



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

**DINÂMICA DA METILAÇÃO DO DNA EM EMBRIÕES DE COELHO NO
PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO**

ADRIANA RODRIGUES REIS E SILVA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2011**



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

**DINÂMICA DA METILAÇÃO DO DNA EM EMBRIÕES DE COELHO NO
PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO**

ADRIANA RODRIGUES REIS E SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. CAROLINA MADEIRA LUCCI

**ORIENTADORA DE ESTÁGIO DE DOUTORANDO (INRA- FRANÇA):
Dra. VÉRONIQUE DURANTHON**

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 42D/2011

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2011**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

REIS E SILVA, A. R. **Dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelho no período pré-implantação.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 63p. Tese de Doutorado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

REIS E SILVA, Adriana Rodrigues. **Dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelho no período pré-implantação.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011. 63p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1. Embriões de coelhos 2. Metilação do DNA 3. Cultivo *in vitro*
4. Pré-implantação embrionária
I. Lucci, C. M. II. Dra.

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

**DINÂMICA DA METILAÇÃO DO DNA EM EMBRIÕES DE COELHO NO
PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO**

ADRIANA RODRIGUES REIS E SILVA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**Carolina Madeira Lucci, Dra. (Universidade de Brasília – UnB).
(ORIENTADORA)**

Carlos Frederico Martins, Dr. (Embrapa Cerrados).

Márcio José Poças Fonseca, Dr. (Universidade de Brasília – UnB).

Margot Alves Nunes Dode, Dra. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Maurício Machaim Franco, Dr. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

BRASÍLIA/DF, 15 de MARÇO de 2011

Deus, “tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses 4:13).

Ao meu esposo *Nilton Antônio* pelo carinho, incentivo e companheirismo.

Aos meus pais, *João Batista e Lázara*, e a minha irmã, *Flávia* pela dedicação e apoio.

Aos meus sogros, *Domingos e Maria*, e familiares pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Carolina Madeira Lucci sinceros agradecimentos pela oportunidade de desenvolver este trabalho, orientação, paciência e pelos exemplos de ética e profissionalismo. Além disso, nos momentos mais difíceis por estar presente, me apoiando e buscando a melhor solução! Minha admiração.

À Dra. Véronique Duranthon por ter me acolhido no seio de sua equipe no *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) e compartilhar suas experiências, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação à ciência, pela orientação e comprometimento com a minha formação profissional e científica.

À Dra. Nathalie Beaujean pelo auxílio imprescindível durante o desenvolvimento deste estudo e pela orientação para a elaboração dos artigos científicos.

Ao Dr. Pierre Adenot por compartilhar suas experiências, pelos conselhos, incentivo e amizade, que contribuíram para o meu aprimoramento profissional e crescimento pessoal.

À Nathalie Daniel, Catherine Archilla, Nathalie Peynot e Renaud Flerot pelo auxílio técnico na coleta dos embriões e processamento das amostras, pelos conselhos, pela dedicação, incentivo e amizade.

Ao Dr. Luc Juneau pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Vicent Brochart pelos sábios conselhos e amizade.

Ao Dr. Márcio José Poças Fonseca e ao Dr. Maurício Machaim Franco pelas valiosas sugestões e discussões científicas durante a participação na banca examinadora de qualificação.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado analisar este trabalho e contribuírem com correções, críticas e sugestões para o aperfeiçoamento deste estudo.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela oportunidade de participar do curso de doutorado, especialmente ao Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários e aos colegas Beronete Barros de Freitas Araújo, Daniela Pacheco de Lacerda, Geraldo Costa Ferreira, Maria Angélica Ribeiro de Oliveira e Vinícius Augusto de Sá pelo apoio.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Animais, pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao INRA que com sua equipe de técnicos e pesquisadores contribuiu para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial Juliana Caldas Pereira Plácido e Emily Nóbrega Borges, e ao Grupo de estudos REPRO-UnB, pela agradável convivência.

Aos colegas do INRA, Anne-Clemence Veillard, Béatrice de Montera, Céline Bruno, Claire Louet, Daulat Khan, Eugène Canon, Julian Maruotti, Karlla Maison e Maitê Rielland, pela “luta” cotidiana em busca de conhecimento, pela convivência e o compartilhar de experiências.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO 1	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Problemática e relevância	2
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo geral	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Pré-implantação embrionária e ativação transcricional do genoma	3
2.2 Modificações epigenéticas na regulação da expressão gênica durante a pré-implantação embrionária	4
2.3 Metilação do DNA	7
2.3.1 Dinâmica da metilação do DNA	8
2.3.2 Desmetilação ativa do pró-núcleo paterno e proteção do genoma materno	9
2.3.3 Dinâmica da metilação do DNA entre espécies de mamíferos	11
2.4 Efeitos do cultivo <i>in vitro</i> na metilação do DNA durante a pré-implantação	12
2.5 Métodos de estudos para análise de metilação do DNA	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPITULO 2 Dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos genomas materno e paterno de coelhos após a fecundação	
RESUMO	24
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Animais	28
2.2 Coleta e cultivo <i>in vitro</i> de embriões de coelhos	29
2.3 Avaliação da replicação do DNA	29
2.4 Tratamento de zigotos de coelhos com 5-Azacitidina	30
2.5 Imunomarcagem	30
2.6 Análise quantitativa	31
2.7 Análise estatística	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Classificação dos zigotos de acordo com a morfologia pró-nuclear	32
3.2 Replicação do DNA em zigotos de coelhos	35
3.3 Dinâmica da metilação do DNA	35
3.4 Estabilidade dos níveis de metilação do DNA durante a replicação	36

4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÕES	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO 3 Dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelhos desenvolvidos <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>	
RESUMO	46
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Animais	50
2.2 Coleta e cultivo <i>in vitro</i> de embriões de coelhos	50
2.3 Imunomarcação	51
2.4 Análise quantitativa	52
2.5 Análise estatística	52
3 RESULTADOS	53
3.1 Desmetilação do DNA durante clivagens	53
3.2 Metilação diferencial entre a massa celular interna e o trofectoderma	53
3.3 Variação na cinética de desmetilação do DNA com a composição do meio de cultivo	54
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 4	
1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
Capítulo 1	
Figura 1.1	Representação do desenvolvimento embrionário em coelhos. PP: Pró-núcleo paterno, PM: Pró-núcleo materno. AGE-Me e Ma: Ativação transcricional do genoma embrionário menor e maior. 4
Figura 1.2	Algumas alterações epigenéticas durante a formação dos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP). As modificações que conferem um estado permissivo à transcrição estão representadas em verde e aquelas que conferem um estado repressivo em vermelho. ac: acetil, H4: histona H4, H3: histona H3, K: lisina, me: metil, F: fecundação, S: singamia. 6
Figura 1.3	Dinâmica da metilação do DNA em embriões de camundongos durante a pré-implantação. Distribuição da marcação com anticorpos anti-5-mC (A) e da metilação do DNA (B). CP: corpúsculo polar, F: fecundação, PP: pró-núcleo paterno, PM: pró-núcleo materno, MCI: massa celular interna, TF: trofotoderma. 9
Capítulo 2	
Figura 2.1	Fases experimentais para a análise e a descrição da dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos genomas materno e paterno durante o primeiro ciclo celular em zigotos desenvolvidos <i>in vivo</i> (DIV) e cultivados <i>in vitro</i> (CIV). 29
Figura 2.2	Classificação de zigotos de coelhos de acordo com os estágios pró-nucleares. (A) Imagens representativas da reconstrução das secções ópticas de diferentes estágios pró-nucleares, que foram definidos de acordo com a morfologia relativa dos pró-núcleos em 5 estágios (PN0 a PN4). O pró-núcleo materno foi identificado pela imunomarcação com H3K9me3. CP: Corpúsculo polar. Barra de escala=20µm. (B) Evolução das áreas do pró-núcleo materno (PM) e do pró-núcleo paterno (PP) nos estágios PN1, PN2 e PN3. (C) Distribuição dos zigotos desenvolvidos <i>in vivo</i> ou cultivados <i>in vitro</i> em cinco estágios pró-nucleares relativos ao tempo <i>post-coitum</i> . Os números de zigotos observados (n) em cada momento analisado são indicados sobre cada barra no histograma. HPC: horas <i>post-coitum</i> . 34
Figura 2.3	(A) Imagens representativas da reconstrução das secções ópticas do sinal de DIG-11-dUTP nos diferentes estágios pró-nucleares. CP: Corpúsculo polar. Barra de escala=20µm. (B) Distribuição da imunomarcação com DIG-11-dUTP nos diferentes estágios pró-nucleares. Marcação com DIG-11-dUTP: AA: ausência em ambos os pró-núcleos; PP: presença em ambos os pró-núcleos; PA: presença no pró-núcleo materno e ausência no paterno. Os números de zigotos observados (n) em cada momento analisado são indicados sobre cada barra no histograma. 37

