



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IMPACTOS DO USO DA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA (SAH) COMO AGENTE
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE BOVINOS**

JULIANA MAYUMI DE AZEVEDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IMPACTOS DO USO DA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA (SAH) COMO AGENTE
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE BOVINOS**

Juliana Mayumi de Azevedo

Orientador: Maurício Machaim Franco

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

PUBLICAÇÃO: 72/2012

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2012

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**IMPACTOS DO USO DA S- ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA (SAH) COMO AGENTE
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE BOVINOS**

JULIANA MAYUMI DE AZEVEDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Doutorado (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADOR)**

**SAMUEL REZENDE PAIVA, Doutorado (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA) (EXAMINADOR INTERNO)**

**CARLOS FREDERICO MARTINS, Doutorado (EMBRAPA CERRADOS)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 24 de MAIO de 2012

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

AZEVEDO, J.M. **Impactos do uso da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 102p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

AZEVEDO, Juliana Mayumi. **Impactos do uso da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

CDD ou CDU
Agris/FAO

Porque os amo, porque devo a minha vida e tudo aquilo que sou. Pelos bons e maus momentos em que nunca me deixaram só. Pela força, pela amizade, pelo amor incondicional. Por serem os meus pilares, a minha força, os meus melhores amigos. Por nunca me deixarem desistir e me aparem todas as quedas, as vezes antes de cair. Por serem os melhores pais do mundo, DEDICO...

“Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me deram força para que eu concluísse meu trabalho, me guiando sabiamente, com muita compreensão e confiança. Aos meus irmãos que sempre me incentivaram.

Ao meu companheiro André de Queiroz Moreira pela paciência, apoio e carinho, me ajudando a superar os momentos difíceis.

Aos amigos Rosana Nishimura, Allice Rodrigues, José Carvalho e Thiago Braga pelo auxílio durante o desenvolvimento experimental.

À amiga Valquíria Lacerda, que me ensinou cuidadosamente parte do que precisei para realização deste trabalho.

À amiga Isabela Rebouças Bessa pela ajuda, apoio, companhia e principalmente pela amizade.

Ao meu orientador Mauricio Machaim Franco pela oportunidade, pelas horas dedicadas a mim, pelos ensinamentos e pelo jeito de ensinar, pelo otimismo, paciência e por acreditar em mim e me apoiar durante todo o trabalho. Um profissional exemplo, a quem tenho grande admiração.

Aos amigos Isabela, Eleonora, Carolina Prestes, Rosana, Allice, José Carvalho, Ana Luíza, Thiago, Sidney, Murilo, Valquíria, Heitor, José Spricigo, Otávio e Pablo, pela amizade, companhia, conselhos e momentos felizes que me proporcionaram. Pessoas que foram essenciais durante este período e agora são essências em minha vida.

Aos colegas de trabalho Anelise e Grazielle, pelo convívio e momentos de aprendizado.

Aos pesquisadores, Eduardo Mello, Ricardo Alamino, Bianca Damiani, Margot Dode e ao técnico Regivaldo Vieira de Souza, profissionais de grande capacidade com os quais tive o privilégio de conviver durante este período.

Agradeço em especial ao Dr. Carlos Frederico Martins e ao Dr. Samuel Rezende Paiva por fazerem parte da banca, e pelas correções e sugestões que engrandeceram este trabalho.

Aos funcionários da EMBRAPA pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte e pela bolsa concedida.

Agradeço à Universidade de Brasília pelo curso oferecido.

A todos que participaram da minha formação pessoal e profissional e que aqui não foram citados. Os meus mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xix
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.3 HIPÓTESE	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 EPIGENÉTICA	5
2.2 METILAÇÃO DE DNA	6
2.3 CÓDIGO DAS HISTONAS	9
2.4 <i>IMPRINTING</i> GENÔMICO	10
2.5 REPROGRAMAÇÃO EPIGENÔMICA	12
2.6 CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR	15
2.7 SUBSTÂNCIAS DESMETILANTES DE DNA	18
2.8 SAM: S- ADENOSILMETIONINA/SAH: S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA	19
2.9 O GENE XIST	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2	45
1 RESUMO	46
2 ABSTRACT	47
3 INTRODUÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 CULTIVO CELULAR DE FIBROBLASTO	51
4.2 CULTIVO CELULAR COM SAH (S- ADENOSIL L-HOMOCISTEÍNA)	52
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS CÉLULAS	53
4.4 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO	54
4.5 AMPLIFICAÇÃO POR PCR E PURIFICAÇÃO	55
4.6 CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR E SEQUENCIAMENTO	56
4.7 EXTRAÇÃO DO RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	57
4.8 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	57
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	60
5.1 RESULTADOS	60
5.2 DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	77
7. PERSPECTIVAS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

IMPACTOS DO USO DA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA (SAH) COMO AGENTE DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE BOVINOS

Juliana Mayumi de Azevedo¹, Maurício Machaim Franco^{1,2}

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Fatores epigenéticos são responsáveis por controlar a expressão de genes e diferenciação durante a vida celular. Dentre eles, a metilação do DNA é o mais estudado. Cada tipo celular possui um padrão epigenético altamente especializado. Após a fecundação natural ou clonagem por transferência nuclear (TNCS), um padrão epigenético préexistente deve ser apagado e restabelecido para garantir o correto desenvolvimento embrionário. Porém, nos clones, essa reprogramação é ineficiente mas é possível que o uso de substâncias desmetilantes de DNA utilizadas durante o cultivo celular de células doadoras de núcleo possa desmetilar o DNA, aumentando a eficiência da técnica. O objetivo desse estudo foi avaliar, em fibroblastos bovinos, o efeito da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) na viabilidade celular, metilação de DNA e expressão do transcrito específico do gene XIST responsável pela inativação do cromossomo X. Células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium -Gibco®), suplementado com 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM de SAH (Sigma®), incubado a 39°C e 5% de CO₂. O padrão de metilação do DNA foi avaliado através do sequenciamento de sequências de DNA tratadas com bissulfito de sódio, usando o kit EZ DNA methylation Kit™ (ZymoResearch®), para converter citosinas não metiladas. O RNA total das células foi extraído com o kit RNeasy Plus Micro kit (Qiagen®) e o transcrito de XIST foi quantificado por PCR em tempo real, usando GAPDH e CYC-A como controles endógenos. O número de células foi comparado entre o grupo controle e os grupos tratados com 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM de SAH e a metilação do DNA e a expressão entre o grupo controle e o grupo tratado com 2.0mM de SAH. Não houve diferença na viabilidade celular, metilação de DNA e expressão gênica entre os tratamentos. O grupo controle apresentou 100% de sequências hipermetiladas e 87,58% de metilação e o grupo tratado com 2.0mM de SAH apresentou 92,86% de sequências hipermetiladas e 82,35% de metilação. O uso do SAH como agente desmetilante no cultivo celular é uma alternativa viável que continua sendo estudada. Acredita-se que um processo de desmetilação

é induzido pelo uso do SAH durante o cultivo celular, contribuindo para o aumento da eficiência da TNCS. Contudo, é necessário avaliar outras concentrações e diferentes tempos de cultivo com o SAH.

Palavras chave: Fibroblastos, Bovino, SAH, metilação de DNA, XIST.

ABSTRACT**IMPACTS OF USING S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE IN BOVINE CELL CULTURE SYSTEM**

Juliana Mayumi de Azevedo¹, Maurício Machaim Franco^{1,2}

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

Epigenetic factors are responsible for controlling gene expression and differentiation through the cell life. Among them, DNA methylation is the most studied. Each cell type possesses a specific and highly specialized epigenetic pattern. After natural fertilization or cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT), a pre-existing epigenetic pattern must be erased and reestablished to ensure correct embryo development. However, in cloning this reprogramming is inefficient and it is possible that the use of a DNA demethylating substance can improve the efficiency of the technique. The aim of this study was to evaluate, in bovine skin fibroblasts, the effects of S-(5'-adenosyl)-L-homocysteine (SAH) on cell viability, DNA methylation and expression of the X-inactive specific transcript (XIST) gene. Cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco[®]) supplemented with 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM of SAH (Sigma[®]) incubated at 39°C with 5% CO₂ in air. The pattern of DNA methylation was assessed by bisulfite sequencing, using the EZ DNA methylation Kit[™] (ZymoResearch[®]) to convert unmethylated cytosines. Total RNA was extracted with the RNeasy Plus Micro kit (Qiagen[®]) and the XIST transcript was quantified by qPCR using GAPDH and CYC-A as endogenous controls. The number of cells was compared among 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM of SAH and control groups and DNA methylation and gene expression between control and 2.0mM groups. There were no differences in cell viability, DNA methylation and gene expression among treatments. Control group showed 100% of hypermethylated sequences and 87.58% of methylation and the 2.0mM group showed 92.86% of hypermethylated sequences and 82.35% of methylation. The use of SAH as a DNA demethylating agent in cell culture is a viable alternative and still little studied. It is believed that a demethylation process is induced by the use of SAH in the culture, contributing to increase the efficiency of SCNT. However, it is necessary to evaluate other concentrations and different times of cultivation with SAH.

Keywords: Fibroblasts, Bovine, SAH, DNA methylation, XIST.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Capítulo 1		
Figura 1.1.	Estrutura química do processo de metilação do DNA.	6
Figura 1.2.	Dinâmica da metilação ocorrendo durante o desenvolvimento normal e em clones. A - Em camundongos, a linha azul representa a desmetilação ativa do genoma parteno e a linha vermelha a desmetilação passiva do genoma materno. A linha roxa representa os embriões clones, mostrando uma desmetilação incompleta após a transferência. B - Em bovinos, ocorre desmetilação ativa e passiva e metilação <i>de novo</i> no estágio de oito a dezesseis células. Já em embriões clones a metilação <i>de novo</i> começa a ocorrer no estágio de quatro células.	14
Figura 1.3.	Representação esquemática do metabolismo da homocisteína.	20
Figura 1.4.	Estrutura genômica do gene XIST. Em verde o comprimento total do gene (36.535pb); em azul o RNA mensageiro (22.812 nucleotídeos). A seta vermelha indica a posição dos <i>primers</i> na ilha CpG estudada	23
Figura 1.5.	Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do gene XIST. Se a ilha CpG estiver metilada (CH ₃) a expressão do gene é reprimida correspondendo ao padrão do cromossomo X ativo. Se a ilha CpG estiver desmetilada permite a expressão do gene XIST que participa da inativação do cromossomo X inativado.	25

Capítulo 2		Página
Figura 2.1.	Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E alvo é a eficiência do gene alvo; E ref é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo threshold; ΔCP alvo é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo; ΔCP ref é desvio de CP do controle amostra do gene referência.	58
Figura 2.2.	Cultivo celular de fibroblastos bovinos após 72 horas de tratamento. A- Grupo controle, B- Suplementação com 0,5 mM de SAH, C- Suplementação com 1,0 mM de SAH, D- Suplementação com 1,5 mM de SAH, E- Suplementação com 2,0mM de SAH. Aumento de 100x. Barra: 500 μ m.	61
Figura 2.3.	Número de células viáveis (média \pm erro padrão) para cada um dos tratamentos com SAH contadas em câmara de Neubauer após adição de azul de tripan (células brancas).	62
Figura 2.4.	Eletroforese em gel de Agarose 1,8%, mostrando a presença do amplicon gerado pelo PCR <i>nested</i> para o gene XIST. As quatro primeiras bandas correspondem ao grupo controle e as quatro últimas correspondem ao grupo tratado com 2,0mM de SAH.	62
Figura 2.5.	Análise comparativa pelo software BIQ Analyzer da sequência obtida no <i>GenBank</i> com uma sequência obtida no experimento, mostrando os 17 sítios CpG. Em laranja e roxo estão indicados ossítios CpG não metilados, mostrando que a citosina foi substituída por uma timina. As duas sequências em laranja indicam os sítios CpG metilados, onde as citosinas não foram substituídas por timinas.	63

- Figura 2.6. Análise de metilação do gene XIST em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com SAH. A e B - Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG (total de 17 CpG). Círculo preto indica citosina metilada enquanto círculo branco não metilada. A- Grupo controle, com 100% de sequências hipermetiladas. B- Grupo tratado com 2,0mM de SAH com 92,86% de sequências hipermetiladas. C- Gráfico mostrando a porcentagem de metilação do DNA (média \pm erro padrão) para os dois tratamentos (A – 87,58% \pm 1,16989 B – 82,35% \pm 5,65803). 64/65
- Figura 2.7. **A-** Amplificação por qPCR do gene XIST, nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene XIST, nas células do grupo controle através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene XIST, nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene XIST, nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR (TM = 73,25°C). 66
- Figura 2.8. **A-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo controle através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR (TM = 79,48°C). 67
- Figura 2.9 **A-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo controle através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. (TM = 76,81°C). 68

- Figura 2.10 Eletroforese em gel de agarose 2%, mostrando a presença dos amplicons para os genes XIST, GAPDH e CYC-A. **A-** As bandas específicas com 148pb correspondentes ao gene XIST. **B-** As bandas com 118pb correspondentes ao gene GAPDH e **C-** As bandas com 65pb correspondentes ao gene CYC- A. 69
- Figura 2.11 Quantidade relativa (média \pm erro padrão) de RNA mensageiro do gene XIST para os grupos controle e tratado com 2,0mM de SAH, utilizando a média geométrica dos genes constitutivos GAPDH e CYC-A para a normalização. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 2.1.	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio.	55
Tabela 2.2.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento.	58
Tabela 2.3	Número de clones avaliados para cada tratamento por réplica.	63

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

°C - Grau Celsius
μL - microlitro
ADA - Adenosina-2,3-dialdeído
ATP - Trifosfato de adenosina
CGP - Células germinativas primordiais
cm - Centímetro
CO₂ - Dióxido de carbono
CTCF - Fator de ligação a seqüência CCCTC
CYC-A - Ciclofilina A
DMEM - Dubelco's Modified Eagle Medium
DMR - Região diferencialmente metilada
DMSO - Dimetilsulfoxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNMT - DNA metiltransferase
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECGC - Epigallocatequina-3-Galato
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
FIV - Fecundação *in vitro*
G - Unidade gravitacional
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H - Hora(s)
H19 - Histocompatibilidade 19
HDAC - Histonas desacetilases
HTM - Histonas metiltransferases
IA - Inseminação artificial
IC - Centro de *imprinting*
ICR - Região controladora de *imprinting*
IGF2 - Fator de Crescimento semelhante a Insulina tipo 2
IGF2R - Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
IPTG - Isopropyl-β-D-thio-galactoside
LB - Meio Luria Bertani
MBD - Proteínas ligadoras de metil
MCI - Massa celular interna
Mg - Miligramas
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
Mm - Milímetros
mM - Milimolar
O₂ - Oxigênio
pb - Pares de base
PBS - Solução salina em tampão fosfato
PCR - Reação em cadeia de polimerase
PIV - Produção *in vitro* de embriões
PTM - Modificações pós-traducionais
RPM - Rotações por minuto
qPCR - Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA - Acido ribonucléico
RNAm - RNA mensageiro
SAM - S-adenosilmetionina

SAH - S-adenosil-L-homocisteína
SFB - Soro fetal bovino
TE - Transferência de embriões
TN - Transferência nuclear
TNCS - Transferência nuclear de célula somática
USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
XCI - Inativação do cromossomo X ou Cromossomo X inativo
X-Gal - 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
XIST - Transcrito específico da inativação do X
XIC - Centro de inativação do X
Xm - Cromossomo X materno
Xp - Cromossomo X paterno
zdC - 5-Aza-2-deoxicitidina

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico e novos conhecimentos científicos, muitas biotecnologias têm sido desenvolvidas para a geração e multiplicação de animais mais produtivos. Dentre essas biotecnologias podem ser citadas a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIV), clonagem por transferência nuclear (TN) e a transgenia.

A técnica da transferência nuclear, cujo princípio consiste na fusão de uma célula diplóide (embrionária, fetal ou adulta) com um ovócito enucleado (Fulka *et al.*, 1998), apresenta-se como poderosa ferramenta biotecnológica. A utilização de células de cultura primária na produção de animais clonados com o emprego da técnica de TN constitui alternativa mais eficiente para a produção de bovinos transgênicos, objetivando a produção de proteínas de interesse humano e produção de animais mais resistentes e produtivos (revisto por Mello., 2003).

Mas apesar do uso dessa ferramenta ter aumentado de maneira significativa, sua eficiência ainda é baixa (Westhusin *et al.*, 2001). O cultivo *in vitro*, como a composição dos meios de cultivo, condições atmosféricas oferecidas *in vitro*, manipulação dos ovócitos e embriões, podem influenciar sua eficácia (Harvey *et al.*, 2004; Gardner & Lane., 2005; Correa *et al.*, 2008). Além disso, falhas de reprogramação das características epigenéticas das células somáticas causam alterações na expressão gênica global e nos genes *imprinted*, comprometendo a produção e a qualidade dos embriões (Xue *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005).

Após uma fecundação natural, um padrão epigenético preexistente nos gametas tem que ser desfeito para em seguida ser restabelecido. Essa reprogramação epigenética também deve ocorrer na clonagem, após a transferência nuclear, ou seja, a célula doadora necessariamente deve ter seu padrão epigenético desfeito para depois ocorrer a reprogramação. Estudos mostram que na clonagem essa reprogramação não acontece ou acontece de forma incompleta (revisto por Sasaki & Matsui., 2008).

Substâncias desmetilantes de DNA têm sido utilizadas em estudos mostrando uma significativa redução dos níveis de metilação existentes, induzindo a expressão de genes regulados por metilação, como por exemplo, genes supressores de tumor, podendo assim reverter a situação clínica do câncer (Aparicio *et al.*, 2003). Essas substâncias também têm sido utilizadas durante o cultivo celular de células doadoras de núcleo a fim de se obter uma

desprogramação antes da transferência nuclear (Jeon *et al.*, 2008). Desprogramando o núcleo antes da TN, a reprogramação epigenética poderá ocorrer de forma completa após a fusão, aumentando assim o sucesso da técnica. Essas substâncias não podem, porém ser mais um componente que irá comprometer o sucesso da técnica, tornando-se muito importante que substâncias desmetilantes não apresentem citotoxicidade celular, como por exemplo a S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que além de ser uma molécula normalmente produzida nas células (Cantoni., 1952), é uma substância não análoga de nucleosídeo (Purohit *et al.*, 2007).

Neste experimento foi analisado o padrão de metilação de uma ilha CpG localizada no éxon 1 do gene XIST e sua expressão em fibroblastos bovinos cultivados com a SAH. Este gene é controlado por fatores epigenéticos e está envolvido na inativação do cromossomo X (ICX) (Heard & Disteché., 2006), apresentando alterações em embriões produzidos *in vitro* e embriões provenientes da TN (Xue *et al.*, 2002; Dindot *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008).

Os processos epigenéticos ainda são pouco conhecidos em várias espécies animais, inclusive na bovina, necessitando de mais estudos para melhor entender a reprogramação epigenética e assim subsidiar o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de clonagem por transferência nuclear.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em fibroblastos bovinos, os efeitos do cultivo *in vitro* e do uso da S-adenosil-L-homocisteína sobre a viabilidade celular, padrões de metilação do DNA e expressão gênica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer o cultivo *in vitro* de fibroblastos em meios com diferentes concentrações de S-adenosil-L-homocisteína (SAH);
- b) Avaliar a dinâmica de crescimento de fibroblastos de bovinos cultivados com a SAH;
- c) Quantificar o padrão de metilação da região diferencialmente metilada (DMR) do éxon 1, que controla a expressão do gene XIST nas células cultivadas com diferentes concentrações de SAH;
- d) Quantificar a expressão do gene XIST nas células cultivadas com diferentes concentrações de SAH;

1.3 HIPÓTESES

Fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com a S- adenosil- L- Homocisteína apresentam um padrão de DNA hipometilado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epigenética

O avanço no conhecimento sobre processos biológicos de plantas e animais se deu muito devido ao seqüenciamento genômico de várias espécies. No entanto, a determinação dos padrões de expressão gênica não depende apenas da seqüência primária de DNA. A organização da cromatina exerce função chave neste processo: regiões menos compactadas da cromatina (eucromatina) são mais acessíveis à transcrição, já as regiões mais compactadas da cromatina (heterocromatina) são menos acessíveis à transcrição. Sabe-se que muitos eventos epigenéticos são responsáveis por controlar essa organização e conseqüentemente a expressão de genes ao longo da vida de uma célula (revisto por Lund & van Lohuizen., 2004). O termo epigenética é uma área da genética que estuda todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional capazes de alterar a expressão gênica e o fenótipo das células, sem alterar, porém a seqüência primária de nucleotídeos do DNA (Santos & Dean., 2004; Sasaski & Matsui., 2008; Dupont *et al.*, 2009).

Já se conhecem alguns tipos de marcações epigenéticas que regulam o funcionamento do genoma ao longo da vida. As mais conhecidas são metilação de DNA, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação, nitrilação, ADP-ribosilação, glicosilação entre outras modificações pós-traducionais (PTMs) que as histonas sofrem, conhecido como código das histonas (Junuwein & Allis., 2001).

Todos estes mecanismos parecem estar interligados para a organização estrutural da cromatina, controle dos genes *imprinted*, para o silenciamento de elementos repetitivos do genoma, para a inativação do cromossomo X, regulação da expressão gênica, diferenciação celular contribuindo para a formação dos tecidos e ao processo do desenvolvimento embrionário (revisto por Bird *et al.*, 2002; revisto por Bernstein & Lander., 2007).

Além disso, os fatores epigenéticos são fortemente influenciados pelo ambiente. Alterações ambientais como, ataque de patógenos, tipo de alimentação, temperatura, podem acarretar em mudanças epigenéticas.

O estudo da epigenética portanto, tornou-se essencial para o melhor entendimento da genômica funcional (Furlan, *et al.*, 2012).

