente. Os genes *PEG1/MEST* e *DLK1* não tiveram transcritos detectados em nenhuma fase embrionária analisada, assim como nos oócitos. Os genes *GNAS*, *GRB10*, *NDN* e *NNAT* foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento embrionário pré implantacional e nos oócitos, assim como os genes *SGCE* e *XIST* (RUDDOCK et al., 2004).

Análise de evento de alteração de expressão multilocus foram feitos em diferentes estudos. YANG et al., (2005) analisaram 3 genes de *imprinting* (*IGF2*, *H19* e *IGF2R*) em 8 tecidos (rim, fígado, coração, pulmão, bexiga, baço, timo e músculo) de 5 clones bovinos pós morte, em 3 tecidos (pele, músculo e fígado) de 6 clones adultos e em 5 animais controle oriundos de reprodução natural. A partir das análises por PCR quantitativo – Real Time, observaram que nos clones que não sobreviveram, o nível de expressão estava alterado em todos os genes analisados, quando comparados com a expressão observada nos animais controle. A expressão desses genes nos clones adultos foi considerada normal em todos os tecidos, exceto a expressão do gene *IGF2* no músculo que foi considerada alterada. Um dos clones apresentou expressão 10x maior do gene



*IGF2* nos tecidos de coração, fígado e baço quando comparado com os controles. Da mesma maneira ocorreram em outros 2 clones, indicando que o gene *IGF2* teve uma superexpressão nos tecidos de clones quando comparado com os controles. Para o gene *H19*, o mesmo foi observado, no qual um dos clones apresentou um aumento de cerca de 30x na expressão desse gene no fígado. Embora a expressão estivesse alterada em todos os clones, não foi possível achar uma relação entre o nível de expressão com as características fenotípicas dos clones analisados (YANG et al., 2005).

Em um estudo com embriões bovinos provenientes de FIV, D'CRUZ et al., (2008) analisaram a expressão de 9 genes (*ATA3*, *IMPACT*, *L3MBTL*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *PEG3*, *SNRPN*, *UBE3A* e *ZAC1*), sendo estes investigados pela primeira vez em bovinos. Foi observado em todos os genes a ausência do padrão de expressão monoalélica esperado nos embriões, exceto o gene *ATA3* que não teve expressão detectada em nenhum estágio de desenvolvimento. Os genes *IMPACT* e *UBE3A* apareceram em quase todas as fases embrionárias analisadas. De maneira geral, todos os genes analisados apareceram em pelo menos duas fases do desenvolvimento inicial do embrião provenientes de FIV (D'CRUZ et al., 2008).

Em embriões formados *in vitro*, *in vivo* e nos partenogênicos – nos dias 14 e 21 – foi analisado o padrão de expressão de 8 genes de *imprinting* (*ATA3*, *DLK1*, *GNAS*, *GRB10*, *MAGEL2*, *PEG1/MEST*, *NDN* e *SGCE*). Todos os genes foram expressos no D21 no grupo *in vivo*, o que não ocorreu com os embriões D14, em que *ATA3* e *DLK1* não apresentaram transcrição. Somente o gene *PEG1/MEST* apresentou ausência de transcrição nos embriões partenogênicos D14, o que era esperado já que este gene é expresso somente pelo alelo paterno. Os genes *GNAS* e *GRB10* foram detectados em todos os embriões de todos os grupos, assim como o gene *MAGEL2* (TVEDEN-NYBORG et al., 2008).

Os primeiros estudos sobre alteração de expressão multilocus em clones bovinos foram feitos por ROBBINS et al., (2012) ao analisarem os tecidos de fígado, cérebro, língua, coração e corioalantóide em diferentes genes de *imprinting* (*PLAGL1*, *H19*, *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*). No entanto, em suas análises em clones de D65 não foi observado nenhuma alteração de expressão. Todos os genes apresentaram expressão monoalélica (Tabela 3).

Entretanto, análises feitas em tecidos de diferentes origens embrionárias (fígado, rim, cérebro, placenta, músculo, língua) demonstraram um padrão de expressão monoalélico e bialélico em diversos *loci* de *imprinting* nos animais com LOS. Por exemplo, os tecidos de rim, músculo e fígado que apresentaram expressão bialélica dos genes *KCNQ10T1*, *PHLDA2*, *KCNQ1*, *BEGAIN*, *DIRAS3*, *IGF2R*, e *NNAT* (CHEN et al., 2013, 2015).

Diferentemente dos estudos feitos até hoje, CHEN et al., (2017) fizeram um transcriptoma de 4 clones bovinos com LOS e 4 fetos controle utilizando a técnica de RNA-seq em diferentes tecidos (músculo esquelético, fígado, rim, cérebro) com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs). A quantidade de genes diferencialmente expressos variou entre os tecidos analisados e os clones. Os clones que apresentavam LOM na *KCNQ10T1* tiveram maior taxa de DEGs no fígado e no músculo esquelético. Os clones 1, 3 e 4 apresentaram maiores DEGs nos tecidos de fígado, rim e músculo esquelético, respectivamente. Esse mosaicismo de expressão tecido específico demonstra a necessidade de maiores caracterizações do padrão de expressão dos diferentes genes e das alterações ocorridas nos tecidos.

Após realização do sequenciamento desses genes, o estudo analisou a associação entre as DEGs com a função biológica nos diferentes tecidos. Com essa análise foi possível observar que as funções biológicas variaram muito entre os tecidos, no qual funções como “vias metabólicas de câncer” e “fosforilação oxidativa” estavam predominantes no músculo esquelético e fígado, respectivamente. A partir dessa associação, foi possível avaliar quais genes estavam com expressão alterada nos tecidos dos clones, tal como o gene *IGF2* que estava associado às vias metabólicas do câncer (CHEN et al., 2017).

No mesmo estudo foi realizado *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) para identificação de regiões de *imprinting* no tecido de músculo esquelético nos clones. Foram encontradas DMRs em 18 genes de *imprinting*, no qual 7 deles já haviam sido descritos em bovinos na literatura (*GNAS*-DMR, *H19/IGF2*-DMR, *GNASXL*-DMR, *IGF2R/AIRN*-DMR, *KvDMR1*, *PEG1/MEST*-DMR e *PLAGL1*-DMR); mais 8 novos genes já descritos em humanos e camundongos foram identificados (*NAP1L5*-DMR, *DIRAS3*-DMR, *GTL2*-DMR e *DLK1*-DMR) e 3 novas regiões foram detectadas (*BEGAIN*-DMR, *MEG*-DMR 8 e *MGC157368*-DMR). As DMRs dos novos genes de *imprinting* detectados

estavam localizadas dentro de corpos gênicos de genes de *imprinting* bovino conhecidos (CHEN et al., 2017).

Tabela 3. Análise de alteração de expressão multilocus em clones bovinos de SCNT.

Genes	Rim	Fígado	Placenta	Musculo	Cérebro	Lingua	Coração	Pulmão	Corioalantóide	Referência
BEGAIN	**									Chen et al (2015)
DIRAS3	**									Chen et al (2015)
H19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Robbins et al (2012) / Chen et al (2013)
IGF2	*	*	*		**	*	*			Chen et al (2013)
IGF2R	**	**		**						Chen et al (2015)
INPP5FV2					**					Chen et al (2015)
KCNQ1OT1	**	**/*	*	**	**/*	**	**/*	**	*	Robbins et al (2012) / Chen et al (2013/2015)
MAGEL2	**									Chen et al (2015)
NAP1L5	**									Chen et al (2015)
NNAT	**	**		**	**					Chen et al (2015)
PEG3	**									Chen et al (2015)
PHLDA2	**	*	*	**	**	**	**	**		Chen et al (2013)
PLAGL1/ZAC	**	*			*	*	*		*	Robbins et al (2012) / Chen et al (2015)
SNRPN/SNURF	**				**					Chen et al (2015)

\*\* Bialélico, \* Monoalélico, \*\*/\* Bialélico e Monoalélico

#### IV. Conclusão

- A partir desses dados, a semelhança no padrão fenotípico e epigenético entre a LOS/AOS e a SBW fica evidente. Assim, justifica-se o uso da espécie bovina para estudos sobre a etiologia de SBW.

- As características clínicas presentes na síndrome SBW podem variar dependendo da epimutação predominante. Esse tipo correlação ainda não foi realizada na LOS/AOS.

- A ocorrência de Ids, geralmente, está associada às alterações epigenéticas multilocus;

- De acordo com a maioria dos estudos relatados, os genes regulados por *imprinting* associados a essas síndromes de hipercrecimento tendem a apresentar um padrão de hipometilação (LOM).

- Os genes regulados por *imprinting* genômico apresentam um padrão de expressão tecido específico, sendo que o mesmo também foi observado em diferentes estudos na síndrome LOS/AOS.

- Esse padrão de alteração de expressão multilocus tecido específico ainda não foi relatado na síndrome SBW.

Apesar dos dados encontrados na literatura já demonstrarem que existe alteração no padrão epigenético dessas síndromes, ainda se fazem necessários estudos mais detalhados para tentar associar as epimutações às características clínicas para melhor investigação sobre etiologia e diagnóstico dessas síndromes.

## V. Referências

AMOAKO, A. A.; NAFEE, T. M.; OLA, B. Epigenetic Influences During the Periconception Period and Assisted Reproduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 15–39, 2017.

ARIMA, T. et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith – Wiedemann syndrome. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2650–2660, 2005.

AZZI, S. et al. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 24, p. 4724–4733, 2009.

AZZI, S. et al. Human Imprinting Anomalies in Fetal and Childhood Growth Disorders: Clinical Implications and Molecular Mechanisms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 1–13, 2014.

BAPLE, E. L. et al. An atypical case of hypomethylation at multiple imprinted loci. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, p. 360–362, 2011.

BARLOW, D. P.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic Imprinting in Mammals. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1–20, 2014.

BEGEMANN, M. et al. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci for human imprinted loci. **Epigenetics**, v. 7, p. 473–481, 2012.

BERTOLINI, M. et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, p. 973–994, 2002.

BETTS, D. H.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 8, p. 445–453, 2008.

BLIEK, J. et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, p. 611–619, 2009.

BLONDIN, P. et al. In vitro production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 384–9, 2000.

BRANCO, M. R.; ODA, M.; REIK, W. Safeguarding parental identity: Dnmt1 maintains imprints during epigenetic reprogramming in early embryogenesis. **Genes & Development**, v. 22, p. 1567–1571, 2008.

BRESSAN, F. F. et al. Unearthing the Roles of Imprinted Genes in the Placenta. **Placenta**, v. 30, p. 823–834, 2009.

CHEN, Z. et al. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 6, p. 591–601, 2013.

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

CHEN, Z. et al. Global misregulation of genes largely uncoupled to DNA methylome epimutations characterizes a congenital overgrowth syndrome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–14, 2017.

CHENG, X. Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, p. 1–23, 2014.

CHOUFANI, S.; SHUMAN, C.; WEKSBERG, R. Beckwith – Wiedemann Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 354, p. 343–354, 2010.

CONSTÂNCIA, M. et al. Deletion of a silencer element in *Igf2* results in loss of imprinting independent of *H19*. **Nature America**, v. 26, p. 203–206, 2000.

COURT, F. et al. Genome-Wide Allelic Methylation Analysis Reveals Disease-Specific Susceptibility to Multiple Methylation. **Human Mutation**, v. 34, p. 595–602, 2013.

D'CRUZ, N. T. et al. Putative imprinted gene expression in uniparental bovine embryo models. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 589–597, 2008.

DE MOUZON, J. DE et al. Assisted reproductive technology in Europe , 2006 : results generated from European registers by ESHRE †. **Human Reproduction**, v. 25, n. 8, p. 1851–1862, 2010.

DEBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 1, p. 156–60, 2003.

DELAVAL, K. et al. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 3, p. 720–729, 2007.

DEMARS, J.; GICQUEL, C. Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith – Wiedemann and Silver – Russell syndromes. **Clinical Genetics**, v. 81, p. 350–361, 2012.

DOCHERTY, L. E. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. **Epigenetics**, v. 51, p. 229–238, 2014.

EGGERMANN, T. et al. Congenital Imprinting Disorders: A Novel Mechanism Linking Seemingly Unrelated Disorders. **The Journal of Pediatrics**, v. 163, p. 1202–1207, 2013.

EGGERMANN, T. et al. Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: An urgent need for multi-locus testing. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 7, p. 769–777, 2014.

EGGERMANN, T. et al. Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 1–18, 2015b.

EGGERMANN, T. et al. Congenital imprinting disorders: EUCID . net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 1–10, 2015a.

EGGERMANN, T. et al. Prenatal molecular testing for Beckwith – Wiedemann and Silver – Russell syndromes: a challenge for molecular analysis and genetic counseling. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, p. 784–793, 2016.

EGGERMANN, T.; EGGERMANN, K.; SCHÖNHERR, N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 4, p. 195–204, 2008.

EL HAJJ, N.; HAAF, T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: Implications for human assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 3, p. 632–641, 2013.

ENGEL, J. R. et al. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 37, p. 921–926, 2000.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178–191, 2006.

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

GIRARDOT, M.; FEIL, R.; LLÈRES, D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications Review. **Epigenomics**, v. 5, p. 715–728, 2013.

GONG, Z. J. et al. Aberrant expression of imprinted genes and their regulatory network in cloned cattle. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 858–866, 2012.



GRAFODATSKAYA, D.; BASRAN, R.; WEKSBERG, R. An Update on Molecular Diagnostic Testing of Human Imprinting Disorders. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 6, p. 3–17, 2017.

GUTIERREZ-ADAN; WHITE., C. R.; SOOM, A. VAN. Why we should not select the faster embryo : lessons from mice and cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 765–775, 2015.

HALLIDAY, J. et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. **American journal of human genetics**, v. 75, p. 514–517, 2004.

HENCKEL, A. et al. Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 3, p. 606–615, 2012.

HIURA, H. et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 27, n. 8, p. 2541–8, ago. 2012.

HORSTHEMKE, B. In Brief: Genomic imprinting and imprinting diseases. **Journal of Pathology**, v. 232, p. 485–487, 2014.

JOHN, R. M.; LEFEBVRE, L. Developmental regulation of somatic imprints. **Differentiation**, v. 81, n. 5, p. 270–280, 2011.

KAGAMI, M. et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3 -DMR at the 14q32 . 2 imprinted region in two patients with Silver – Russell Syndrome-compatible phenotype. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, p. 1062–1067, 2015.

KANDURI, C. Long noncoding RNAs: Lessons from Genomic imprinting. **BBA - Gene Regulatory Mechanisms**, p. 1–34, 2015.

KANEDA, M. Genomic imprinting in mammals-Epigenetic parental memories. **Differentiation**, v. 82, n. 2, p. 51–56, 2011.

KANEDA, M.; NAGAI, T. Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis. **Animal Science Journal**, p. 1–8, 2017.

KANEKO, S. et al. Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin. **Mol Cell**, v. 23, n. 2, p. 290–300, 2014.

KHOSLA, S. et al. Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expression of Imprinted Genes 1. v. 926, p. 918–926, 2001.

KIM, J. DO et al. Rex1 / Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 7, p. 1353–1362, 2011.

KUROIWA, M. et al. Manifestation of alveolar rhabdomyosarcoma as primary cutaneous lesions in a neonate with Beckwith-Wiedemann syndrome. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 44, p. 31–35, 2009.