- Figura 2.4 Dinâmica da metilação do DNA em zigotos de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) (A-F) ou cultivados *in vitro* (CIV) (G,H). Quantificação dos níveis de 5-mC, nível de DNA metilado (A,B) e EthD-2, conteúdo do DNA total (C,D) e nível da metilação do DNA (5-mC/EthD-2; E-H) nos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP) de zigotos DIV e CIV. Os asteriscos (*) representam valores extremos. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre dois estágios de desenvolvimento pró-nuclear consecutivos. 38
- Figura 2.5 Nível normalizado da metilação do DNA (5-mC/EthD-2) nos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP) após 10 horas de cultivo (24 hpc) em presença (n=17, 24 hpc grupo 5-Aza) ou ausência (n=15, 24 hpc grupo controle) de 5-Azacitidina. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes denotam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre grupos em ambos os pró-núcleos. 39
- Capítulo 3**
- Figura 3.1 Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho desenvolvidos *in vivo* (DIV) ou cultivados *in vitro* (CIV). n= quantidade de blastômeros analisados em cada estágio de desenvolvimento. Os asteriscos (*) representam valores extremos. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre dois estágios de desenvolvimento consecutivos. 54
- Figura 3.2 (A) Imagem representativa de blastocisto desenvolvido *in vivo* (DIV) seccionado. Barra de escala=20 μ m. (B-D) Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho desenvolvidos *in vivo* (DIV) ou cultivados *in vitro* (CIV) em meio B2S. n= quantidade de blastômeros analisados. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$) entre a massa celular interna (MCI) e o trofóderma (TF) para blastocistos DIV às 91 hpc, DIV às 97 hpc ou CIV às 98 hpc. 55
- Figura 3.3 Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho cultivados *in vitro* em meio B2 e B2 suplementado com soro fetal bovino (B2S). n= quantidade de blastômeros analisados em cada estágio de desenvolvimento. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre estágios de desenvolvimento para o mesmo meio de cultivo. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) para embriões no mesmo estágio de desenvolvimento entre os dois diferentes meios. 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ativação transcricional do genoma embrionário
CIV	Cultivados <i>in vitro</i>
CPG	Células germinativas primordiais
DIV	Desenvolvidos <i>in vivo</i>
DM-DNA	Dinâmica da metilação do DNA
DNMT	DNA-metiltransferases
EthD-2	Etídio Homodímero-2
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HTM	Histonas metiltransferases
hpc	Horas <i>post-coitum</i>
MBD	<i>Methyl CpG binding Protein</i>
MCI	Massa celular interna
PAF	Paraformaldeído
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PP	Pró-núcleo paterno
PM	Pró-núcleo materno
SAM	S-Adenosil metionina
SFB	Soro fetal bovino
TRA	Tecnologias de reprodução assistida
TF	Trofectorma
5-Aza	5-Azacitidina
5-mC	5-Metil citosina
5-hmC	5 Hidroxi-metilcitosina

DINÂMICA DA METILAÇÃO DO DNA EM EMBRIÕES DE COELHO NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO

Adriana Rodrigues Reis e Silva¹ e Carolina Madeira Lucci²

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Brasília/DF. adriana.reis@agricultura.gov.br. ²Doutora em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasília/DF. cmlucci@unb.br.

RESUMO

A metilação do DNA nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário tem sido considerada importante para a reprogramação diferenciada dos genomas parentais, para a ativação transcricional do genoma embrionário (AGE) e o completo desenvolvimento. No entanto, a dinâmica da metilação do DNA (DM-DNA) parece diferir entre espécies e pode ser alterada pelo ambiente *in vitro*. Neste sentido, o coelho aparece como um modelo pertinente para a análise dos eventos epigenéticos envolvidos na regulação da AGE, apresentando uma AGE tardia como a maioria dos mamíferos. Além disso, nestes animais, embriões desenvolvidos tanto *in vivo* como *in vitro* são de fácil obtenção, o que é de grande interesse. No entanto, a variação da metilação do DNA nunca foi quantificada durante o desenvolvimento pré-implantação de embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* e a desmetilação do pró-núcleo paterno é ainda controversa nestes animais. Este estudo relatou a dinâmica da reprogramação da metilação do DNA em embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) e cultivados *in vitro* (CIV) nos estágios de uma célula a blastocisto. Embriões cultivados *in vitro* foram coletados após a fecundação *in vivo* e cultivados em meio B2. Os embriões foram imunomarcados com anticorpos anti 5-metilcitosina e o DNA marcado com EthD-2. Em seguida foi realizada a quantificação da imunofluorescência. Os resultados mostraram que a DM-DNA foi diferente entre os pró-núcleos materno e paterno de zigotos DIV. O pró-núcleo materno apresentou um nível constante de metilação durante o estágio de uma célula, resultando em uma metilação de manutenção durante a replicação do DNA. Por outro lado, no pró-núcleo paterno uma desmetilação parcial ocorreu antes da replicação, provavelmente por uma desmetilação ativa do DNA, enquanto uma metilação de manutenção ocorreu durante a fase S. Além disso, uma desmetilação ocorreu durante as clivagens celulares em embriões DIV e CIV. Mas, a DM-DNA foi diferente entre os grupos de DIV e CIV. Este estudo forneceu a primeira descrição detalhada da DM-DNA em embriões de coelhos e em conjunto, a extensão destes resultados *in vivo* abre caminho para uma análise das consequências de diferentes condições de cultivo *in vitro* na metilação do DNA.

Palavras-chave: zigotos de coelhos, desmetilação do DNA, metilação de manutenção, pró-núcleos, cultivo *in vitro*.

DYNAMICS OF DNA-METHYLATION IN RABBIT EMBRYOS DURING PREIMPLANTATION

ABSTRACT

DNA methylation in the early embryo has been considered important for differential parental genome reprogramming, embryonic genome transcriptional activation (EGA) and further development. However, DNA methylation dynamics (DNA-MD) seems to differ among species and may be altered by the *in vitro* culture environment. The rabbit thus appears to be a pertinent model for analyses of the epigenetic events involved in EGA regulation due to its delayed EGA as in most mammals. Moreover, in these animals, both *in vivo* and *in vitro* developed embryos are easy to obtain. However, the variation of DNA methylation was never quantified during the preimplantation development of *in vivo*-developed rabbit embryos and paternal pronucleus demethylation is still controversial in these animals. This study reported DNA-MD in *in vivo*-developed (IVD) and *in vitro* cultured (IVC) rabbit embryos from one cell to the blastocyst stage. IVC embryos were collected after *in vivo* fertilization and cultured in B2 medium. Immunostaining for 5-methyl cytosine and DNA labeling by EthD2 were performed and the embryos were analyzed by fluorescence quantification. The results showed that DNA-MD differed between the maternal and paternal pronuclei in IVD zygotes. The maternal pronucleus displayed a constant DNA methylation level over the one cell stage, resulting in a maintenance methylation throughout DNA replication. On the other hand, in the paternal pronucleus, partial demethylation occurred before replication, probably by active DNA demethylation, while a maintenance methylation took place over the S-phase. Moreover, a demethylation took place during cell cleavages in IVD and IVC rabbit embryos. Nonetheless, DNA-MD differed between the IVD and IVC groups. This study provided the first detailed description of DNA-MD in rabbit embryos and taken together, the extent of these *in vivo* results paves the way to the analysis of the consequences of different *in vitro* culture conditions in DNA methylation.

Keywords: rabbit zygote, DNA demethylation, maintenance methylation, pronuclei, *in vitro* culture.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A metilação do DNA desempenha papel fundamental na regulação da expressão de genes *imprinting* (Li et al., 1993; Shemer et al., 1996), na inativação do cromossomo X e no controle de elementos repetitivos (Yoder et al., 1997; revisto por Morgan et al., 2005). O perfil de metilação do DNA nas células somáticas é mantido pela atividade exercida pela DNA-metiltransferase (DNMT)1 (Sen et al., 2010), mas dois ciclos de reprogramação da metilação do DNA ocorrem durante o desenvolvimento dos mamíferos. Eles envolvem um processo dinâmico, com uma desmetilação do DNA seguida de uma metilação *de novo* pela ação da DNMT3. Um ciclo ocorre durante o desenvolvimento das células germinativas e o outro durante a pré-implantação embrionária, quando o genoma embrionário recém-formado é reprogramado para sustentar o desenvolvimento a termo (revisto por Reik & Walter, 2001; Santos et al., 2002).