2.2 Metilação de DNA

A metilação do DNA constitui uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas e parece ser a principal responsável pela herança epigenética entre as gerações (NG & Gurdon., 2005; Tchurikov., 2005). Além disso, desempenha importante função na regulação de muitos processos biológicos em animais vertebrados, plantas e fungos (Colot & Rossignol., 1999), por isso é um dos eventos epigenéticos mais estudados.

Estudos mostram que através de uma evolução de um mecanismo de defesa, a metilação do DNA surgiu para combater genomas parasitários presentes em bactérias, que utilizam metilação para proteger o próprio DNA da ação de enzimas de restrição (Kaneko Ishino & Khoda Ishino., 2003).

A metilação é uma ligação covalente ao DNA, estável, que ocorre pela adição de um grupamento metil (CH₃), proveniente da S-adenosil metionina, no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas, localizadas na posição 5' das guaninas na molécula de DNA, resultando na base modificada 5-metilcitosina (Figura 1.1).

Em torno de 70 a 80% das 5-metilcitosinas do genoma dos mamíferos estão concentradas em regiões de intensa repetição conhecidas como ilhas CpG, localizadas principalmente nas regiões promotoras de alguns genes, e um percentual muito menor localizado nas seqüências CpNpG (N = qualquer nucleotídeo) (Ramchandani *et al.*, 1999).

As ilhas CpGs representam aproximadamente 3% do genoma total e são foco de pesquisas em câncer, no processo de diferenciação celular e na clonagem de mamíferos (Gebert *et al.*, 2009).

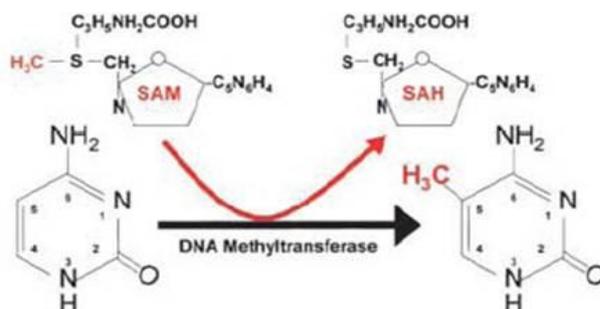


Figura 1.1- Estrutura química do processo de metilação do DNA (CMLS Cell. Mol. Life Sci 59 (2002).

A principal função da metilação é a repressão da expressão gênica, que é baseada em dois mecanismos. O primeiro consiste no impedimento da ligação dos fatores de transcrição à molécula de DNA, que se dá através da metilação das CpGs no DNA. Na maioria dos mamíferos, as regiões CpGs possuem sítios de reconhecimento e ligação, nos quais a maquinaria transcricional requer contato para que ocorra sua ligação com a molécula de DNA. A metilação dos fatores de transcrição ou das regiões CpGs impedem essa ligação, reprimindo assim a expressão gênica (Iguchi-Arigo & Schaffner., 1989; Robertson *et al.*, 2000, 2004). O segundo mecanismo de repressão da transcrição se dá pelas proteínas ligadoras de metil (MBD), que ao serem recrutadas se ligam ao DNA metilado, impedindo a ligação dos fatores de transcrição. As proteínas ligadoras de metil que estão envolvidas na repressão transcricional são: MBD1, MBD2, MBD3 e MeCP2 (proteína ligadora de metil CpG2) (NG *et al.*, 1999). A MBD1 e a MeCP2 participam do recrutamento das enzimas histonas desacetilases (HDACs) provocando a desacetilação das histonas (remoção do grupo acetil-COCH₃). A remoção desses grupos provoca a remodelação da cromatina para uma forma mais compactada, impedindo assim a transcrição gênica. Já a MBD2 e MBD3 fazem parte de outra estrutura protéica, a MeCP1, que se liga ao DNA silenciando a transcrição (NG *et al.*, 1999). Estudos mostram que a MeCP1 causa silenciamento transcricional apenas transitório, por possuir menor afinidade à molécula de DNA do que a MeCP2, que gera um silenciamento permanente (NG *et al.*, 1999).

De maneira geral, ocorre silenciamento da transcrição de genes quando há hipermetilação de regiões promotoras, enquanto a hipometilação está associada à transcrição destes genes (NG *et al.*, 1999).

As ilhas CpG geralmente estão localizadas em diferentes regiões, regiões promotoras, regiões diferencialmente metiladas (DMR) ou em regiões controladoras de *imprinting* (ICR) (Gebert *et al.*, 2009). A metilação de DNA, de modo geral, interfere na expressão gênica auxiliando no controle dessa expressão. A região promotora pode receber essa metilação, podendo ser um evento comum aos dois alelos. Já em regiões diferencialmente metiladas (DMR) a metilação ocorre em apenas um dos alelos de uma região promotora, o que ocorre com os genes *imprinted*. Se a metilação estiver fora da região promotora, mas for responsável pela manutenção de um *locus* de um gene *imprinted*, refere-se a uma região controladora de *imprinting* (ICR) (Gebert *et al.*, 2009).

As enzimas envolvidas no processo de metilação pertencem à família das DNA metiltransferases (DNMTs). As DNMTs são enzimas responsáveis tanto pela metilação de

manutenção, quanto pela metilação *de novo* dos dinucleotídeos (Swales & Spears., 2005). A metilação de manutenção é relacionada à replicação do DNA (Leonhardt *et al.*, 1992), enquanto que a metilação *de novo* é observada durante a gametogênese e em embriões no início do desenvolvimento (Jähner *et al.*, 1982). As enzimas DNA metiltransferases envolvidas nesses dois processos são: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L.

Na tentativa de entender melhor o envolvimento dessas enzimas nos processos de metilação, alguns estudiosos realizaram experimentos de *knockout* gênico em camundongos e células tronco embrionárias. No *knockout* do gene DNMT1, observou-se uma extensa desmetilação de todas as seqüências examinadas (Li *et al.*, 1992; Lei *et al.*, 1996). Além disso, a proteína DNMT1 foi identificada no sítio de replicação do DNA. Esses resultados geram evidências de que a DNMT1 funciona como a principal metiltransferase de manutenção, garantindo a replicação dos padrões de metilação do DNA após cada ciclo de divisão celular, metilando o DNA hemimetilado. A proteína responsável por esse processo é a UHRF, que reconhece a fita hemimetilada e recruta a DNMT1, sustentando o perfil epigenético (Barreto *et al.*, 2007).

Já as DNMT3A e DNMT3B mostraram uma estrita relação com a metilação *de novo*. Estudos mostraram que o *knockout* desses genes em camundongos e células tronco embrionárias causou uma desorganização na metilação *de novo*, acarretando morte embrionária durante o desenvolvimento (Okano *et al.*, 1999). Porém, no *knockout* da DNMT2 nas mesmas células, não foi observado perturbação na metilação *de novo* ou na metilação de manutenção, mostrando que a mesma pode não estar envolvida neste processo (Okano *et al.*, 1998). O envolvimento da DNMT1 neste processo é incerto.

No *knockout* do gene DNMT3L de camundongos, regiões *imprinted* não apresentaram metilações, levando a expressão bialélica desses genes (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Kaneda *et al.*, 2004), mostrando que embora não apresente atividade catalítica, ou seja, não possua um sítio ativo, a DNMT3L auxilia no estabelecimento do *imprinting* materno (Bourc'his *et al.*, 2001) e desempenha importante papel na regulação do estabelecimento dos genes *imprinting*.

2.3 Código das histonas

Nos eucariontes, a unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que consiste em um complexo protéico formado por quatro pares de proteínas, as histonas. As histonas são as principais proteínas que compõem a cromatina, formam uma “matriz” na qual o DNA se enrola, possuem importante papel na conformação da cromatina e conseqüentemente na expressão gênica (Jenuwein & Allis., 2001; Chakravarthy *et al.*, 2005).

O nucleossomo é formado por oito moléculas de histonas, duas cópias da H3, H4, H2a e H2b, que são constituídas por 102 a 135 aminoácidos. Esse octâmero encontra-se envolto de DNA contendo aproximadamente 146 pares de nucleotídeos, além disso, encontra-se ligado a outra histona, a histona H1 (Zhou *et al.*, 1998; Sivolob *et al.*, 2003).

A histona H1 possui cerca de 220 aminoácidos e liga-se externamente ao centro do nucleossomo e ao DNA, formando uma fibra e enrolando o DNA de uma forma ainda mais eficaz. Essa classificação, H1, H2a, H2b, H3 e H4 se dá em função da proporção de aminoácidos lisina e arginina presentes nas histonas, que conferem a essas estruturas uma carga positiva, formando um complexo juntamente com os grupos fosfatados do DNA, que são carregados negativamente (Zhou *et al.*, 1998; Sivolob *et al.*, 2003).

Além disso, as extremidades N-terminais de todas as histonas, exceto a H1, se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer várias modificações pós-traducionais (PTM), podendo assim modificar a estrutura da cromatina (revisito por Jenuwein & Allis., 2001). As PTMs mais estudadas são a acetilação, a metilação (mono, di e trimetilação) e a fosforilação (Strahl & Allis., 2000; Li., 2002; Delcuve *et al.*, 2009). Essas modificações estão relacionadas ao grau de compactação, manutenção da cromatina e conseqüentemente na regulação dos genes (Dean *et al.*, 2003).

Estudos mostram que as lisinas metiladas estão envolvidas no silenciamento gênico de heterocromatina, e que a metilação das argininas está envolvida com o processo de ativação de genes (Fischele *et al.*, 2005).

As histonas podem receber essas alterações pós-traducionais em vários resíduos de aminoácidos diferentes. Existem mais de 60 resíduos diferentes com modificações que foram detectados por meio de anticorpos específicos (Kouzarides., 2007), por exemplo, mono, di, e trimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9), dimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me2), metilação da lisina 20 da histona H4 (H4K20me), entre outros (Kouzarides., 2007).

A hipacetilação das histonas H3 e H4, hipometilação da lisina 4 da histona H3 e a hipermetilação da lisina 9 da histona H3, levam a cromatina a um estado de heterocromatina, ou seja, transcricionalmente inativa (Jasencakova *et al.*, 2003). Essas “combinações” de fatores epigenéticos não são aleatórias, acredita-se que a ação das enzimas ocorra de forma organizada e sincronizada, um fator funcionando como uma âncora para recrutar outros efetores (Grewall *et al.*, 2007; Jasencakova *et al.*, 2003).

Existem algumas hipóteses que explicam a interação entre a metilação das histonas e a metilação do DNA. Jackson e colaboradores em 2002 sugerem que a metilação das histonas ligada a proteínas de heterocromatina podem recrutar DNMTs e metilar o DNA. Outro modelo sugere que proteínas que dependem de ATP e da atividade de DNA helicase, acabam remodelando o DNA aumentando assim o acesso à estrutura do nucleossomo e facilitando a metilação do DNA e modificações das histonas por ação das DNMTs, HDACs e HTMs (revisado por Li., 2002). Há ainda um modelo que relata que após o DNA ser metilado pelas DNMTs essa nova estrutura recruta proteínas ligantes a metil-CpG desacetilando as histonas por enzimas histonas desacetilases (HDAC), podendo também ser metilado por histonas metiltransferases (HTM) (Jackson *et al.*, 2002).

O código das histonas é, portanto formado pela grande variedade de modificações que as histonas podem sofrer, incluindo o alto número de resíduos que podem ser modificados dentro da cauda das histonas. Essas alterações individuais ligadas aos vários processos nucleares formam combinações específicas que determinam funções também específicas (Jasencakova *et al.*, 2003).

2.4 Imprinting genômico

O imprinting genômico consiste na expressão monoalélica dos genes de acordo com a sua origem parental, ou seja, ao contrário dos genes mendelianos, há expressão de apenas uma, entre as duas cópias herdadas de um gene (Reik & Walter., 2001). Os genes imprinted paternos têm o alelo paterno epigeneticamente modificado, impedindo a transcrição e garantindo a expressão monoalélica do gene materno, e vice e versa. O imprinting genômico gera diferentes fenótipos, dependendo da origem do alelo, paterna ou materna (Alho., 2004).

Experimentos demonstraram que ambos os genomas parentais são necessários para o desenvolvimento de mamíferos e foi possível demonstrar que a função dos genomas paterno e materno não é equivalente (Barton *et al.*, 1984). Em mamíferos foram descritos atualmente cerca de 80 genes regulados por *imprinting* (www.geneimprint.com), esses genes são importantes para o crescimento embrionário, controle do ciclo celular, padrões de comportamento e o desenvolvimento placentário (Li *et al.*, 1998; Isles & Wilkinson., 2000; Reik & Walter., 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2002).

Um dos mecanismos da repressão da expressão gênica nos genes *imprinted* é alto nível de compactação da cromatina, ocasionada principalmente pela metilação do DNA, gerando maior resistência à transcrição, como no caso do gene XIST (Reik *et al.*, 1987). Este mecanismo pode ser causado por variados graus de metilação do DNA (Alho., 2004).

Como os genes *imprinted* estão localizados em grupos e geralmente são controlados por elementos que se ligam na região controladora de *imprinting* (ICR) ou centros de *imprinting* (IC) (Edwards & Ferguson- Smith., 2007) outro mecanismo envolvido no controle da expressão desses genes é a proteína isolatória CTCF, que se liga em ICRs não metiladas ou hipometiladas, contribuindo para bloquear o acesso dos fatores de transcrição ao promotor (Matsuzaki *et al.*, 2010). As ICRs são sequências de DNA ricas em CpG que, no caso de genes *imprinted*, são metiladas em um dos dois gametas parentais.

Um exemplo da atuação da proteína CTCF é o controle da expressão dos genes IGF2 e H19 que estão localizados adjacentes, no cromossomo 29 e compartilham os mesmo *enhancers*. No alelo materno a ICR presente na H19 encontra-se desmetilada, então a proteína insuladora CTCF se liga à ICR impedindo o acesso dos *enhancers* ao promotor do gene IGF2, ativando assim o promotor do H19. No alelo paterno, a ICR do H19 encontra-se hipermetilada, portanto, não há ligação da proteína CTCF, permitindo que *enhancers* ativem o promotor de IGF2 expressando esse gene e bloqueando a expressão de H19 (Yang *et al.*, 2003; Murrel *et al.*, 2004).

Outro modelo de controle da expressão gênica é a regulação do gene XIST. Pode ser controlado direta ou indiretamente por fatores de pluripotência, pela transcrição do gene TSIX, um gene que transcreve um RNA antisense ao XIST, pelo RNA repA, que junto à um complexo protéico (PRC2), se liga ao promotor do gene XIST aumentando sua transcrição. O RNA XIST por sua vez, cobre o cromossomo em *cis* e recruta fatores epigenéticos e outros complexos protéicos para que a inativação de um cromossomo X seja mantida (Del Arenal *et al.*, 2011).

O *imprinting* genômico é um processo passível de erros, como por exemplo, mutações. Caso ocorra mutação no alelo silenciado, nenhum efeito pode ser obviamente esperado. Se ocorrer no alelo ativo, poderá haver ausência de produção de uma determinada proteína; porém, se ocorrer no Centro de *Imprinting*, poderá acometer um número maior de genes devido à sua maior abrangência (Greally & State., 2000).

Existem outras regiões, as DMRs que fazem parte dos ICRs. Essas regiões são estabelecidas na linhagem germinativa. Quando há alto nível de metilação do DNA no espermatozóide e ausência de metilação no ovócito resulta um *imprinting* paterno. A situação inversa resulta em um *imprinting* materno. Essa metilação parental específica é mantida ao longo do desenvolvimento, sem sofrer o efeito da reprogramação *de novo* que ocorre após a fecundação (Tremblay *et al.*, 1995).

2.5 Reprogramação epigenômica

A reprodução em mamíferos é um processo ordenado, após a união das células germinativas um zigoto indiferenciado e totipotente é formado. Ao longo do desenvolvimento, uma série de tipos celulares diferenciados e específicos passa a fazer parte do indivíduo adulto (Surani., 2001).

O primeiro ciclo de reprogramação nuclear ocorre após a fecundação. Como cada gameta possui sua marca epigenética, após a fecundação, é necessário que ocorra uma reprogramação no genoma do zigoto pré- formado, para que essas marcas epigenéticas gaméticas sejam apagadas e sejam estabelecidas marcas embrionárias. Nesta fase, um processo de desmetilação do DNA é iniciada, em ambos os genomas, paterno e materno, além do apagamento de outras marcas epigenéticas (Reik *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2005) (Figura 1.2).

Em camundongos, o genoma do espermatozóide é ativamente desmetilado, após 4 horas da fecundação, sofrendo uma rápida perda de metilação de DNA. Estudos mostram que essa rápida desmetilação é ocasionada pela ligação de proteínas com complexos desmetilases, que aceleram esse processo (Barreto *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). Além disso, o gameta masculino precisa substituir rapidamente as protaminas por histonas acetiladas,

originadas do citoplasma do ovócito (Heijden *et al.*, 2005), para que inicie a duplicação do seu material genético (Kitsberg *et al.*, 1993) (Figura 1.2).

Enquanto que no genoma proveniente do gameta feminino ocorre uma desmetilação passiva, após o estágio de 2 células até o estágio de 8-16 células, deixando de ser metilado durante as divisões celulares (revisto por Reik & Walter., 2001) (Figura 1.2).

Essa onda de desmetilação dos genomas provenientes dos gametas “apaga” quase todo o padrão de metilação herdado dos pais, exceto dos genes *imprinted*, sendo seguida de um processo de metilação *de novo* que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial, estabelecendo assim os padrões de metilação do embrião (Mann & Bartolomei., 2002). Nos bovinos, a metilação *de novo* ocorre a partir do estágio de 8 a 16 células (Monk *et al.*, 1987; Sanford *et al.*., 1987; Kafri *et al.*, 1992; Reik *et al.*, 2001; Young & Beaujean., 2004) (Figura 1.2).

Como citado anteriormente, os genes *imprinted* não sofrem essa reprogramação durante a embriogênese. Esses genes devem manter o seu padrão de metilação durante essa fase, que é controlado por fatores epigenéticos (Gehring *et al.*, 2009). Estudos mostram que alguns centros reguladores de *imprinting* (ICRs) não sofrem o processo de desmetilação por estarem protegidos por um complexo de proteínas e enzimas, e que regiões diferencialmente metiladas individuais são importantes para a expressão dos genes *imprinted* (revisto por Feil & Khosla., 1999).

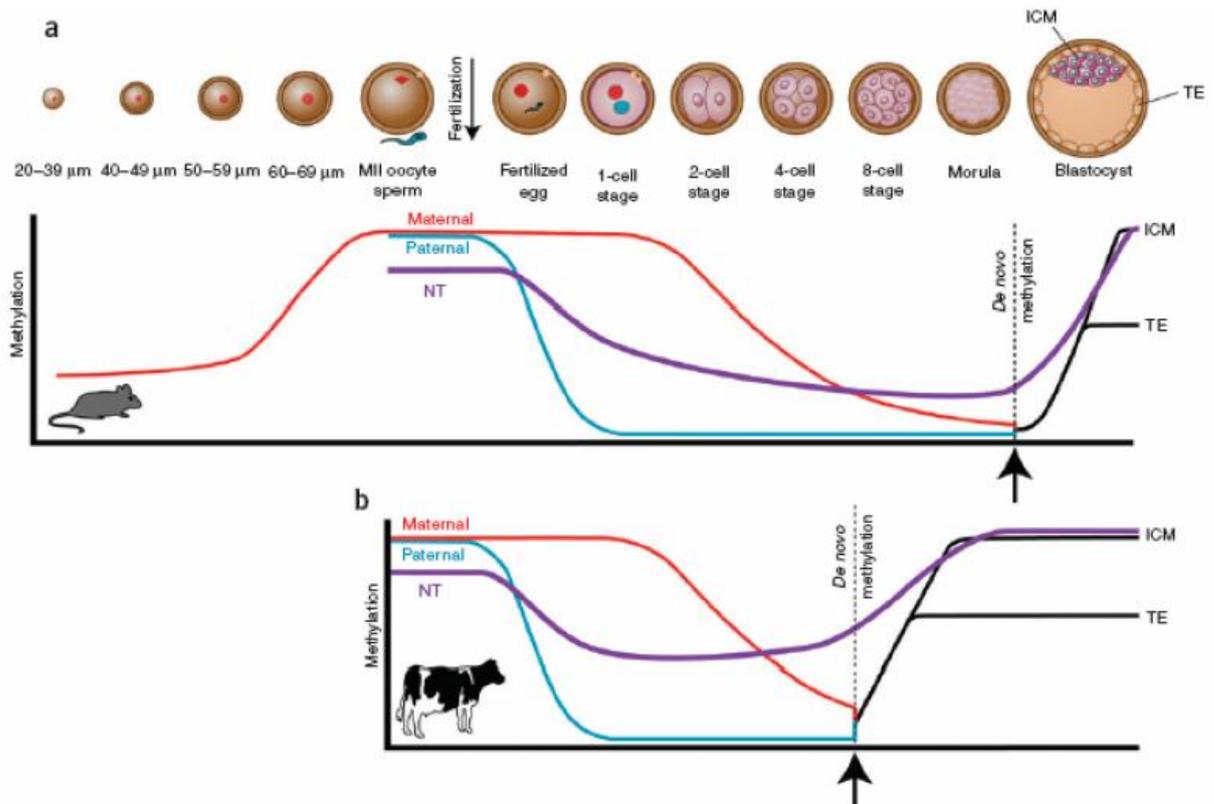


Figura 1.2- Dinâmica da metilação ocorrendo durante o desenvolvimento normal e em clones. **A** - Em camundongos, a linha azul representa a desmetilação ativa do genoma paterno e a linha vermelha a desmetilação passiva do genoma materno. A linha roxa (NT- transferência nuclear) representa os embriões clones, mostrando uma desmetilação incompleta após a transferência. **B** - Em bovinos, ocorre desmetilação ativa e passiva e metilação *de novo* no estágio de oito a dezesseis células. Já em embriões clones a metilação *de novo* começa a ocorrer no estágio de quatro células. **ICM**- massa celular interna. **TE**- trofoblasto (Modificado de Yang *et al.*, 2007).