LAMBERTINI, L. et al. Imprinted gene expression in fetal growth and development. **Placenta**, v. 33, p. 480–486, 2012.

LAMBERTINI, L. Genomic imprinting : sensing the environment and driving the fetal growth. **Curr Opin Pediatr.**, v. 26, p. 237–242, 2014.

LEE, B. et al. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, v. 436, p. 641–649, 2005.

LI, Y.; SASAKI, H. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. **Nature Publishing Group**, v. 21, n. 3, p. 466–473, 2011.

LIM, D. et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 741–7, mar. 2009.

MA, P. et al. Metastasis Tumor Antigen 2 ( MTA2 ) Is Involved in Proper Imprinted Expression of H19 and Peg3 During Mouse Preimplantation Development 1. **Biology of Reproduction**, v. 1035, p. 1027–1035, 2010.

MACKAY, D. et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. **Human Genetics**, v. 120, p. 262–269, 2006.

MACKAY, D. J. G. et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. **Nature genetics**, v. 40, n. 8, p. 949–951, 2008.

MACKAY, D. J. G. et al. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. **Biomolecular Concepts**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2015.

MAEDA, T. et al. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith – Wiedemann syndrome with epimutations. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 12, p. 903–912, 2014.

MAGEE, D. A. et al. Imprinted loci in domestic livestock species as epigenomic targets for artificial selection of complex traits. **Animal Genetics**, v. 45, p. 25–39, 2014.

MAGER, J. et al. Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. **Nature**, v. 33, p. 502–507, 2003.

MARSIT, C. J. et al. Placenta Imprinted Gene Expression Association of Infant Neurobehavior. **Journal of Pediatric**, v. 160, n. 5, p. 854–860, 2013.

MEYER, E. et al. Germline Mutation in NLRP2 ( NALP2 ) in a Familial Imprinting Disorder ( Beckwith-Wiedemann Syndrome ). **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, p. 3–7, 2009.

MILLER, W. et al. 28-Way vertebrate alignment and conservation track in the UCSC Genome Browser. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1797–1808, 2007.

MOHAMMAD, F. et al. Epigenetics of imprinted long non-coding RNAs Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. **Epigenetics**, v. 4, p. 277–286, 2009.

MONK, D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, p. 1–11, 2015.

NAKAMURA, T. et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. **Nature**, p. 2–7, 2012.

NATOLI, G.; ANDRAU, J. Noncoding Transcription at Enhancers : General Principles and Functional Models. **Annu Review Genetics**, v. 46, p. 1–19, 2012.

PANNETIER, M.; FEIL, R. Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 556–562, 2007.

PARK, Y. J. et al. Sequences Sufficient for Programming Imprinted Germline DNA Methylation Defined. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.

PETERS, J. The role of genomic imprinting in biology and disease : an expanding view. **Nature Reviews Genetics**, p. 1–14, 2014.

POOLE, R. L. et al. Targeted Methylation Testing of a Patient Cohort Broadens the Epigenetic and Clinical Description of Imprinting Disorders. **American Journal of Medical Genetics**, v. 161, p. 2174–2182, 2013.

PROUDHON, C. et al. Protection against De Novo Methylation Is Instrumental in Maintaining Parent-of-Origin Methylation Inherited from the Gametes. **Molecular Cell**, v. 47, p. 909–920, 2012.

QUENNEVILLE, S. et al. In Embryonic Stem Cells , ZFP57 / KAP1 Recognize a Methylated Hexanucleotide to Affect Chromatin and DNA Methylation of Imprinting Control Regions. **Molecular Cell**, v. 44, p. 361–372, 2011.

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

RODRIGUEZ-OSORIO, N. et al. Comparative functional genomics of mammalian DNA methyltransferases. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 20, p. 243–255, 2010.

ROSSIGNOL, S. et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith—Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. **Journal of medical genetics**, v. 43, p. 902–907, 2006.

RUDDOCK, N. T. et al. Analysis of Imprinted Messenger RNA Expression During Bovine Preimplantation Development 1. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1131–1135, 2004.

SANCHEZ-DELGADO, M. et al. Causes and Consequences of Multi-Locus Imprinting Disturbances in Humans. **Trends in Genetics**, p. 1–12, 2016.

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, out. 2015.

SANO, S. et al. Beckwith – Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type Ib in a patient with multilocus imprinting disturbance : a female-dominant phenomenon ? **Journal of Human Genetics**, p. 1–5, 2016.

SANTOS, M. A.; KUIJK, E. W.; MACKLON, N. S. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. **Reproduction**, v. 139, p. 23–34, 2010.

SASAKI, K. et al. Japanese and North American/European patients with Beckwith-Wiedemann syndrome have different frequencies of some epigenetic and genetic alterations. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 15, n. 12, p. 1205–10, 2007.

SHEN, C.-J. et al. Imprinted genes and satellite loci are differentially methylated in bovine somatic cell nuclear transfer clones. **Cellular reprogramming**, v. 15, n. 5, p. 413–24, 2013.

SHI, D. et al. Buffalos ( *Bubalus bubalis* ) Cloned by Nuclear Transfer of Somatic Cells 1. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 285–291, 2007.

SHI, L.; WU, J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, p. 1–11, 2009.

SMITH, L. C. et al. Developmental and Epigenetic Anomalies in Cloned Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 107–114, 2012.

SOEJIMA, H.; HIGASHIMOTO, K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith – Wiedemann syndrome and related disorders. **Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 402–409, 2013.

SOELLNER, L. et al. Congenital imprinting disorders : Application of multilocus and high throughput methods to decipher new pathomechanisms and improve their management \*. **Molecular and Cellular Probes**, p. 1–9, 2015.

STELZER, Y. et al. The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1 - DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. **Nature Genetics**, 2014.

SU, H. et al. Molecular structure of bovine Gtl2 gene and DNA methylation status of Dlk1-Gtl2 imprinted domain in cloned bovines. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 23–30, 2011.

TEE, L. et al. Epimutation profiling in Beckwith-Wiedemann syndrome: relationship with assisted reproductive technology. **Clinical Epigenetics**, v. 5, p. 1–10, 2013.

TERRANOVA, R. et al. Polycomb Group Proteins Ezh2 and Rnf2 Direct Genomic Contraction and Imprinted Repression in Early Mouse Embryos. **Developmental Cell**, v. 15, p. 668–679, 2008.

TIAN, X. C. Genomic Imprinting in Farm Animals. **Annu Rev Anim Biosci**, v. 2, p. 23–40, 2014.

TURNER, C. L. S. et al. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 18, n. 6, p. 648–55, 2010.

TVEDEN-NYBORG, P. Y. et al. Analysis of the expression of putatively imprinted genes in bovine peri-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 70, p. 1119–1128, 2008.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803–15, jun. 2014.

UYAR, A.; SELI, E. The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, p. 210–221, 2014.

VALS, M. et al. The Frequency of Methylation Abnormalities Among Estonian Patients Selected by Clinical Diagnostic Scoring Systems for Silver–Russell Syndrome and Beckwith–Wiedemann Syndrome. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 19, n. 12, p. 684–691, 2015.

WEAVER, J. R.; BARTOLOMEI, M. S. Chromatin regulators of genomic imprinting. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1–9, 2013.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; BECKWITH, B. Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 8–14, 2010.

WILLIAMSON, C. M. et al. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. **Nature Genetics**, v. 38, n. 3, p. 350–355, 2006.

WOSSIDLO, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature Communications**, v. 2, p. 1–8, 2011.

WRENZYCKI, C. et al. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos : relationship to the large offspring syndrome ? **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 593–603, 2004.

YANG, L. et al. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 431–438, 13 maio 2005.

ZHANG, T. et al. The interplay of histone modifications – writers that read. **EMBO Reports**, v. 16, n. 11, p. 1467–1481, 2015.

## CAPÍTULO II

### **Análise do padrão de metilação do DNA multilocus em amostras de bovinos provenientes de transferência nuclear**

Paula Magnelli Mangiavacchi,<sup>a</sup> Maria Clara Caldas-Bussiere,<sup>a</sup> Mariana da Silva Mendonça,<sup>c</sup> Priscila de Sousa Ferreira,<sup>c</sup> Rodolfo Rumpf,<sup>d</sup> Paulo Edson Soares Lemos Júnior,<sup>d</sup> Carla Soares Alves,<sup>d</sup> Warlei da Silva Carneiro,<sup>d</sup> Álvaro Fabrício Lopes Rios,<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal - LRMGA. Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuárias - CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biotecnologia - LBT. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia do Reconhecer – LBR. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>d</sup> Geneal Genética Animal – Análise, Pesquisa e Laboratório S/A, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

## Resumo

O mecanismo epigenético de *imprinting* genômico é caracterizado pela expressão monoalélica parental específica, sendo este essencial durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos. Devido ao seu estabelecimento e manutenção estarem associados às fases iniciais do desenvolvimento, as alterações no padrão de *imprinting* podem ocasionar síndromes decorrentes das falhas na regulação gênica. O surgimento de determinadas síndromes ocorrem em maior proporção nos protocolos de tecnologias de reprodução assistida (ART), como fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de célula somática (SCNT). Percebe-se que o ambiente *in vitro* dessas biotécnicas pode ocasionar instabilidade epigenética para os gametas e embriões em desenvolvimento. Síndromes como a *Large Offspring Syndrome* (LOS) / *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS) em bovinos e Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) em humanos têm maior incidência em progênes provenientes de ART. Essas síndromes estão associadas à desregulação dos genes de *imprinting*, através da perda ou ganho de metilação do DNA. Dentre os genes regulados por *imprinting* genômico já descritos, os genes *IGF2*, *H19* e *KCNQ1OT1* têm sido relacionados com o surgimento de ambas síndromes. Recentemente, estudos têm associado a ocorrência de evento de alteração de metilação multilocus (MLMD) com o surgimento dessas síndromes, como os genes *PEG1/MEST*, *GNAS*, *SNRPN*, *GRB10*, entre outros. Porém, embora a síndrome humana e a bovina apresentem similaridades clínicas e moleculares, existem poucas informações sobre as alterações nos genes regulados por *imprinting* em bovinos provenientes de transferência nuclear. Portanto, o presente estudo visou analisar o padrão de metilação do DNA nos genes *H19* (*H19-DMR*), *KCNQ1OT1* (*KvDMR1*) e *PEG1/MEST* (*PEG1-DMR*) em tecidos de clones bovinos que não sobreviveram após o nascimento e animais controles (concebidos naturalmente). Através das análises quantitativas de metilação do DNA por PCR quantitativo (Real Time), foram observadas alterações nos níveis de metilação do DNA na *KvDMR1* em ambos tecidos analisados (coração e fígado) em clones. No entanto, esse tipo de alteração epigenética não foi encontrada na *H19-DMR*, em comparação com os valores obtidos nos animais controles. Assim como a ocorrência de perda (LOM) e ganho (GOM) de metilação no gene *PEG1/MEST-DMR* de maneira indivíduo e



tecido-específico. Mesmo entre os animais gerados pela mesma doadora de núcleo, foi encontrada epimutação (LOM e GOM) na CGI analisada. Esse trabalho é o primeiro relato de epimutação na *PEG1/MEST*-DMR em clones bovinos. Os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados na literatura para alterações epigenéticas em ambas as DMRs na SBW. O que reforça a utilização da espécie bovina como modelo para estas síndromes na espécie humana. Contudo, estudos mais detalhados devem ser realizados para investigação de outras DMRs que podem estar sendo afetadas, assim como para associação das alterações moleculares presentes na LOS/AOS com as características fenotípicas predominantes nessa síndrome.

**Palavras-chave:** *H19*, *KCNQ1OT1*, *PEG1/MEST*, *imprinting* genômico, metilação do DNA, tecnologias de reprodução assistida

## Abstract

The epigenetic mechanism of genomic imprinting is characterized by the specific parental monoallelic expression, being essential during the embryonic development of mammals. Due to genomic imprinting establishment and maintenance with early developmental stages, changes in the imprinting pattern can lead to syndromes owing to gene regulation failures. The occurrence of certain syndromes occurs in a greater proportion in the protocols of Assisted Reproduction Technologies (ART), such as in vitro fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). In such a way that the in vitro environment of these techniques can induce epigenetic instability for the gametes and embryos in development. Syndromes such as Large Offspring Syndrome (LOS)/Abnormal Offspring Syndrome (AOS) in cattle and Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) in humans have a higher incidence in progenies from ART. These syndromes are associated with deregulation of imprinting genes, through the loss or gain of DNA methylation. Among the genomic imprinting regulated genes already described, genes *H19* and *KCNQ1OT1* have been related to the onset of both syndromes. Recently, studies have associated the occurrence of multilocus methylation defects (MLMD) with the onset of these syndromes, such as *PEG1/MEST*, *GNAS*, *SNRPN*, *GRB10*, among others. However, although the human and bovine syndrome have clinical and molecular similarities, there is little information on changes in genes imprinted in cattle from nuclear transfer. Therefore, the present study aimed to analyze the DNA methylation pattern in the genes *H19* (*H19*-DMR), *KCNQ1OT1* (*KvDMR1*) and *PEG1/MEST* (*PEG1*-DMR) in bovine clone tissues that did not survive after birth and control animals (naturally designed). Through quantitative DNA methylation analyzes by quantitative PCR (Real Time), changes in DNA methylation levels in *KvDMR1* were observed in both tissues analyzed (heart and liver) in clones. However, this type of epigenetic change was not found in *H19*-DMR when compared to values obtained in the control animals. As well as the occurrence of loss (LOM) and methylation gain (GOM) in the *PEG1/MEST*-DMR gene in an individual and tissue-specific manner. Even in the animals generated by the same core donor, epimutation (LOM and GOM) was found in the analyzed CGI. This work is the first report of epimutation in *PEG1/MEST*-DMR in bovine clones. The results of the present study are similar to those found in the literature for epigenetic

changes in both DMRs in BWS. This reinforces the use of the bovine species as a model for the human syndrome. However, further studies should be performed to investigate other DMRs that may be affected, as well as to associate the molecular alterations present in LOS/AOS with the predominant phenotypic characteristics in this syndrome.

**Key words:** *H19*, *KCNQ1OT1*, *PEG1/MEST*, genomic imprinting, DNA methylation, assisted reproduction

## I. Introdução

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético que leva a expressão diferencial de um gene, no qual apenas um dos alelos parentais é expresso. Trata-se de um fenômeno, cujo estabelecimento inicia-se no desenvolvimento das células germinativas primordiais (BARLOW, 2011; DELAVAL et al., 2007) e é essencial ao desenvolvimento de mamíferos. Durante a gametogênese, padrões distintos de metilação do DNA e modificações de histonas são estabelecidos em elementos regulatórios, conhecidos como regiões controladoras de *imprinting* (ICRs, *Imprinting Control Region*) (SANLI; FEIL, 2015). Depois da fecundação, essa assimetria molecular resulta em uma expressão monoalélica parental específica em cada *loci* regulado por *imprinting* genômico (SANLI; FEIL, 2015). Por estar associada às fases importantes no crescimento e desenvolvimento embrionário, a desregulação da expressão de genes de *imprinting* pode ocasionar anomalias congênitas e tumores (SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013).