Nesses estágios iniciais de desenvolvimento, extensas modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, regulam a ativação transcricional do genoma embrionário (AGE) e a reprogramação do padrão de expressão gênica (revisto por Morgan et al., 2005). A metilação do DNA tem sido considerada essencial para o desenvolvimento embrionário inicial (Li et al., 1992; Tate et al., 1996) e a sua reprogramação descrita como necessária para o estabelecimento de um estado de totipotência, por apagar marcas de DNA metilado em reguladores de pluripotência (Farthing et al., 2008).

A dinâmica da metilação do DNA (DM-DNA), durante a pré-implantação, foi primeiramente evidenciada em embriões de camundongos, sendo caracterizada por uma desmetilação ativa do pró-núcleo paterno (PP), seguida de uma desmetilação passiva durante as sucessivas divisões celulares (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002). Mas, esta dinâmica não parece ser conservada entre as espécies e por isso sua significância funcional tem sido questionada (Beaujean et al., 2004a), sendo observadas diferenças principalmente no processo de desmetilação do PP, bem como na perda de metilação do

DNA durante o desenvolvimento embrionário (Dean et al., 2001, Beaujean et al., 2004b; Shi et al., 2004).

1.1 Problemática e relevância

Alterações dos níveis de metilação do DNA em embriões foram atribuídas ao cultivo *in vitro* (Zaitseva et al., 2007; Deshmukh et al., 2011), e estas alterações podem estar relacionadas a modificações da expressão gênica (Morgan et al., 2008). Neste sentido é necessário primeiro conhecer a dinâmica deste processo em embriões desenvolvidos *in vivo* (DIV) e então compará-los a embriões provenientes de cultivo *in vitro*.

O coelho aparece como um modelo pertinente para a análise dos eventos epigenéticos envolvidos na regulação AGE por apresentar um perfil de AGE semelhante à maioria dos grandes mamíferos. Além disso, tanto embriões desenvolvidos *in vivo* como *in vitro* são de fácil obtenção. No entanto, a DM-DNA nunca foi analisada durante o desenvolvimento pré-implantação em embriões de coelhos DIV e a desmetilação do PP é ainda controversa (Beaujean et al., 2004a; Shi et al., 2004; Park et al., 2007; Lepikhov et al., 2008), tornando-se também objeto importante de análise.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho visa a contribuir para o conhecimento de modificações epigenéticas que ocorrem durante a pré-implantação embrionária e os possíveis efeitos do cultivo *in vitro* nestas modificações, por meio do estudo da dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) ou cultivados *in vitro* (CIV).

1.2.2. Objetivos específicos

- Analisar e descrever a dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos genomas materno e paterno durante o primeiro ciclo celular em zigotos DIV e CIV.
- Avaliar a dinâmica da metilação do DNA durante a pré-implantação de embriões de coelhos DIV e CIV.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pré-implantação embrionária e ativação transcricional do genoma

O desenvolvimento pré-implantação compreende a formação do zigoto ao início da diferenciação celular e caracteriza-se por uma série de eventos, tais como: a formação e a divisão embrionária, a ativação transcricional do genoma embrionário (AGE), a compactação, as diferenciações celulares e a formação da blastocele, que vai definir o estágio de blastocisto. Neste estágio são observados dois grupos celulares, a massa celular interna (MCI) e o trofotoderma (TF). Em coelhos, 24 horas *post-coitum* (hpc) os embriões estão presentes no oviduto (Bourdage & Halbert, 1988) e em sua maioria estão completando o primeiro ciclo celular. Em seguida, continuam as divisões celulares até atingirem os estágios de 4 células às 32 hpc, 8 células às 39 hpc, 16 células às 55 hpc, mórula às 67 hpc e de blastocistos às 91 hpc (Figura 1.1). Concomitantemente ao seu desenvolvimento, os embriões migram pelo oviduto, onde adquirem um envoltório de mucina (Morgan & Kane, 1993; revisto por Salvetti, 2008).

O desenvolvimento embrionário é assegurado pelas proteínas e transcritos maternos presentes no ovócito, pois o novo genoma é transcricionalmente inativo (Minami et al., 2007). A transição materno-embrionária caracteriza-se pela tradução de transcritos maternos, que é requisitada para a síntese de transcritos embrionários, e os produtos da transcrição embrionária controlam a degradação de moléculas maternas (revisto por Memili & First, 2000).

A AGE é progressiva, com ativação diferencial de grupos de genes de acordo com suas funções biológicas (Ko et al., 2000), podendo ser observada uma fase onde apenas alguns transcritos de origem embrionária são expressos, chamada de ativação menor, e uma segunda fase onde o nível de transcrição é mais intenso, chamada de ativação maior. A AGE é variável de acordo com a espécie animal. A fase de ativação menor inicia no estágio de zigoto em bovinos (Memili & First, 1998), camundongos (Schultz, 1993) e coelhos (Christians et al., 1994). A ativação maior apresenta-se em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário, sendo em camundongos após uma única divisão celular (Schultz, 1993) e de 8 a 16 células em coelhos (Manes, 1973),

bovinos (Telford et al., 1990) e caprinos (Crosby et al., 1988). Esses eventos são regulados por um programa de expressão gênica estabelecido por modificações epigenéticas (revisado por Reik, 2007).

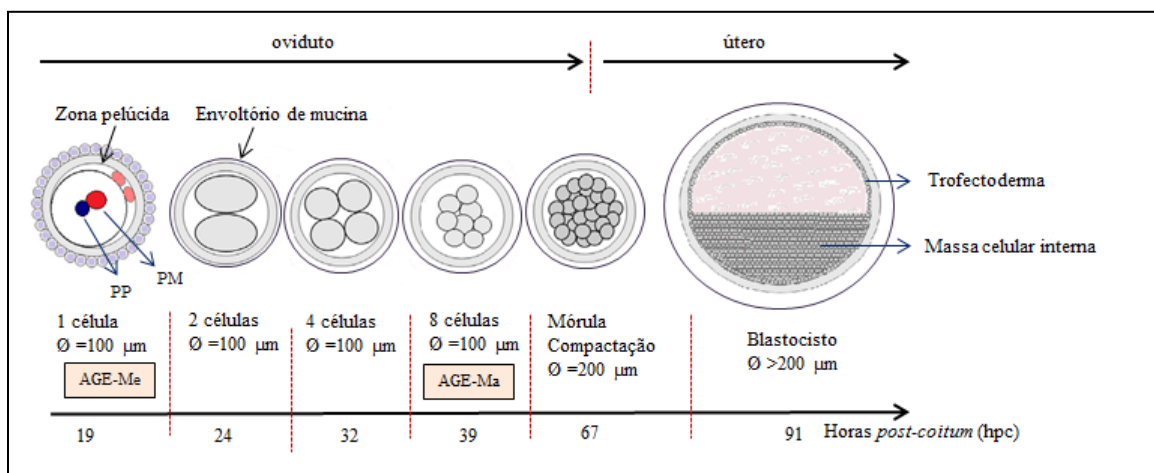


Figura 1.1: Representação do desenvolvimento embrionário em coelhos. PP: Pró-núcleo paterno, PM: Pró-núcleo materno. AGE-Me e Ma: Ativação transcricional do genoma embrionário menor e maior (Adaptado de Salvetti, 2008).

2.2 Modificações epigenéticas na regulação da expressão gênica durante a pré-implantação embrionária

A epigenética estuda o conjunto de modificações transmissíveis e reversíveis que controlam a expressão gênica e que não estão relacionadas à sequência primária do DNA (revisado por Probst et al., 2009). Estas modificações incluem a metilação do DNA e modificações de histonas, como a acetilação, a metilação, a fosforilação e ubiquitinação e outras, e podem alterar a estrutura da cromatina, aumentando ou diminuindo o acesso ao DNA e influenciando na expressão gênica (revisado por Kanka, 2003; revisado por Kouzarides, 2007). Este conjunto de modificações das histonas é chamado de “código de histonas” (revisado por Jenuwein & Allis, 2001). Adicionalmente, evidências demonstram o papel de RNAs não codantes na regulação epigenética da expressão gênica (Svoboda et al., 2004).