A desmetilação do genoma do embrião formado é realizada por fatores genéticos do ovócito, assim como a reprogramação epigenética global do mesmo. Com isso, estudos indicam que danos na estrutura do citoplasma do ovócito ou aquisição de fatores estranhos a ele podem comprometer esse processo (Surani., 2001).

Sinclair e colaboradores em 2000, afirmaram que, perdas citoplasmáticas e introdução de fatores somáticos ao ambiente embrionário podem ocorrer durante técnicas de reprodução assistida, como a transferência nuclear. Esses tipos de danos podem comprometer o processo de reprogramação e conseqüentemente alterar a programação da expressão de diversos genes (Humpherys *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). Em processos de transferência nuclear, a falta de reprogramação ou a reprogramação incompleta dos núcleos doadores, podem comprometer a viabilidade embrionária (Kang *et al.*, 2001).

No segundo ciclo de reprogramação nuclear, apenas no genoma das células germinativas primordiais (CGP) que ocorre a desprogramação da metilação do DNA referente aos genes *imprinted*. Ao longo do processo da gametogênese, as células germinativas primordiais devem ter a sua metilação do DNA biparental original apagada e posteriormente restabelecida (Pedone *et al.*, 1999), pois indivíduos em desenvolvimento necessitam adquirir um padrão epigenético adequado ao sexo nas suas células germinativas (Pedone *et al.*, 1999).

Além disso, essa reprogramação dos genes *imprinted* também faz-se necessária para que o perfil epigenético herdado seja retirado, reduzindo assim possíveis epimutações adquiridas por efeitos ambientais (revisto por Reik *et al.*, 2001).

Através da metilação *de novo*, as duas fitas do DNA que estavam desmetiladas irão receber um novo padrão de metilação de acordo com sua especificidade celular (Khosla., 1999), ovócito ou espermatozóide.

Reik e colaboradores, em um trabalho de 2007, afirmam que em CGPs, indivíduos machos e fêmeas estabelecem seu perfil epigenético *imprinting* em períodos totalmente diferentes. Acredita-se que a remetilação nas CGPs femininas ocorra após o nascimento, durante o crescimento do ovócito (Matsui., 2008). E nas CGP masculinas, a remetilação ocorre mais cedo, no estágio de pró-espermatogônia em embriões de camundongos. Em bovinos, o modelo epigenômico *in vivo* dos genes *imprinted* nas CGP ainda não está estabelecido (Liu *et al.*, 2008).

2.6 Clonagem por transferência nuclear

A técnica da clonagem foi originalmente desenvolvida em anfíbios para estudar os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular e totipotência embrionária (Robl., 1999).

Em 1981, Illmensee e Hoppe utilizando células de embriões como doadoras de núcleo, anunciaram o nascimento de três camundongos clonados, os primeiros clones de mamíferos produzidos pela técnica de transferência nuclear. Após várias tentativas e muitos estudos, em 1997 Wilmut e colaboradores obtiveram sucesso na clonagem de um mamífero, a ovelha Dolly, a partir de uma célula somática diferenciada. Desde então, a clonagem de animais adultos já foi relatada em diversas espécies: bovinos (Kato *et al.*, 1998),

camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999), suínos (Polejava *et al.*, 2000), gatos (Shin *et al.*, 2002), coelhos (Chesne *et al.*, 2002), ratos (Zhou *et al.*, 2003), eqüinos (Galli *et al.*, 2003), cervídeos (Burke., 2003), cães (Lee *et al.*, 2005) e furões (Li *et al.*, 2006).

A clonagem por transferência nuclear consiste na produção de indivíduos geneticamente idênticos (Fulka *et al.*, 1998) a partir da transferência nuclear de uma célula somática (TNCS), na qual uma célula doadora de núcleo ou um carioplasto (núcleo celular com um pouco de citoplasma) é introduzido(a) em um ovócito enucleado (citoplasto) que sofre uma ativação artificial para o desenvolvimento de um novo indivíduo. No entanto, o carioplasto é uma célula diferenciada, possuindo um padrão epigénético muito diferente dos gametas e precisa se tornar indiferenciada novamente para o sucesso da técnica (revisto por Jaenisch & Bird., 2003; revisto por Niemann *et al.*, 2008).

Apesar da utilização e do sucesso da clonagem em várias espécies, a eficiência dessa técnica ainda é muito baixa. Em bovinos, ainda durante o período de cultivo *in vitro*, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos têm-se mostrado bastante variáveis, de 5% a 65% (Westhusin *et al.*, 2001), e os resultados de obtenção de gestações a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (Cibelli *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999).

As falhas do desenvolvimento embrionário e de placentação estão entre as principais causas de perdas durante a gestação de clones (Hill *et al.*, 2000). Estas alterações podem estar relacionadas com as próprias condições de cultivo, como presença de soro e aminoácidos (Rinaudo & Schultz., 2004), hormônios (revisto por Lucifero *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007), concentração de oxigênio no sistema *in vitro* (Correa *et al.*, 2008), que podem afetar de maneira negativa a qualidade de embriões produzidos *in vitro*, causando alterações no padrão de metilação do DNA, alterações de genes *imprinted* e alteração de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e de placentação (Shi & Haaf., 2002; Ludwig *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007). Estudos mostram que alterações de genes *imprinted*, como a expressão bialélica dos genes XIST, H19, IGF2 e IGF2R estavam presentes em clones que não sobreviveram e uma expressão normal desses genes foi encontrada nos sobreviventes (Xue *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005).

Outro importante aspecto que deve ser considerado é a qualidade do citoplasma do ovócito a ser utilizado, pois este está envolvido em diversos processos após a transferência nuclear como, garantir a complementação da meiose, fecundação, garantir as divisões

mitóticas no início do desenvolvimento embrionário (Katz Jaffe *et al.*, 2009) e a reprogramação epigenética (revisto por Sasaki & Matsui., 2008) até a ativação do genoma embrionário (revisto por Solter., 2000).

Na tentativa de melhorar a eficiência da técnica, alguns estudos têm buscado alterar o estado epigenético da célula doadora de núcleo antes da reconstrução, pois o embrião proveniente da TN além de se reprogramar em um espaço de tempo mais curto que no sistema natural (revisto por Solter., 2000; revisto por Sasaki & Matsui., 2008), a remetilação do DNA ocorre antes, no estágio de 4 células (Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001). Conseqüentemente, as células mantêm um padrão hipermetilado, inviabilizando o desenvolvimento. Apenas os embriões que conseguem se reprogramar corretamente são capazes de se desenvolver até a fase adulta (revisto por Sasaki & Matsui., 2008).

Após a reconstrução e a fusão da célula doadora com o citoplasma receptor (citoplasto), uma série de reações em cascata ocorre entre o núcleo e o citoplasma e outro problema que pode influenciar a competência do desenvolvimento é a herança mitocondrial diferente (Fu *et al.*, 2008).

Características de citoplasma receptor (citoplasto), como seu estágio de desenvolvimento e sua posição no ciclo celular, também tem grande importância no sucesso da técnica, pois o desenvolvimento do embrião após a TN depende fundamentalmente da compatibilidade entre o núcleo doador e o citoplasma receptor (Zakhartchenko *et al.*, 1997). Núcleos em estado quiescente (G0), no qual o ciclo de divisão celular é interrompido momentaneamente, assemelham-se às células espermáticas no momento da fecundação, sendo esse fato importante para o estabelecimento da correta ploidia do embrião reconstruído, mostrando-se mais eficientes na TN (Fulka *et al.*, 1998).

De qualquer forma, as anormalidades observadas nos animais clonados não são transmitidas para as progênes, ou seja, não são herdáveis (Tamashiro *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2004; Wells., 2005). Podendo concluir então que as causas dessas anormalidades são geradas por falhas de reprogramação das características epigenéticas das células somáticas, provocando alterações na expressão gênica global e nos genes *imprinted*, e não por alterações cromossômicas ou mutações do DNA.

Portanto, almejando-se melhores índices de produção de embriões clones em animais, torna-se muito importante entender e controlar os mecanismos epigenéticos possivelmente susceptíveis às agressões dos sistemas de produção *in vitro* para que se obtenha um bom núcleo doador (revisto por Eilertsen *et al.*, 2007).

2.7 Substâncias desmetilantes de DNA

Danos durante o procedimento de TN podem comprometer os processos de reprogramação e conseqüentemente alterar a expressão de diversos genes (Humpherys *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007), e a reprogramação incorreta de núcleos doadores nesta técnica pode comprometer a viabilidade embrionária (Bourc'his *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001). O embrião proveniente da TN mantém um padrão hipermetilado (revisto por Solter., 2000; Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001; revisto por Sasaki & Matsui, 2008), o que inviabiliza o desenvolvimento embrionário.

Alguns estudos vêm adicionando ao cultivo celular diferentes substâncias para desmetilar o genoma, como por exemplo, a 5-aza-2'-deoxicitidina (zdC), antibióticos (Mitramicin A e Nanomicin A), a procainamida, a procaína, a Epigalocatequina-3-galato (ECGC), a S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Algumas são incorporadas à moléculade DNA, como as substâncias análogas de nucleosídeos, impedindo a ação das DNMTs e conseqüentemente a metilação do DNA (Aparicio *et al.*, 2003; Villar-Garea., 2005). Outras interagem com enzimas transmetilases, ou seja, impedem a metilação sem incorporar na molécula de DNA, as substâncias não análogas de nucleosídeos (Deng *et al.*, 2003). Dentre as substâncias não análogas de nucleosídeos está a SAH.

A 5-aza-2'-deoxicitidina é um análogo da citosina que se incorpora à molécula de DNA e se liga irreversivelmente à DNA-metiltransferase (DNMT), inibindo a ação desta enzima no processo de divisão celular (Colot & Rossignol.,1999). O uso da 5-aza-2'-deoxicitidina em diversos estudos mostrou uma significativa redução dos níveis de metilação existentes, induzindo a expressão de genes regulados por metilação, como por exemplo, genes supressores de tumor, podendo assim reverter a situação clínica do câncer (Villar-Garea., 2005).

Experimentos com Mitramicin A resultaram na deleção da DNMT1, reduzindo a metilação nas ilhas CpG de genes supressores de tumor bem como a mobilidade das células cancerosas (Lin *et al.*,2007). A Nanaomicin A, outro antibiótico, apresentou resultado semelhante quanto à diminuição da metilação e reexpressão de genes supressores de tumor, porém a enzima alvo desse antibiótico é a DNMT3a (Kuck *et al.*, 2010).

A procaína é um anestésico local, de baixa toxicidade, utilizado na medicina e na medicina veterinária, e é uma substância não análoga de nucleosídeo que se intercala com

a molécula de DNA alterando sua estrutura e impedindo assim a ligação do DNA com outras proteínas, como as DNMTs (Zacharia & Koopman., 1990). A procainamida é um análogo sintético da procaína, também considerado um inibidor de metilação não análogo de nucleosídeo. Apesar do seu mecanismo de ação ainda não estar determinado, estudos mostram seu efeito na reativação de genes supressores de tumor (Villar-Garea *et al.*, 2003).

A ECGC tem sido bastante estudada por ser um dos compostos do chá verde. Estudos mostram que a utilização dessa substância *in vitro* provocou uma desmetilação do DNA e reexpressão de genes supressores de tumor, possivelmente através da sua ligação com a DNMT1 (Fang *et al.*, 2003).

O SAH é uma substância endógena, um dos produtos do metabolismo da metionina na célula, considerado por Jeon e colaboradores (2008) um importante indutor de desmetilação do DNA.

2.8 SAM: S-adenosilmetionina/SAH: S-adenosil-L-homocisteína

A S-adenosilmetionina (SAM), descoberta em 1952 (Cantoni., 1952), é uma substância naturalmente presente nas células do corpo, encontrada no núcleo celular, no citoplasma e meio extracelular, proveniente do ciclo da metionina, sendo um cofator enzimático envolvido na transferência de grupamentos metil. É formada a partir de adenosina tri-fosfato (ATP) e metionina pela enzima metionina adenosiltransferase. As vias metabólicas que fazem o uso da SAM são transmetilação, transulfuração e aminopropilação. Apesar destas reações anabólicas ocorrerem por todo o corpo, a maioria da SAM é produzida e consumida no fígado (Cantoni., 1952).

O grupamento metil que está ligado ao átomo de enxofre na SAM é quimicamente reativo, permitindo a doação deste grupo para um substrato receptor em reação de transmetilação. Mais de 40 reações metabólicas envolvem a transferência de grupos metil da SAM para vários substratos, como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Cantoni., 1952).

A família das DNA metiltransferases que é responsável por catalisar a adição do grupamento metil na maioria das reações de transmetilação. Após a transferência desse grupamento metil, a SAM é convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) (Fowler., 1997; Mudd *et al.*, 2001) (Figura 1.3).

A SAH é hidrolisada a adenosina e homocisteína. A homocisteína por sua vez pode ser metabolizada através de duas vias: condensada à enzima serina, em reação catalisada pela enzima cistationina beta-sintase. Esta via utiliza vitamina B6 como co-fator para formar cistationina, que será convertida de forma irreversível a cisteína, este processo se dá pela via da transsulfuração (Fowler., 1997; Mudd *et al.*, 2001) (Figura 1.3).

A segunda via, permite com que a homocisteína seja remetilada através de uma complexa reação que envolve a enzima metionina sintase (MS) e é dependente de vitamina B12 e ácido fólico, resultando na formação de uma nova molécula de metionina (Fowler., 1997; Mudd *et al.*, 2001) (Figura 1.3).

Existem duas vias bioquímicas que recuperam a metionina a partir da homocisteína: a do ácido fólico, como citado anteriormente e a da betaína (produto da oxidação enzimática da colina). A SAH é recuperada então em metionina e inicia-se o ciclo novamente (Klee *et al.*, 1961) (Figura 1.3).

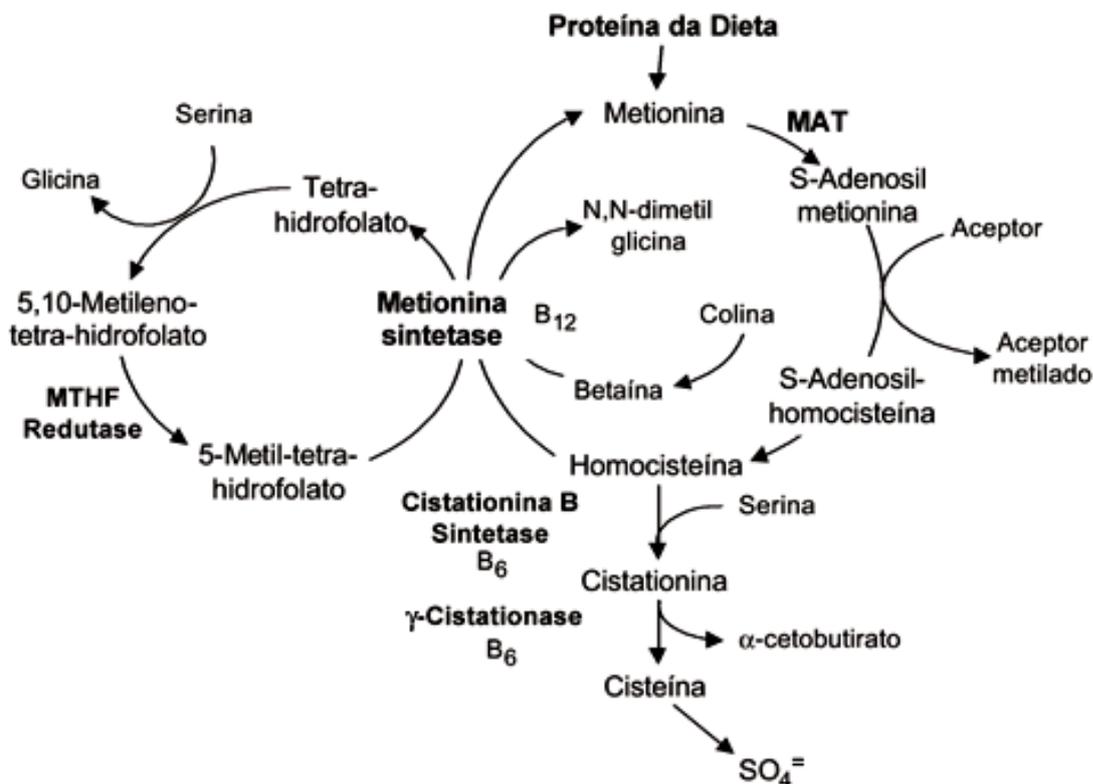


Figura 1.3- Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (Bydlowski., 1998).

Muitos processos bioquímicos dependem dos grupos metil formados a partir deste metabolismo. Eles são necessários para a replicação do DNA, e a hipometilação do

DNA está associada à instabilidade cromossômica e erros durante a segregação, como pode ser observado em estudos realizados com cultura de células vegetais e tumores humanos (Leyton *et al.*, 1995; Lengauer *et al.*, 1997).

Pesquisas mostram que a SAH ($C_{14}H_{20}N_6O_5S$) é uma substância desmetilante de DNA não análoga de nucleosídeo, proveniente da reação de transmetilação catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs) (Purohit *et al.*, 2007). A SAH possui muita afinidade pelas metiltransferases, fazendo com que essa molécula ligue-se ao sítio ativo das DNMTs, diminuindo as reações de metilação (Jeon *et al.*, 2008); portanto mais metiltransferase celular é inibida pelo acúmulo intracelular de SAH. Assim, a razão entre SAM e SAH celular tem sido freqüentemente utilizada como um indicador do potencial de metilação do DNA (Yi *et al.*, 2000; Caudill *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2005).

Castro e colaboradores em 2005 utilizaram a adenosina 2,3 dialdeído (ADA) no meio de cultura e observaram que essa substância, sem provocar efeito citotóxico, aumentou a concentração de SAH de maneira dose dependente. Ainda, mostraram que o aumento do SAH intracelular apresentou uma correlação negativa com padrão de metilação do DNA genômico, ou seja, quanto maior era a quantidade de SAH menor era o padrão de metilação do DNA.

Além disso, Jeon e colaboradores (2008), ao utilizarem SAH em meio de cultivo de células doadoras de núcleo de bovinos para realizar a TN, obtiveram uma indução da desmetilação global, reativação parcial do cromossomo X inativo e um aumento significativo de blastocistos e blastocistos expandidos.

Um importante fato é que a SAH é uma substância endógena, que não é incorporada à molécula de DNA e não possui efeitos citotóxicos.

2.9 O gene XIST

Nos mamíferos, as fêmeas possuem dois cromossomos X, enquanto os machos apenas um, o que teoricamente significa que as fêmeas teriam uma expressão gênica maior que os machos. Isso pode estar relacionado ao aparecimento, num contexto evolutivo, de um mecanismo chamado de “compensação de dose” no qual um dos cromossomos X está inativado nas células de mamíferos do sexo feminino, proporcionando um equilíbrio de

dosagem entre machos e fêmeas em relação aos genes presentes no cromossomo X (Lyon, 1961).

Essa inativação é controlada por uma região genômica conhecida como Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC), que age no mesmo cromossomo, ou seja, em *cis* (Brown *et al.*, 1991). Neste centro encontra-se o gene XIST (X inactive specific transcript) que é fundamental para iniciar o processo de inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas (Kay.,1998). Em mamíferos, a escolha de qual cromossomo X será inativado é aleatória, ou seja, tanto o X materno como o X paterno tem a mesma probabilidade de serem escolhidos para a inativação. A partir desse momento, todas as células oriundas de uma célula que já inativou um dos cromossomos X mantêm o mesmo padrão da célula mãe, inativando o mesmo cromossomo (Kay., 1998).

O gene XIST possui um comprimento total de 36.535pb, e está localizado no cromossomo X do genoma bovino. Este gene transcreve um RNAm não codante, portanto, não é traduzido em proteína, de 22.812 nucleotídeos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>) (Figura 1.4).



Figura 1.4- Estrutura genômica do gene XIST. Em verde o comprimento total do gene (36.535pb); em azul o RNA mensageiro (22.812 nucleotídeos). A seta vermelha indica a posição dos iniciadores na ilha CpG estudada. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>.

Este RNAm envolve o cromossomo a ser inativado e sinalizações bioquímicas determinam marcas epigenéticas para manter um padrão de silenciamento local (revisto por Brockdorff., 2002), ou seja, o XIST isoladamente não é capaz de manter o processo de silenciamento nas linhagens celulares subsequentes, apenas induz a inativação do X em células embrionárias. Portanto, após induzir o processo de inativação do X, mecanismos específicos devem ser estabelecidos para que esse estado seja mantido nos descendentes clonais celulares. A metilação é um dos mecanismos mais relevantes, ocasionando o silenciamento dos genes.

Na inativação do X ocorrerá inicialmente a ação do gene XIST, mas é através da metilação do DNA que o padrão de inativação determinado pelo XIST será mantido (Figura 1.5) (Lock *et al.*, 1987; Singer-Sam *et al.*, 1990).

A cromatina do X inativo sofre modificações geradas pela associação do RNA XIST e dos mecanismos específicos, como a metilação, tornando-se heterocromatina, a qual permanece condensada ao longo da maior parte do ciclo celular (De La Fuente *et al.*, 1999; Csankovszki *et al.*, 2001). Esta heterocromatina é frequentemente vista sob o envoltório nuclear de células femininas, conhecido como corpúsculo de Barr (Barr & Bertram., 1949).