O ganho (GOM, *Gain Of Methylation*) e a perda (LOM, *Loss Of Methylation*) de metilação do DNA são eventos de epimutação que podem influenciar a regulação gênica, afetando negativamente a eficiência das tecnologias de reprodução assistida (ARTs, *Assisted Reproductive Technologies*). Essas características de metilação do DNA estão associadas as ARTs, principalmente, a transferência nuclear de célula somática (SCNT), a fertilização *in vitro* (IVF) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (CHEN et al., 2015; DEBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003; KAGAMI et al., 2007; NELISSEN et al., 2013; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). Tanto a GOM quanto a LOM podem contribuir para a perda de *imprinting* (LOI, *Loss Of Imprinting*), caracterizada pela interrupção do perfil de transcrição monoalélica dos genes regulados por *imprinting* genômico.

A ocorrência de eventos de LOI em humanos e bovinos provenientes de ART estão associados ao desenvolvimento fenotípico anormal, ao hipercrecimento; à macroglossia; à hérnia umbilical; à visceromegalia e à hipoglicemia neonatal (CHEN et al., 2013). Em ruminantes, esses fenótipos em animais derivados de ARTs induzem a síndrome do bezerro grande (LOS/AOS, *Large Offspring Syndrome/Abnormal Offspring Syndrome*), considerado um

modelo animal para a síndrome humana Beckwith-Wiedemann (SBW) (CHEN et al., 2013). Em humanos, a epimutação em distúrbios nos genes de *imprinting* genômico pode surgir em um padrão multilocus e tecido específico (MACKAY et al., 2015; SPENGLER et al., 2011).

A associação entre o surgimento de síndromes provenientes de ARTs e epimutações nos genes de *imprinting* ocorrem devido à manipulação dos gametas (maturação, criopreservação), embrião, meios de cultivo e outros (KOHDA; ISHINO, 2012; ZHENG et al., 2011). Nas síndromes SBW e LOS/AOS, os genes *H19/IGF2* e *KCNQ1OT1* são, frequentemente, relatados na literatura devido às epimutações por meio de LOM e GOM (CHEN et al., 2013; SHEN et al., 2012; SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013). Porém, recentemente estudos têm demonstrado que essas síndromes podem surgir devido à alterações multilocus de metilação do DNA (MLMD), não sendo exclusivamente causadas por alteração em um único *locus* (COURT et al., 2013; SAZHENOVA et al., 2012).

Tem-se sido sugerido que a ocorrência de epimutação multilocus é clinicamente relevante (TEE et al., 2013). Entretanto, para comprovar o padrão multilocus tecido específico em animais doméstico derivados de ART, são requeridas maiores investigações. Tanto humanos como em bovinos provenientes de ARTs, um conjunto de genes de *imprinting* genômico já foi caracterizado para ocorrência de epimutações, como por exemplo, os genes *IGF2R*, *SNRPN*, *GRB10*, *PEG10*, *LIT1*, *IGF2*, *H19* e *PEG1/MEST* (COCCHI et al., 2013; DEBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003; GONG et al., 2012; HIURA et al., 2014; HORI et al., 2010; JR et al., 2009; LIU et al., 2008; LONG; CAI, 2007; SUZUKI et al., 2011; YANG et al., 2005).

O gene *PEG1/MEST* (*Paternally Expressed Gene 1/Mesoderm Specific Transcript*), regulado por *imprinting* genômico, sofre alterações em indivíduos provenientes de ART (ROSSIGNOL et al., 2006). A ocorrência de GOM ou LOM na região, diferencialmente, metilada (DMR) do gene *PEG1/MEST* humano já foi relatada em pacientes de SBW e na síndrome de Silver-Russell (SRS) (HIURA et al., 2012; KAGAMI et al., 2007; LIM et al., 2009; ROSSIGNOL et al., 2006). A metilação anormal do *PEG1/MEST*-DMR em pacientes de SBW e SRS é, frequentemente, vista junto com a epimutação em outras DMRs, como *H19*-DMR e *KvDMR1*. Tal ocorrência sugere que seja a causa seja um evento

multilocus (HIURA et al., 2012; LIM et al., 2009; ROSSIGNOL et al., 2006). Embora seja relatada em humanos, a epimutação do *PEG1/MEST* ainda não está muito bem descrita em clones bovinos gerados por transferência nuclear.

O gene *H19* encontra-se, altamente, expresso durante a embriogênese, especialmente, nos tecidos mesodérmicos e endodérmicos. A partir da expressão do alelo materno, este gene produz ncRNA. Dentro do seu *cluster* genômico encontra-se o gene *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*). Ambos genes regulados pelo mesmo centro de controle de *imprinting* (ICR), denominado ICR1. O ICR1 comporta-se como uma DMR gamética, com a metilação ocorrendo no alelo paterno (SAKIAN et al., 2015). Por estarem associados a mesma ICR, esses genes apresentam nível de expressão similar nos tecidos embrionários (GABORY; JAMMES; DANDOLO, 2010; SASAKI; ISHIHARA; KATO, 2000). Diferentemente do gene *H19*, o *IGF2* é expresso somente pelo alelo paterno, sendo capaz de promover o crescimento fetal e placentário durante a embriogênese devido a sua função de proliferação celular. O *H19*, por sua vez, apresenta função de repressão oncogênica (NORDIN et al., 2014).

A ICR1 possui sítios de ligação de uma proteína insuladora CTCF. Esta proteína é capaz de se ligar no alelo materno não metilado, o que permite a expressão do gene *H19*. Por outro lado, no alelo paterno, a metilação da DMR na ICR1 impede a ligação da proteína CTCF. Desse modo, um *enhancer* a jusante do *H19* age sobre a região promotora do gene *IGF2* permitindo sua expressão (BELL; FELSENFELD, 2000; SZABÓ et al., 2000). Portanto, a ligação do CTCF e a metilação na ICR1 regulam a expressão monoalélica parental específica entre esses dois genes. Assim, temos estudos que já demonstraram que a epimutação, por perda ou ganho de metilação, no sítio ligante de CTCF causa perda do padrão de expressão monoalélico de *H19/IGF2* (ENGEL; THORVALDSEN; BARTOLOMEI, 2006; HAN; LEE; SZABO, 2008; KURUKUTI et al., 2006).

Em humanos, o *cluster H19/IGF2* está localizado no cromossomo 11p15.5, e sua alteração tem sido associada as síndromes Beckwith-Wiedemann e Silver-Russell. Estudos descrevem que a ICR1 encontra-se hipermetilada e hipometilada nas síndromes SBW e SRS, respectivamente (AZZI; ABI; NETCHINE, 2014; JACOB; ROBINSON; LEFEBVRE, 2013). A hipermetilação da ICR1 está relacionada com o ganho de função do gene *IGF2*,

resultando em expressão bialélica e na perda da expressão de *H19* (SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013). Sabendo-se que a função do *IGF2* é promover o crescimento fetal, a alteração de expressão em pacientes SBW resulta no aumento de peso dos indivíduos afetados, dando a característica de hiper crescimento da síndrome (EGGERMANN et al., 2014; MAEDA et al., 2014).

Juntamente com a perda de *imprinting* (LOI) ocorrida no *loci H19/IGF2* em pacientes SBW, é descrita a ocorrência de epimutação no *locus* do gene *KCNQ1OT1*. Este gene também se encontra no cromossomo 11p15.5 e, em humanos, está associado à região controladora de *imprinting* 2 (ICR2), sendo esta composta pelos genes *KCNQ1*, *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *PHLDA2*, *SCL22A18*, *TSSC4*, *CD81*, *ASCL2*, *TH*, *OSBPL5* (MANCINI-DINARDO et al., 2006, 2003). O domínio do gene *KCNQ1* contém uma região diferencialmente metilada (*KvDMR1*), estando localizada na ICR2. A *KvDMR1* está associada à regulação da expressão dos genes no *cluster* através do controle da expressão do gene *KCNQ1OT1* (*LIT1*) (GUSEVA; MONDAL; KANDURI, 2012; SHIN; FITZPATRICK; HIGGINS, 2008).

O ncRNA *KCNQ1OT1* é transcrito a partir do alelo paterno na direção antisense ao gene *KCNQ1*. Já no alelo materno, a ICR2 está metilada e o *KCNQ1OT1* silenciado, permitindo a expressão dos outros genes dentro do *cluster*. Em relação à SBW, a maior causa do surgimento dessa síndrome (50-60%) é a perda de metilação (LOM) da ICR2, resultando na expressão bialélica do *KCNQ1OT1* e no silenciamento dos outros genes do *cluster* de *imprinting* (CHIESA et al., 2012). Outras causas da SBW são a dissomia uniparental paterna (20%) e as mutações no gene *CDKN1C* (aprox. 1%) (ROMANELLI et al., 2011).

Assim como a Beckwith-Wiedemann, a LOS/AOS apresenta uma combinação de características clínicas, como macroglossia, macrossomia, gestação prolongada, organomegalia e desenvolvimento anormal dos membros. Da mesma maneira, clones gerados por transferência nuclear (SCNT) apresentam perda de *imprinting* (LOI) na ICR2, embora estudos recentes demonstrem alterações em outros *loci* de *imprinting* (CHEN et al., 2013, 2015).

Devido às similares das características clínicas e moleculares entre as síndromes SBW e LOS/AOS e pela impossibilidade de se estudar embriões humanos, a espécie bovina tem sido muito utilizada como modelo para estudos da etiologia de síndromes provenientes de ART. Ademais, a investigação das alterações epigenéticas e taxa de variabilidade podem contribuir para a identificação de fatores que influenciam a estabilidade molecular de muitos genes. Dessa forma, novas estratégias e protocolos para aperfeiçoar as biotecnologias de reprodução podem ser considerados como uma ferramenta de reprodução assistida animal. Com base nisso, o presente estudo visou analisar o padrão de metilação do DNA nas regiões *H19-DMR* e *KvDMR1* e *PEG1/MES-TDMR* em tecidos somáticos de clones bovinos gerados por SCNT que não sobreviveram após nascimento.



## **II. Metodologia**

### **II.I Material biológico**

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas no banco de tecidos de clones da empresa GENEAL – Genética Animal (Uberaba – MG, Brasil). A Geneal é autorizada pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Gado e Suprimento) e utiliza a tecnologia patenteada por VIAGEN LC com o INPI. Os tecidos de fígado e coração foram escolhidos para análise do padrão de metilação do DNA, sendo estes coletados por biópsia logo após morte dos animais. 12 clones do sexo feminino foram analisados e foram divididos em grupos com base na doadora de núcleo: A (A1, A2, A3 e A4), B (B1, B2, B3 e B4), C (C1 e C2), D1 e E1.

Como controle do estudo foram coletados os mesmos tecidos de animais provenientes de reprodução natural no matadouro de Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil. Os tecidos dos animais controle também foram obtidos logo após sua morte. Após a coleta, todos os tecidos foram armazenados em RNAlater® (Ambion), e congelados no freezer -70°C até a extração do DNA.

### **II.II Características clínicas dos clones**

Utilizando os dados fornecidos pela empresa Geneal Genética, foi possível reportar as características clínicas dos clones analisados. Foram avaliados o peso ao nascer, o tempo de gestação da receptora, tempo de sobrevivência do clone e as características clínicas observadas. Dentro dos 12 clones analisados, alguns eram provenientes da mesma doadora de núcleo celular. Portanto, os clones foram divididos em grupos de acordo com a sua doadora, sendo divididos entre os grupos A, B, C, D e E. Os grupos A, B e C apresentam clones gerados a partir da mesma doadora de núcleo (Tabela 1). De maneira que esses clones foram gerados da mesma doadora, estes podem ser considerados geneticamente idênticos.

As características observadas em todos os clones variaram até mesmo entre os clones da mesma doadora (grupos A, B e C). Sabendo-se que o peso normal de um bezerro ao nascer varia de 30 a 35Kg, cerca de 66% dos clones apresentaram pesos anormais (baixo e alto peso - 23 e 62Kg) (AKAGI; GESHI;

NAGAI, 2013; DHAKAL et al., 2013). Assim como o peso, o tempo de sobrevivência nesses animais variaram, porém todos apresentaram pouco tempo de vida, de poucas horas a no máximo 9 dias. Somente um clone conseguiu sobreviver até quase dois meses após nascimento. Muitas das características clínicas observadas nos clones são similares as encontradas na síndrome LOS/AOS, sendo predominante as alterações morfológicas nos órgãos. As anormalidades variaram desde anemia e alterações no tamanho do umbigo, até modificações morfológicas em diversos órgãos (pulmão, coração e fígado), sangramento e anemia. Os animais controles utilizados no estudo foram obtidos de matadouros na cidade de Campos dos Goytacazes e suas características fenotípicas não foram analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. **Dados clínicos dos clones analisados.** \* Dados não coletados

Clones	Peso ao nascer (Kg)	Prenhez (dias) / Temp. de sobrev.	Características fenotípicas
A1	28	266 / natimorto	*
A2	48	288 / 17 horas	Coágulo na cavidade torácica
A3	53	289 / 7 dias	Coração aumentado e edema pulmonar
A4	23	283 / 2 dias	Anemia Umbigo fino
B1	49	289 / 9 dias	Hemorragia em uma das artérias umbilicais
B2	35	294 / 40 horas	Enterite hemorrágica grave
B3	30	301 / 1 mês 21 dias	Fígado com aparência amarelada
B4	50	308 / 12 horas	Esplenomegalia e congestão hepática Bezerro grande com pescoço dobrado
C1	30	286 / 36 horas	*
C2	50	280 / 2 dias	Fígado com aparência amarelada Edema pulmonar
D1	62	291 / natimorto	*
E1	45	295 / 2 horas	Umbigo grosso Hemorragia em uma das artérias umbilicais
Controles			
F1			
F2			
F3			
		Dados não coletados	

### II.III Protocolo de transferência nuclear de célula somática

Para o protocolo de transferência nuclear de célula somática (SCNT) foram utilizados oócitos de vacas cicladas, sendo estes coletados através de aspiração folicular guiado por ultrassom (OPU). Após coleta, os oócitos foram selecionados e maturados em uma incubadora controlada com temperatura de 38,8°C e saturação de 5% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>. Os oócitos foram desnudados, e escolhidos pela presença do primeiro corpúsculo polar (maturação) e marcados com Hoechst – Bisbenzimidazole 33342.

Com o uso do micromanipulador, os núcleos dos oócitos foram retirados e reconstruídos com o núcleo celular de uma doadora do banco de células da empresa Geneal. As células utilizadas foram retiradas do banco de células, descongeladas e colocadas em cultura DMEM com soro fetal bovino e 10% de amicacina. Desse modo, os oócitos enucleados e as células doadoras de núcleo fundiram-se através de eletro fusão no equipamento BTX®, ao que se seguiu a ativação com ionomycin e 6-DMAP. Após esse procedimento, as estruturas reconstruídas foram colocadas em cultivo de oviduto sintético suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose e antibióticos (SOFaaci) sob óleo mineral em uma incubadora à 38,8°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>.

Os oócitos permaneceram em cultivo até o sétimo dia, quando os embriões formados foram selecionados, classificados e armazenados. Com os embriões formados, as vacas receptoras foram escolhidas e submetidas à transferência transcervical dos embriões. Após 30 a 35 dias de gestação, a taxa de prenhez foi avaliada por ultrassonografia transrectal. Todas as vacas foram monitoradas todo mês para avaliação do desenvolvimento placentário e fetal com ajuda de uma equipe de veterinários da Geneal.