A cromatina tem como unidade básica o nucleossomo, caracterizado por 147 pares de bases da fita de DNA envoltos em um octâmero contendo moléculas de histonas (H2A, H2B, H3 e H4). As extremidades N-terminais das histonas H3, H4, H2A,

H2B se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer modificações pós-traducionais alterando a estrutura da cromatina. A acetilação de resíduos de lisina de regiões N-terminais de histonas favorece uma estrutura menos compacta para a cromatina e aumenta o acesso ao DNA. A acetilação é catalisada pelas Histonas Acetiltransferases (HAT) e a desacetilação pelas Histonas Desacetilases (HDAC). Na metilação de histonas as lisinas podem favorecer de forma diferente a transcrição gênica. Certas modificações são encontradas no nível de região eucromática, que são áreas do DNA menos compactadas (H3K4me, H3K36me, H3K79me) e outras no nível de região heterocromática, que se refere às áreas mais compactadas (H3K9me, H3K27me, H4K20me). A metilação é catalizada pelas Histonas Metiltransferases (HTM) (revisto por Kouzarides, 2007). Em camundongos, a H3K9me tem sido implicada no silenciamento de elementos repetitivos (Martens et al., 2005).

Acredita-se que a metilação do DNA e as modificações das histonas sejam processos interligados, sendo propostos três modelos para esta interdependência. No primeiro modelo, os padrões de metilação do DNA são estabelecidos por meio de uma metilação *de novo* pelas DNMT3a e DNMT3b e são mantidos pela DNMT1. Em seguida, são recrutadas proteínas, que têm um domínio de ligação ao DNA metilado (methyl CpG binding Protein ou MBD) e HDAC, induzindo a desacetilação e o silenciamento gênico. A cromatina então atrai HTM, as quais metilam a lisina 9 da histona 3 (H3K9) e estabiliza a cromatina em um estado inativo (revisto por Bird, 2002). No segundo modelo, H3K9 metilada age como um sinal para inativar a cromatina pelo recrutamento da heterocromatina proteína 1 (HP1) (revisto por Hiragami & Festenstein, 2005) para histonas metiladas, as quais poderiam recrutar DNMTs, metilando o DNA. No terceiro modelo, proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP e da atividade de DNA helicase podem facilitar a metilação do DNA e a modificação de histonas por aumentarem o acesso ao nucleossomo de DNMTs, HDACs e HTMs (Revisto por Li, 2002).

Em blastocistos de camundongos, proteínas TET1 foram requeridas para a especificação de células da MCI, sendo mais concentradas neste tipo celular que nas células do TF (Ito et al., 2010). Estas proteínas catalisam a conversão da 5-metil-citosina (5-mC) em 5-hidroxi-metilcitosina (5-hmC) mediante um mecanismo de oxidação

(Tahiliani et al., 2009). As consequências da 5-hmC no DNA genômico não são conhecidas. De acordo com a hipótese proposta por Wu & Zhang (2010), em artigo de revisão, como a 5-hmC parece ser estável, ela poderia funcionar como uma outra modificação por alterar a estrutura da cromatina local ou contribuir na exclusão de fatores que influenciam a transcrição. Pois, repressores da transcrição MBD1, MBD2, MBD4, que se ligam ao DNA metilado, não reconhecem a 5-hmC (Valinluck et al., 2004; Jin et al., 2010). A presença da 5-hmC foi observada em zigotos de camundongos, coelhos e bovinos (Wossidlo et al., 2011), mostrando que a oxidação da 5-mC pode fazer parte do ciclo de vida inicial (Iqbal et al., 2011).

Logo após a fecundação, as protaminas vão ser substituídas por histonas presentes no citoplasma do ovócito (Mclay & Clarke, 1997) e estas histonas serão incorporadas sob a forma acetilada no pró-núcleo paterno (Adenot et al., 1997). Além disso, os genomas parentais vão sofrer modificações epigenéticas, as quais modulam o estado transcricional da cromatina (revisto por Morgan et al., 2005, Figura 1.2). Estas modificações, assim como a metilação do DNA, a qual tem seus níveis globais diminuídos progressivamente durante o desenvolvimento, continuam nas células embrionárias na pré-implantação (Santos et al., 2002; 2005; Jeong et al., 2007a), influenciando a transcrição gênica (revisto por Kanka, 2003; Farthing et al., 2008).

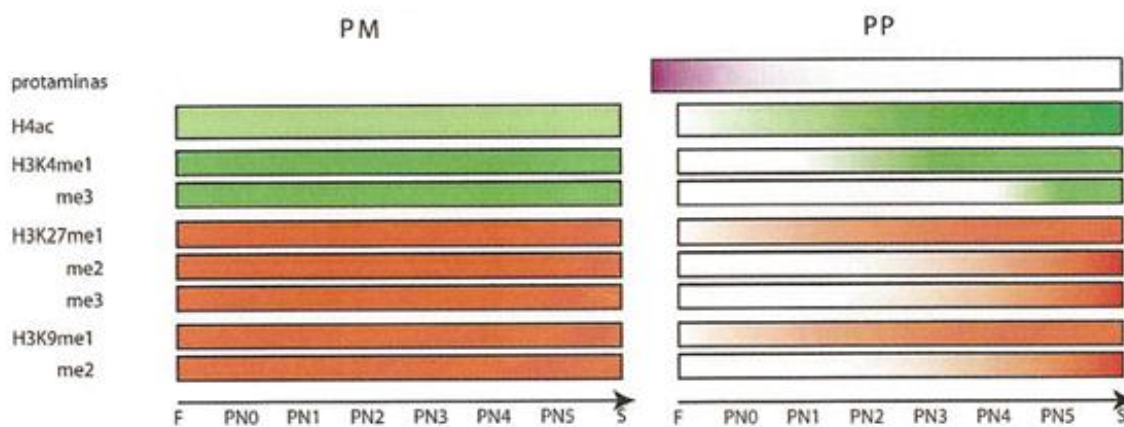


Figura 1.2: Algumas alterações epigenéticas durante a formação dos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP). As modificações que conferem um estado permissivo à transcrição estão representadas em verde e aquelas que conferem um estado repressivo em vermelho. ac: acetil, H4: histona H4, H3: histona H3, K: lisina, me: metil, F: fecundação, S: singamia (Adaptado de Morgan et al., 2005).

2.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação química covalente correspondente à junção de um grupamento metil no quinto carbono do núcleo pirimídico de citosina que precedem as guaninas (dinucleotídeos CpG - citosina e guanina separadas por um fosfato) (Gruenbaum et al., 1981). O padrão de metilação do DNA e a distribuição de 5-metilcitosina (5-mC) no genoma varia em diferentes tecidos (Ehrlich et al., 1982) e em diferentes estágios funcionais de uma mesma célula, e também durante o desenvolvimento embrionário pré-implantação (Santos et al., 2002). A presença de 5-mC geralmente favorece uma repressão transcricional, silenciamento gênico, por prevenir a ligação de fatores de transcrição e por promover o recrutamento de proteínas repressoras e formação da cromatina inativa (Razin, 1998; Bird, 2002; Miranda & Jones, 2007), a qual foi relacionada a um DNA hipermetilado (Razin & Cedar, 1977). Os dinucleotídeos CpG encontram-se principalmente em regiões do DNA altamente repetitivo e heterocromatina (Fazzari & Grealley, 2004), o que poderia ser considerado como uma “proteção ao genoma” por controlar a dispersão de transposons (Yoder et al., 1997) ou por silenciar a transcrição de genes que não precisam ser expressos em uma determinada célula (Bird, 1995).

O processo de metilação é catalisado por um grupo de enzimas denominadas DNA-metiltransferases (DNMT). As DNMT transferem um grupamento metil, fornecido pela S-adenosilmetionina (SAM), para o carbono 5 do anel da citosina. Existem dois mecanismos diferentes de metilação na célula: a metilação *de novo* e a metilação de manutenção. A metilação *de novo* ocorre quando citosinas anteriormente não metiladas tornam-se metiladas. Este processo é catalisado pelas enzimas DNMT3a e DNMT3b, as quais utilizam DNA não metilado como substrato (Okano et al., 1999). Na metilação de manutenção, que tem como principal enzima a DNMT1, são realizadas cópias dos padrões de metilação do DNA, à partir de DNA hemi-metilado, durante a divisão celular (Revisto por Bestor, 2000). Quando a metilação de manutenção é ausente, devido à inibição, depleção ou exclusão nuclear de DNMT1 ocorre uma desmetilação passiva. Por outro lado, uma desmetilação ativa pode ocorrer quando há uma perda da metilação por via enzimática (revisto por Niehrs, 2009).