Em fêmeas de mamíferos essa inativação de um dos dois cromossomos X se dá no início da embriogênese (Lyon., 1961), e estudos mostram que o cromossomo X materno (Xm) é protegido da inativação por uma marcação diferencial, que é adquirida durante a maturação do ovócito (Goto & Takagi., 2000; Tada *et al.*, 2000).

Estudos mostram que em camundongos o X paterno (Xp) encontra-se transcricionalmente ativo nos zigotos mas no estágio de 4 a 8 células o gene XIST começa a ser transcrito para iniciar o processo de inativação do Xp (Okamoto *et al.*, 2004, 2005; Huynh & Lee., 2003; Mak *et al.*, 2004), que é mantido nesse estado inativo até o estágio de blastocisto nas células da massa celular interna, sendo reativado no estágio de blastocisto expandido para que a seleção aleatória entre os cromossomos paterno e materno finalmente aconteça (Okamoto *et al.*, 2004).

Ferreira e colaboradores (2010) mostraram, através da detecção da expressão alelo-específica do gene MAO-A, que em bovinos a inativação é estabelecida no estágio de mórula, onde embriões de 4, 8-16 células e blastocisto expandido mostraram expressão bialélica do gene MAO-A, enquanto que os embriões no estágio de mórula possuem a expressão desse gene apenas do alelo materno. Estes autores mostraram que no estágio de mórula, o X paterno não estava presente, reaparecendo no estágio de blastocisto. Assim, especulam que isso ocorre provavelmente para que o segundo ciclo de inativação aleatória nas células da massa celular interna aconteça.

Paralelamente a esses eventos, um outro gene que está localizado a 15kb abaixo do XIST em camundongos (Lee *et al.*, 1999), transcreve um RNA anti-sense. Este RNA anti-sense tem a função de manter o cromossomo X ativo, inibindo a transcrição do gene XIST em *cis*, impedindo fisicamente o recrutamento de RNA polimerase para a transcrição (Luikenhuis *et al.*, 2001) e recrutando a DNMT3A para metilar o promotor do XIST (Del Arenal *et al.*, 2011).

Sendo assim, esses dois loci (XIST e TSIX) precisam interagir de maneira correta para manter um padrão fisiológico. A transcrição do TSIX é regulada pelo gene XITE, ou seja, a transcrição de XITE promove a transcrição de TSIX, sendo assim considerado um dos responsáveis pela inativação do cromossomo X. Por isso informações entre os genes XIST e TSIX homólogos devem ser trocadas para estabelecer um padrão de regulação monoalélica de TSIX e regulação do XIST em um cromossomo X e não no outro (Heard & Disteche., 2006).

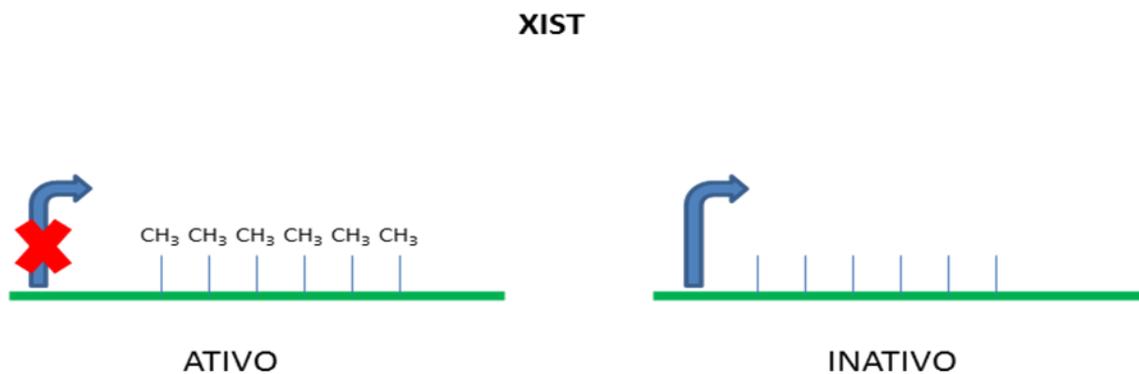


Figura 1.5 -. Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do gene XIST. Se a ilha CpG estiver metilada (CH_3) a expressão do gene é reprimida correspondendo ao padrão do cromossomo X ativo. Se a ilha CpG estiver desmetilada permite a expressão do gene XIST que participa da inativação do cromossomo X inativado (Arquivo pessoal).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, C.S. **Fundamentos da genômica: Dinâmica dos genes e medicina genômica.** Ed. Atheneu: São Paulo, 2004, p.71-91.

APARICIO, A.; EADS, C.A.; LEONG, L.A.; LAIRD, P.W.; NEWMAN, E.M.; SYNOLD, T.W.; BAKER, S.D.; ZHAO, M.; WEBER, J.S. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Chemotherapy & Pharmacology**, v. 51, n. 3, p.231-239, 2003.

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTRÖM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v.17, p. 456-461, 1999.

BARR, M. L.; BERTRAM, E. G. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. **Nature**, v.163, p.676-677, 1949.

BARRETO, G.; SCHAFER, A.; MARHOLD, J.; STACH, D.; SWAMINATHAN, S.K.; HANDA, V.; DODERLEIN, G.; MALTRY, N.; WU, W.; LYKO, F.; NIEHRS, C. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. **Nature**, v. 445, p. 671–675, 2007.

BARTON, S.C.; SURANI, M. A. H.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, v. 311, p. 374- 376, 1984.

BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The Mammalian Epigenome. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 128, p. 669–681, 2007.

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

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfate sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, n. 21, p. 4067-4068, 2005.

BOURC'HIS, D.; XU, G.L.; LIN, C.S.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T.H. Dnmt3L and the Establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, p. 2536-2539, 2001.

BROWN, C.J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J.L.; LAFRENIERE, R.G.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H.F. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 349, p. 38-44, 1991.

BURKE, J. [2003]. **CVM Researchers first to clone White-tailed Deer**. Disponível em: <http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer_clone.shtml> Acesso em: 01.09.2006.

BYDŁOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE, D.A. F. [1998]. Hiperhomocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 1, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X1998000700013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15/09/2012.

CANTONI, G.L. The Nature of the Active Methyl Donor Formed Enzymatically from L-Methionine and Adenosinetriphosphate. **Journals American Chemic Society**, v.74, p. 2942-2943, 1952.

CASTRO, R.; RIVERA, I.; MARTINS, C.; STRUYS, E.A.; JANSEN, E.E.W.; CLODE,N.; GRACA, L.M.; BLOM, H.J.; JAKOBS, C.; ALMEIDA, I.T. Intracelular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, p. 831-836, 2005.

CAUDILL, M. A.; WANG, J. C.; MELNYK, S.; POGRIBNY, I. P.; JERNIGAN, S.; COLLINS, M. D.; SANTOS-GUZMAN, J.; SWENDSEID, M. E.; COGGER, E. A.; JAMES, S. J. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA

hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta synthase heterozygous mice. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2811–2818, 2001.

CHAKRAVARTHY, S.; PARK, Y.J.; CHODAPARAMBIL, J.; EDAYATHUMANGALAM, R.S.; LUGER, K. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. **FEBS Letters**, v. 579, p.895-898, 2005.

CHEN JIE, LI DONGJIE, LIU YANQIN, ZHANG CUI, DAI YUNPING, LI SHIJIE, & LI NING. DNA methylation status of H19 and Xist genes in lungs of somatic cell nuclear transfer bovines. **Chinese Science Bulletin**, v.53, p. 1996-2001, 2008.

CHESNE, P.; ADENOT, P. G.; VIGLIETTA, C.; BARATTE, M.; BOULANGER, L.; RENARD, J. P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature Biotechnology**, v.20, p.366- 369, 2002.

LIU, C. C.; HO, W. Y.; LEU, K. L.; TSAI, H.; YANG, T. Effects of *S*-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. **Biochemical Molecular Toxicology**, v. 23, n.5, 2009.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v.280, p.1256-1258, 1998.

COLOT, V.; ROSSIGNOL, J.L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **Bioessays**, v.21, p.402-411, 1999.

CORREA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 14, p. 93-100, 2003.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive specific transcript (*XIST*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.

DEL ARENAL, M. E.; ROCHA, S.T.; HEARD, E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. **Human Genetics**, v.130, p. 307-327, 2011.

DELUCUVE, G.P.; RASTEGAR, M.; DAVIE, J.R. Epigenetic control. **Journal of Cellular Physiology**, p. 243-250, 2009.

DENG, C.; LU, Q.; ZHANG, Z.; RAO, T.; ATTWOOD, J.; YUNG, R.; RICHARDSON, B. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signalling. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48 n. 3, p. 746-756, 2003.

DUPONT, C.; ARMANT, D.R.; BRENNER, C.A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 351- 357, 2009.

EDWARDS, C.A.; FERGUSON-SMITH, A.C. Mechanisms regulating *imprinted* genes in clusters. **Cell Biology**, v. 27, p. 281-289, 2007.

EILERTSEN, K.J.; POWER, R.A.; HARKINS, L.L.; MISICA, P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science Review**, v. 98, p. 129-146, 2007.

FANG, M. Z.; WANG, Y.; AI, N.; HOU, Z.; SUN, Y.; LU, H.; WELSH, W.; YANG, C. S. Tea Polyphenol Epigallocatechin- 3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates

Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v.63, p.7563–7570, 2003.

FEIL, R.; KHOSLA, S. Genomic imprinting in mammals an interplay between chromatin and DNA methylation. **Science**, v. 15, n.11, p. 431-435, 1999.

FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O.; CARVALHO, J.O.; RUMPF, R.; MELO, E.O.; DODE, MA.N.; FRANCO, M.M. Allele-specific expression of Xchromosome-linked gene MAO-A during pre-implantation development in bovine embryo In: IETS, 2010, Cordoba. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n.1, p. 277, 2010.

FISCHELE, W.; TSENG, B.S.; DORMANN, H.L.; UEBERHEIDE, B.M.; GARCIA, B.A.; SHABANOWITZ,J.; HUNT, DF.; FUNABIKI, H.; ALLIS, C.D. Regulation of HP-1 chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature**, v. 438, p. 1116-1122, 2005.

FOWLER,B. Disorders of homocysteine metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.20, p.270-285, 1997.

FU, J.; GUAN, P.; ZHAO, L.; LI, H.; HUANG, S.; ZENG, F.; ZENG, Y. Effects of donor cells on in vitro development of clone bovine embryos. **Journal of Genetics & Genomics**, v. 35, p. 273-278, 2008.

FULKA, H.; JOHN, J.C.S.; FULKA, J. Cromatin in early mammalian embryos: achieving the pluripotent state. **Diferentiation**, v. 76, p. 3 14, 2008.

FULKA, J. JR.; FIRST, N.L.; LOI, P.; MOOR, R.M. Cloning by somatic cells nuclear transfer. **Bioessays**, v. 20, n.10, p. 847-851, 1998.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 331-341, 2012.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v.424, p.635, 2003.

GARDNER, D.K.; LANE, M. *Ex vivo* early embryo development and effects on gene expression and imprinting. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p.361-370, 2005.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GROGER, D.; THIEL, J.; REINHARDT, R.; LEHRACH, H.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics**, v. 94, p.63– 69, 2009.

GEHRING, M.; KERRY, L.; BUBB.; HENIKOFF, S. Extensive Demethylation of Repetitive Elements During Seed Development Underlies Gene Imprinting. **Science**, 324, p. 1447-1451, 2009.

GOTO, Y.; TAKAGI, N. Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. **Chromosome Research**, v.8,

GREALLY, J.M.; STATE, M.W. . Genomic imprinting: the indelible mark of the gamete. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v.39, n.4, p. 532-535, 2000.

GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews**, v. 8, p. 35-46, 2007.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1108-1119, 2004.

HATA, K.; OKANO, M.; LEI, H.; LI, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. **Development**, v.129, p.1983-1993, 2002.

HEARD, E.; DISTECHE, C.M. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. **Genes Development**, v.20, p.1848-1867, 2006.

van der HEIJDEN, G.W.; DIEKER, J.W.; DERIJCK, A.A.; MULLER, S.; BERDEN, J.H.; BRAAT, D.D.; van der VLAG, J.; de BOER, P. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 9, p. 1008-1022, 2005.

HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; FRIEDMAN, A.; HOECHEDLINGER, K.; YANAGIMACHI, R.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R.; JAENISCH, R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v.99, p.12889-12894, 2002.

HUYN, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature*, v.426, p. 857-862, 2003.

IGUCHI-ARIGA, S.M.M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **Genes Development**, v. 3, p. 612-619, 1989.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v.23, p.9-18, 1981.

ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. *Imprinted* genes, cognition and behavior. *Trends Cognitive Science Society*, v.4, n.xxx, p. 309-318, 2000.

JACKSON, J.P.; LINDROTH, A.M.; CAO, X.; JACOBSEN, S.E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, v. 416, p. 556-560, 2002.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics Review*, v. 33, p. 245- 254, 2003.

JÄHNER, D.; STUHLMANN, H.; STEWART, C. L.; HARBERS, K.; LOHLER, J.; SIMON, I.; JAENISCH, R. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature*, v.298, p.623-628, 1982.

JASENCAKOVA, Z.; SOPPE, W.J.; MEISTER, A.; GERNAND, D.; TURNER, B.M.; SCHUBERT, I. Histone modifications in *Arabidopsis*—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The Plant Journal* , v. 33, p. 471–480, 2003.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. *Science Review*, v. 293, p. 1074-1080, 2001.

JEON, B.G.; COPPOLA, G.; PERRAULT, S.D.; RHO, G.J.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Sadenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, v. 135, n. 6, p. 815–828, 2008.

KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; McCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Development*, v.6, p.705- 714, 1992.

KANEDA, M.; OKANO, M.; HATA, K.; SADO, T.; TSUJIMOTO, N.; LI, E.; SASAKI, H. Essential role for the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. **Nature**, v.429, p.900-903, 2004.

KANEKO-ISHINO, T.; KHODA, T.; ISHINO, F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. **The Journal of Biochemistry.**, v.133, p. 699- 711, 2003.

KANG, Y.K.; KOO,D.B.; PARK, J.S.; CHOI, Y.H.; CHUNG, A.S.; LEE, K.K. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature Genetics**, v. 28, p. 173- 178, 2001.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v.282, p.2095-2098, 1998.

KATZ-JAFFE, M.G.; MCCALLIE, B.R.; PREIS, K.A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D.K. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, p. 939-941, 2009.

KAY, G.F. Xist and X chromosome inactivation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 71-76, 1998.

KITSBERG, D.; SELING, S.; BRANDELS, M.; SIMON, I.; KESHET, I.; DRISCOLL, D.J.; NICHOLLS, R.D.; CEDAR, H. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. **Nature**, v. 364, p. 459-463, 1993.

KLEE, W.A.; RICHARDS, H.H.; CANTONI, G.L. The synthesis of methionine by enzymic transmethylation. Existence of two separate homocysteine methyltransferases on mammalian liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, n. 54, p. 157-164, 1961.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 193- 705, 2007.

KUCK, D.; CAULFIELD, T.; LYKO, F.; MEDINA-FRANCO, J. L. Nanaomycin A Selectively Inhibits DNMT3B and Reactivates Silenced Tumor Suppressor Genes in Human Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.9, p.3015-3023, 2010.

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; SHAMIM, M. H.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, v.426, p.641, 2005.

LEE, J.T.; DAVIDOW, L.S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nature Genetics**, v. 21, p. 400-404, 1999.

LEI, H.; OH, S. P.; OKANO, M.; JUTTERMANN, R.; GOSS, K. A.; JAENISCH, R.; LI, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **Development**, v.122, p.3195-3205, 1996.

LEONHARDT, H.; PAGE, A. W.; WEIER, H. U.; BESTOR, T. H. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. **Cell**, v.71, p.865-873, 1992.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v.69, p.915-926, 1992.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, v. 3, p. 662-673, 2002.

LI, Z.; SUN, X.; CHEN, J.; LIU, X.; WISELY, S. M.; ZHOU, Q.; RENARD, J. P.; LENO, G. H.; ENGELHARDT, J. F. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. **Developmental Biology**, v.293, p.439-448, 2006.

LI, Y. M.; FRANKLIN, G.; CUI, H. M.; SVENSSON, K.; HE, X. B.; ADAM, G.; OHLSSON, R.; PFEIFER, S. The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.28247-28252, 1998.

LIN, R. K.; HSU, C. H.; WANG, Y. C. Mithramycin A Inhibits DNA Methyltransferase and Metastasis Potential of Lung Cancer Cells. **Anticancer Drugs**, v.18, p.1157–1164, 2007.

LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 598–607, 2008.

LOCK LF, TAKAGI N, MARTIN GR. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. **Cell**, v.48, p.39-46, 1987.

LUCIFERO, D.; CHAILLET, J.R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 3-18, 2004.

LUDWIG, M.; KATALINIC, A.; GROSS, S.; VARON, R.; HORSTHEMKE, B. Increased prevalence of imprinting defects in Angelman Syndrome (AS) patients born to infertile couples. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 49, 2004.

LUIKENHUIS S, WUTZ A, JAENISCH R. Antisense transcription through the XIST locus mediates TSIX function in embryonic stem cells. **Molecular Cell Biology**, v.21, p.8512-8520, 2001.

LUND, A.H., VAN LOHUIZEN, M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, n. 3, p.239-246, 2004.

LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 190, p. 372-373, 1961.

MA, D.K.; JANG, M.H.; GUO, J.U.; KITABATAKE, Y.; CHANG, M.I.; POWANPONGKUL, N.; FLAVELL, R.A.; LU, B.; MING, G.L.; SONG, H. Neuronal activity induces GADD45B promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1074-1077, 2009.

MAK, W.; NESTEROVA, T.B.; DE NAPOLES, M.; APPANAH, R.; YAMANAKA, S.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. **Science**, v.303, p.666-669, 2004.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v.3, p.1-4, 2002.

MATSUZAKI, H.; OKAMURA, E.; FUKAMIZU, A.; TANIMOTO, K. CTCF binding is not the epigenetic mark that establishes post-fertilization methylation *imprinting* in the transgenic H19 ICR. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 7, p. 1190-1198, 2010.

MELLO, Marco Roberto Bourg de. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003. 83p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.

MONK, M.; BOUBELIK, M.; LEHNERT, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extra embryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. **Development**, v.99, p.371-382, 1987.

MORGAN, H.D; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 47-58, 2005.

MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F.; KRAUS, J. P. Disorders of Transulfuration. **Scriver's**, v. 8, 2001.

MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the *imprinted* genes IGF2 and H19 into parent specific chromatin loops. **Nature Genetics**, v. 36, p. 889-893, 2004.

NG, R. K.; GURDON, J. B. Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. **Cell Cycle**, v.4, p.760-763, 2005.

NG, H. H.; ZHANG, Y.; HENDRICH, B.; JOHNSON, C. A.; TURNER, B. M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; REINBERG, D.; BIRD, A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. **Nature Genetics**, v.23, p. 58-61, 1999.

NIEMANN, H.; TIAN, X.C.; KING, W.A.; LEE, R.S.F. Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction Review**, v. 135, p. 151-163, 2008.

OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LeBACCON, P.; OTTE, A.P.; DISTECHE, C.M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. **Nature**, v. 438, p. 369-373, 2005.

OKAMOTO, I.; OTTE, A. P.; ALLIS, C. D.; REINBERG, D.; HEARD, E. Epigenetics dynamics of *imprinted X* inactivation during early mouse development. **Science**, v. 303, p. 644-649, 2004.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. **Nucleic Acids Researchs**, v.26, p.2536-2540, 1998.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a e Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, Cambridge, v.99, p.247-257, 1999.

PEDONE, P.V.; PIKAART, M.J.; CERRATO, F.; VERNUCCI, M.; UNGARO, P.; BRUNI, C.B.; RICCIO, A. Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the *imprinted* expression of the *H19* and *IGF2* genes. **FEBS Letters**, v. 458, p. 45-50, 1999.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S-H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. S.

Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v.407, p.505-509, 2000.

PUROHIT, P., AND A. AUERBACH. Acetylcholine receptor gating: movement in the α -subunit extracellular domain. **The Journal of General Physiology**, v.130, p.569–579, 2007.

RAMCHANDANI, S.; BHATTACHARYA, S.K.; CERVONI, N.; SZYF, M. DNA methylation is a reversible biological signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 6107-6112, 1999.

REIK, W.; COLLICK, A.; NORRIS, M. L.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. **Nature**, v.328, p.248-251, 1987.

REIK, W.; SANTOS, F.; MITSUYA, K.; MORGAN, H.; DEAN, W. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 358, p.1403-1409, 2003.

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

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature Review**, v. 447, p. 425-432, 2007.

RINAUDO, P.; SCHULTZ, R.M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. **Reproduction**, v. 128, p. 301-311, 2004.

ROBERTSON, A. K.; GEIMAN, T. M.; SANKPAL, U. T.; HAGER, G. L.; ROBERTSON, K. D. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.322, p.110-118, 2004.

ROBERTSON, K D.; KEYOMARSI, K.; GONZALES, F. A.; VELICESCU, M.; JONES, P. A. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a e 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. **Nucleic Acids Research**, v.28, p.2108-2113, 2000.

ROBL, J. M. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. **Theriogenology**, v.51, n. 2, p. 499- 508, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Ed. 3: New York, 2001.

SANFORD, J. P.; CLARK, H. J.; CHAPMAN, V. M.; ROSSANT, J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. **Genes and Development**, v.1, p.1039-1046, 1987.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetics reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, p. 643-651, 2004.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Review Genetics**, v. 9, p. 129-140, 2008.

SATO, A.; OTSU, E.; NEGISHI, H.; UTSUNOMIYA, T.; ARIMA, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n.1, p. 26-35, 2007.

SHI, W.; HAAF, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 329- 334, 2002.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v.415, p.859, 2002.