### II.IV Desenho dos “*primers*”

Os primers utilizados foram desenhados através do software GeneRunner 5.0.37 beta. Toda sequência genômica usada para estudo do padrão de metilação do DNA da região DMR dos genes *H19*, *KCNQ10T1* e *PEG1/MEST*

foi obtida no banco de dados para o genoma bovino (Btau\_4.6.1/bosTau7) presentes no UCSC *genome browser* (<http://genome.ucsc.edu/>).

#### **II.V Extração de DNA e ensaio de MSRED-qPCR (*Modified Sensitive Restriction Enzyme Digestion* – Quantitative PCR)**

A extração do DNA genômico dos tecidos de fígado e coração dos clones e animais controles foi feita através do protocolo modificado de (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992). Após quantificação do DNA extraída usando o NanoDrop ND-2000, cerca de 200ng de DNA foram utilizadas para o ensaio de digestão enzimática. Para cada ensaio 5U da endonuclease sensível à metilação, *Hpa*II (New England Biolabs), foram usados para digerir o DNA dos tecidos. Para as amostras controle do ensaio de digestão enzimática, a mesma quantidade de enzima foi substituída por ddH<sub>2</sub>O. O ensaio de digestão enzimática foi incubado a 37°C por 4 horas em um volume final de 20µL. Após o ensaio, cada amostra digerida foi diluída a ¼ (v/v) com ddH<sub>2</sub>O para ajustar a concentração ideal de DNA para os ensaios subsequentes de qPCR.

Para análise do padrão de metilação do DNA da região DMR nos genes *H19*, *KCNQ1OT1* e *PEG1/MEST* foi realizado o ensaio de PCR quantitativo – Real Time usando o StepOnePlus™–Real Time PCR System (Applied Biosystems®), através do protocolo modificado de MSRED-qPCR (*Modified Sensitive Restriction Enzyme Digestion* – Quantitative PCR) descrito por (GOMES et al., 2009). Os *primers* utilizados para a quantificação de metilação do DNA para os genes foram: *H19*-DMR fwd – 5'-GGCTGACCAAATAGACCC-3' e, rev - 5'- ACCTTGCTGGTCTGCACAG– 3'; *KvDMR1* fwd - 5'-GGTGGATCAGCATAGCGT-3' e, rev - 5'- GGCACACCGCTTTCCACAC-3' e, *PEG1/MEST*-DMR fwd – 5' – GGGTGGGCTCTAAAAGTCG – 3' e, rev - 5'- CCTCCTCTGCGGCAACCG – 3'. A porcentagem de metilação do DNA de cada amostra foi calculada de acordo com a fórmula  $5mC \% = 100 \times 1/2^{(\Delta Ct)}$  ( $\Delta Ct = Ct$  média da amostra digerida –  $Ct$  média da amostra não digerida) (GOMES et al., 2009). Cada reação foi feita em triplicata.

## II.VI Análise estatística

A estatística feita para avaliação da metilação do DNA foi descritiva. Os dados dos grupos de clones e controle foram analisados através do software GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Os níveis de metilação do DNA com valores médios acima de 65% ou abaixo de 35% foram consideradas GOM ou LOM, respectivamente.

Para análise do evento de perda de *imprinting* (LOI), foi estabelecido como padrão normal de metilação, valores entre 35% e 65% com base nos resultados obtidos pela análise dos animais controle e por valores similares aos de WOODFINE; HUDDLESTON; MURRELL, 2011. Portanto valores abaixo de 35% ou acima de 65% foram considerados hipometilação e hipermetilação, respectivamente.

### III. Resultados

#### III.I Níveis de metilação do DNA nas regiões *KvDMR1*, *H19DMR* e *PEG1/MESTDMR*

Os dados de metilação do DNA obtidos após análise nos tecidos de fígado e coração variaram nos genes analisados. Para o gene *H19*, foram encontrados variações entre os tecidos e os clones. Para o tecido de fígado, os valores de 5mC variaram de 37,59% a 62,76%, com uma média geral de 52,65%. Embora a média de 5mC tenha variado entre os clones dentro dos grupos, o seu padrão de metilação do DNA foi similar ao encontrado nos animais controle, exceto o clone B3 que apresentou um quadro de hipermetilação (80,14%) (Figura 1A). Para o tecido de coração a média geral de 5mC foi de 48,44% (SD  $\pm$  11,90), no qual apenas dois clones apresentaram alteração no padrão normal de metilação do DNA (A1: 70,64% e E1: 23,33%) (Figura 1B).

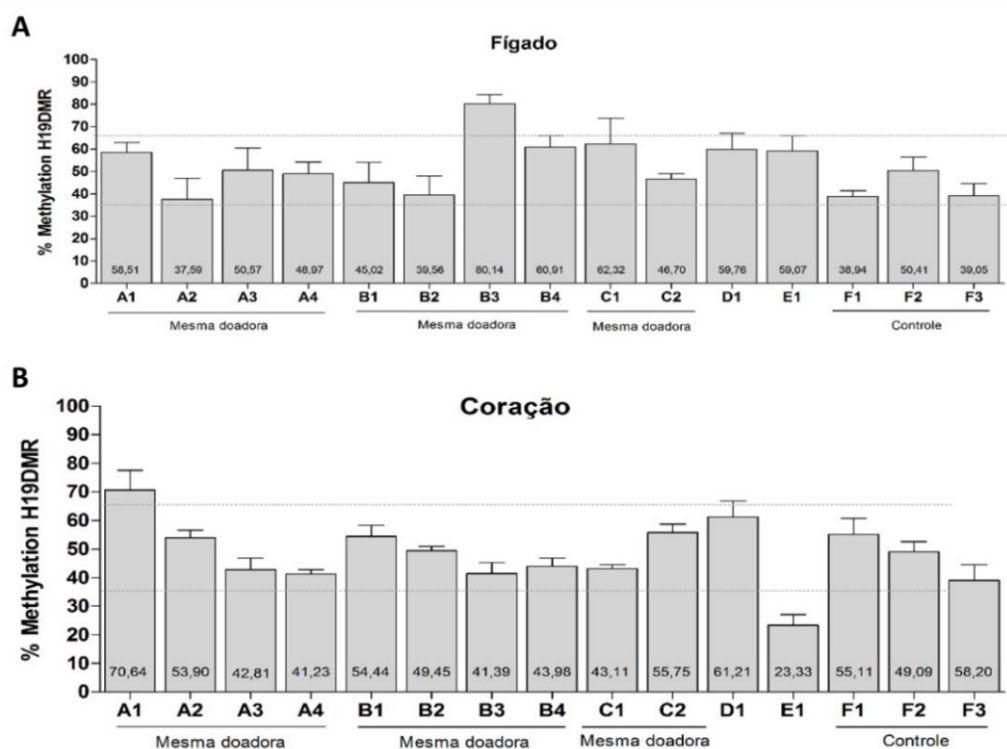


Figura 1. Níveis de metilação do DNA (5mC) no gene *H19DMR*. (A) Dados de 5mC em amostras de fígado nos clones e animais controle. (B) Dados de 5mC em amostras de coração nos clones e animais controle. Os valores dentro da barra indicam a média de metilação do DNA.

Diferentemente da *H19*-DMR, ao analisar o padrão de metilação do DNA na região DMR do gene *KCNQ1OT1*, observamos LOI em ambos tecidos. Cerca de 25% dos clones apresentaram padrão de hipometilação nas amostras de fígado, sendo que a média geral desse tecido foi de 50,90% (SD  $\pm$  21,93%) (Figura 2A). Ao analisarmos os grupos de clones provenientes da mesma doadora, percebemos uma variação de 14,89%, 22,52% e 11,61% de 5mC no fígado nos grupos A, B e C, respectivamente. Já nas amostras de coração, 83% (10/12) dos clones apresentaram LOI, com valores variando de 8,56% a 31,16%. Somente dois clones apresentaram padrão normal de metilação do DNA (A2: 36,10% e B3: 60,27%) comparado ao observado nos animais controle. Nos grupos de clones gerados pela mesma doadora, encontramos uma variação de 4,49%, 17,54% e 1,97% de 5mC no grupos A, B e C, respectivamente (Figura 2B).

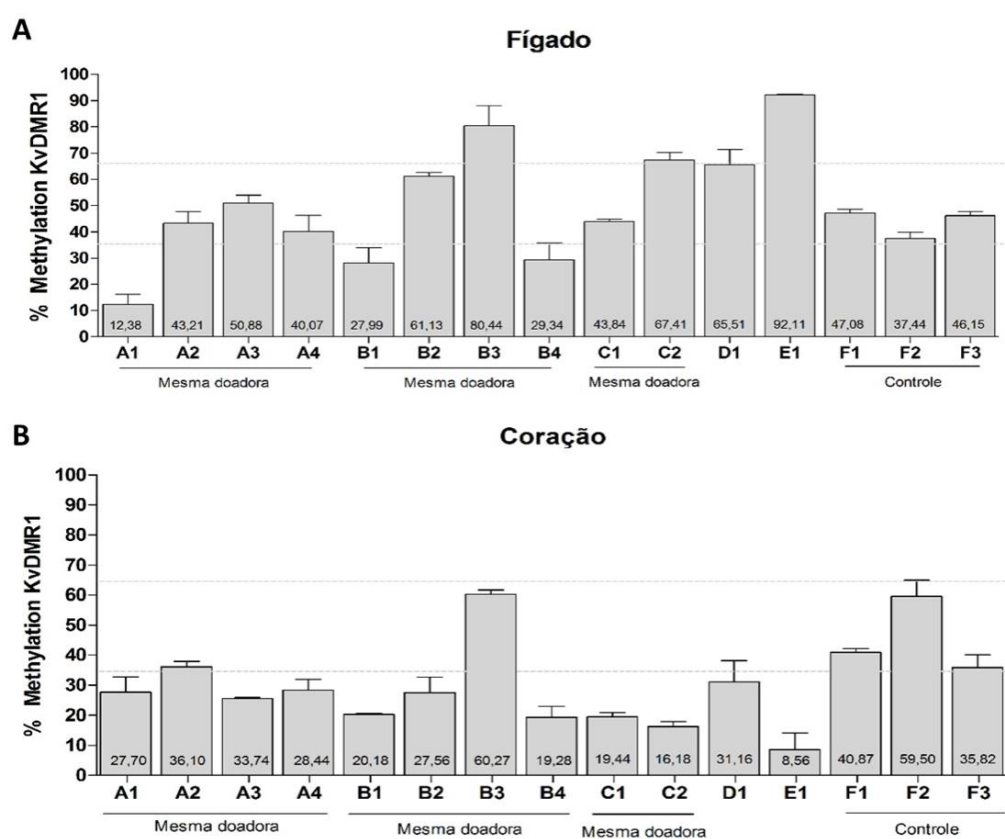


Figura 2. **Padrão de metilação do DNA no gene *KCNQ1OT1* (*KvDMR1*).** (A) Níveis de 5mC em amostras de fígado nos clones e animais controle. (B) Níveis de 5mC em amostras de coração nos clones e animais controle. Os valores dentro da barra indicam a média de metilação do DNA (5mC).



As médias de 5mC% para a região *PEG1/MEST-DMR* nas amostras de fígado e coração foram 55,37% (SD  $\pm$  14,65) e 55,42% (SD  $\pm$  23,47), respectivamente (Figura 3A e 3B). As taxas de 5mC% variaram de 29,83% a 74,63% para as amostras de fígado e de 17,72% a 90,54% para amostras de coração nos clones analisados. Duas amostras de célula espermática bovina que apresentaram metilação da *PEG1/MEST-DMR* foram analisadas para confirmar a completa ausência de metilação, ratificando a metilação parental específica na DMR investigada. Eventos de perda de metilação foram detectados em três animais de maneira tecido-específica, com valores de 5mC% variando de 17,72% a 30,03%. O ganho de metilação foi detectado em cinco animais – com variação de 66,94% a 90,57% no gene *PEG1/MEST-DMR* –, sendo que em três animais o evento ocorreu de maneira tecido-específico. Dos doze clones analisados, oito (66%) apresentaram pelo menos um tecido afetado por GOM ou LOM. A ocorrência de LOM ou GOM foi tecido-específico entre os animais dos diferentes grupos de clones, com exceção dos animais C2 e D que demonstraram ganho de metilação em ambos tecidos analisados. Portanto, para os grupos de clones, que possuem um *background* genético idêntico, verificou-se uma variação de 5mC nos eventos de perda e ganho de metilação.

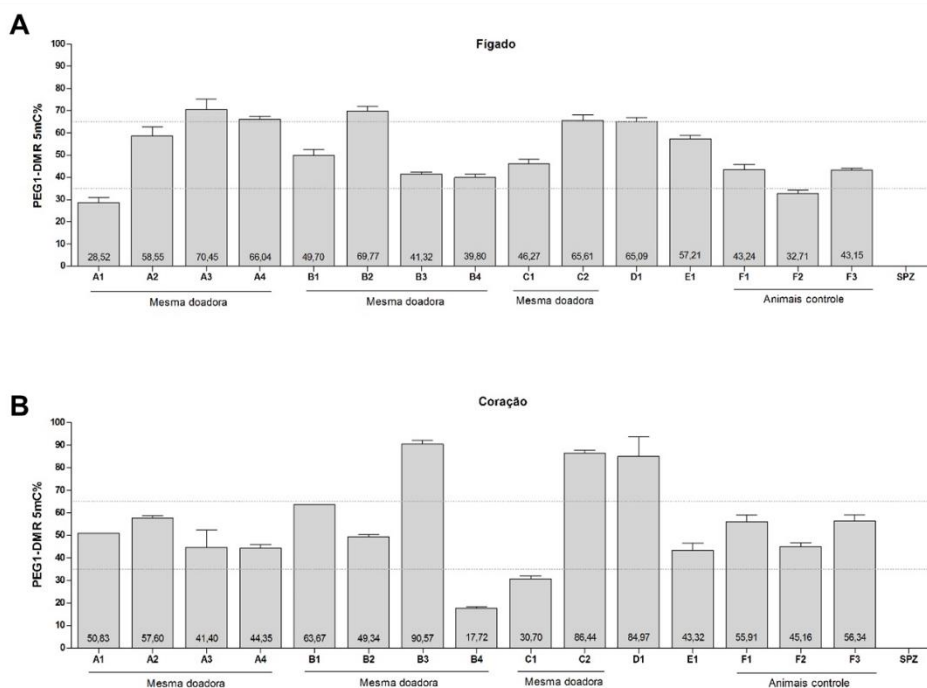


Figura 3. **Padrão de metilação do DNA no gene *PEG1/MEST* DMR.** (A) Níveis de metilação do DNA em amostras de fígado nos animais controle e clones. (B) Níveis de metilação do DNA em amostras de coração nos animais controle e clones. Os valores dentro da barra indicam a média de metilação do DNA (5mC).

### III.II Análise de alteração multilocus nas DMRs

Dos doze clones analisados, dez clones (83%) apresentaram LOM na *KvDMR1* em pelo menos um dos tecidos analisados (fígado ou coração). Desses dez clones, nove (90%) apresentaram alteração de metilação do DNA em um outro *locus* de *imprinting*. Ao analisar as variações tecido específico, observamos que para o tecido de coração, seis clones (60%) que apresentavam LOM na *KvDMR1*, também demonstraram alteração em outro *locus* de *imprinting*, o que não foi observado para o tecido de fígado (somente um clone). Nenhum dos clones analisados apresentou alterações nas três regiões estudadas simultaneamente. Ao observamos o padrão de 5mC nos grupos separadamente (grupos A, B e C), somente um clone do grupo A apresentou padrão de metilação do DNA normal nas três DMRs (clone A2), em ambos tecidos avaliados. Ao avaliar os eventos de perda e ganho de metilação, observou-se que para o tecido de coração 83% dos clones apresentaram LOM,

porém somente 25% dos clones apresentaram LOM no tecido de fígado (Tabela 2).