A deficiência de DNMT1 foi relacionada a um aumento da expressão embrionária de *Intracisternal A Particle* - IAP (Walsh et al., 1998). Além disso, a expressão de genes *imprinting* foi analisada em camundongos mutantes que tinham deficiência na atividade de DNMT e observou-se que a expressão desses genes foi afetada em embriões mutantes: o alelo paterno do gene H19 foi ativado, enquanto o alelo materno, normalmente ativo do gene IGF2, foi reprimido (Li et al., 1993).

2.3.1 Dinâmica da metilação do DNA

O desenvolvimento dos mamíferos é caracterizado por duas fases de reprogramação da metilação do DNA, uma durante o desenvolvimento das células germinativas primordiais (CGP) e outra durante a pré-implantação (revisto por Reik & Walter, 2001; revisto por REIK et al., 2001; Hyldig et al., 2011). A reprogramação que ocorre durante o desenvolvimento CGP coincide com o estabelecimento de marcas parentais específicas, que incluem a metilação do DNA em regiões diferencialmente metiladas associadas à expressão de genes alelo-específicos (Tucker et al., 1996).

Em camundongos, o espermatozóide e o ovócito estão altamente metilados no momento da fecundação, quando uma fase de reprogramação se inicia. Neste momento, uma perda assimétrica da metilação é observada nos genomas parentais, ocorrendo uma desmetilação ativa no PP, independente da replicação do DNA. Enquanto o pró-núcleo materno (PM) parece estar protegido de uma desmetilação (Mayer et al., 2000). Em seguida, com as sucessivas divisões celulares observa-se uma desmetilação progressiva (Santos et al., 2002), dependente da replicação e denominada passiva (Rougier et al., 1998), a qual é considerada resultado da ausência da DNMT1 durante a replicação (revisto por Bestor, 2000). Após este período tem-se uma metilação *de novo*, que coincide com os eventos de diferenciação celular. O estabelecimento de duas linhagens celulares resulta em outra assimetria, quando a MCI se torna mais metilada que o TF (Santos et al., 2002, Figura 1.3). Entre a pré e a pós-implantação a expressão da DNMT3b diminui gradualmente nos tecidos extra-embriônicos, originários do TF, e aumenta nas células derivadas da MCI (Hirasawa & Sasaki, 2009).

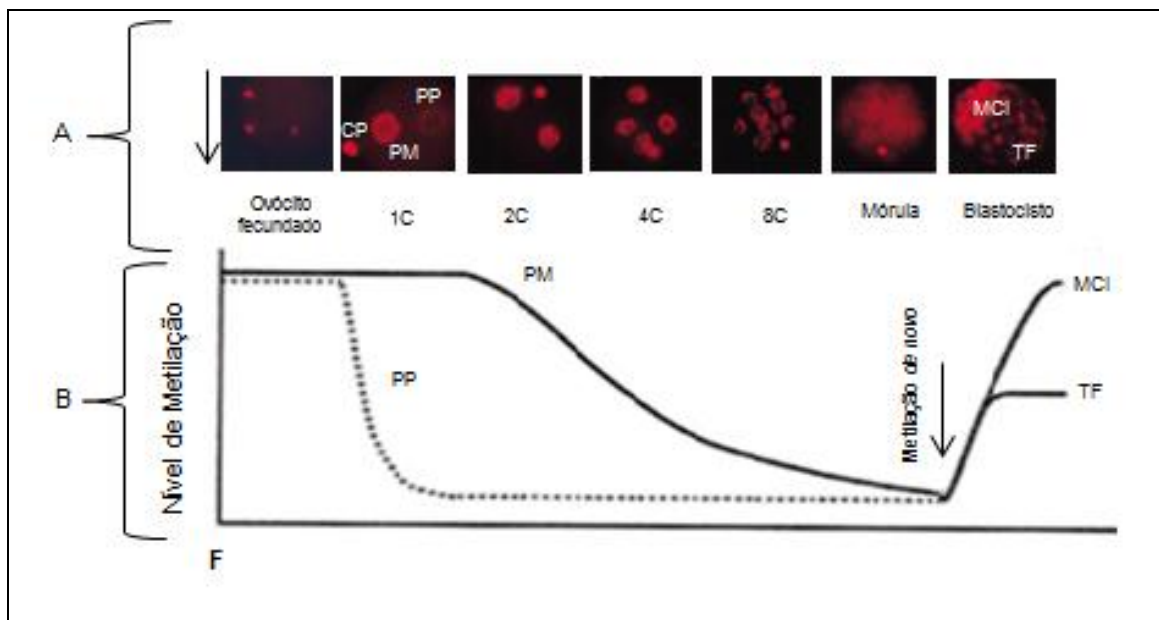


Figura 1.3: Dinâmica da metilação do DNA em embriões de camundongos durante a pré-implantação. Distribuição da marcação com anticorpos anti-5-mC (A) e da metilação do DNA (B). CP: corpúsculo polar, F: fecundação, PP: pró-núcleo paterno, PM: pró-núcleo materno, MCI: massa celular interna, TF: trofectoderma (Adaptado de Santos et al., 2002).

2.3.2 Desmetilação ativa do pró-núcleo paterno e “proteção” do genoma materno

A significância da desmetilação ativa do pró-núcleo paterno (PP) não está clara, mas poderia ser requerida para permitir uma pequena “explosão” transcricional que ocorre no final do primeiro ciclo celular com alelos paternos expressos antes dos maternos (Aoki et al., 1997) ou estar implicada na mediação do “conflito” entre os genomas parentais pela expressão de genes *imprinting*. Neste “conflito” tanto o macho quanto a fêmea têm interesse em obter o número máximo de descendentes, assegurando a transmissão de sua herança genética. Dessa forma, o macho teria o interesse de exercer o controle sobre genes para maximizar o crescimento e sobrevivência da prole, utilizando o máximo dos recursos maternos. Enquanto a fêmea moderaria o crescimento dos indivíduos em benefício não só da ninhada, mas também de futuras gestações (Moore & Haig, 1991). Essa mediação poderia ser possível através da metilação e desmetilação seletiva de genes reguladores, por exemplo genes paternos expressos (alelo materno

silenciado) como o IGF2, promovem crescimento fetal, enquanto genes maternos expressos (alelo paterno silenciado) como o IGF2R, tendem a restringir o crescimento fetal (Tycko & Morison, 2002).

A rápida perda de metilação no DNA paterno tem sido associada à mecanismos de reparo de DNA. Em camundongos, uma desmetilação ativa, independente da replicação, foi observada no PP e foi associada à presença de um “marcador” de reparo de DNA, o PARP-1 (Wossidlo et al., 2010). No PM, a “proteção” contra a desmetilação poderia estar relacionada a um processo ativo, pois zigotos que não tinham o fator materno STELLA não desenvolveram ao estágio de blastocisto e apresentaram desmetilação do DNA em ambos os pró-núcleos (Nakamura et al., 2007). Além disso, o padrão assimétrico de modificação de histonas que tem sido observado entre PP e o PM (revisto por Morgan et al., 2005) poderia também contribuir para as diferenças observadas neste processo de desmetilação. Em camundongos, o uso de anticorpos anti-H3K9me2 (Reik et al., 2003) e anti-H3K9me3 (Santos et al., 2005) demonstrou que PP foi negativo para esta modificação, enquanto o PM foi positivo. Em zigotos bovinos (Park et al., 2007) e suínos (Jeong et al., 2007b) um padrão paterno de H3K9me3 foi gradualmente sendo estabelecido com o desenvolvimento pró-nuclear.

A desmetilação do PP tem sido observada em camundongos (Mayer et al., 2000), mas parece estar ausente em ovinos (Beaujean et al., 2004a). Quando espermatozoides ovinos foram injetados em ovócitos de camundongos foi observada a desmetilação do genoma paterno, sugerindo que os fatores de desmetilação são fornecidos pelo ovócito. No entanto, ovócitos ovinos injetados com espermatozoide de camundongos também resultaram em desmetilação do PP (Beaujean et al., 2004c), o que pode conduzir a pensar que fatores presentes no espermatozoide ou características exclusivas do genoma paternal favorecem a desmetilação ou talvez sejam fatores espécie-específicos.

2.3.3 Dinâmica da metilação do DNA entre espécies de mamíferos

Uma análise dos estudos sobre o perfil de metilação do DNA embrionário realizados em diversas espécies permite verificar algumas diferenças nos processos de desmetilação ativa e passiva entre as espécies e em uma mesma espécie.