SINCLAIR, K. D.; YOUNG, L. E.; WILMUT, I.; McEVOY, T. G. In- utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. **Human Reproduction**, v. 15, p. 68- 86, 2000.

SINGER-SAM J, GRANT M, LEBON JM, OKUYAMA K, CHAPMAN V, MONK M, RIGGS AD. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular Cell Biology**, v.10, p.4987-4989, 1990.

SIVOLOB, A.; PRUNELL, A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. **The Journal of Molecular Biology**, v. 331, p.1025-1040, 2003.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews Genetics**, v.1, p. 199-207, 2000.

STRAHL, B.D.; ALLIS, D. The language of covalent histone modification. **Nature Review**, v. 403, p. 41-45, 2000.

STRAHL, B.D.; ALLIS, D. The language of covalent histone modification. **Nature Review**, v. 403, p. 41-45, 2000.

SURANI, M. A. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. **Nature**, v. 414, p. 112- 128, 2001.

SWALES, A. K. E.; SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. **Reproduction**, v. 130, p. 389- 399, 2005.

TADA, T.; OBATA, Y.; TADA, M.; GOTO, Y.; NAKATSUJI, N.; TAN, S.; KONO, T.; TAKAGI, N. *Imprint* switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. **Development**, v.127, p.3101-3105, 2000.

TAMASHIRO, K. L.; WAKAYAMA, T.; AKUTSU, H.; YAMAZAKI, Y.; LACHEY, J. L.; WORTMAN, M. D.; SEELEY, R. J.; D'ALESSIO, D. A.; WOODS, S. C.; YANAGIMACHI, R.; SAKAI, R. R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. **Nature Medicine**, v.8, p.262-267, 2002.

TCHURIKOV, N. A. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry**, v.70, p.406-423, 2005.

TREMBLAY, K. D.; SAAM, J. R.; INGRAM, R. S.; TILGHMAN, S. M.; BARTOLOMEI, M. S. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. **Nature Genetics**, v.9, p.407-413, 1995.

VILLAR-GAREA, A.; FRAGA, M.F.; ESPADA, J.; ESTELLER, M. Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 4984–4989, 2003.

VILLAR-GAREA, Angel. Epigenetic transcriptional repression of tumor supresor genes and its reversion by drugs. Espanha. Departamento de laboratório de epigenética, Universidade de Valencia, Espanha, 2005. Tese de doutorado- Departamento de laboratório de epigenética, Universidade de Valencia, Espanha, 2005.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v.394, p.369-374, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology Reproduction**,v.60, p.996-1005, 1999.

WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Review Science Techninology**, v.24, p.251-256, 2005.

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; McMILLAN, V.; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.101- 110, 2004.

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T.; HILL, J. R.; LOONEY, C. R.; PRYOR, J. H.; PIEDRAHITA, J. A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, p.35-49, 2001.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p.810-813, 1997.

WUTZ, A.; GRIBNAU, J. X inactivation Xplained. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 17, p. 387-393, 2007.

YANG, Y.; HU, J-F.; ULANER, G.A.; LI, T.; YAO, X.; VU, T.H.; HOFFMAN, A.R. Epigenetic regulation of *Igf2/H19 imprinting* at CTCF insulator binding sites. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, p. 1038-1055, 2003.

YANG, X.; SMITH, L.S.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics Review**, v. 29, n. 3, p. 295-302, 2007.

YI, P.; MELNIK, S.; POGRIBNA, M. POGRIBNY, I. P.; HINE, R. J.; JAMES, S. J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n.38, p.29318- 23, 2000.

YOUNG, L. E.; BEAUJEAN, N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of mouse and sheep. **Animal Reproduction Science**, v.82- 83, p.61-78, 2004.

ZACHARIAS, W.; KOOPMAN, W.J. Lupus-inducing drugs alter the structure of supercoiled circular DNA domains. **Arthritis & Rheumatic**, v. 33, n. 3, p. 366-374, 1990.

ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G.; WOLF, E.; BREM, G. Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmatic volume: effect on development of nuclear transfer embryos. **Theriogenology**, v. 47, n.1, p. 238, 1997.

ZHOU, Q.; RENARD, J. P.; Le FRIEC, G.; BROCHARD, V.; BEAUJEAN, N.; CHERIFI, Y.; FRAICHARD, A.; COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, v.302, p.1179, 2003.

ZHOU YB, GERCHMAN SE, RAMAKRISHNAN V, TRAVERS A, MUYLDERMANS S. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. **Nature**, v.395, p.402-405, 1998.

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

Fatores epigenéticos são responsáveis por controlar a expressão de genes e diferenciação durante a vida celular. Dentre eles, a metilação do DNA é o mais estudado. Cada tipo celular possui um padrão epigenético altamente especializado. Após a fecundação natural ou clonagem por transferência nuclear (TNCS), um padrão epigenético pré existente deve ser apagado e restabelecido para garantir o correto desenvolvimento embrionário. Porém, nos clones, essa reprogramação é ineficiente mas é possível que o uso de substâncias desmetilantes de DNA utilizadas durante o cultivo celular de células doadoras de núcleo possa desmetilar o DNA, aumentando a eficiência da técnica. O objetivo desse estudo foi avaliar, em fibroblastos bovinos, o efeito da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) na viabilidade celular, metilação de DNA e expressão do transcrito específico do gene XIST responsável pela inativação do cromossomo X. Células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium -Gibco®), suplementado com 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM de SAH (Sigma®), incubado a 39°C e 5% de CO₂. O padrão de metilação do DNA foi avaliado através do sequenciamento de sequências de DNA tratadas com bissulfato de sódio, usando o kit EZ DNA methylation Kit™ (ZymoResearch®), para converter citosinas não metiladas. O RNA total das células foi extraído com o kit RNeasy Plus Micro kit (Qiagen®) e o transcrito de XIST foi quantificado por PCR em tempo real, usando GAPDH e CYC-A como controles endógenos. O número de células foi comparado entre o grupo controle e os grupos tratados com 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM de SAH e a metilação do DNA e a expressão entre o grupo controle e o grupo tratado com 2.0mM de SAH. Não houve diferença na viabilidade celular, metilação de DNA e expressão gênica entre os tratamentos. O grupo controle apresentou 100% de sequências hipermetiladas e 87,58% de metilação e o grupo tratado com 2.0mM de SAH apresentou 92,86% de sequências hipermetiladas e 82,35% de metilação. O uso do SAH como agente desmetilante no cultivo celular é uma alternativa viável que continua sendo estudada. Acredita-se que um processo de desmetilação é induzido pelo uso do SAH durante o cultivo celular, contribuindo para o aumento da eficiência da TNCS. Contudo, é necessário avaliar outras concentrações e diferentes tempos de cultivo com o SAH.

Palavras chave: Fibroblastos, Bovino, SAH, metilação de DNA, XIST.

2 ABSTRACT

Epigenetic factors are responsible for controlling gene expression and differentiation through the cell life. Among them, DNA methylation is the most studied. Each cell type possesses a specific and highly specialized epigenetic pattern. After natural fertilization or cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT), a pre-existing epigenetic pattern must be erased and reestablished to ensure correct embryo development. However, in cloning this reprogramming is inefficient and it is possible that the use of a DNA demethylating substance can improve the efficiency of the technique. The aim of this study was to evaluate, in bovine skin fibroblasts, the effects of S-(5'-adenosyl)-L-homocysteine (SAH) on cell viability, DNA methylation and expression of the X-inactive specific transcript (XIST) gene. Cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco[®]) supplemented with 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM of SAH (Sigma[®]) incubated at 39°C with 5% CO₂ in air. The pattern of DNA methylation was assessed by bisulfite sequencing, using the EZ DNA methylation Kit[™] (ZymoResearch[®]) to convert unmethylated cytosines. Total RNA was extracted with the RNeasy Plus Micro kit (Qiagen[®]) and the XIST transcript was quantified by qPCR using GAPDH and CYC-A as endogenous controls. The number of cells was compared among 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM e 2.0mM of SAH and control groups and DNA methylation and gene expression between control and 2.0mM groups. There were no differences in cell viability, DNA methylation and gene expression among treatments. Control group showed 100% of hypermethylated sequences and 87.58% of methylation and the 2.0mM group showed 92.86% of hypermethylated sequences and 82.35% of methylation. The use of SAH as a DNA demethylating agent in cell culture is a viable alternative and still little studied. It is believed that a demethylation process is induced by the use of SAH in the culture, contributing to increase the efficiency of SCNT. However, it is necessary to evaluate other concentrations and different times of cultivation with SAH.

Keywords: Fibroblasts, Bovine, SAH, DNA methylation, XIST.

3 INTRODUÇÃO

A metilação é uma ligação covalente ao DNA, estável, que ocorre pela adição de um grupamento metil (CH₃), proveniente da S-adenosil metionina, no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas, localizadas na posição 5' das guaninas na molécula de DNA, resultando na base modificada 5-metilcitosina.

Em torno de 70 a 80% das 5-metilcitosinas do genoma dos mamíferos estão concentradas em regiões de intensa repetição conhecidas como ilhas CpG, localizadas principalmente nas regiões promotoras de alguns genes, e um percentual muito menor localizado nas seqüências CpNpG (N = qualquer nucleotídeo) (Ramchandani *et al.*, 1999).

As ilhas CpGs representam aproximadamente 3% do genoma total e são foco de pesquisas em câncer, no processo de diferenciação celular e na clonagem de mamíferos (Gebert *et al.*, 2009).

De maneira geral, ocorre silenciamento da transcrição de genes quando há hipermetilação de regiões promotoras, enquanto a hipometilação está associada à transcrição destes genes (NG *et al.*, 1999).

A família das DNA metiltransferases (DNMT) que é responsável por catalisar a adição do grupamento metil na maioria das reações de transmetilação. Após a transferência desse grupamento metil, a SAM, considerada o maior doador de grupamento metil do sistema fisiológico, é convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) (Fowler., 1997; Mudd *et al.*, 2001). A SAH possui muita afinidade pelas enzimas DNMTs, fazendo com que essa molécula ligue-se ao sítio ativo dessas enzimas, diminuindo as reações de metilação (Jeon *et al.*, 2008). Portanto, mais DNMT celular é inibida pelo acúmulo intracelular de SAH. Assim, a razão entre SAM e SAH celular tem sido freqüentemente utilizada como um indicador do potencial de metilação do DNA (Yi *et al.*, 2000; Caudill *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2005).

O melhor entendimento da regulação da metilação do DNA é particularmente importante para o processo de clonagem por transferência nuclear (TN), que consiste na produção de indivíduos geneticamente idênticos (Fulka *et al.*, 1998) a partir da transferência nuclear de uma célula somática (TNCS). Apesar da utilização e do sucesso da clonagem em várias espécies, a eficiência dessa técnica ainda é muito baixa. Em bovinos, ainda durante o período de cultivo *in vitro*, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos têm-se mostrado bastante variáveis, de 5% a 65% (Westhusin *et al.*, 2001), e os resultados de

obtenção de gestações a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (Cibelli *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999). Um dos motivos da baixa eficiência da técnica é a inabilidade do núcleo doador se desprogramar de maneira completa e se reprogramar corretamente após a fusão. Após uma fecundação natural, um padrão epigenético preexistente nos gametas tem que ser desfeito para em seguida ser restabelecido (revisto por Sasaki & Matsui., 2008). O genoma do espermatozóide é ativamente desmetilado, enquanto que no genoma proveniente do gameta feminino ocorre uma desmetilação passiva, deixando de ser metilado durante as divisões celulares (revisto por Reik & Walter., 2001). Estudos mostram que na clonagem essa reprogramação não acontece ou acontece de forma incompleta (revisto por Sasaki & Matsui., 2008), gerando embriões com padrão hipermetilado. Essas alterações podem afetar de maneira negativa a qualidade dos embriões, causando alterações de genes *imprinted* e alteração de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, como por exemplo o gene XIST (Shi & Haaf., 2002; Ludwig *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007).

Estudos mostram que alterações de genes *imprinted*, como a expressão bialélica dos genes XIST, H19, IGF2 e IGF2R estavam presentes em clones que não sobreviveram e uma expressão normal desses genes foi encontrada nos sobreviventes (Xue *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005). Essa expressão bialélica do gene XIST pode alterar o processo de inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas (Xue *et al.*, 2002), um processo necessário para gerar um equilíbrio de dosagem entre machos e fêmeas em relação aos genes presentes no cromossomo X (Lyon, 1961).

Essa inativação é controlada por uma região genômica conhecida como Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC), que age no mesmo cromossomo, ou seja, em *cis* (Brown *et al.*, 1991). Neste centro encontra-se o gene XIST (*X inactive specific transcript*) que é fundamental para iniciar o processo de inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas (Kay.,1998). Este gene transcreve um RNAm não codante, que envolve o cromossomo a ser inativado e sinalizações bioquímicas determinam marcas epigenéticas para manter um padrão de silenciamento local (revisto por Brockdorff., 2002). A cromatina do X inativo sofre modificações geradas pela associação do RNA XIST e dos mecanismos específicos, como complexos modificadores de cromatina (PRC1 e PRC2), além de outros fatores como H3K27me3, H2AK199ub, H3K9me2 e H4K20me que são recrutados, resultando no acúmulo de modificações típicas de heterocromatina. Em seguida, outros fatores epigenéticos aparecem, tais como, aquisição da metilação do DNA e a incorporação da

histona macroH2A, além do recrutamento de outras proteínas, mantendo o estado inativo do cromossomo (Zhao *et al.*, 2008; Del Arenal *et al.*, 2011).

Para tentar solucionar problemas na técnica de clonagem, como aberrações no processo de inativação do cromossomo X, entre outros, substâncias desmetilantes de DNA têm sido utilizadas durante o cultivo celular de células doadoras de núcleo a fim de se obter uma desprogramação antes da transferência nuclear (Jeon *et al.*, 2008). Desprogramando o núcleo antes da TN, espera-se que a reprogramação epigenética ocorra de forma completa após a fusão, aumentando assim o sucesso da técnica.

Essas substâncias não podem, porém, ser mais um componente que irá comprometer o sucesso da técnica, tornando-se muito importante que substâncias desmetilantes não apresentem citotoxicidade celular, como por exemplo a S- adenosil-L- homocisteína (SAH), que além de ser uma molécula normalmente produzida nas células (Cantoni., 1952), é uma substância não análoga de nucleosídeo (Purohit *et al.*, 2007).

Na tentativa de se obter um melhor resultado na clonagem por transferência nuclear, neste experimento foram cultivados fibroblastos bovinos com a substância desmetilante de DNA, SAH, com o objetivo de avaliar os efeitos do cultivo *in vitro* e do uso dessa substância sobre a viabilidade celular, sobre os padrões de metilação do DNA da ilha CpG localizada no éxon 1 do gene XIST e sobre sua expressão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular de fibroblastos

Para o cultivo *in vitro*, foram utilizados fibroblastos bovinos de um animal fêmea da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A biópsia foi retirada da inserção da cauda e enviada ao Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia acondicionada em solução salina fosfatada (PBS) contendo antibióticos, penicilina G (100UI/ mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), amicacina (0,075 mg/mL e nistadina (20 mg/mL), para o estabelecimento do cultivo primário. Após o cultivo primário e três passagens (P3), as células foram congeladas em meio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em palhetas de 0,25 mL, devidamente identificadas. As palhetas foram estocadas em nitrogênio líquido.

Para descongelar as células, uma palheta foi retirada do nitrogênio líquido, permaneceu em temperatura ambiente por 5 segundos e foi imediatamente colocada em água aquecida a 39°C por 1 minuto.

O conteúdo da palheta foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 0,5 mL de DMEM + SFB (10%). A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 200xg. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 1 mL de DMEM para ressuspender as células, e deste volume 0,5 mL foi transferido para uma garrafa de cultivo de 25 cm² contendo 3 mL de DMEM. A garrafa foi incubada em estufa de cultivo previamente estabilizada a 39°C, com 5% de CO₂ e 20% de O₂ por sete dias até as células entrarem em confluência.

A confluência das células foi observada em microscópio invertido AXIOVERT 135M (ZEISS Germany) com aumento de 100 vezes. O sobrenadante da garrafa foi descartado, e foram adicionados 0,5 mL de PBS previamente aquecido a 39°C. Esta solução foi descartada e foi adicionado 1,0 mL de solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO), previamente estabilizada na estufa a 39°C, 5% de CO₂ e umidade saturada, por 10 minutos. A garrafa foi novamente observada no microscópio para verificar se as células estavam soltas, em suspensão. As células foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 200xg por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL

de meio DMEM. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 30 μl e foi adicionado a essa alíquota 30 μl de azul de tripan, 0,4% (SIGMA) pré aquecido a 39°C em banho maria, proporção 1:1, para a realização da contagem celular, enquanto o restante das células permaneceu na estufa. Desse volume (60 μL), 10 μL foram aplicados em cada poço da câmara de Neubauer de 0,100 mm de profundidade e 0,0025 mm² (Optik Labor). Em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos dos dois poços e então calculada a média. Esse procedimento foi realizado para determinar a viabilidade celular inicial.

Para determinar a quantidade de células a serem depositadas em cada poço da placa, as células que estavam na estufa foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi retirado, e a diluição dessas células foi feita em 800 μL de meio. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, como descrito anteriormente, para determinar a quantidade de células por μL de meio utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Número médio de células dos 4 quadrantes} & \text{----- } 0,0001\text{cm}^3 \\ \text{X ----- } & 1\text{cm}^3 = 1\text{ml} \end{aligned}$$

4.2 Cultivo celular com SAH (S-adenosil-L-homocisteina)

O cultivo foi realizado em placas de cultivo com 24 poços de 2 cm² (TPP), para cada tratamento foi utilizado 4 poços. Após a contagem celular na câmara de Neubauer, dez mil células viáveis foram adicionadas em cada poço e cultivadas em 400 μl de DMEM por 24h, tempo necessário para as células vivas se aderirem ao fundo da placa.

Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS suplementado com antibiótico (penicilina G 100UI/ml e sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O PBS foi retirado e em seguida cada poço recebeu 400 μl de meio com as respectivas concentrações de SAH. Ao total foram quatro repetições de cada tratamento (quatro poços), para que as células dos dois primeiros poços de cada tratamento fossem congeladas para a extração de DNA e as células dos dois últimos poços fossem congeladas para extração de RNA, sendo cinco tratamentos, quatro cultivos suplementados com SAH com concentração final de 0,5mM, 1,0mM, 1,5mM e 2,0mM e o grupo controle não foi suplementado.

Baseado em outros trabalhos, o tratamento com a SAH teve duração de 72 horas, sendo que a cada 24 horas o meio era trocado. O meio do cultivo controle também foi trocado a cada dia, durante os três dias de tratamento.

Após o período de 72 h, as células presentes no sobrenadante, de cada tratamento, foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 200x g por 5 min. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspensionado em um volume de 30 µl de DMEM. A esse volume foi acrescentado 30µl de azul de tripan 0,4% (SIGMA), proporção 1:1 para a contagem das células mortas.

As células aderidas foram retiradas da placa utilizando-se uma solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO), centrifugadas e o *pellet* ressuspensionado conforme já descrito anteriormente. Uma alíquota de 30µl dessas células também foi retirada para que se realizasse a contagem com azul de tripan para a avaliação da viabilidade celular.

Tanto as células em suspensão quanto as células aderidas de cada tratamento foram contadas em câmara de Neubauer 0,100 mm de profundidade e 0,0025 mm² (Optik Labor) em microscópio óptico no aumento de 100x (Nikon Eclipse E200).

As células brancas e azuis dos quatro quadrantes externos foram contadas. As células brancas correspondem às viáveis, e as azuis às células mortas.

Ao final do tratamento, apenas as células que estavam aderidas foram congeladas. As células dos poços 1 e 2 de cada tratamento foram agrupadas em um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 200x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µl de PBS em cada tubo para posterior extração de DNA. Para os poços 3 e 4 foi realizado o mesmo procedimento, porém foram adicionados 50µl de RNAlater (Applied Biosystems®) para posterior extração de RNA.

As amostras para extração de DNA foram armazenadas diretamente a -80°C, enquanto as amostras para extração de RNA foram acondicionadas a 4°C *overnight* e posteriormente acondicionadas a -80°C até a extração dos ácidos nucleicos. Foram realizadas quatro réplicas em momentos diferentes.

4.3 Extração de DNA

Para avaliar o padrão de metilação do DNA, foram utilizadas as células acondicionadas em PBS. Para a extração do DNA, as amostras foram descongeladas, adicionou-se 1 mL de PBS, homogeneizou-se e centrifugou-se a 2000g por 10 minutos. Após

a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e novamente lavou-se o *pellet* com 1 mL de PBS. Foi adicionado 600µl de solução de lise nuclear (50mM Tris pH7.8; 25mM EDTA; 400mM NaCl; 1% SDS) à temperatura ambiente e as amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos. Logo após, adicionou-se 200µl de solução de precipitação de proteína (6M NaCl), as amostras foram homogeneizadas em agitador mecânico por 30 segundos e incubada sem gelo por 5 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL.

Para a precipitação do DNA foi adicionado 600µl de isopropanol gelado e homogeneizado invertendo-se os tubos. Em seguida, as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000g por 25 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 2000g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, centrifugou-se por mais 10 segundos para que o excesso de sobrenadante fosse retirado. O *pellet* permaneceu secando por 10 minutos para ser reconstituído num volume de 20 µl de H₂O milliQ. Ao final, a quantificação foi realizada em espectrofotometro ND-1000 (NanoDrop[®]) e as amostras estocadas a -20°C.

4.4 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Para quantificar o padrão de metilação do DNA apenas os grupos controle e tratado com 2,0mM de SAH foram utilizados. Uma quantidade de 350 ng de DNA genômico foi tratada com o Kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research) de acordo com as recomendações do fabricante. Apenas a temperatura de conversão foi alterada para 55°C.