Embora tenha ocorrido alteração de metilação do DNA em mais de um *loci* estudado nos diferentes clones, não foi possível fazer associação entre as características moleculares observadas e as características fenotípicas presentes nos clones.

Tabela 2. Média dos valores de 5mC (%) nas DMRs analisadas. Valores abaixo de 35% foram considerados hipometilação (verde) e acima de 65% hipermetilação (vermelho).

Clones	Fígado			Clones	Coração		
	<i>KvDMR1</i>	<i>H19DMR</i>	<i>PEG1/MESTDMR</i>		<i>KvDMR1</i>	<i>H19DMR</i>	<i>PEG1/MESTDMR</i>
A1	12,38	58,52	28,51	A1	27,7	70,64	50,83
A2	43,22	37,59	58,55	A2	36,1	53,9	57,6
A3	50,89	50,57	70,45	A3	33,74	42,82	41,4
A4	40,07	48,97	66,04	A4	28,44	41,23	44,35
B1	27,99	45,03	49,7	B1	20,18	54,45	63,67
B2	61,13	39,56	69,77	B2	27,56	49,45	49,34
B3	80,44	80,15	41,33	B3	60,27	41,4	90,57
B4	29,34	60,91	39,8	B4	19,28	43,98	17,72
C1	43,85	62,32	46,27	C1	19,44	43,12	30,71
C2	67,42	46,71	65,61	C2	16,18	55,75	86,44
D1	65,51	59,76	65,09	D1	31,16	61,21	84,97
E1	92,11	59,08	57,22	E1	8,57	23,33	43,33

#### IV. Discussão

Embora as tecnologias de reprodução assistida tenham avançado muito nas últimas décadas, pouco se sabe como as etapas de manipulação dos gametas e embrião podem alterar a expressão dos genes regulados por *imprinting* genômico. Vários estudos tem focado em alterações no padrão de metilação do DNA nesses genes, uma vez que essa marca epigenética é fundamental na regulação desses genes, cuja função é essencial no início da embriogênese (CHEN et al., 2010; SATO et al., 2007).

A perda de *imprinting* (LOI) pode ocorrer devido as falhas nos fatores de regulação em *cis* e, recentemente, foram descritas alterações em fatores *trans* (UYAR; SELI, 2014). Em se tratando de tecnologias da reprodução, sabe-se que fatores externos podem induzir à epimutações, como o ambiente de cultivo *in vitro*. Porém, ainda não está claro de que forma esse ambiente causa erros nos mecanismos epigenéticos (DUPONT; SIFER, 2012; ZHENG et al., 2012).

Em bovinos, a tecnologia de transferência nuclear tem sido utilizada para animais geneticamente superiores ou, até mesmo, para estudos da área biomédica. No entanto, muitos animais gerados por essa tecnologia nascem com anomalias congênitas e possuem baixas taxas de sobrevivência (BUREAU et al., 2003; WILMUT et al., 1997). A LOS/AOS é uma síndrome em bovinos que inclui hipercrecimento com maior incidência em animais gerados por transferência nuclear (ROBBINS et al., 2012). As características clínicas dessa síndrome são similares às encontradas na síndrome humana de Beckwith-Wiedemann (SBW)(CHEN et al., 2015).

No presente estudo, foram analisados clones que não sobreviveram, sendo estes divididos em grupos de acordo com a sua fonte doadora de núcleo. Alguns tecidos foram coletados e dados clínicos anotados. A partir das análises, foi possível observar que muitos órgãos estavam com sua morfologia alterada, como por exemplo, o coração, o fígado e umbigo. De maneira semelhante, o peso dos clones apresentou variação entre baixo (23Kg) e alto (45Kg a 62Kg) peso. A duração da gestação em todos os clones analisados foi similar aos animais naturais, exceto um animal que apresentou gestação de 308 dias (CHUD et al., 2014). Devido a essas características pode-se supor

que a morte desses animais está associada a ocorrência da LOS/AOS (Tabela 1).

SHEN et al., (2013) demonstraram que todos os clones analisados em sua pesquisa apresentavam alterações no coração, fígado, rim, pulmão, de maneira similar às características fenotípicas observadas nos clones do presente estudo. O período de taxa de sobrevivência também foi de poucas horas, com somente um clone sobrevivendo até 6 meses (SHEN et al., 2013).

Vale ressaltar que a fonte de célula doadora pode influenciar a taxa de eficiência da clonagem, dependendo do tipo celular, nível de diferenciação e genótipo da célula, por exemplo (INOUE et al., 2003). A baixa eficiência da clonagem e o surgimento de anormalidades pode ser devido a incompleta reprogramação epigenética no DNA da célula doadora (INOUE et al., 2003; KOHAN-GHADR et al., 2011). Desse modo, os fenótipos anormais são causados devido a falhas epigenéticas, pois os clones provenientes de uma mesma célula doadora são geneticamente idênticos (WAKAYAMA, 2007). Tendo em vista que em nosso estudo os clones pertencentes aos grupos A, B e C são provenientes da mesma fonte de células doadoras, as alterações fenotípicas encontradas devem ser inteiramente consequência do efeito de epimutações.

Da década de 2000 até hoje, alguns estudos demonstram que os genes regulados por *imprinting* alterados na LOS/AOS e SBW são ortólogos nas duas espécies. Na SBW, sua maior ocorrência é devido ao padrão de hipometilação da ICR2 (de 50-60%) e, em alguns casos, com ganho de metilação do DNA na ICR1 (~5%) (NETCHINE et al., 2012; RICCIO; CRESCENZO; RUSSO, 2009; SOEJIMA; HIGASHIMOTO, 2013). Entretanto, recentemente outros *loci* tem sido identificados com LOI nessas síndromes, como os genes *PEG1/MEST*, *GRB10*, *GNAS*, *SNRPN*, entre outros (AZZI et al., 2010; MACKAY et al., 2015; SOELLNER et al., 2015). Portanto, em bovinos, a perda de *imprinting* pode ocorrer em *loci* diferentes do que nos genes *IGF2/H19* e *KCQN1OT1*(CHEN et al., 2015)

Ao comparar com os dados de LOI em pacientes com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann, muitos estudos apresentam resultados semelhantes ao encontrado pelo nosso estudo, em que a maioria dos casos analisados não exibem alteração no padrão de 5mC na região *H19-DMR* (BEGEMANN et al.,

2012; BLIEK et al., 2009; VALS et al., 2015). Diferentemente dos dados encontrados no presente estudo e na literatura, SHEN et al. (2013) constataram um padrão de hipometilação no gene *H19* em todos os clones, quando comparado com os animais controle. O mesmo foi visto em embriões D17 de bovinos gerados por transferência nuclear, induzindo a expressão bialélica no gene *H19* (SMITH et al., 2012).

No entanto, esses dados contradizem o que foi observado em alguns estudos de síndromes de hipercrecimento, como a SBW, em que 5% dos pacientes apresentam um quadro de hipermetilação da ICR1, induzindo a expressão bialélica do gene *IGF2* (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010; EGGERMANN et al., 2015).

Assim como é, classicamente, descrito na SBW, o padrão de hipometilação da *KvDMR1* também foi observado na maioria dos clones estudados. Em um estudo com pacientes SBW, 72% dos casos apresentaram hipometilação da ICR2, com alta incidência assim como o encontrado em nosso estudo (POOLE et al., 2013). Outros estudos também apresentam predominância da LOI na ICR2 em pacientes de SBW (COURT et al., 2013; ROSSIGNOL et al., 2006; SANO et al., 2016; TEE et al., 2013). O quadro de hipometilação da *KvDMR1* no tecido do coração observado nos clones foi correspondente ao encontrado por outros autores em clones bovinos (CHEN et al., 2013, 2015).

Considerando a heterogeneidade tecido-específica, pode-se imaginar que a ação de fatores esteja associada a regulação do *imprinting*, desde a manutenção dos perfis de metilação nas DMRs, como por exemplo, pela ação de fatores como CTCF, STELLA e ZFP157, às alterações nos padrões de herança de metilação nas DMRs.

Do mesmo modo, dentro de um mesmo cromossomo é possível encontrar alteração no *imprinting* em um gene específico e não em todos (MANCINI-DINARDO et al., 2006), como o observado nos genes *H19* e *KCNQ10T1* que estão localizados no mesmo cromossomo, tanto em humanos quanto em bovinos.

Da mesma maneira que muitos estudos que tem focado os MLMDs, o presente estudo analisou alterações epigenéticas no *PEG1/MESTDMR* bovino em clones bovinos para corroboração de alterações multilocus em animais

provenientes de ARTs. Observamos ganho e perda de metilação em 55% dos tecidos analisados (fígado e coração). Esse padrão de epimutação tem sido descrito em humanos, tanto na síndrome SBW (LOM) quanto na SRS (GOM), indicando que essa DMR pode ser alterado em diferentes padrões (TEE et al., 2013); (KAGAMI et al., 2007). O ganho de metilação foi detectado em pacientes de SRS nascidos de fertilização *in vitro* (KAGAMI et al., 2007). Por outro lado, hipometilação foi encontrada na *PEG1/MEST*-DMR em pacientes com SBW provenientes de ART (ROSSIGNOL et al., 2006; TEE et al., 2013). Nos resultados, observamos uma maior prevalência no aumento dos níveis de metilação nos tecidos analisado, sendo que oito das onze (88%) amostras de tecidos apresentaram GOM.

A alteração epigenética comportou-se de maneira tecido-específica nos dez dos doze (83%) dos clones analisados. Exclusivamente, os clones C2 e D1 apresentaram metilação anormal em ambos tecidos (Figura 3). As diferenças de detecção de ganho e perda de metilação foram relatados como sendo tecido específico tanto na síndrome SBW como na SRS com discordância somente nas células periféricas sanguíneas e epitélio bucal (MURPHY; MACKAY; MITCHELL, 2012; SPENGLER et al., 2011).

Nossos resultados corroboram com o descrito na literatura, indicando que a ocorrência específica ou co-ocorrência de epimutações para os diferentes tecidos derivados da linhagem germinativa é indicativo de que essa epimutação ocorreu em diferentes fases do desenvolvimento, afetando os diferentes tecidos.

Tendo em vista que muitos estudos recentes têm demonstrado alterações multilocus nas síndromes de ARTs, a associação entre as características clínicas e a heterogeneidade molecular ainda é uma tarefa difícil (DOCHERTY et al., 2014; EGGERMANN, 2010; MAEDA et al., 2014). Na SBW, a associação entre as características clínicas e as moleculares tem sido realizada para melhor entendimento da síndrome. Desta maneira, as alterações moleculares devido a GOM e LOM podem induzir características clínicas específicas dentro de um grupo de pacientes (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010).

Por exemplo, pacientes que possuem ganho de metilação do DNA na ICR1 apresentaram maior chance de aparecimento de tumores, como o tumor de Wilms, relacionado a expressão bialélica do gene *IGF2* (WEKSBERG;



SHUMAN; BECKWITH, 2010). Assim como a perda de 5mC na ICR2 induz a maior risco de hérnia umbilical (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010). Porém na LOS não existem dados com essas associações. Isso ilustra a necessidade de maiores investigações moleculares em animais com características de distúrbios de *imprinting* (IDs). Com base nos dados obtidos no presente estudo, não foi possível associar a ocorrência de alterações multilocus às características fenotípicas observadas nos clones de transferência nuclear devido às poucas informações fenotípicas desses.

Em vista disso, assim como a SBW, a LOS/AOS proveniente da transferência nuclear é causada devido a distúrbios epigenéticos (CHEN et al., 2015), nos quais a perda de metilação do DNA em diferentes *loci* de *imprinting* podem ocorrer durante a reprogramação do núcleo celular somático e/ou durante o desenvolvimento. Os resultados do presente estudo reforçam a LOS/AOS como uma síndrome MLMD e como modelo para doenças de *imprinting* humanas. Os resultados aqui apresentados também reforçam a necessidade de novos estudos de análise dos perfis de 5mC em um número maior de genes regulados por *imprinting* genômico com um maior número de *loci* em bovinos, assim como a associação das alterações multilocus com as características fenotípicas nos clones analisados.

## V. Conclusões

- Tendo em vista a presença de características de hipercrecimento em alguns clones do presente estudo, assim como anomalias nos órgãos, pode-se supor que a morte desses clones está relacionada à ocorrência da LOS/AOS;
- O padrão de perda de *imprinting* observado na *KvDMR1* nos clones é semelhante ao observado na síndrome SBW, como descrito na literatura;
- O padrão de metilação tecido-específico encontrado nas regiões *H19-DMR*, *KvDMR1* e *PEG1/MEST-DMR* é um indicativo da ação de fatores de regulação, dando essa característica heterogênea aos genes regulados por *imprinting*;
- Devido ao mosaicismo do padrão de metilação do DNA encontrado nos genes *H19*, *KCNQ1OT1* e *PEG1/MEST*, outros cluster de *imprinting* devem ser analisados para avaliação de eventos multilocus em clones gerados por transferência nuclear;
- Com base nas características fenotípicas e moleculares observadas, reforçamos que estudos sobre alterações multilocus de metilação do DNA devem ser feitos para elucidação da associação desses eventos com as características fenotípicas observadas nos clones.

## V. Referências

AKAGI, S.; GESHI, M.; NAGAI, T. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. **Animal Science Journal**, p. 1–9, 2013.

AZZI, S. et al. Lessons from imprinted multilocus loss of methylation in human syndromes. **Epigenetics**, v. 5, p. 373–377, 2010.

AZZI, S.; ABI, W.; NETCHINE, I. Beckwith – Wiedemann and Russell – Silver Syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.**, v. 21, n. 1, p. 30–38, 2014.

BARLOW, D. P. Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 379–403, 15 dez. 2011.

BEGEMANN, M. et al. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci for human imprinted loci. **Epigenetics**, v. 7, p. 473–481, 2012.

BELL, A C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 482–485, 2000.

BLIEK, J. et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including *PLAGL1* and *GNAS* loci in Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, p. 611–619, 2009.

BUREAU, W. S. et al. Assessment of Chromosomal Abnormalities in Bovine Nuclear Transfer Embryos and in Their Donor Cells. **Cloning and stem cells**, v. 5, n. 2, p. 123–132, 2003.

CHEN, S. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted *H19* gene in human preimplantation embryos. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2356–2359, 2010.

CHEN, Z. et al. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 6, p. 591–601, 2013.

CHEN, Z. et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4618–23, 2015.

CHIESA, N. et al. The *KCNQ1OT1* imprinting control region and non-coding RNA: New properties derived from the study of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome cases. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 1, p. 10–25, 2012.

CHOUFANI, S.; SHUMAN, C.; WEKSBERG, R. Beckwith-Wiedemann syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 154, n. 3, p. 343–354, 2010.