Em camundongos (Oswald et al., 2000; Santos et al., 2002) algumas horas após a fecundação, uma desmetilação completa do DNA ocorre no PP em função do estágio de maturação pró-nuclear (Santos et al., 2002). E a partir do estágio de duas células, em camundongos, o nível de metilação do DNA diminui com as clivagens celulares até o estágio de mórula, provavelmente devido à ausência de DNMT1 (Monk et al., 1991), e uma metilação *de novo* ocorre no estágio de blastocisto, de uma forma diferencial entre a MCI e o TF, que permanece menos metilado (Santos et al., 2002). Em zigotos de ratos (Zaitseva et al., 2007; Yoshizawa et al., 2009) e de caprinos (Park et al., 2007) foi observada uma desmetilação parcial do PP. Em zigotos bovinos produzidos *in vitro*, de uma forma diferente, durante o primeiro ciclo celular foi observada uma desmetilação parcial do DNA no PP seguida de uma metilação *de novo* (Park et al., 2007). Nesses animais, a desmetilação passiva se produziu até o estágio de oito células e uma metilação *de novo* foi relatada a partir de 16 células. Além disso, a MCI apresentou-se mais metilada que o TF (Dean et al., 2001). Por outro lado, em embriões ovinos desenvolvidos *in vivo* (Beaujean et al., 2004b; Young & Beaujean, 2004) e suínos (Jeong et al., 2007a; Park et al., 2007; Deshmukh et al., 2011) não foi relatada a desmetilação do PP. Embora, uma desmetilação passiva tenha sido descrita entre os estágios de 2 a 8 células em ovinos (Beaujean et al., 2004b) e suínos (Deshmukh et al., 2011).

Em coelhos, a desmetilação do genoma paterno ainda é controversa, sendo descrita como ausente em alguns estudos (zigotos DIV- 19 hpc, Beaujean et al., 2004a; 24 hpc - Shi et al., 2004), mas como presente em outros (zigotos CIV, 18 hpc, Park et al., 2007; zigotos DIV, 20-22hpc, Lepikhov et al., 2008). Nesses animais, a desmetilação passiva do DNA não foi observada entre 2 e 16 células e a MCI foi considerada menos metilada que o TF (Shi et al., 2004).

As divergências na dinâmica da metilação entre espécies poderiam ser devidas a uma natureza não conservativa da DM-DNA (Beaujean et al., 2004a) ou à uma

reação adaptativa às mudanças ambientais (Arányi & Pádi, 2006), bem como ao sistema de produção de embriões, o qual poderia influenciar na DM-DNA (Hou et al., 2007). Em uma mesma espécie, os resultados contraditórios podem estar relacionados, no estágio de uma célula, a períodos restritos de observação, pois como a metilação do DNA é um processo dinâmico, não estaria sendo analisada uma possível variação dos níveis de metilação. Além disso, estas contradições poderiam estar associadas às diferenças entre sistemas de produção de embriões, *in vivo* ou *in vitro*.

2.4 Efeitos do cultivo *in vitro* na metilação do DNA durante a pré-implantação

Nas tecnologias de reprodução assistida (TRA), como a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a clonagem, os embriões são mantidos durante um período da pré-implantação em cultivo *in vitro*. Neste processo são submetidos a condições artificiais que podem induzir a alterações epigenéticas aberrantes, como especialmente descrito para DM-DNA (Dean et al., 2001). Em ratos, um alto nível de metilação do DNA foi observado em zigotos desenvolvidos *in vitro* em relação aos cultivados *in vivo* (Zaitesava et al., 2007). Somando-se a isto, em zigotos de ratos a dinâmica de desmetilação do genoma paterno foi alterada pela produção *in vitro* (Yoshizawa et al., 2010). Em suínos, os níveis de metilação do DNA apresentaram-se aumentados em embriões produzidos *in vitro* em comparação aos desenvolvidos *in vivo* (Deshmukh et al., 2011).

Em camundongos, diversos estudos têm relatado desregulações epigenéticas de genes *imprinting* no estado pré (Doherty et al., 2000) ou pós (Khosla et al., 2001; Mann et al., 2004) implantação, quando o desenvolvimento foi realizado *in vitro*. Um padrão *imprinting* alterado do gene H19 com perda de metilação da região diferencialmente metilada sobre o alelo paterno foi observado em embriões fecundados *in vivo* e cultivados *in vitro* no meio de Whitten's do estágio de zigoto ao blastocisto (Doherty et al., 2000).

Um estudo desenvolvido para analisar as alterações da expressão gênica induzidas pelo cultivo *in vitro* em embriões de coelhos, no desenvolvimento pré-implantação, ressaltou modificações na expressão de diversos genes. Dentre eles, a superexpressão de elementos transponíveis, como sequências do tipo retrotransposon

com Longas Repetições Terminais. Entretanto, a adição de soro fetal bovino (SFB) ao meio B2 pareceu minimizar sua superexpressão. Neste estudo, também foi observada uma subexpressão do gene MAT2A (Duranthon, V., 2010, dados não publicados). Este gene codifica a enzima Metionina Adenosil Transferase 2, que catalisa a conversão da metionina em S-Adenosil metionina (SAM), principal fornecedor de grupamentos metil implicados nas reações de metilação do DNA (Lu & Mato, 2008). A subexpressão de MAT2A teria como consequência a diminuição da biodisponibilidade de SAM, influenciando o grau de metilação do DNA no momento da ativação transcricional do genoma. Dessa forma podendo gerar alterações na expressão gênica e modificações epigenéticas, cujos efeitos seriam mais tardios.

Em ovinos, fibroblastos fetais cultivados em ausência de SFB usados em procedimento de transferência nuclear de célula somática apresentaram um nível de metilação do DNA 27% menor que aqueles cultivados em presença de SFB (Beaujean et al., 2004b). Em camundongos, o cultivo de embriões pré-implantação em presença de SFB alterou a metilação do DNA e influenciou na expressão de genes *imprinting* (Khosla et al., 2001). Embriões bovinos cultivados com altas concentrações de homocisteína no meio de cultivo apresentaram DNA genômico hipermetilado, bem como retardo no desenvolvimento (Ikeda et al., 2010).

Em bovinos, a “Síndrome do Bezerro Grande”, caracterizada pelo tamanho anormal dos animais ao nascimento e anormalidades placentárias, é descrita em animais oriundos de manipulações tais como, PIV e clonagem (Young et al., 1998). Essas disfunções fisiológicas têm sido relacionadas a perturbações epigenéticas induzidas pelas primeiras etapas de desenvolvimento *in vitro* (Sinclair et al., 2000; Wrenzycki et al., 2005) e em especial a mudanças no padrão de metilação do DNA (Niemann et al., 2002).

Uma melhor compreensão da DM-DNA durante o desenvolvimento embrionário inicial poderia aumentar o conhecimento de modificações epigenéticas neste período e otimizar as condições de cultivo *in vitro*, bem como os protocolos para transferência nuclear (revisto por Niemann et al., 2008).

2.5 Métodos de estudos para análise de metilação do DNA

Existem diversas metodologias para a análise da metilação do DNA. No entanto, a escolha do método depende das aplicações, da sensibilidade requisitada e do material biológico disponível. Alguns métodos se baseiam na metilação diferencial de algumas posições CpG como a associação de análise por digestão enzimática e *Southern Blot*, mas permitem uma análise de um número limitado de sítios (Moore, 2001). Além disso, existem também técnicas baseadas no sequenciamento após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio. O tratamento com bissulfito de sódio desamina citosinas, que não são metiladas, as quais se transformam em uracilas, sendo possível discriminar as citosinas que possuem um radical metil ligado ao carbono 5 das que não possuem. Assim, a informação epigenética é transformada em informação de tipo de polimorfismo de sequência, onde o sequenciamento possibilitará a direta determinação do *status* da metilação da sequência analisada (revisto por Hayatsu, 2008). Adicionalmente, pode ser utilizada a técnica de HRM (*High Resolution Melting*), a qual explora as diferenças no perfil de *melting* do *amplicon*, derivado de DNA modificado por bissulfito (Wojdacz & Dobrovic, 2007; Wojdacz et al., 2008).