Este tratamento consistiu na conversão mediada pelo bissulfito de sódio das citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas não são convertidas. Após o tratamento, as amostras foram diluídas em 12 µl de H₂O milliQ e armazenadas a -20°C para posterior amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.5 Amplificação por PCR e purificação

O DNA das amostras das células controle e cultivadas com 2,0mM de SAH e posteriormente tratado com bissulfito de sódio, foi amplificado em dois ciclos de PCR para o gene XIST. Todas as reações foram realizadas utilizando-se 20 µl de volume final e os iniciadores utilizados para amplificação estão especificados na tabela 2.1.

Tabela 2.1-Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio.

Gene	Seqüência dos iniciadores (5' - 3')	Acesso sequência	Localização do iniciador	Ilha CpG	Tamanho do fragmento
XIST externo	F: GGGTGT TTTTGT TTTTAGTGTGTAGTA R:CTTTAATACCACCCACTAAAATTAATC	AJ421481.1	1127-1252 1581-1608	Éxon1	482pb
XIST interno	F:TTGTTATATAGTAAAAGATGGT R: ACCAATCCTAACTAACTAAATA	AJ421481.1	1169-1190 1552-1573	Éxon1	405pb

Liu *et al.*, 2008.

Para a primeira reação do PCR (externo) do gene XIST utilizou-se solução tampão 1X (Invitrogen®); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®); 100 µM de cada dNTP; 0,5µM de cada iniciador (Liu *et al.*, 2008) (Tabela 2.1); 1,0 U da enzima Taq Polimerase Platinum (InvitrogenR) e 3 µl de DNA tratado com bissulfito de sódio. A reação utilizou uma desnaturação inicial de 94°C por 7 min em um termociclador (PXE 0,5 -Thermo), seguidos de 40 ciclos com 94°C por 45 s, 47°C por 1min. e 30 s, 72°C por 1min, acrescidos de uma extensão final de 72°C por 15 min. Para a segunda reação, PCR interno, utilizou-se 1µl do produto amplificado do primeiro PCR e utilizou-se as mesmas concentrações dos reagentes da primeira, com os iniciadores descritos (Liu *et al.*, 2008) (Tabela 2.1). A reação teve uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min., seguidos de 40 ciclos com 94°C por 40 s, 42°C por 45 s, 72°C por 45 s, seguidos de uma extensão final de 72°C por 15 min. a 72 °C. Todas as reações foram realizadas em termocicladores PXE 0,5 X (Thermo Scientific) e Mastercycler Gradiente (Eppendorf).

O volume total dos quatro PCR internos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL), utilizando-se um marcador de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). O gel foi visualizado e fotografado utilizando-se um fotodocumentador Image Capture 300 (GE). Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Logo após, realizou-se uma quantificação em espectrofotômetro NanoDrop (ND- 1000).

4.6 Clonagem dos produtos da PCR e seqüenciamento

Os produtos purificados e quantificados em espectrofotometro ND-1000 (NanoDropR), referentes a cada grupo, foram inseridos no vetor Topo TA Cloning (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em células DH5 α por choque térmico e o produto foi semeado em placas de 90 x 15 mm em meio LB Agar contendo 200 μ g/mL de ampicilina, 40 μ l de X-Gal (Sigma) a 20 mg/mL e 4 μ l IPTG (Sigma) a 0,5 M. As placas foram fechadas, invertidas e incubadas em estufa a 37°C por 16 h. Logo após, as placas foram acondicionadas a 4°C por 2 horas. Somente as colônias brancas foram selecionadas com um palito de madeira autoclavado e transferidas para crescimento em meio LB líquido contendo 200 μ g/mL de ampicilina. Este foi realizado em tubo de 15 mL contendo 3 mL do meio, permanecendo em agitador (New Brunswick Scientific) a 250 rpm, 37°C por 16 h.

O conteúdo dos tubos que apresentaram turbidez foi transferido para 2 tubos de 1,5 mL. O vetor foi extraído seguindo o protocolo de mini preparação de plasmídeo (Sambrook *et al.*, 1989). Uma nova quantificação foi realizada utilizando o mesmo espectrofotometro. As amostras diluídas a 100 η g/ μ l contendo o fragmento inserido foram encaminhadas para sequenciamento utilizando-se a metodologia de dideoxi no sistema ABI 3130xl utilizando os iniciadores universais M13. Os dados foram obtidos de quatro réplicas independentes para o tratamento com bissulfito, amplificação, clonagem e sequenciamento. As sequências foram analisadas utilizando o programa BIQ Analyzer (Bock *et al.*, 2005) e comparadas a uma seqüência de referência (*GenBank* AJ421481.1) para estabelecer o padrão de metilação da ilha CpG contida no éxon 1 do gene XIST. As citosinas não precedidas de guaninas (não CpG) foram avaliadas quanto à taxa de conversão e, apenas as sequências que

apresentaram uma eficiência de conversão pelo bissulfito $\geq 90\%$ foram consideradas para as análises de metilação.

4.7 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Para avaliar a expressão gênica, foram utilizadas as células armazenadas em RNA *later* (Applied Biosystems®) dos grupos e tratado com 2,0mM de SAH. Para a extração do RNA, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e foi utilizado o kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®), conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações já estabelecidas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após a extração do RNA total, este foi utilizado para a transcrição reversa utilizando-se 200 U de *SuperScriptIII* (200U μ l⁻¹; Invitrogen®) e 0,5 μ g de Oligo-DT₁₂₋₁₈*primer* (0,5 μ g/ μ l; Invitrogen®). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf), utilizando-se um programa com as seguintes condições: 65°C por 5min, 42°C por 52min e 70°C por 15min para a inativação da enzima.

4.8 PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a quantificação da expressão gênica para o gene XIST foi realizado um qPCR utilizando-se o kit Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems®) em uma máquina 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas em um volume final de 10 μ l e as condições para a amplificação foram: 95°C por 20 seg, seguido de 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 3 seg; anelamento: 60°C por 30 seg), seguido de curva de dissociação (95°C por 15 seg, 65°C por 1 min, 95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg). As seqüências dos iniciadores, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene estão apresentados na Tabela 2.2. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene.

Tabela 2.2- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência	Tamanho	Temperatura
XIST	F: CCT TTC AAA GCA GAT TGC CTG GCT R: TCC ACC CTG CAA TCC AGA TGT CTT	148pb	60°C
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	119pb	60°C
CYC-A	F: GCC ATG GAG CGC TTT GG R: CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T	65pb	60°C

F: iniciador *forward*; R: iniciador *reverse*; pb: pares de base

Os valores de expressão para o gene XIST foram normalizados pela média geométrica da expressão dos genes constitutivos GAPDH e CYC- A calculados utilizando-se o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método de Pfaff (2001) (Figura 2.1). A identidade dos produtos de PCR foi confirmada primeiramente pela curva de dissociação no qPCR e em seguida pelo tamanho do amplicon em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (10mg/mL), utilizando-se o marcador de 100pb DNA Ladder (Invitrogen®). O gel foi visualizado e fotografado utilizando-se o fotodocumentador Image Capture 300 (GE).

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Figura 2.1- Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E alvo é a eficiência do gene alvo; E ref é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; ΔCP_{alvo} é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo; ΔCP_{ref} é desvio de CP do controle amostra do gene referência.

4.9 Análises estatísticas

Os dados de quantificação do número de células foram comparados utilizando-se Análise de Variância e teste de Tukey ou Kruskal-Wallis se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Para os dados de expressão gênica e padrão de metilação foi utilizado o teste *t* de *student* ou Mann-Whitney, se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. O padrão de metilação, nos 17 sítios CpG para o gene XIST, também foi comparado quanto à quantidade de clones hipermetilados ($\geq 50\%$ de sítios CpGs metilados na sequência, de acordo com Imamura *et al.*, 2005). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Cultivo celular com SAH, morfologia e viabilidade celular

Após o cultivo utilizando o SAH, todos os tratamentos, controle; 0,5mM; 1,0mM; 1,5mM e 2,0mM apresentaram crescimento celular normal, atingindo a confluência em 72 horas, a partir do número de células cultivadas inicialmente. Ao longo do experimento não foram verificadas diferenças morfológicas, no aumento de 100x visualizado em microscópio invertido, em nenhum dos grupos tratados (Figura 2.2).

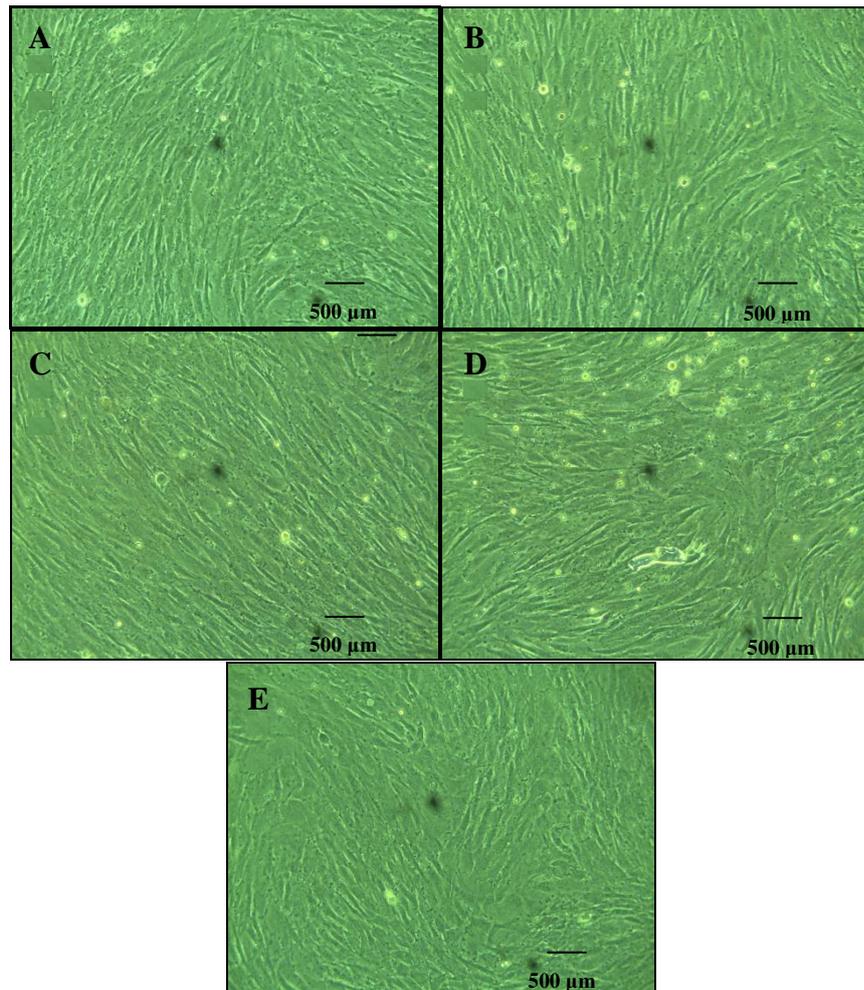


Figura 2.2-Cultivo celular de fibroblastos bovinos após 72 horas de tratamento. **A**- Grupo controle, **B**- Suplementação com 0,5 mM de SAH, **C**- Suplementação com 1,0 mM de SAH, **D**- Suplementação com 1,5 mM de SAH, **E**- Suplementação com 2,0mM de SAH. Aumento de 100x. Barra: 500 µm. Fotos: Arquivo pessoal.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células de cada tratamento foram contadas separadamente, utilizando-se o critério citado anteriormente: células brancas referem-se às células viáveis, células com coloração azul referem-se às não viáveis e o total, a soma de todas elas. Não houve diferença significativa nas quantidades de células viáveis e não viáveis entre os tratamentos (Figuras 2.3).

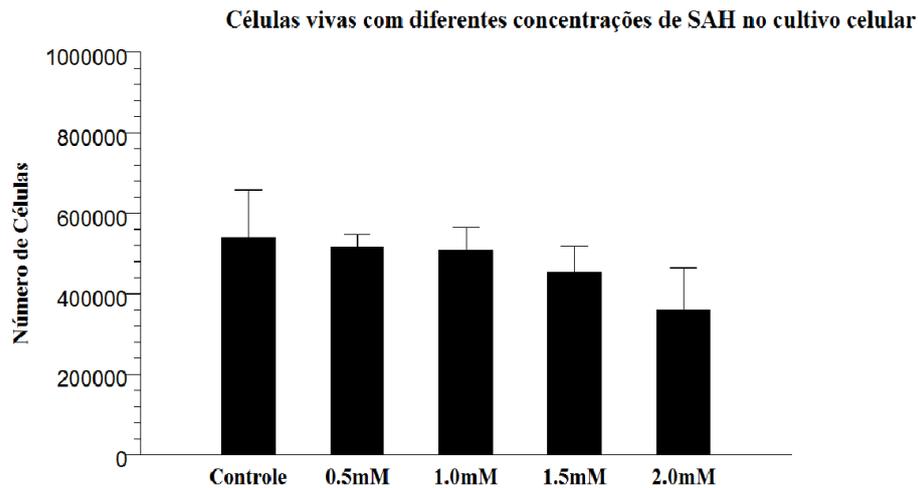


Figura 2.3- Número de células viáveis (média \pm erro padrão) para cada um dos tratamentos com SAH contadas em câmara de Neubauer após adição de azul de tripan (células brancas).

5.1.2 PCR

Após a realização do PCR, o volume total das reações, para cada tratamento, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,8%. Pôde-se constatar, pelo tamanho, que o fragmento era realmente o fragmento de interesse (Figura 2.4), que foi recortado do gel e submetido à uma purificação.

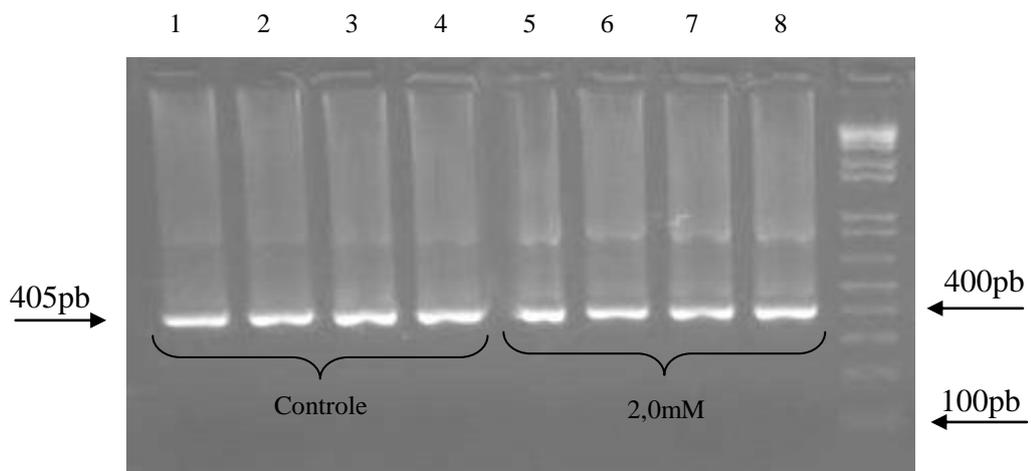


Figura 2.4- Eletroforese em gel de Agarose 1,8%, mostrando a presença do amplicon gerado pelo PCR interno para o gene XIST. As quatro primeiras bandas correspondem a réplicas técnicas para o grupo controle e as quatro últimas para o grupo tratado com 2,0mM de SAH.

5.1.3 Metilação do DNA

Para a avaliação do padrão de metilação, foram analisadas um total de 21 sequências para o grupo controle e 14 sequências para o grupo tratado com 2,0mM de SAH (Tabela 2.3).

Tabela 2.3- Número de clones avaliados para cada tratamento por réplica.

Número de Clones					
Tratamento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	TOTAL
Controle	3	9	4	5	21
2,0 mM	0	9	3	2	14

As seqüências foram comparadas com uma seqüência de referência depositada no *GenBank* (acesso número AJ421481.1) utilizando o software BiQ Analyzer (Bock *et al.*, 2005) para a análise do padrão de metilação das CpG. Um exemplo de alinhamento é mostrado na figura 2.5. As citosinas não CpG foram avaliadas quanto à taxa de conversão e apenas as seqüências que apresentaram uma homologia $\geq 95\%$ na seqüência de nucleotídeos e uma taxa de conversão pelo bissulfito $\geq 90\%$ foram consideradas.

```

Needleman-Wunsch pairwise alignment

Genomic_Sequence      -----
[2]UD20111128_F06_... GCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTATATAG

Genomic_Sequence      -----CGTTAAGTATTGTCTAGTTTAAAATATGGCGGGTTTTGTTTTGT
[2]UD20111128_F06_... TAAAAGATGGTCTTTAAGTATTGTCTAGTTTAAAATATGGCGGGTTTTGTTTTGT

Genomic_Sequence      -----CGTGTGTATTTTTGATAGGTTTTGTTGTAGGGATAATATGGTTGATTTTGTATGTGGA
[2]UD20111128_F06_... CGTGTGTATTTTTGATAGGTTTTGTTGTAGGGATAATATGGTTGATTTTGTATGTGGA

Genomic_Sequence      TATTATGGTAGTTTGTTACGTGGATATCGTGGTAGGGGTGTTTGATCGTTATATTTTGG
[2]UD20111128_F06_... TATTATGGTAGTTTGTTATGTTGGATATGTTGGTAGGGGTGTTTGATCGTTATATTTTGG

Genomic_Sequence      -----CGGGTTTTGTATTAGGAGGGTTTGTCTATTGTTAAAGATGGCGTGTTTTGTGCGGATA
[2]UD20111128_F06_... CGGGTTTTGTATTAGGAGGGTTTGTCTATTGTTAAAGATGGCGTGTTTTGTGCGGATA

Genomic_Sequence      AAGTGAAAGGAGGGATTGTAATGTTAGATTGTGCGTGTGTTTTATTTAATTAGAAAGGGT
[2]UD20111128_F06_... AAGTGAAAGGAGGGATTGTAATGTTAGATTGTGCGTGTGTTTTATTTAATTAGAAAGGGT

Genomic_Sequence      GGTAGAATCGGTTATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAGTTAGTATAGTATT
[2]UD20111128_F06_... GGTAGAATGTTTATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAGTTAGTATAGTATT

Genomic_Sequence      -----CGTTATCGTTTT-----
[2]UD20111128_F06_... CGTTATCGTTTTTATTAGTTAGTTAGGATTGGTAAGGGCGAATCCAGCACACTGGCGG

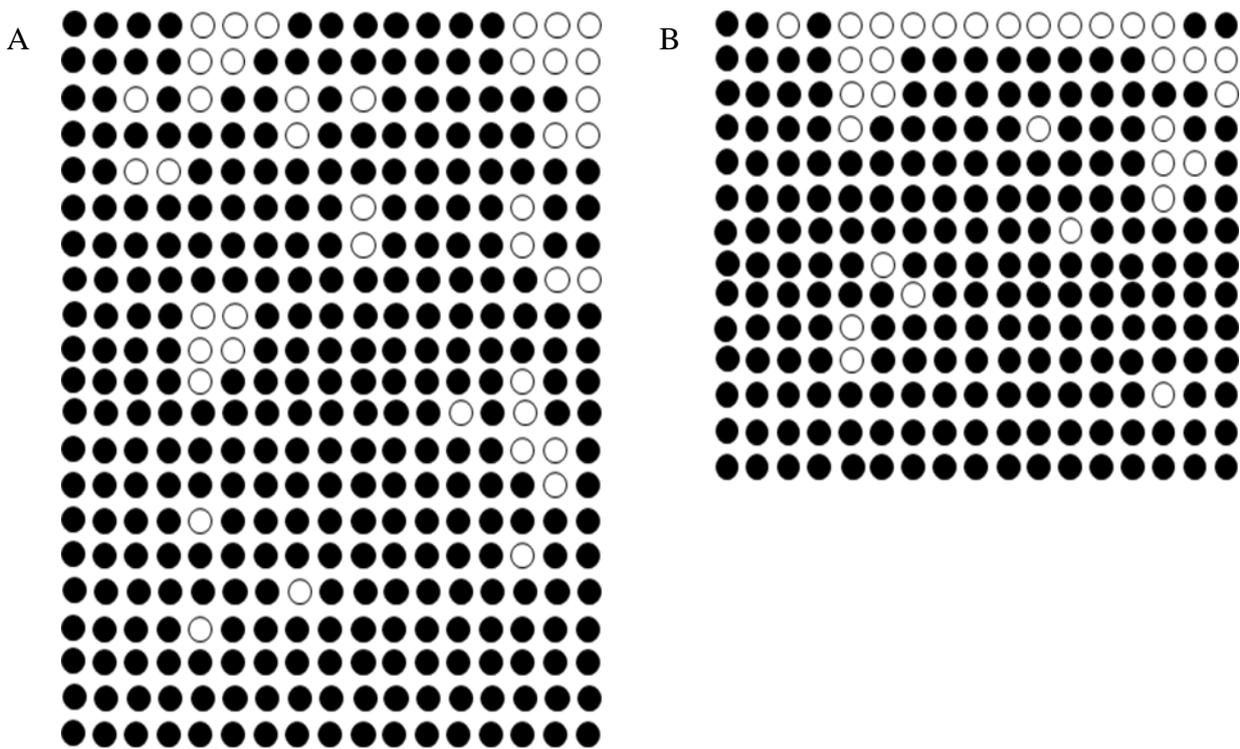
Genomic_Sequence      -----
  
```

Figura 2.5- Análise comparativa pelo software BIQ Analyzer da seqüência obtida no *GenBank* com uma seqüência obtida no experimento, mostrando os 17 sítios CpG. Em

laranja e roxo estão indicados os sítios CpG não metilados, mostrando que a citosina foi substituída por uma timina. As duas sequências em laranja indicam os sítios CpG metilados, onde as citosinas não foram substituídas por timinas.