CHUD, T. C. S. et al. Genetic analysis for gestation length , birth weight , weaning weight , and accumulated productivity in Nellore beef cattle. **Livestock Science**, v. 170, p. 16–21, 2014.

COCCHI, G. et al. Silver-Russell syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a twin girl born after in vitro fertilization. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 161, n. 10, p. 2652–2655, 2013.

COURT, F. et al. Genome-Wide Allelic Methylation Analysis Reveals Disease-Specific Susceptibility to Multiple Methylation. **Human Mutation**, v. 34, p. 595–602, 2013.

DEBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Association of In Vitro Fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and Epigenetic Alterations of LIT1 and H19. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 1, p. 156–160, jan. 2003.

DELAVAL, K. et al. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 3, p. 720–729, 2007.

DHAKAL, K. et al. Calf birth weight, gestation length, calving ease, and neonatal calf mortality in Holstein, Jersey, and crossbred cows in a pasture system. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 690–698, 2013.

DOCHERTY, L. E. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. **Epigenetics**, v. 51, p. 229–238, 2014.

DUPONT, C.; SIFER, C. A Review of Outcome Data concerning Children Born following Assisted Reproductive Technologies. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

EGGERMANN, T. Russell–Silver Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part C**, v. 364, p. 355–364, 2010.

EGGERMANN, T. et al. Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: an urgent need for multi-locus testing. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 7, p. 769–777, 2014.

EGGERMANN, T. et al. Congenital imprinting disorders: EUCID . net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 1–10, 2015.

ENGEL, N.; THORVALDSEN, J. L.; BARTOLOMEI, M. S. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19 / Igf2 locus. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 19, p. 2945–2954, 2006.

GABORY, A.; JAMMES, H.; DANDOLO, L. The H19 locus: Role of an imprinted noncoding RNA in growth and development. **Bioessays**, v. 32, p. 473–480, 2010.

GOMES, M. V. et al. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 471–477, 1 ago. 2009.

GONG, Z.-J. et al. Aberrant expression of imprinted genes and their regulatory network in cloned cattle. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 858–66, 1 set. 2012.

GUSEVA, N.; MONDAL, T.; KANDURI, C. Antisense noncoding RNA promoter regulates the timing of de novo methylation of an imprinting control region. **Developmental Biology**, v. 361, p. 403–411, 2012.

HAN, L.; LEE, D.; SZABO, P. E. CTCF Is the Master Organizer of Domain-Wide Allele-Specific Chromatin at the H19 / Igf2 Imprinted Region. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 3, p. 1124–1135, 2008.

HIURA, H. et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2541–2548, 1 ago. 2012.

HIURA, H. et al. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 13, n. 4, p. 193–202, 2014.

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

INOUE, K. et al. Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1394–1400, 2003.

JACOB, K.; ROBINSON, W. P.; LEFEBVRE, L. Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: Opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth. **Clinical Genetics**, v. 84, n. 4, p. 326–334, 2013.

JR, J. S. et al. SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. **BMC developmental biology**, v. 13, p. 1–13, 2009.

KAGAMI, M. et al. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, n. 4, p. 131–6, 20 abr. 2007.

KOHAN-GHADR, H. R. et al. Endocrine profiles of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 76, p. 911–920, 2011.

KOHDA, T.; ISHINO, F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, 2012.

KURUKUTI, S. et al. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. **PNAS**, v. 103, p. 10684–10689, 2006.

LIM, D. et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 741–7, mar. 2009.

LIU, J.-H. et al. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 4, p. 598–607, abr. 2008.

LONG, J.-E.; CAI, X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, v. 388, n. 1–2, p. 125–134, 15 fev. 2007.

MACKAY, D. J. G. et al. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. **Biomolecular Concepts**, v. 6, n. 1, p. 47–57, 2015.

MAEDA, T. et al. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith – Wiedemann syndrome with epimutations. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 12, p. 903–912, 2014.

MANCINI-DINARDO, D. et al. Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. **Genes and Development**, v. 20, n. 10, p. 1268–1282, 2006.

MURPHY, R.; MACKAY, D.; MITCHELL, E. A. Beckwith Wiedemann imprinting defect found in leucocyte but not buccal DNA in a child born small for gestational age. **BMC medical genetics**, v. 13, n. 1, p. 99, 2012.

NELISSEN, E. C. M. et al. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 4, p. 1117–26, 1 abr. 2013.

NETCHINE, I. et al. Imprinted Anomalies in Fetal and Childhood Growth Disorders: The Model of Russell- Silver and Beckwith- Wiedemann Syndromes. **Endocr Dev. Basel**, v. 23, p. 60–70, 2012.

NORDIN, M. et al. Epigenetic regulation of the Igf2/H19 gene cluster. **Cell Proliferation**, v. 47, p. 189–199, 2014.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue antigens**, v. 39, n. 5, p. 225–35, maio 1992.

POOLE, R. L. et al. Targeted Methylation Testing of a Patient Cohort Broadens the Epigenetic and Clinical Description of Imprinting Disorders. **American Journal of Medical Genetics**, v. 161, p. 2174–2182, 2013.

PRICKETT, A. R.; OAKLEY, R. J. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. **Mol Genet Genomics**, v. 287, p. 621–630, 2012.

RICCIO, A.; CRESCENZO, A. DE; RUSSO, S. Inherited and Sporadic Epimutations at the IGF2-H19 Locus in Beckwith-Wiedemann Syndrome and Wilms' Tumor. **Endocrine Involvement in Developmental Syndromes**, v. 14, p. 1–9, 2009.

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

ROMANELLI, V. et al. Beckwith – Wiedemann syndrome and uniparental disomy 11p: fine mapping of the recombination breakpoints and evaluation of several techniques. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, p. 416–421, 2011.

ROSSIGNOL, S. et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 12, p. 902–907, 2006.

SAKIAN, S. et al. Altered gene expression of H19 and IGF2 in placentas from ART pregnancies. **Placenta**, v. 36, p. 1100–1105, 2015.

SANLI, I.; FEIL, R. Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 67, p. 139–147, 2015.

SANO, S. et al. Beckwith – Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type Ib in a patient with multilocus imprinting disturbance: a female-dominant phenomenon? **Journal of Human Genetics**, p. 1–5, 2016.

SASAKI, H.; ISHIHARA, K.; KATO, R. Mechanisms of Igf2/H19 Imprinting: DNA Methylation, Chromatin and Long-Distance Gene Regulation. **JB Review**, v. 127, n. 5, p. 711–715, 2000.

SATO, A. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 26–35, 2007.

SAZHENOVA, E. A. et al. Multilocus Epimutations of Imprintome in the Pathology of Human Embryo Development. **Molecular Biology**, v. 46, p. 183–191, 2012.

SHEN, C.-J. et al. Imprinted genes and satellite loci are differentially methylated in bovine somatic cell nuclear transfer clones. **Cellular reprogramming**, v. 15, n. 5, p. 413–24, 2013.

SHEN, C. J. et al. Differential differences in methylation status of putative imprinted genes among cloned swine genomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

SHIN, J.; FITZPATRICK, G. V; HIGGINS, M. J. Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 1, p. 168–178, 2008.

SMITH, L. C. et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 107–114, 2012.

SOEJIMA, H.; HIGASHIMOTO, K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith – Wiedemann syndrome and related disorders. **Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 402–409, 2013.

SOELLNER, L. et al. Congenital imprinting disorders : Application of multilocus and high throughput methods to decipher new pathomechanisms and improve their management \*. **Molecular and Cellular Probes**, p. 1–9, 2015.

SPENGLER, S. et al. Testing of buccal swab DNA does not increase the detection rate for imprinting control region 1 hypomethylation in Silver-Russell syndrome. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 15, n. 10, p. 725–6, out. 2011.

SUZUKI, J. et al. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 5, p. 947–956, 2011.

SZABÓ, P. E. et al. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. **Current Biology**, v. 10, p. 607–610, 2000.

TEE, L. et al. Epimutation profiling in Beckwith-Wiedemann syndrome: relationship with assisted reproductive technology. **Clinical Epigenetics**, v. 5, p. 1–10, 2013.



URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803–15, jun. 2014.

UYAR, A.; SELI, E. The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, p. 210–221, 2014.

VALS, M. et al. The Frequency of Methylation Abnormalities Among Estonian Patients Selected by Clinical Diagnostic Scoring Systems for Silver–Russell Syndrome and Beckwith–Wiedemann Syndrome. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 19, n. 12, p. 684–691, 2015.

WAKAYAMA, T. Production of Cloned Mice and ES Cells from Adult Somatic Cells by Nuclear Transfer: How to Improve Cloning Efficiency? **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 13–26, 2007.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; BECKWITH, B. Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 8–14, 2010.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997.

WOODFINE, K.; HUDDLESTON, J. E.; MURRELL, A. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. **Epigenetics & Chromatin**, v. 4, n. 1, p. 1, 31 jan. 2011.

YANG, L. A. N. et al. Expression of Imprinted Genes Is Aberrant in Deceased Newborn Cloned Calves and Relatively Normal in Surviving Adult Clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 431–438, 2005.

ZHENG, H. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in human spontaneous abortions after assisted reproduction techniques and natural conception. **Human Reproduction**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2012.

ZHENG, H. Y. et al. Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 4, p. 751–755, 2011.

### CAPÍTULO III

#### **Identificação do transcrito antisense do gene *PEG1/MEST*, *MESTIT1*, em bovinos**

Paula Magnelli Mangiavacchi,<sup>a</sup> Maria Clara Caldas-Bussiere,<sup>a</sup> Mariana da Silva Mendonça,<sup>c</sup> Rodolfo Rumpf,<sup>d</sup> Paulo Edson Soares Lemos Júnior,<sup>d</sup> Carla Soares Alves,<sup>d</sup> Warlei da Silva Carneiro,<sup>d</sup> Álvaro Fabrício Lopes Rios,<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal - LRMGA. Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuárias - CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biotecnologia - LBT. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia do Reconhecer– LBR. Centro de Ciências e Biotecnologias - CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>d</sup> Geneal Genética Animal – Análise, Pesquisa e Laboratório S/A, Uberaba, Minas Gerais, Brasil

## Resumo

A regulação do mecanismo de *imprinting* genômico está associado a transcrição em grande parte a ação de RNAs não codificadores de proteínas (non-coding RNAs - ncRNAs). A ação desses ncRNAs está associada a regulação das marcas epigenéticas de maneira parental específicas nas regiões controladoras de *imprinting*. O gene *PEG1/MEST* é regulado por *imprinting* genômico e expresso pelo alelo paterno, sendo sua sequência altamente conservada no genoma de humanos e bovinos. Em humanos, foi detectado um transcrito intrônico antisense no gene *PEG1*, denominado *MESTIT1*. Esse transcrito antisense foi caracterizado como um ncRNA, possivelmente associado a regulação de *PEG1*. Portanto, o *MESTIT1* pode exibir uma função relevante durante o início do desenvolvimento podendo ser detectado no início da embriogênese. A espécie bovina é utilizada como modelo fenotípico para síndromes humanas provenientes do uso de tecnologias de reprodução assistida. Apesar disso, ainda não há informação sobre a transcrição de *MESTIT1* em bovino. O objetivo do estudo foi identificar em bovinos a região homóloga ao *MESTIT1* humana e, por meio de análise de bancos de dados públicos de RNA-seq analisar a presença de transcritos que possam ser parte do *MESTIT1* bovino em tecidos somáticos de animais de reprodução natural e de clones gerados por transferência nuclear. A partir dos dados analisados nos bancos de dados de RNA-seq foi possível identificar transcritos nos tecidos de fígado, coração, cérebro e blastocistos *in vivo* de bovinos na região homóloga do *MESTIT1* humano. Do mesmo modo, após análise da presença de transcrito do gene *MESTIT1*, foi detectado a transcrição em tecidos de fígado em um clone e nos tecidos de fígado e cérebro de animais naturais. Esse estudo é o primeiro indicativo da presença do gene *MESTIT1* em tecidos de animais naturais e clones bovinos.

**Palavras-chave:** *Peg1/MEST*, reprodução assistida, *MESTIT1*, *imprinting* genômico, transferência nuclear de célula somática

**Abstract**

The regulation of the genomic imprinting mechanism is associated with transcription to a largely due the action of non-coding RNAs (ncRNAs). The action of this ncRNAs is associated with specific parental epigenetic in the imprinting control regions. The *PEG1/MEST* gene is regulated by genomic imprinting and expressed by the paternal allele, its sequence being highly conserved in the human and bovine genome. In humans, an antisense transcript was detected in the *PEG1* gene, named *MESTIT1*. This antisense transcript was characterized as an ncRNA, possibly associated with regulation of *PEG1*. Therefore, *MESTIT1* may exhibit a relevant function during early development and may be detected early in embryogenesis. The bovine species is used as a phenotypic model for human syndromes derived from the use of assisted reproduction technologies. Despite this, there is still no information on the transcription of *MESTIT1* in cattle. The objective of the study was to identify in bovines the region homologous to human *MESTIT1* and, through analysis of public RNA-seq databases, to analyze the presence of transcripts that may be part of the bovine *MESTIT1* in somatic tissues of natural breeding animals and of clones generated by nuclear transfer. From the data analyzed in the RNA-seq databases, it was possible to identify transcripts in liver, heart, brain and in vivo blastocyst bovines' tissues in the homologous region of human *MESTIT1*. Likewise, after analysis of the transcript presence of the *MESTIT1* gene, transcription was detected in liver tissues in a clone and in liver and brain tissues of natural animals. This study is the first indication of the presence of the *MESTIT1* gene in tissues of natural animals and bovine clones.

**Key words:** *Peg1/MEST*, assisted reproduction, *MESTIT1*, genomic imprinting, somatic cell nuclear transfer

## I. Introdução

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético que possui uma importante função durante o desenvolvimento de mamíferos, sendo sua transcrição monoalélica parental específica (BAJRAMI; SPIROSKI, 2016; CHESS, 2016). O gene *PEG1/MEST* (*Paternally Expressed Gene 1 / Mesoderm Specific Transcript*) está localizado nos cromossomo 7 e 4 nas espécies humana e bovina, respectivamente. O gene *PEG1* está associado com o desenvolvimento embrionário e comportamental, embora como a ação do mesmo ocorre ainda é desconhecido (LEFEBVRE et al., 1998; PENG et al., 2016). O *PEG1* possui duas isoformas no qual somente uma é transcrita pelo alelo paterno.

A primeira identificação do transcrito antisense do gene *PEG1*, conhecido como *MESTIT1*, foi em células espermáticas e testiculares (LI et al., 2002). O transcrito *MESTIT1* pode estar associado a regulação do gene *PEG1*, entretanto, nenhuma caracterização molecular foi feita nos últimos quinze anos (NAKABAYASHI et al., 2002). Esse transcrito antisense possui dois éxons localizados entre as regiões promotoras das isoformas do *PEG1*, sendo localizado entre duas ilhas CpGs. O primeiro relato, em 2002, sobre o transcrito antisense humano relatava ter 2.4kb de extensão (LI et al., 2002), porém em um segundo estudo o *MESTIT1* apresentava um tamanho de 4.2kb (NAKABAYASHI et al., 2002).