Outros métodos analisam os níveis globais da metilação, detectando assim a quantidade de 5-mC. Mas, não podem dar informações sobre a localização da metilação. Entre estas técnicas tem-se a Cromatografia Líquida de Alta Performance (Dahl & Gulberg, 2003). Adicionalmente, há métodos que dão uma informação sobre o nível global de metilação no núcleo, como a utilização de imunofluorescência com anticorpos anti-5-mC, a qual favorece a análise quando se dispõe de um pequeno número de amostras (Santos & Dean, 2006). Esta técnica tem sido bastante utilizada para avaliar a metilação diferencial de genomas parentais, bem como entre diferentes estágios de desenvolvimento embrionário pré-implantação (Santos et al., 2002; Beaujean et al., 2004b).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENOT, P.G.; MERCIER, Y.; RENARD, J.P.; THOMPSON, E.M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. **Development**, v.124, n.22, p.4615-25, 1997.
- AOKI, F.; WORRAD, D.M.; SCHULTZ R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. **Dev Biol.**, v.181, n.2, p. 296-307, 1997.
- ARÁNYI, T.; PÁLDI, A. The constant variation: methylation changes during preimplantation development. **FEBS Letters**, v.580, p.6521-6526, 2006.
- BEAUJEAN, N.; HARTSHORNE, G.; CAVILLA, J.; TAYLOR, J.; GARDNER, J.; WILMUT, I.; MEEHAN, R.; YOUNG, L. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. **Curr Biol.**, v.14, p. R266-R267, 2004a.
- BEAUJEAN, N.; TAYLOR, J.; GARDNER, J.; WILMUT, I.; MEEHAN, R.; YOUNG, L. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod.**, v.71, n.1, p.185-93, 2004b.
- BEAUJEAN, N.; TAYLOR, J.E.; MCGARRY, M.; GARDNER, J.O.; WILMUT, I.; LOI, P.; PTAK, G.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; BIRD, A.; YOUNG, L.E.; MEEHAN, R.R. The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, n.20, p.7636-40, 2004c.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Gen.**, v.9, n.16, p. 2395-2402, 2000.
- BIRD, A. DNA methylation pattern and epigenetics memory. **Gens Dev.**, v.16, p. 6-21, 2002.
- BIRD, A.P. Gene number, noise reduction and biological complexity. **Trends Genet.**, v.11, p. 94, 1995.
- BOURDAGE, R.J.; HALBERT, S.A. Distribution of embryos and 500-micromM microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport. **Biol Reprod**, v. 38, p. 282-291, 1988.
- CHRISTIANS, E.; RAO, V. H.; RENARD, J. P. Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. **Dev Biol.**, v.164, p.160-172, 1994.
- CROSBY, I.; M.; GANDOLFI, F.; MOOR, R. M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. **J Reprod Fertil.**, v.82, p.769-775, 1988.

- DAHL, C.; GULBERG, P. DNA methylation analysis techniques. **Biogerontology**, v.4, p.233-250, 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. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.13734-13738, 2001.
- DESHMUKH, R.S.; OSTRUP, O.; OSTRUO, E.; VEJLSTED, M.; NIEMMANN, H.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v.6, n.2, p.1-11, 2011.
- DOHERTY, A.S.; MANN, M.R.W.; TREMBLAY, K.D.; BARTOLOMEI, M.S.; SCHULTZ, R.M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1526-1535, 2000.
- EHRlich, M.; GAMA-SOS, M.A.; HUANG, L.H.; MIDGETT, R.M.; KUO, K.C.; MCCUNE, R.A.; GEHRKE, C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. **Nucleic Acids Res.**, v.10, n.8, p.2709-21, 1982.
- FARTHING, C.R.; FICZ, G.; NG, R.K.; CHAN, C.F.; ANDREWS, S.; DEAN, W.; HEMBERGER, M.; REIK, W. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. **PLoS Genet.**, 4(6): e1000116, doi:10.1371/journal.pgen.1000116, 2008.
- FAZZARI, M.J.; GREALLY, J.M. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature Rev Gen.**, v.5, p.446-455, 2004.
- GRUENBAUM, Y.; STEIN, R.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. **FEBS Letters**, v.124, n.1, p.67-71, 1981.
- HAYATSU, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetics states, technique in the emerging environmental genotoxicology. **Mutation Recherche.**, 659, 77-82, 2008.
- HIRAGAMI, K.; FESTENSTEIN, R. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell. Moll. Life Sci.*, 62, 2711-2726, 2005.
- HIRASAWA, R.; SASAKI, H. Dynamic transition of Dnmt3b expression in mouse pre- and early post-implantation embryos. **Gene Expr Patterns.**, v.9, n.1, p.27-30, 2009.
- HOU, J.; LIU, L.; LEI, T.; CUI, X.; AN, X.; CHEN, Y. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. **Sci China C Life Sci.**, v.50, n.1, p.56-61, 2007.

- HYLDIG SM, OSTRUP O, VEJLSTED M, THOMSEN PD. Changes of DNA Methylation Level and Spatial Arrangement of Primordial Germ Cells in Embryonic Day 15 to Embryonic Day 28 Pig Embryos. **Biol Reprod.**, DOI:10.1095/biolreprod.110.086082, 2011
- IKEDA, S.; NAMEKAWA, T.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.**, v.313, n.3, p.129-36, 2010.
- IQBAL, K.; JIN, S.G.; PFEIFER, G.P.; SZABÓ, P.E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.108, n.9, p.3642-7, 2011.
- ITO, S.; D'ALESSIO, A.C.; TARANOVA, O.V.; HONG, K.; SOWERS, L.C.; ZHANG, Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v.466, n.7310, p.1129-33, 2010.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**. v.293, n.5532, p.1074-80, 2001.
- JEONG, Y.S.; YEO, S.; PARK, J.S.; KOO, D.B.; CHANG, W.K.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. DNA methylation state is preserved in the sperm-derived pronucleus of the pig zygote. **Int J Dev Biol.**, v.51, n. 8, p:707-14, 2007a.
- JEONG, Y.S.; YEO, S.; PARK, J.S.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Gradual development of a genome-wide H3-K9 trimethylation pattern in paternally derived pig pronucleus. **Dev Dyn**, v.236, p.1509-1516, 2007b.
- JIN, S.G.; KADAM, S.; PFEIFER, G.P. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. **Nucleic Acids Res.**, v.38, n.11, p.e125, 2010.
- KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.59, p.3-19, 2003.
- KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol. Reprod**, v.64, p.918- 926, 2001.
- KO, M. S.; KITCHEN, J. R.; WANG, X.; THREAT, T. A.; WANG, X.; HASEGAWA, A.; SUN, T.; GRAHOVAC, M. J.; KARGUL, G. J.; LIM, M. K.; CUI, Y.; SANO, Y.; TANAKA, T.; LIANG, Y.; MASON, S.; PAONESSA, P. D.; SAULS, A. D.; De PALMA, G.; SHARARA, R.; ROWE, L. B.; EPIGG, J.; MORRELL, C.; DOI, H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. **Development**, v.127, p.1737-1749, 2000.

- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, p.693-705, 2007.
- LEPIKHOV, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAO, R.; YANG, F.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; WOLF, E.; WALTER, J. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. **Epigenetics Chromatin**, 1:8, doi: 10.1186/1756-8935-1-8, 2008.
- LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, v. 3, p. 662-673, 2002.
- LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v.366, p.362-365, 1993.
- 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.
- LU, S. C.; MATO, J. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. **J. Gastroenterol Hepatol.**, v.23, Suppl.1, p.S73-S77, 2008.
- MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J. The ability to organize sperm DNA into functional chromatin is acquired during meiotic maturation in murine oocytes. **Dev Biol.**, v.186, n.1, p.73-84, 1997.
- MANES, C. The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. **Dev Biol.**, v.32, p. 453-459, 1973.
- MANN, M.R.; LEE, S.S.; DOHERTY, A.S.; VERONA, R.I.; NOLEN, L.D.; SCHULTZ, R.M.; BARTOLOMEI, M.S. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. **Development**, v.131, p.3727-3735, 2004.
- MARTENS, J.H.; O'SULLIVAN, R.J.; BRAUNSCHWEIG, U.; OPRAVIL, S.; RADOLF, M.; STEINLEIN, P.; JENUWEIN, T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. **The EMBO Journal**, v.24, p.800-812, 2005.
- MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v.403, p.501-502, 2000.
- MEMILI, E.; FIRST, N.L. Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. **Mol Reprod Dev.**, v.51, p.381-389, 1998.
- MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v.8, p.87-96, 2000.