Todos os 17 sítios CpG foram analisados em todas as sequências avaliadas. Não houve diferença significativa para o padrão de metilação de DNA entre os grupos controle ($87,58\% \pm 1,16989$) e o grupo suplementado com 2,0 mM de SAH ($82,35\% \pm 5,65803$) (Figura 2.6C).

As sequências foram obtidas de quatro réplicas realizadas em momentos diferentes. O grupo controle apresentou 18 sequências diferentes para o padrão de metilação de DNA de um total de 21 e o grupo tratado com 2,0 mM das 14 sequências, 12 possuem um padrão diferente (Figura 2.6).



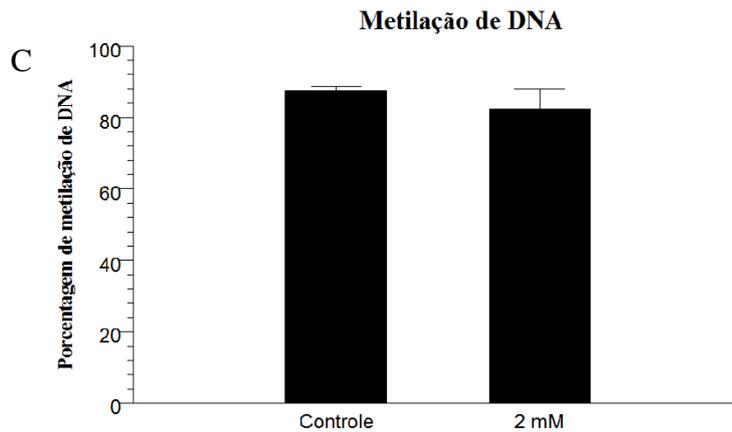


Figura 2.6 - Análise de metilação do gene XIST em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com SAH. A e B - Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG (total de 17 CpG). Círculo preto indica citosina metilada enquanto círculo branco não metilada. A- Grupo controle, com 100% de seqüências hipermetiladas. B- Grupo tratado com 2,0mM de SAH com 92,86% de seqüências hipermetiladas. C- Gráfico mostrando a porcentagem de metilação do DNA (média ± erro padrão) para os dois tratamentos (A – 87,58% ± 1,16989 B – 82,35% ± 5,65803).

Comparando as seqüências desse experimento com Imamura e colaboradores (2005), o grupo controle apresentou 21/21 (100%) de seqüências hipermetiladas e o grupo tratado com 2,0 mM 13/14 (92,86%) de seqüências hipermetiladas.

5.1.4 Expressão gênica

A expressão do gene XIST foi quantificada por qPCR, tanto nas células controle quanto nas células tratadas com 2mM de SAH (Figuras 2.7 e 2.11). Para a normalização do gene XIST, a expressão dos genes constitutivos GAPDH e CYC- A também foram quantificados por qPCR nas células de ambos tratamentos (Figuras 2.8 e 2.9). Os produtos da qPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% para confirmar o tamanho de cada amplicom (Figura 2.10).

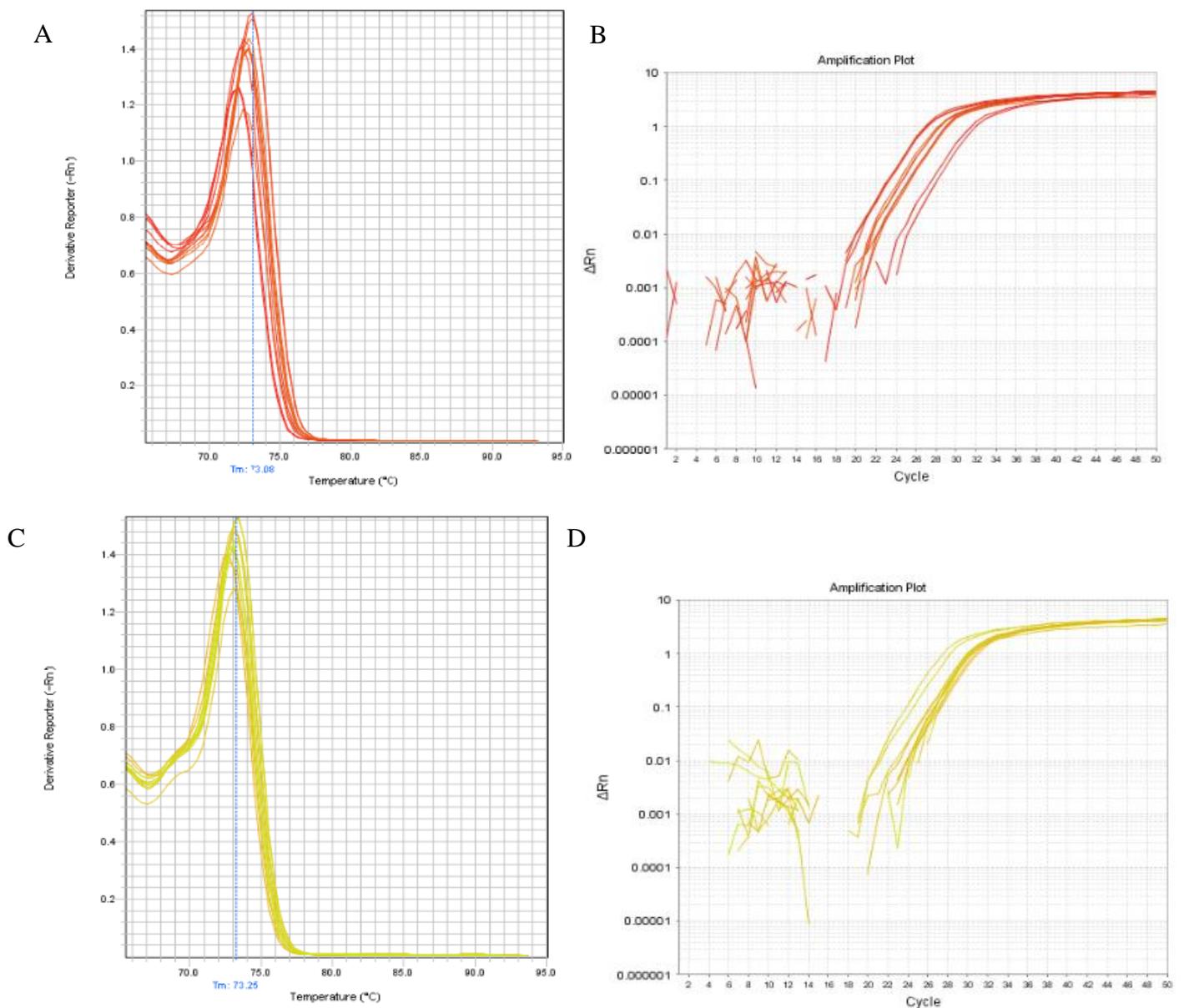


Figura 2.7-A- Amplificação por qPCR do gene XIST, nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene XIST, nas células do grupo controle através da curva de

dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene XIST, nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene XIST, nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR ($T_M = 73,25^\circ\text{C}$).

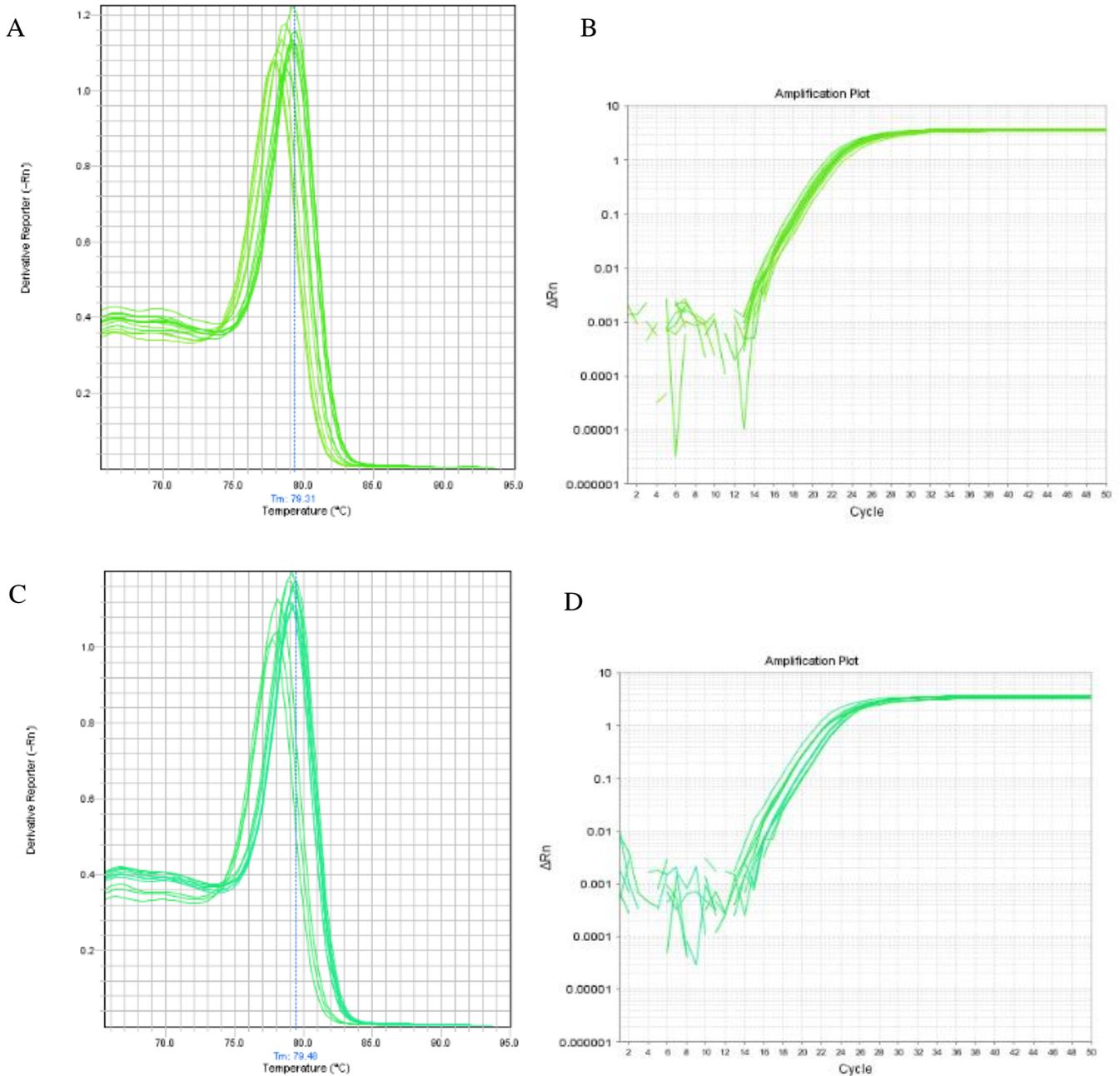


Figura 2.8-A- Amplificação por qPCR do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo controle através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene constitutivo GAPDH nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR ($T_M = 79,48^\circ\text{C}$).

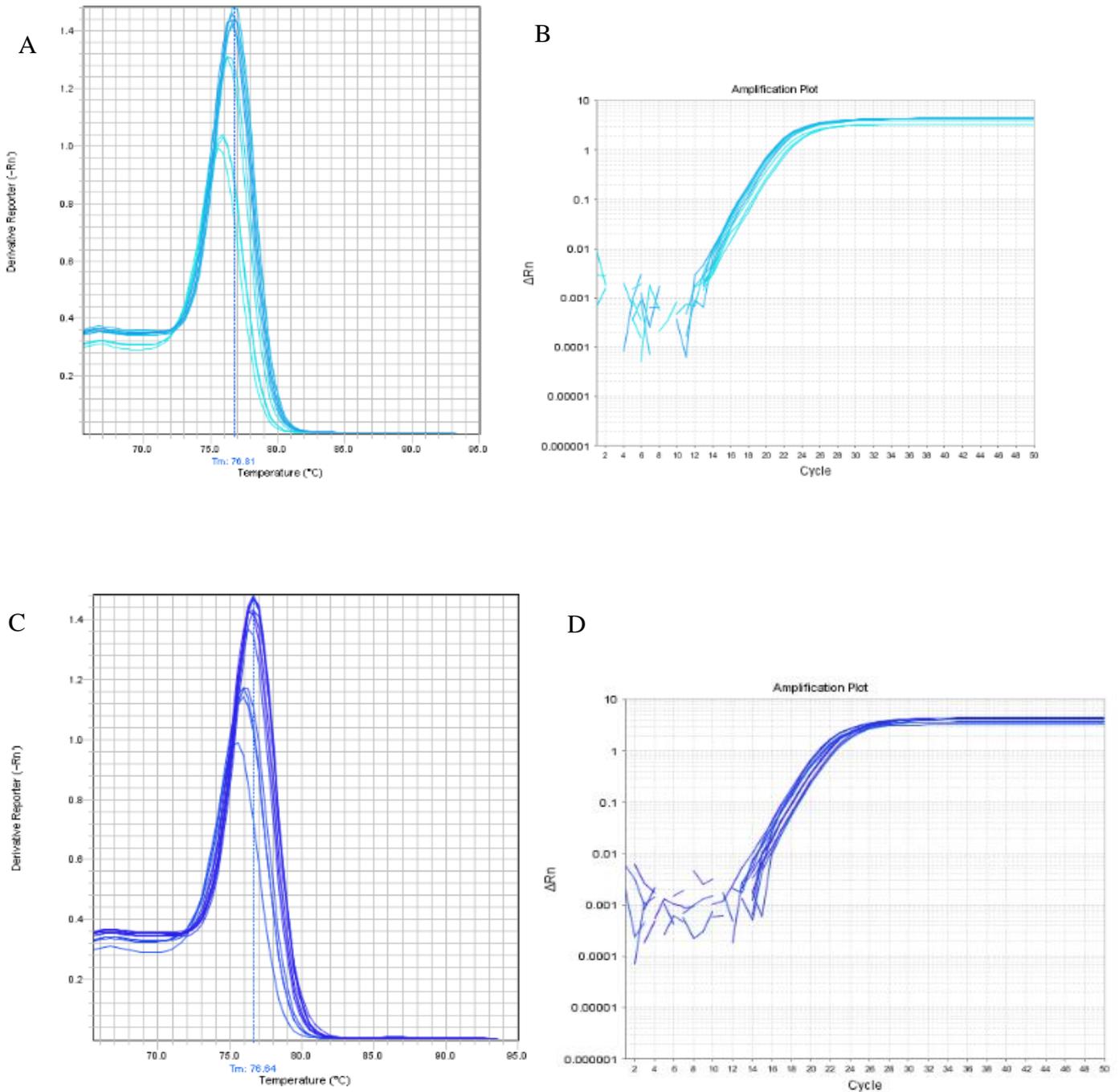


Figura 2.9-A- Amplificação por qPCR do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo controle. **B-** Confirmação da presença do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo controle através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. **C-** Amplificação por qPCR do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo tratado com 2mM de SAH. **D-** Confirmação da presença do gene constitutivo CYC- A nas células do grupo tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. ($T_M = 76,81^\circ\text{C}$).

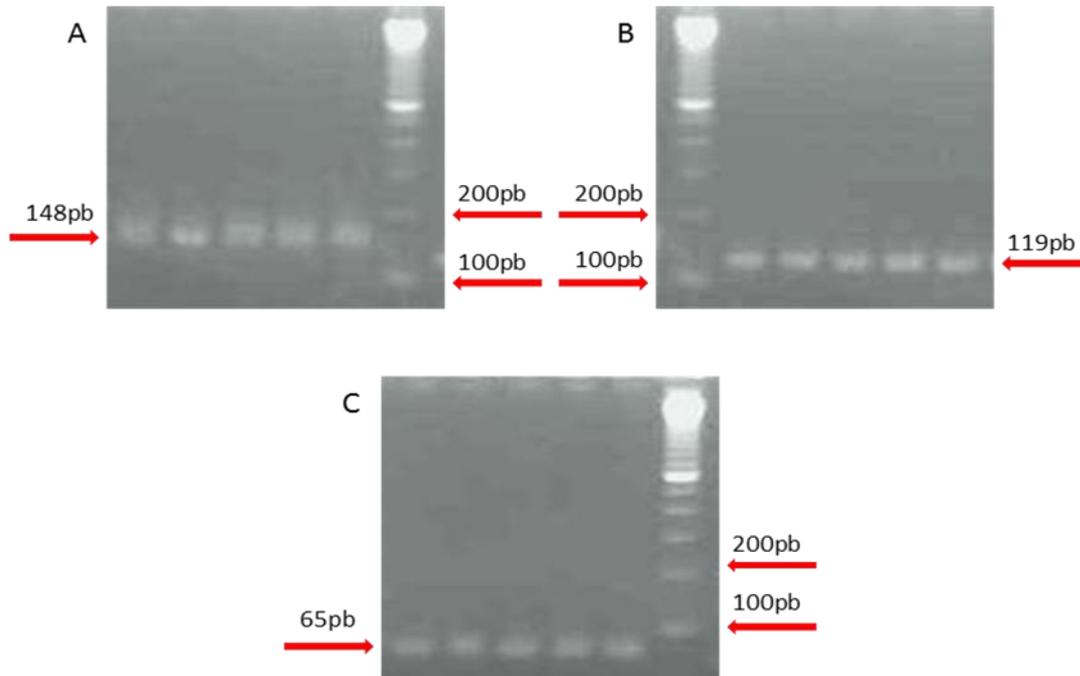


Figura 2.10 - Eletroforese em gel de agarose 2%, mostrando a presença dos amplicons para os genes XIST, GAPDH e CYC-A. **A**- As bandas específicas com 148pb correspondentes ao gene XIST. **B**- As bandas com 118pb correspondentes ao gene GAPDH e **C**- As bandas com 65pb correspondentes ao gene CYC- A.

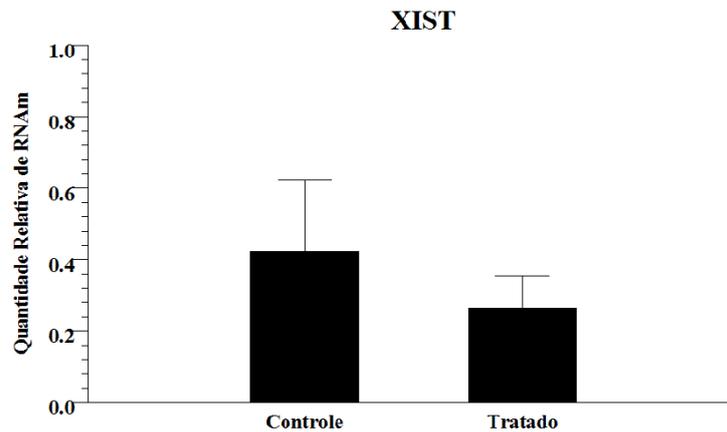


Figura 2.11- Quantidade relativa (média \pm erro padrão) de RNA mensageiro do gene XIST para os grupos controle e tratado com 2,0mM de SAH, utilizando a média geométrica dos genes constitutivos GAPDH e CYC-A para a normalização.

A presença de XIST, GAPDH e CYC-A foi confirmada, tanto nas células do grupo controle quanto nas células tratadas com 2,0mM de SAH, não apresentando diferença significativa entre os grupos para o gene XIST.

5.2 DISCUSSÃO

Neste estudo foram testadas diferentes concentrações de SAH no cultivo de fibroblastos bovinos. A morfologia e a viabilidade das células tratadas com SAH não foram alteradas em nenhuma das concentrações testadas quando comparadas com as células do grupo controle, não apresentando crescimento e morfologia anormais ou morte celular significativamente (Figuras 2.2, 2.3).

Este resultado está de acordo com Liu e colaboradores (2009), que mostraram que a utilização de SAH no meio de cultivo celular não provoca citotoxicidade em células BNL CL.2, células hepáticas murinas e BV-2 e células da microglia. Por ser um agente endógeno, um subproduto natural do metabolismo celular, fazendo parte do ciclo da metionina (Panayiotidis *et al.*, 2009) e por ser uma substância não análoga de nucleosídeo, o SAH não apresenta risco de toxicidade e apoptose, como os fármacos análogos de nucleosídeo (Nieto *et al.*, 2004).

Neste estudo foram utilizadas concentrações de SAH maiores que as utilizadas por Liu e colaboradores em 2009. Apesar disso, a viabilidade celular das células tratadas com as diferentes concentrações de SAH não foi comprometida como pode ser observada pela contagem celular utilizando o corante azul de tripan (Figuras 2.3).

Os resultados mostraram que a suplementação do meio de cultivo com as diferentes concentrações de SAH não inviabilizou o crescimento celular de fibroblastos bovinos.

Além da viabilidade celular, o padrão de metilação da DMR do gene XIST, um dos genes responsáveis pelo processo de inativação do cromossomo X (ICX), foi avaliado.

O gene XIST foi selecionado para essa avaliação por ser um gene controlado por fatores epigenéticos, por ser o primeiro evento molecular responsável por iniciar o processo de ICX (Heard & Disteché., 2006) e por apresentar alterações na expressão gênica nos embriões durante o cultivo no sistema *in vitro* e nos embriões provenientes da TNCS (Xue *et al.*, 2002; Dindot *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008).

O processo de ICX se dá inicialmente pela interação do RNA XIST com o cromossomo, que depois é mantido por outras modificações epigenéticas (Brockdorff., 2002; Liu *et al.*, 2008; Agrelo & Wutz., 2010). Esse gene possui uma DMR bem caracterizada no éxon 1, que auxilia no controle da sua expressão. A hipometilação dessa DMR está

correlacionada com a inativação do cromossomo X, enquanto que a hipermetilação corresponde ao padrão encontrado no cromossomo X ativo (revisto por Goto & Monk., 1998; revisto por Heard., 2004; Jeon *et al.*, 2012).