A região diferencialmente metilada (DMR) presente nas regiões de controle de *imprinting* (ICR) dos genes regulados por *imprinting* estabelecem a expressão monoalélica paterna de ambos os genes *PEG1* e *MESTIT1*. Porém, a distribuição de transcrição nos tecidos pode variar. Estudos avaliando a expressão do *MESTIT1* humano encontraram transcrição em diversos tecidos somáticos, como em cérebro, rim, coração, pulmão, músculo e placenta (LI et al., 2002; NAKABAYASHI et al., 2002). Tem sido sugerido que o gene *MESTIT1*, sendo um ncRNA, possa apresentar função regulatória de *PEG1* durante o desenvolvimento embrionário (LI et al., 2002).

Alterações na regulação de *PEG1* tem sido detectadas em embriões e em crianças nascidas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) (HUNTRISS et al., 2013; KAGAMI et al., 2007). É sabido que o uso de tecnologias de

reprodução assistida (ART) podem acarretar alterações de marcas epigenéticas nos gametas e embriões, ocasionando o surgimento de síndromes cuja base molecular é epigenética. As características fenotípicas e moleculares das síndromes Beckwith-Wiedemann (SBW), em humanos e a *Large Offspring Syndrome* (LOS)/*Abnormal Offspring Syndrome* (AOS), em bovinos, tem apresentado semelhanças. Devido isto, a espécie bovina pode ser considerado um modelo fenotípico para a síndrome humana (CHEN et al., 2013, 2015).

Portanto, devido as semelhanças fenotípicas e moleculares da SBW e LOS/AOS entre humanos e bovinos, a espécie bovina pode ser um importante modelo na investigação de associação com diversas síndromes relacionadas a alterações de *imprinting* genômico (CHEN et al., 2013; YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998).

Muitos estudos descrevem que a alteração no padrão de genes regulados por *imprinting* contribuem para o surgimento de muitas síndromes, como a Silver Russell (SRS) e a de Beckwith-Wiedemann (SBW), em humanos (NAGAI; MEGURO-HORIKI; HORIKI, 2012). A SBW possui uma menor incidência na fertilização natural, porém, na reprodução assistida, esta síndrome tem maior incidência devido as epimutações associadas a manipulação *in vitro* de gametas e embriões (HIURA et al., 2012).

Da mesma forma, a LOS/AOS exibe maior probabilidade de ocorrer durante o uso de tecnologias de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência nuclear de célula somática (SCNT) (SMITH et al., 2012). Entretanto, supõe-se que os clones bovinos conseguem tolerar maiores modificações do padrão de *imprinting* no estágio fetal, aumentando sua taxa de eficiência da clonagem. Porém, esses clones se tornam animais fracos durante a modificação ambiental abrupta pós natal, induzindo um estresse no recém-nascido causando a morte logo após o nascimento (ZHANG et al., 2004).

Diferentemente de estudos em humanos, a descrição dos genes de *imprinting* genômico bovino permanecem pouco elucidados devido à falta de informação e caracterização molecular dos mesmos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar a região homóloga do transcrito antisense *MESTIT1* humano, em bovinos, através do uso de banco de dados públicos de RNA-seq. E analisar a presença do transcrito *MESTIT1* em tecidos somáticos

de animais concebidos naturalmente e tecidos de clones bovinos gerados por transferência nuclear de célula somática.

## **II. Metodologia**

### **II.I Amostras**

Os clones bovinos utilizados no estudo foram doados pela empresa Geneal – Genética Animal (Uberaba, MG, Brasil). A Geneal é uma empresa autorizada pelo Ministério da Agricultura, Gado e Suprimento (MAPA) e utiliza a tecnologia patenteada por VIAGEN LC com o INPI. As amostras de fígado utilizadas no presente estudo foram de clones bovinos que não sobreviveram devido à dificuldade de se fazer biópsia em clones vivos. Os tecidos de fígado e cérebro de animais concebidos naturalmente foram obtidos no matadouro de Campos dos Goytacazes – RJ, sendo estes coletados após a morte dos animais. Após coleta, as amostras permaneceram congeladas no freezer -70°C em RNA Later (Ambion) até o momento da extração de RNA.

### **II.II Protocolo de transferência nuclear de célula somática**

Para a transferência nuclear de célula somática (SCNT) foram utilizados oócitos de vacas cicladas, no qual os oócitos foram coletados por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). Após coleta, os oócitos selecionados foram maturados em uma incubadora de CO<sub>2</sub> com temperatura e saturação controladas de 38.8°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>, respectivamente. Os oócitos maduros foram desnudados e os oócitos na fase de primeiro corpúsculo polar (maturação) foram escolhidos e marcados com Hoechst – Bisbenzimidazole 33342.

Através do micromanipulador os oócitos foram enucleados e restaurados com o núcleo de uma célula doadora obtida no banco de células do laboratório da GENEAL. Anterior a reconstrução celular, o núcleo foi descongelado e colocados em cultura com DMEM, soro fetal bovino e 10% de amicacina. Os oócitos enucleados e as células doadoras de núcleo foram submetidos a eletrofusão no equipamento BTX® seguido por ativação com ionomicina e 6-DMAP. Após a reconstrução dos oócitos, esses foram colocados em cultura com meio de oviduto sintético suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, antibióticos (SOFaaci), sob óleo mineral em uma incubadora a 38.8°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>.



Os embriões formados foram selecionados, classificados e armazenados após sete dias de cultura. Logo após, as vacas receptoras foram escolhidas e submetidas a transferência transcervical dos embriões. Após 30 a 35 dias de gestação, a prenhez foi avaliada por ultrassonografia transretal. A cada mês de gestação as vacas eram examinadas para acompanhamento fetal e desenvolvimento placentário. Todo o acompanhamento foi realizado por uma equipe de veterinários da GENEAL, que utilizaram o melhor procedimento para cada caso.

### **II.III Análise da presença de transcritos na região homóloga de *MESTIT1* bovino utilizando bancos de dados de RNA-seq públicos.**

Dados de sequenciamento de última geração de RNA-seq de tecidos bovinos foram obtidos do banco de dados de SRA ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA)). Foram utilizados dados de cérebro (SRR594473, SRR594482 e SRR594491), coração (SRR594484 e SRR594493) e fígado (SRR594477, SRR594486 e SRR594495) (MERKIN et al., 2012); embriões *in vivo* (SRR2927479, SRR2927480, SRR2927483, SRR2927484 e SRR2927486) (HERAS et al., 2016) e; espermatozoides (SRR578271) (arquivo SRA submetido pela UNIVERSITY OF RHODE ISLAND correspondente a sequenciamento de um pool de espermatozoides de 9 touros). Os arquivos SRA foram convertidos em FASTQ utilizando o pacote SRA Toolkit (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?cmd=show&f=software&m=software&s=software>), e alinhados contra o genoma bovino (BaylorBtau\_4.6.1/bosTau7) utilizando o software bowtie2 (LANGMEAD et al., 2009).

A partir dos arquivos de alinhamento em formato SAM (*Sequence Alignment Map*) gerados, a presença de transcrição na região bovina homóloga ao gene *MESTIT1* em humanos foi realizada utilizando o software SeqMonk versão 1.40.1.

Como o transcrito de *MESTIT1* humano sobrepõe-se a CGI-shores a jusante e a montante da CGI-66 e CGI-177, respectivamente, foi utilizada a ferramenta *View (in other genomes) - UCSC genome browser* para identificação dessa região homóloga em bovinos. Utilizando a ferramenta *probe generator*

do software Seqmonk 1.40.1, foram definidas como probes regiões -2k a montante das CGI homólogas (CGI-37 e CGI-119) no genoma bovino (Baylor Btau\_4.6.1/bosTau7). Essas *probes* permitiram avaliar a presença de transcritos na região homóloga bovina onde *MESTIT1* deveria estar localizado.

#### II.IV Desenho dos “*primers*”

Os primers para identificação do *MESTIT1* foram desenhados através do GeneRunner 5.0.37 beta. A sequência genômica na espécie bovina (chr4:95,065,428-95,079,873; assembly ID: bosTau7) para o desenho dos *primers* foi obtida após avaliação da região homóloga no genoma humano do loci *MESTIT1* (chr7:130,126,898-130,131,013; assembly ID: hg19) no banco de dados UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

#### II.V Extração de RNA

As amostras de RNA dos tecidos de fígado dos clones e de fígado e cérebro dos animais naturais foram extraídos através do protocolo de Trizol (Invitrogen®). Para tal, um fragmento de tecido (aproximadamente 0.3 – 0.5 cm) foram coletados utilizando lâminas de bisturi estéreis. As amostras coletadas foram maceradas em um tubo de 1.5mL sendo adicionado 1mL de Trizol para cada amostra. Para cada 1mL de Trizol foram adicionados 200µL de clorofórmio, sendo misturados por inversão e deixados em temperatura ambiente (15-30°C) por 3 minutos.

Posterior a isso, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min (centrífuga refrigerada – 2-8°C), onde ocorreu a separação da fase aquosa e orgânica. A fase aquosa (aproximadamente 300µL) foi transferida para um novo tubo estéril e adicionado 500µL de isopropanol. Novamente as amostras foram misturadas por inversão e permaneceram em temperatura ambiente (15-30°C) por 10 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas (2-8°C) por 10 minutos a 12.000 x g. Todo o material sobrenadante após a centrifugação foi descartado por inversão do tubo. Ao *pellet* das amostras foram adicionados 1mL de etanol 75%, vortexado por 10 segundos para suspensão da amostra e centrifugado por 5 minutos a 7.500 x g. Mais uma vez o sobrenadante foi

descartado por inversão. O material ficou secando em temperatura ambiente sobre papel filtro por 15 minutos. Após isso, foram adicionados 30µL de água milli-Q. As amostras de RNA extraídas foram quantificadas através da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop2000).

## II.VI Transcrição reversa fita específica e PCR quantitativo (RT-qPCR)

Aproximadamente 600-800ng de RNA total foram submetidos a transcrição reversa. O RNA total passou por um ensaio de digestão com DNase I (1U) por 10 minutos a 37°C para eliminação de qualquer resquício de DNA genômico nas amostras. Em seguida, o EDTA (25mM) foi utilizado para inativar a DNase I, por 15 minutos a 75°C. Para conversão da fita específica do transcrito *MESTIT1*, foram utilizados 1µL do *primer* sense original do *MESTIT1* (100mM), sendo esse adicionado nas amostras após reação com EDTA e submetidos a reação de 5 minutos por 65°C e 1 minuto no gelo para anelamento do primer na amostra. Por fim, a transcrição reversa foi realizada utilizando *High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems®) conforme instruções do fabricante. As condições de ciclagem para a transcrição reversa foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 segundos.

## II.VII Reação de Cadeia de Polimerase – PCR

Após a transcrição reversa fita específica, os cDNAs passaram por PCR para amplificação da sequência do *MESTIT1*. As amostras de cada cDNA foram diluídas na proporção 1:5 (v:v) em ddH<sub>2</sub>O, sendo utilizados 2µL de cDNA por reação. A PCR foi realizada em um volume final de 10µL [5,85µL ddH<sub>2</sub>O; 1,0µL 10x RT-Buffer; 150mM de cada primer (*sense* e *antisense*); 100mM dNTP (25mM cada); 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.25U de Unitaq50 DNA Polimerase (Uniscience); 2,0µL de cDNA). Foram utilizados os primers do *MESTIT1* e *β-actina* (como controle – *housekeeping*). O primers utilizados para o gene *MESTIT1* foram: sense: 5'-AACTAGGGTCTCAAACCTGGG-3' e antisense 3'-CACAGATAGCAGCATTCCCT-5'; e para o *β-actina*: sense: 5'-GGCACCCAGCACAAATGAAG-3' e antisense: 3'-CGCAGCTAACAGTCCGCC-5'.

As condições de ciclagem foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Após PCR, as amostras amplificadas foram submetidas a gel de acrilamida 10% e corados com nitrato de prata (0.02%) para verificação da presença dos transcritos.

## II.VIII Real Time PCR – Quantitative PCR (qPCR)

A detecção de transcritos de na região homóloga de *MESTIT1* em bovinos foi realizada por transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR). As quantificação relativa de transcritos de cada amostra foram calculadas segundo a fórmula  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os ensaios de qPCR foram realizados em um volume final de 10  $\mu$ L (5,0  $\mu$ L PCR Mastermix [SybrGreen, AppliedBiosystem]; 2,7 $\mu$ L água; 150mM de cada primer (sense e antisense); 2,0 $\mu$ L de cada amostra).

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Toda distribuição das alíquotas de mixe amostras do qPCR foi realizada utilizando um micropitetador eletrônico monocanal da marca Gilson. As curvas de dissociação foram obtidas seguindo os ciclos. Cada reação foi feita em duplicata.

### III. Resultados

#### III.I Análise *in silico* da presença de transcritos na região homóloga do gene *MESTIT1* humano em bovinos

A análise dos dados de RNA-seq de gametas, embriões e tecidos somáticos de bovinos identificaram a presença de transcritos na região homóloga do gene *MESTIT1* humano no genoma bovino (Figure 1C). A região analisada faz parte da *shore* associada a CGI-119 em bovinos (Figura 1B). A região homóloga a essa *shore* em humanos é parte da região que codifica o éxon 2 do gene *MESTIT1* em humanos (figure 1A).

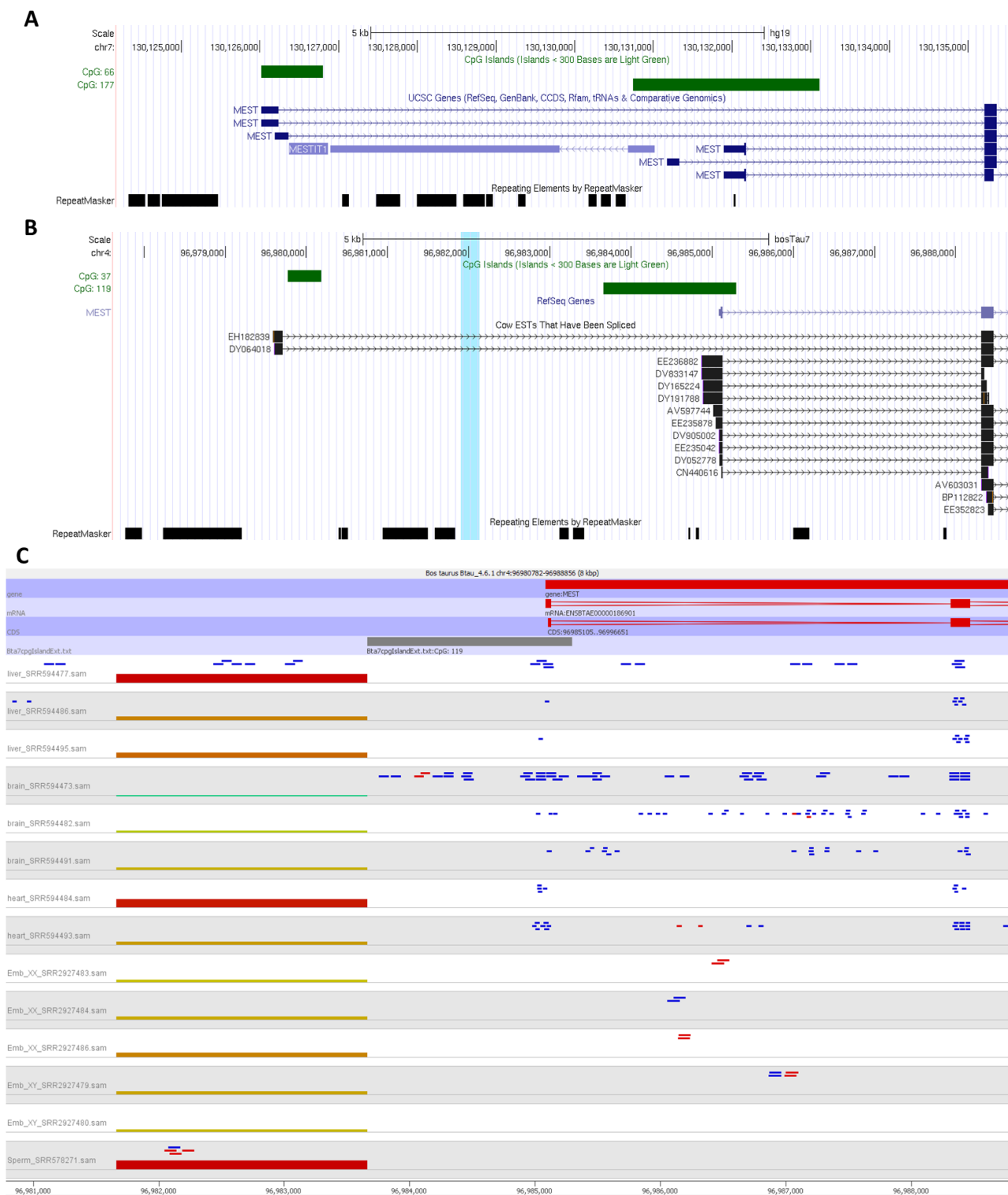


Figura 1. Representação gráfica da região do *loci PEG1*. (A) em humanos; (B) bovinos; e (C) presença de *MESTIT1* e da sua região homóloga em bovinos (dados retirados UCSC genome browser).

### III.II Detecção de transcritos *MESTIT1* bovino

Após amplificação da sequência gênica do *MESTIT1* bovino, foi possível detectar a presença do transcrito em uma amostra de fígado em um clone gerado por transferência nuclear. A mesma amostra amplificou a sequência do gene controle (*housekeeping*)  $\beta$ -actina (Figura 2). Em uma segunda amostra de fígado analisada (clone C2) não foi possível detectar a presença do *MESTIT1*. Contudo, a mesma amostra não apresentou amplificação para o *housekeeping*, o que demonstra uma falha na PCR. Ambos os controles da reação não amplificaram (Figura 2). Esse é o primeiro relato na literatura da possível transcrição do *MESTIT1* em clone bovino gerado por reprodução assistida.

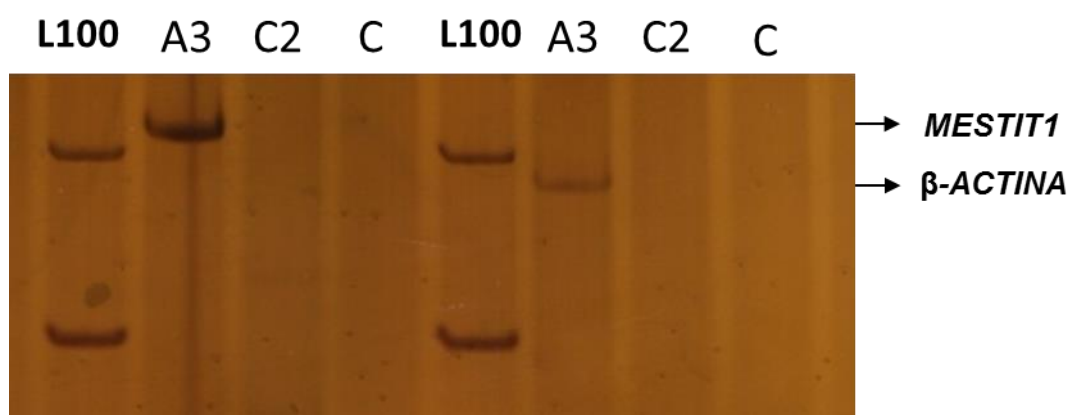


Figura 2. **Avaliação de presença de transcritos *MESTIT1* em amostras de fígado de clones.** Primeira quadrante representa amostras de fígado dos clones com o primer *MESTIT1* (L100: ladder 100pb; A3 e C2: clones; C: controle da PCR). Segundo quadrante representa as amostras de fígados dos clones com o primer  $\beta$ -actina (L100: ladder 100pb; A3 e C2: clones; C: controle da PCR). *Amplicons*: *MESTIT1* – 210pb;  $\beta$ -actina – 186pb

O nível de transcrição de *MESTIT1* também foi analisada em tecidos de animais concebidos naturalmente. Amostras de cérebro e fígado foram utilizadas para análise, sendo observado um nível de 3.335 (SD  $\pm$ 5.366) e 0.3375 (SD $\pm$ 0.3576) de transcrição do antisense *MESTIT1*. A expressão de *MESTIT1* variou até 10 vezes entre amostras do mesmo tecido, sendo uma

maior abundância relativa de transcritos detectada em tecido cerebral (Figura 3).

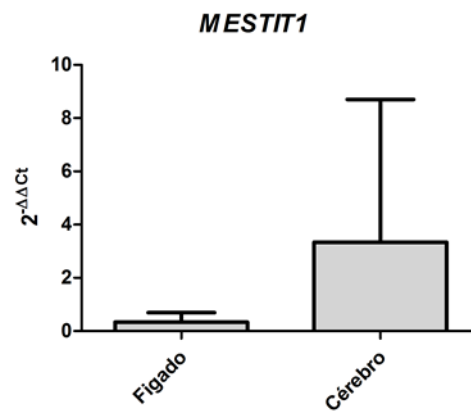


Figura 3. Médias dos resultados de RT-qPCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para o gene *MESTIT1*. *MESTIT1* (Cérebro = 3.335, SD ±5.366; Fígado = 0.3375, ±0.3576).



#### IV. Discussão

O transcrito antisense *MESTIT1*, um ncRNA, foi primeiro detectado em humano sendo sugerida uma função reguladora do gene *PEG1*. No entanto, nenhuma caracterização molecular foi feita nos últimos 15 anos (NAKABAYASHI et al., 2002). Um outro indício da presença e função do *MESTIT1* surgiu da identificação de transcritos em amostras de testículos e em espermatozoides maduros em humanos (LI et al., 2002). Esses autores sugerem que esse transcrito possa participar de eventos de fertilização em mamíferos.

Em bovinos a identificação do *MESTIT1* ainda não foi realizada. Através de dados obtidos por RNA-seq e do UCSC *genome browser*, observou-se que a sequência da *shore* associada a CGI-119 no *loci PEG1* bovino era homóloga ao gene *MESTIT1* humano (NAKABAYASHI et al., 2002). Portanto no presente estudo, foi utilizado um par de *primers* associado a CGI-*shore* do gene *PEG1* para identificação do transcrito *MESTIT1*. De forma similar ao gene *PEG1*, o *MESTIT1* também é paternalmente expresso em humanos e já foi observado que em ambientes *in vitro* se torna instável (KIM et al., 2007; MEYER; WOLLMANN; EGGERMANN, 2003; NAKABAYASHI et al., 2002; YAMADA et al., 2004).

Através da análise de dados públicos de RNA-seq foi possível identificar transcrição na região homóloga do *MESTIT1* humano em diferentes tecidos bovinos (fígado, cérebro, coração e espermatozoide), assim como em embriões femininos e masculinos. Esses dados de transcrição são semelhantes aos observados pelos únicos estudos do gene *MESTIT1* em humanos (LI et al., 2002; NAKABAYASHI et al., 2002)

Com base nos nossos resultados, foi encontrada transcrição na região homóloga de *MESTIT1* em amostras de cérebro e fígado em animais concebidos naturalmente, e uma possível transcrição em amostra de fígado de clone bovino. Embora a maior transcrição do gene *MESTIT1* seja em tecidos espermáticos e testicular, outros autores também identificaram *MESTIT1* em outros tecidos somáticos (LI et al., 2002; NAKABAYASHI et al., 2002).

Esses dados são as primeiras detecções do gene *MESTIT1* em bovinos na literatura científica. Maiores investigações são necessárias para validar a presença de transcritos *MESTIT1* nos clones gerados por transferência nuclear.

## V. Conclusão

- Os dados de análise de transcrição qualitativa e quantitativa demonstram que há presença do gene *MESTIT1* em tecidos somáticos de bovinos concebidos naturalmente e por transferência nuclear;
- A detecção da transcrição da região homóloga humana do gene *MESTIT1* nos tecidos no banco de dados de RNA-seq é um indicativo da presença desse transcrito antisense em bovinos.
- Essa é a primeira identificação de transcritos em tecidos somáticos em bovinos concebidos naturalmente e de reprodução assistida, o que demonstra que a sequência do gene *MESTIT1* é conservada entre as espécies humana e bovina;
- Maiores estudos deverão ser feitos para a caracterização desse gene em bovinos.

## VI. Referências

BAJRAMI, E.; SPIROSKI, M. Genomic Imprinting. **Open Access Maced J Med Sci.**, v. 4, n. 1, p. 181–184, 2016.

CHEN, Z. et al. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 6, p. 591–601, 2013.

CHEN, Z. et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4618–23, 2015.

CHESS, A. Monoallelic Gene Expression in Mammals. **Annu Rev Genet**, v. 50, p. 317–330, 2016.

HERAS, S. et al. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 72, 2016.

HIURA, H. et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2541–2548, 1 ago. 2012.

HUNTRISS, J. D. et al. Variable imprinting of the MEST gene in human preimplantation embryos. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, p. 40–47, 2013.

KAGAMI, M. et al. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, n. 4, p. 131–6, 20 abr. 2007.

KIM, K. et al. Gene-specific vulnerability to imprinting variability in human embryonic stem cell lines. **Genome Research**, v. 17, p. 1731–1742, 2007.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. 1–10, 2009.

LEFEBVRE, L. et al. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. **Nature genetics**, v. 20, n. 2, p. 163–169, 1998.

LI, T. et al. An Imprinted PEG1 / MEST Antisense Expressed Predominantly in Human Testis and in Mature Spermatozoa. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13518–13527, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. v. 408, p. 402–408, 2001.

MERKIN, J. et al. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in mammalian tissues. **Science**, v. 338, n. 6114, p. 1593–1599, 2012.

MEYER, E.; WOLLMANN, H. .; EGGERMANN, T. Searching for genomic variants in the MESTIT1 transcript in Silver-Russell syndrome patients. **J Med Genet**, p. 1–2, 2003.

NAGAI, M.; MEGURO-HORIKE, M.; HORIKE, S. Epigenetic Defects Related Reproductive Technologies: Large Offspring Syndrome ( LOS ). **DNA Methylation - From Genomics to Technology**, 2012.

NAKABAYASHI, K. et al. Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (MESTIT1) in the human MEST locus on chromosome 7q32. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 15, p. 1743–1756, 2002.

PENG, W. et al. DNA methylation-associated repression of MEST / PEG1 expression contributes to the invasion of extravillous trophoblast cells. **Placenta**, v. 46, p. 92–101, 2016.

SMITH, L. C. et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 107–114, 2012.

YAMADA, T. et al. Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST -flanking region at human chromosome 7q32. **Genomics**, v. 83, p. 402–412, 2004.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of reproduction**, v. 3, p. 155–163, 1998.

ZHANG, S. et al. Genomic Imprinting of H19 in Naturally Reproduced and Cloned Cattle 1. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 1540–1544, 2004.

## CONCLUSÃO GERAL

- Em bovinos, a SCNT está associada a ocorrência de alterações epigenéticas em um padrão multilocus;

- A heterogeneidade dessas alterações epigenéticas se mostram no padrão de GOM e LOM em uma mesma DMR e nos perfis tecidos específicos de epimutações;

- A heterogeneidade da ocorrência das alterações de metilação do DNA em animais geneticamente idênticos ressalta a natureza epigenética dos eventos de GOM e LOM observados;

- A ocorrência tecido específica sugere que os eventos possam ocorrer em períodos mais avançados do desenvolvimento, após a formação das folhetos germinativos;

- A caracterização de novos transcritos, como o ncRNA *MESTIT1*, em *loci* regulados por *imprinting* pode auxiliar na elucidação desse mecanismo entre diferentes espécies e, na origem das epimutações decorrentes da exposição a protocolos de ARTs;

- Embora alguns *loci* de genes de *imprinting*, como a *H19*, *KCNQ10T1* e *PEG1* apresentaram alteração em pelo menos um tecidos analisado, outras investigações são necessárias para tentar associar a ocorrência de LOI nesses *loci* com as características clínicas observadas nos clones de transferência nuclear;

- Os resultados do presente estudo reforçam a utilização do modelo bovino, como comparativo para estudos de IDs em humanos, em especial as decorrentes de tecnologias que manipulam gametas e embriões *in vivo*;

- A soma dos resultados reforça a necessidade de mais estudos para elucidação dos mecanismos que levam a metilação do DNA anormal que ocorre nos clones gerados por SCNT. Novos achados poderão fornecer informações sobre como melhorar a eficiência dessa tecnologia e conseqüentemente aumentar a taxa de sobrevivência desses animais.

## REFERÊNCIAS

AMOAKO, A. A.; NAFEE, T. M.; OLA, B. Epigenetic Influences During the Periconception Period and Assisted Reproduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 15–39, 2017.

AZZI, S. et al. Lessons from imprinted multilocus loss of methylation in human syndromes. **Epigenetics**, v. 5, p. 373–377, 2010.

CHEN, Z. et al. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 6, p. 591–601, 2013.

CHEN, Z. et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 15, p. 4618–4623, 14 abr. 2015.

CHEN, Z. et al. Global misregulation of genes largely uncoupled to DNA methylome epimutations characterizes a congenital overgrowth syndrome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–14, 2017.

CHOUFANI, S.; SHUMAN, C.; WEKSBERG, R. Beckwith-Wiedemann syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 154, n. 3, p. 343–354, 2010.

EGGERMANN, T. et al. Congenital imprinting disorders: EUCID . net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 1–10, 2015.

EROGLU, A.; PH, D.; LAYMAN, L. C. Role of ART in Imprinting Disorders. v. 1, n. 212, p. 92–104, 2012.

GUTIERREZ-ADAN; WHITE., C. R.; SOOM, A. VAN. Why we should not select the faster embryo : lessons from mice and cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 765–775, 2015.

HIURA, H. et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2541–2548, 1 ago. 2012.

ILIADOU, A. N.; JANSON, P. C. J.; CNATTINGIUS, S. Epigenetics and assisted reproductive technology. **Journal of Internal Medicine**, v. 270, n. 5, p. 414–420, 2011.

KOHDA, T.; ISHINO, F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, 2012.

MACKAY, D. J. G. et al. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. **Biomolecular Concepts**, v. 6, n. 1, p. 47–57, 2015.

MANIPALVIRATN, S.; DECHERNEY, A.; SEGARS, J. H. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. v. 91, n. 2, p. 305–315, 2011.

POPLINSKI, A. et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. v. 33, p. 642–649, 2010.

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

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803–15, jun. 2014.

UYAR, A.; SELI, E. The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, p. 210–221, 2014.

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. 12, p. 1433–1442, 2003.

ZHANG, S. et al. Genomic Imprinting of H19 in Naturally Reproduced and Cloned Cattle 1. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 1540–1544, 2004.

ZHENG, H. Y. et al. Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 4, p. 751–755, 2011.