No decorrer do desenvolvimento embrionário e fetal, diferenciam-se, a partir da MCI, as células germinativas primordiais (CGP), que permanecem com apenas um cromossomo X ativo (Hajkova *et al.*, 2002; Napoles *et al.*, 2007). No entanto, durante o tempo da migração das CGP para o mesênquima da crista genital e posterior colonização das gônadas, é visto a reativação do cromossomo X inativo (Nesterova *et al.*, 2002). Também é considerado que, durante o tempo de migração das CGP, comece um dos ciclos epigenéticos, que é a desmetilação de genes *imprinted* e não *imprinted* (Reik *et al.*, 2001; Hajkova *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2003). Estudos mostram um progressivo processo de desmetilação do promotor XIST, associado a uma progressiva diminuição de transcritos deste gene, resultando na reativação do cromossomo X inativo durante a migração das CGP, sugerindo que outros fatores epigenéticos que não metilação devam estar interferindo na repressão transcricional do gene XIST (Hajkova *et al.*, 2002).

Em 1998, McDonald e colaboradores mostraram que em espermatozóides essa região está hipermetilada e em ovócitos hipometilada. Porém, logo após a fecundação uma nova fase de reprogramação se inicia. Neste momento inicia-se o processo de desmetilação dos pró- núcleos paterno (desmetilação ativa) e materno (desmetilação passiva). Após esse período, tem-se uma metilação *de novo* que coincide com os eventos de diferenciação celular (Mayer *et al.*, 2000). Ainda de acordo com McDonald e colaboradores (1998) em células somáticas, essa região apresenta um padrão *imprinted*. Corroborando com o fato de os espermatozóides se mostrarem hipermetilados e os ovócitos hipometilados, já citado anteriormente, sugerindo um padrão *imprinted* após a fecundação. No entanto, outros trabalhos afirmam que diferentes tecidos apresentam diferentes padrões de metilação, mostrando que nem sempre esse padrão *imprinted* é observado (Gibbs *et al.*, 2010).

Neste estudo, ao avaliar o padrão de metilação do DNA nos grupos controle e tratado com 2,0mM de SAH, pôde-se observar que não houve diferença entre os grupos no sistema de cultivo *in vitro*, apresentando um padrão de metilação e de sequências hipermetiladas de 87,58% e 100% respectivamente para o grupo controle e 82,35% e 92,86% para o grupo tratado. (Figura 2.6- A, B e C). Isto significa que essa região não apresentou um padrão de uma região *imprinted* para essa linhagem celular, pois se encontra hipermetilada, diferente de uma região *imprinted* que deve ter um padrão ao redor de 50% de metilação

(Reik & Walter., 2001). Como não houve diferença entre o grupo controle e o de maior concentração, a avaliação nas concentrações intermediárias não se fez necessária.

Vários outros trabalhos também mostraram essa região hipermetilada, corroborando nossos dados. Dvash e colaboradores (2010) observaram um padrão hipermetilado na região promotora do gene XIST, em diferentes passagens de cultivo *in vitro*, estudando células indiferenciadas humanas e em processo de diferenciação, não apresentando um padrão *imprinted*. Neste mesmo trabalho os autores afirmam que as condições de cultivo podem alterar o padrão normal de metilação. Então especulamos que o padrão hipermetilado encontrado em nosso estudo pode ser devido às condições de cultivo utilizadas (composição do meio de cultivo e condições de atmosfera); ou esse padrão hipermetilado é normal em fibroblastos bovinos (Jie *et al.*, 2008; revisto por Muleronavarro & Esteller, 2008).

Jie e colaboradores (2008), ao utilizarem células somáticas de pulmão para avaliar o padrão de metilação do gene XIST, encontraram um padrão hipermetilado tanto nas células do grupo controle quanto nas células de bovinos provenientes de transferência nuclear. Michalczechen Lacerda *et al* (2010) ao cultivar fibroblastos bovinos *in vitro* com outra substância desmetilante de DNA, e avaliar o padrão de metilação da DMR do éxon 1 do gene XIST também encontraram um padrão hipermetilado, tanto para as células controle quanto para as células tratadas. Portanto, nosso resultado está de acordo com os dados citados acima.

Comparando nossos resultados, que não mostraram diferenças entre os alelos paterno e materno, estando ambos hipermetilados, e os resultados de McDonald e colaboradores 1998, que mostraram diferenças no padrão de metilação entre espermatozoides e ovócitos, podemos especular que no início do desenvolvimento essa região tem um padrão de metilação *imprinted* sendo importante na escolha de qual cromossomo X será escolhido para ser inativado e que após a diferenciação celular esse padrão é perdido, através da hipermetilação, pelo menos em fibroblastos de pele. Ainda, sabendo-se que após a escolha de qual cromossomo será inativado todas as células originadas daquela célula seguem o mesmo padrão de inativação (Kay., 1998), pode-se especular que são outros eventos epigenéticos, diferentes de metilação, que são importantes a partir daí no processo de inativação do cromossomo X em células somáticas (Hajkova *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2011; Del Arenal *et al.*, 2011).

Baseando-se no potencial desmetilante da SAH (Jeon *et al.*, 2008; Leyton *et al.*, 1995; Lengauer *et al.*, 1997), esperava-se que, pelo menos com o tratamento com 2,0mM,

uma menor quantidade de sítios CpG metilados fosse detectada nessas células, o que não ocorreu.

Spikens e colaboradores (2011) alegam que o SAH não possui a capacidade de entrar na célula, pois ao cultivarem células endotéliais umbilicais humanas com SAH extracelular por 6 horas, não verificaram um aumento de SAH intracelular. Isso pode explicar porque não encontramos diferenças no presente trabalho. Porém, a concentração de SAH utilizado no trabalho de Spikens e colaboradores (2011) foi muito inferior à concentração utilizada no nosso trabalho, assim como o tempo de cultivo.

Por outro lado, Jeon e colaboradores, 2008 cultivando fibroblastos bovinos com uma concentração de 2,0mM de SAH por 120 horas, observaram uma desmetilação global do DNA, reativação parcial do cromossomo X inativo nos carioplastos e aumento nas taxas de blastocisto e blastocisto expandido quando as células tratadas foram utilizadas na TN. Em nosso trabalho, avaliamos o padrão de metilação em apenas uma região genômica e o resultado mostrou que não houve efeito da SAH desmetilando o DNA nessa região. Isso não descarta a possibilidade de ter ocorrido uma desmetilação global no genoma ou em outras DMRs, mas que não foram avaliadas neste estudo. De qualquer forma, nossos resultados foram diferentes de Jeon e colaboradores 2008, o que pode ser devido ao tempo de exposição à droga e/ou ao sistema de cultivo diferentes.

Um ponto importante a ser considerado é se há alguma diferença entre diferentes regiões genômicas quanto à resistência para serem desprogramadas. Assim, algumas regiões seriam mais susceptíveis e outras mais resistentes para peder metilação (Bogs *et al.*, 2002; Sudbrak *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2004). Outro fato importante a se considerar é a possibilidade de linhagens celulares diferentes se comportarem diferentemente ao serem expostas a substâncias desmetilantes de DNA (Villar- Garea *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2007). De qualquer forma, no presente estudo, 2,0mM de SAH por 72 horas, nas condições de cultivo utilizadas, não foram suficientes para desmetilar essa região da ilha CpG contida no éxon 1 do gene XIST.

Considerando que o gene XIST tem um controle de sua transcrição envolvendo um padrão de metilação (De La Fuente *et al.*, 1999; Csankovszki *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2012), a utilização de uma substância desmetilante de DNA no cultivo celular poderia alterar o padrão de metilação e conseqüentemente o perfil de expressão do gene. Portanto, após o tratamento das células com SAH, a presença de transcritos para o gene XIST foi quantificada e comparada entre os grupos controle e tratado com 2,0mM de SAH utilizando qPCR. A

presença do RNA XIST é necessária para que ocorra a ICX (Penny *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2008; Del Arenal *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012). Este gene transcreve um RNA que envolve o cromossomo, iniciando o silenciamento dos outros genes do cromossomo. Após a indução do silenciamento do X, o padrão de inativação determinado pelo XIST é mantido por metilação de DNA e histonas e associação da cromatina com vários complexos proteicos (Lock *et al.*, 1987; Singer-Sam *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2008; Del Arenal *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012).

A presença do gene XIST foi detectada, tanto nas células controle como nas células tratadas (Figura 2.7), e não houve diferença significativa na expressão relativa do gene XIST entre os dois grupos (Figura 2.11). A detecção de transcritos para o XIST sugere não haver o envolvimento apenas do padrão de metilação da ilha CpG presente no éxon 1 do gene no controle de sua expressão, nessas células, pois esta região se encontra hipermetilada em ambos os alelos (Figura 2.6). Nossos resultados estão de acordo com outro trabalho que detectou a expressão do gene XIST em diferentes linhagens de células tronco embrionárias humanas, mesmo apresentando o promotor com um padrão hipermetilado (Dvash *et al.*, 2010).

Como já discutido anteriormente, o padrão hipermetilado encontrado neste estudo pode estar relacionado às condições de cultivo *in vitro* ou mesmo ser um padrão normal em fibroblastos de pele. A detecção de transcritos para o gene XIST seria um nível basal de expressão, não sendo transcricionalmente controlado pelo padrão de metilação dessa região e nem sendo essencial para a manutenção do padrão de inativação do cromossomo X. Outras alterações epigenéticas conhecidamente envolvidas com a XCI como a H3K27me3 e a H3K4me (Nesterova *et al.*, 2008; revisto por Hemberger *et al.*, 2009; revisto por Sasaki&Matsui., 2008; Del Arenal *et al.*, 2011) poderiam estar envolvidas neste processo. Especulamos que uma diminuição da H3K27me3 e aumento da H3K4me poderiam garantir o nível basal de transcrição do XIST ao longo das divisões celulares que aconteceram durante o cultivo celular.

Levando-se em consideração que uma região *imprinted* apresenta um padrão de metilação de 50%, por apresentar um alelo metilado e outro não (Reik & Walter., 2001), existe ainda a possibilidade de que a ilha CpG estudada neste experimento não seja uma região *imprinted* em bovinos, o que justificaria apenas um padrão de metilação encontrado neste estudo, concordando com o trabalho de Dindot e colaboradores (2004), que também sugerem que esta região pode não ser o elemento responsável pelo *imprinting* no bovino. Portanto, considerando-se esta última possibilidade, a presença de transcritos detectada se

explicaria pelo fato de existir outra forma de controle para o gene. De qualquer forma, McDonald e colaboradores (1998) encontram diferenças no padrão de metilação para essa região entre espermatozóides e ovócitos, sugerindo um padrão *imprinted*, mas em camundongos. Como comentado anteriormente, sugerimos que essa região poderia ter um padrão *imprinted* até o momento de se estabelecer o padrão de ICX e após esse momento perder seu padrão *imprinted* em fibroblastos de pele de bovinos.

Em células não diferenciadas, fatores de pluripotência celular reprimem a expressão de XIST. Esses fatores podem agir diretamente, se ligando ao íntron 1 do gene XIST, ou indiretamente, ativando a transcrição de TSIX, um gene que transcreve um RNA antisense ao XIST ou ainda reprimindo os ativadores de XIST como o Rnf12. O RNA TSIX recruta a enzima DNMT3A, metilando o gene XIST em *cis* para que o cromossomo permaneça ativo. Durante a diferenciação celular, os fatores de pluripotência diminuem e os ativadores de XIST aumentam, desencadeando a inativação em *cis* de um cromossomo X e finalmente baixando os níveis de Rnf12. Em cada cromossomo (ativo e inativo) diferentes modos de regulação em *cis* acontecem. No futuro cromossomo X ativo a expressão de TSIX é estimulada por fatores de pluripotência e possivelmente pelo XITE. E no futuro cromossomo X inativo um pequeno RNA (repA) se liga ao complexo policomb 2 (PRC2) que se ligam ao promotor de XIST através de um “receptor” o YY1, permitindo a transcrição de XIST. O RNA XIST cobre o cromossomo X em *cis* e o silenciamento gênico ao longo do cromossomo é então iniciado. Complexos modificadores de cromatina, como a PRC1 e PRC2 além de outros fatores como H3K27me3, H2AK199ub, H3K9me2 e H4K20me são recrutados, resultando no acúmulo de modificações típicas de heterocromatina. Em seguida, outros fatores epigenéticos aparecem, tais como, aquisição da metilação do DNA e a incorporação da histona macroH2A, além do recrutamento de outras proteínas, mantendo o estado inativo do cromossomo (Zhao *et al.*, 2008; Del Arenal *et al.*, 2011).

Acreditamos que algumas destas alterações citadas anteriormente, importantes para o início e estabelecimento da ICX mas não a metilação do DNA, podem se desfazer da cromatina ao longo das divisões celulares, sendo estas alterações suficientes para garantir um nível basal de expressão do gene XIST.

A utilização do SAH como agente desmetilante de DNA no cultivo de células doadoras de núcleo para clonagem por transferência nuclear é uma alternativa técnica ainda não muito utilizada, e com poucos relatos na literatura, a maioria deles relacionados a diagnóstico de doenças cardíacas.

Os resultados encontrados nesse estudo mostraram que 2,0mM de SAH por 72 horas não foi suficiente para inviabilizar o crescimento celular e desmetilar o DNA. Portanto, o perfil de expressão para o XIST, igual entre os dois tratamentos, corroboram os resultados de viabilidade celular e padrão de metilação do DNA.

6 CONCLUSÕES

O SAH nas condições utilizadas nesse experimento, concentração de 2,0mM e 72 horas de cultivo, não foi capaz de desmetilar o DNA da região estudada e alterar a expressão do gene XIST.

7 PERSPECTIVAS

Atualmente, objetiva-se desenvolver protocolos que visem o aumento da eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear. No caso desse experimento, submeter a célula doadora de núcleo a um tratamento para sofrer uma desprogramação epigenética antes da clonagem pode aumentar a eficiência da técnica. Acredita-se que o SAH, desmetilando o genoma do núcleo doador, seja capaz de aumentar a eficiência da clonagem de mamíferos, produção de animais transgênicos, e produção de células-tronco a partir de células diferenciadas. No entanto, se faz necessário testar novas concentrações de SAH e/ou tempo de cultivo. Além disso, outras avaliações como a quantificação do padrão de metilação global de DNA e modificações de histonas podem ser úteis para que o efeito dessa substância seja melhor entendida e otimizada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRELO, R.; WUTZ, A. X inactivation and disease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, p.194-200, 2010.

BOGGS, B.A.; CHEUNG, P.; HEARD, E.; SPECTOR, DL.; CHINAULT, A. C.; ALLIS, C.D. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. **Nature Genetics**, v.30, p.73-76, 2002.

BROCKDORFF, N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *XIST* RNA. **Trends in Genetics Review**, v. 18, p. 352-358, 2002.

CRAIG, I.W.; MILL, J.; CRAIG, G.M.; LOAT, C. SCHALKWYK, L.C. Application of microarrays to the analysis of the inactivation status of human X-linked genes expressed in lymphocytes. **European Journal of Human Genetics**, v.12, p.639-46, 2004.

CSANKOVSKI, G.; NAGY, A.; JAENISCH, R. Synergism of *XIST* RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. **Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 4, p. 773-784, 2001.

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive specific transcript (*XIST*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.

DEL ARENAL, M. E.; ROCHA, S.T.; HEARD, E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. **Human Genetics**, v.130, p. 307-327, 2011.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 14, p. 93-100, 2003.

DINDOT, S.V.; KENT, K.C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J.A. Conservation of genomic *imprinting* at the XIST, IGF2 and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, p. 966-974, 2004.

DVASH, T.; LAVON, N.; FAN, G. Variations of X chromosome Inactivation Occur in Early Passages of Female Human Embryonic Stem Cells. **Plos ONE**, v. 5, n.6, 2010.

GIBBS, JR.; van der BRUG, M.P.; HERNANDEZ, D.G.; TRAYNOR, B.J.; NALLS, M.A. et al. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. **Plos Genetics**, v. 6, n.5, 2010.

GOTO, T.; MONK, M. Regulation of Xchromosome inactivation in development in mice and humans. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 62, p.362–378, 1998.

HAJKOVA, P.; ERHARDT, S.; LANE, N.; HAAF, T.; EL-MAARRI, O.; REIK, W.;WALTER, J.; SURANI, M.A. Epigenetic reprogramming in mouse primordialgermcells. **Mechanisms of Development**, v. 117, p. 15-23, 2002.

HEARD, E.; DISTECHE, C.M. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. **Genes Development**, v.20, p.1848-1867, 2006.

HEARD, E. Recent advanceds in X-chromosome inactivation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p.247-255, 2004.

HEMBERGER, M.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 10, p.526–537, 2009.

IMAMURA, T.; KERJEAN, A.; HEAMS, T.; KUPIEC, J.; THENEVIN, C.; PALDI, A. Dynamic CpG and Non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocytes and preimplantation embryo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20171-29175, 2005.

JEON, B.G.; COPPOLA, G.; PERRAULT, S.D.; RHO, G.J.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Sadenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. **Reproduction**, v. 135, n. 6, p. 815–828, 2008.

JEON, Y.; SARMA, K.; LEE, J.T. New and Xisting regulatory mechanisms of X chromosome inactivation. **Science**, v.22, p. 1-10, 2012.

JIE, C.; JIE, L.D.; YANQIN, L.; CUI, Z.; YUNPING, D.; SHIJIE, L.; NING, L. DNA methylation status of H19 and Xist genes in lungs of somatic cell nuclear transfer bovines. **Chinese Science Bulletin**, v.53, p. 1996-2001, 2008.

KARL, Juliana. Damm. **Estudo da fosforilação e estrutura de filamentos intermediários em astrocitos permeabilizados com digitonia**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.103. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

KAY, G.F. Xist and X chromosome inactivation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 71-76, 1998.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, p.623–627, 1997.

LEYTON, C.; MERGUDICH, D. de la TORRE, D.; SANS, J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Proliferation**, v. 28, p. 481-496, 1995.

LIU, C.C.; HO, W.Y.; LEU, K. L.; TSAI, H.M.; YANG, T. H. Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. **Biochemical Molecular Toxicology**, v. 23, n.5, 2009.

LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 598–607, 2008.

LOCK LF, TAKAGI N, MARTIN GR. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. **Cell**, v.48, p.39-46, 1987.

MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Demethylation of de zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, p. 501-502, 2000.

McDONALD, L.E.; PATERSON, C.A.; KAY, G.F. Bisulfite genomic sequencing-derived methylation profile of the Xist gene throughout early mouse development. **Genomics**, v. 54, p. 379-386, 1998.

MICHALCZECHEN LACERDA, Valquíria. Alice. **Impactos do uso da procaína como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, 2010. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, 2010.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. **Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer**. **Epigenetics**, v. 3, n.4, p.210-5, 2008.

NAPOLLES, M.; NESTEROVA, T.; BROCKDORFF, N. Early loss of Xist RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. **Plos One**, v. 2, n. 9, p. 860, 2007.

NESTEROVA, T.B.; MERMOUD, J.E.; HILTON, K.; PEHRSON, J.; SURANI, M.A.; MCLAREN, A.; BROCKDORFF, N. Xist expression and macroH2A localisation in mouse primordial and pluripotent embryonic germ cells. **Differentiation**, v. 69, p. 216-225, 2002.

NESTEROVA, T.B.; POPOVA, B. C.; COBB, B. S.; NORTON, S.; SENNER, C. E.; TANG, Y. A.; SPRUCE, T.; RODRIGUEZ, T. A.; SADO, T.; MERKENSCHLAGER, M.; BROCKDORFF, N. Dicer regulates Xist promoter methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of Dnmt3a. **Epigenetics & Chromatin**, 2008.

NIETO, M.; SAMPER, E.; FRAGA, M. F.; GONZALES De BUITRAGO, G.; ESTELLER, M.; SERRANO, M. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxyxytidine. **Oncogene**, v.23, p.735-743, 2004.

PANAYIOTIDIS, M. I.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H.; PAPPAS, A.; WHITE, C. W. Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. **Mutation Research/Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.674, p.23-30, 2009.

PENNY GD, KAY GF, SHEARDOWN SA, RASTAN S, BROCKDORFF N. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. **Nature**, v.379, p.131-137, 1996.

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

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science Review**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Review Genetics**, v. 9, p. 129-140, 2008.

SINGER-SAM J, GRANT M, LEBON JM, OKUYAMA K, CHAPMAN V, MONK M, RIGGS AD. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular Cell Biology**, v.10, p.4987-4989, 1990.

SIPKENS, J. A.; HAHN, N. E.; BLOM, H. J.; LOUGHEED, S. M.; STEHOUWER, C. D. A.; RAUWERDA, J. A.; KRIJNEN, P. A. J.; Van HINSBERGH, V. W. M.; NIESSEN, H. W. M. S-adenosylhomocysteine induces apoptosis and phosphatidylserine exposure in endothelial cells independent of homocysteine. **Atherosclerosis**, v. 221, n.1, p.48-54, 2011.

SUDBRAK R, WIECZOREK G, NUBER UA, MANN W, KIRCHNER R, ERDOGAN F, BROWN CJ, WOHRLE D, STERK P, KALSCHEUER VM, BERGER W, LEHRACH H,

ROPER HH. X chromosome-specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications. *Human Molecular Genetics*, v.10, p.77-83, 2001.

TADA, M.; IMAZEKI, F.; FUKAI, K.; SAKAMOTO, A.; ARAI, M.; MIKATA, R.; TOKUHISA, T.; YOKOSUKA, O. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. **Hepatology International**, v. 1, p. 355-364, 2007.

VILLAR-GAREA, A.; FRAGA, M.F.; ESPADA, J.; ESTELLER, M. Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 4984–4989, 2003.

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216-220, 2002.

YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinting 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.

ZHAO, J.; SUN, B.K.; ERWIN, J.A.; SONG, J.J.; LEE, J. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 750-756, 2008.