- MINAMI, N.; SUZUKI, T.; TSUKAMOTO, S. Zygotic gene activation and maternal factor in mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.4, p. 707-715, 2007.
- MIRANDA, T.B.; JONES, P.A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **J. Cell. Physiol.**, v.213, p.384-390, 2007.
- MONK, M.; ADAMS, R.L.; RINALDI, A. Decrease in DNA methylase activity during preimplantation development in mouse. **Development**, v.112, p.189-192, 1991.
- MOORE, T. Southern analysis using methyl-sensitive restriction enzymes. **Methods Mol. Biol.**, v.181, p.193-203, 2001.
- MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics**, v.7, n.2, p.45-49, 1991.
- MORGAN, H.C.; JIN, X.L.; LI, A.; WHITELAW, E.; O'NEILL, C. The culture of zygotes to the blastocyst stage changes the postnatal expression of an epigenetically labile allele, Agouti Viable Yellow, in mice. **Biol. Reprod.**, v.79, P.618-623, 2008.
- MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet.**, v.14, n.1, p.R47-R58, 2005.
- MORGAN, P.M.; KANE, M.T. Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocyst. **J Reprod Fertil.**, v.97, n.1, p.101-6, 1993.
- NAKAMURA, T.; ARAI, Y.; UMEHARA, H.; MASUHARA, M.; KIMURA, T.; TANIGUCHI, H.; SEKIMOTO, T.; IKAWA, M.; YONEDA, Y.; OKABE, M.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; NAKANO, T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. **Nat Cell Biol.**, v.9, n.1, p.64-71, 2007.
- NIEHRS, C. Active DNA demethylation and DNA repair. **Differentiation**, v.77, p.1-11, 2009.
- NIEMANN, H.; TIAN, X.C.; KING, W.A.; LEE, R.S. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v.135, n.2, p.151-63, 2008.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro* - produced and nuclear transfer – derived embryos and their implications for early development. **Cloning and Stem Cells**, v.4, n.1, p.29-38, 2002.

- OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v.99, n.3, p.247-57, 1999.
- OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Curr Biol**, v.10, p.475-478, 2000.
- PARK, J.S.; JEONG, Y.S.; SHIN, S.T.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. **Dev Dyn**, v.236, p.2523-2533, 2007.
- PROBST, A.V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature**, v.10, n. 3, p.192-206, 2009.
- RAZIN, A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three way connection. **EMBO J.**, v.17, p.4905-4908, 1998.
- RAZIN, A.; CEDAR, H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, n.7, p.2725-2728, 1977.
- REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, p.425-432, 2007.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science Review**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.
- REIK, W.; SANTOS, F.; MITSUYA, K.; MORGAN, H.; DEAN, W. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v.358, n.1436, p.1403-9; 2003.
- REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nat Rev Genet.**, v.2, n.1, p.21-32, 2001.
- ROUGIER, N.; BOURCHIS, D.; GOMES, D.M.; NIVELEAU, A.; PLACHOT, M.; PÀLDI, A.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. **Genes Dev.**, v.12, n.14, p.2108-13, 1998.
- SALVETTI, P. **Production des embryons et cryopreservation des ovocytes chez la lapine: application à la gestion des ressources génétiques**. Lyon : L'Université Claude Bernard, 2008. 179p. Tese - L'Université Claude Bernard, 2008.
- SANTOS, F.; DEAN, W. Using immunofluorescence to observe methylation changes in mammalian preimplantation embryos. **Methods Mol Biol.**, v.325, p.129-37, 2006.
- SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol.**, v.241, p.172-182, 2002.

- SANTOS, F.; PETERS, A.H.; OTTE, A.P.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. **Dev Biol.**, v.280, n.1, p.225-36, 2005.
- SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **Bioessays**, v.15, p.531-538, 1993.
- SEN, G.L.; REUTER, J.A.; WEBSTER, D.E.; ZHU, L.; KHAVARI, P.A. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. **Nature**, v. 463, p.563-567, 2010.
- SHEMER, R.; BIRGER, Y.; DEAN, W.L.; REIK, W.; RIGGS, A.D.; RAZIN, A. Dynamic methylation adjustment and counting as part of imprinting mechanisms. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, n.13, p.6371-6, 1996.
- SHI, W.; DIRIM, F.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAAF, T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. **Biol Reprod.**, v.71, p.340-347, 2004.
- 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. **Hum Reprod.**, v.15, p.68-86, 2000.
- SVOBODA, P.; STEIN, P.; ANGER, M.; BERNSTEIN, E.; HANNON, G.J.; SCHULTZ, R.M. RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L e IAP in preimplantation mouse embryos. **Developmental Biology**, v.269, p.276-285, 2004.
- TAHILIANI, M.; KOH, K.P.; SHEN, Y.; PASTOR, W.A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L.M.; LIU, D.R.; ARAVIND. L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v.324, p.930-935, 2009.
- TATE, P.; SKARNES, W.; BIRD, A. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. **Nat Genet.**, v.12, n.2, p.205-8, 1996.
- TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev.**, v.26, p.90-100, 1990.
- TUCKER, K.L.; BEARD. C.; DAUSMANN, J.; JACKSON-GRUSBY, L.; LAIRD, P.W.; LEI, H.; LI, E.; JAENISCH, R. Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. **Genes Dev.**, v.10, n.8, p.1008-20, 1996.
- TYCKO, B.; MORISON, I. M. Physiological functions of imprinted genes. **J. Cell. Physiol.**, v.192, p.245-258, 2002.

- VALINLUCK, V.; TSAI, H.H.; ROGSTAD, D.K.; BURDZY, A.; BIRD, A.; SOWERS, L.C. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). **Nucleic Acids Res.**, v.32, n.14, p.4100-8, 2004.
- WALSH, C.P.; CHAILLET, J.R.; BESTOR, T.H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. **Nat. Genet.**, v.20, p.116-117, 1998.
- WOJDACZ, T.K.; DOBROVIC, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MSHRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. **Nucleic Acids Res.**, v.35, n.6, p.e41, 2007.
- WOJDACZ, T.K.; DOBROVIC, A.; ALGAR, E.M. Rapid detection of methylation change at *H19* in human *imprinting* disorders using methylation-sensitive highresolution melting. **Hum Mutat** ,v.29, n.10, p.1255-1260, 2008.
- WOSSIDLO, M.; ARAND, J.; SEBASTIANO, V.; LEPIKHOV, K.; BOIANI, M.; REINHARDT, R.; SCHÖLER, H.; WALTER, J. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. **EMBO J.**, v.29, n.11, p.1877-88, 2010.
- WOSSIDLO, M.; NAKAMURA, T.; LEPIKHOV, K.; MARQUES, C.J.; AKHARTCHENKO, V.; BOIANI, M.; ARAND, J.; NAKANO, T.; REIK, W.; WALTER, J. 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nat Commun.**, v.2, n.241, doi:10.1038/ncomms1240, 2011.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, K.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, n.2, p.23-35, 2005.
- WU, S.C. ; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.11, n.9, p.607-20, 2010.
- YODER, J.A.; WALSH, C.P.; BESTOR, T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet.**, v.13, p.335-340, 1997.
- YOUNG, L.E; BEAUJEAN, N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. **Anim Reprod Sci.**, v.82-83, p.61-78, 2004.
- YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, n.3, p.155-63, 1998.

YOSHIZAWA, Y.; KATO, M.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. Impaired active demethylation of the paternal genome in pronuclear-stage rat zygotes produced by in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Mol Reprod Dev.**, v.77, n.1, p.69-75, 2010.

ZAITSEVA, I.; ZAITSEV, S.; ALENINA, N.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. **Mol Reprod Dev.**, v.74, p.1255-1261, 2007.

CAPITULO 2

Dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos genomas materno e paterno de coelhos após a fecundação

Reis e Silva A.R.^{1,2}, Adenot P.¹, Daniel N.¹, Archilla C.¹, Peynot N.¹, Lucci, C.M.², Beaujean, N.¹, Duranthon V.¹

1. INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France.
2. Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brasil.

RESUMO

A metilação do DNA tem sido considerada importante para a ativação transcricional do genoma embrionário (AGE), a diferenciação e o desenvolvimento embrionário. No entanto, sua dinâmica parece diferir entre espécies e pode ser alterada pelo cultivo *in vitro*. Enquanto o coelho é um modelo pertinente para espécies com AGE tardia, porque tanto embriões desenvolvidos *in vivo* como *in vitro* são de fácil obtenção, a variação dos níveis de metilação é ainda controversa em ambos os genomas parentais. Para fornecer dados relativos à dinâmica dos níveis de metilação de DNA em zigotos de coelho, durante o primeiro ciclo celular, foram definidos cinco estágios pró-nucleares. Zigotos de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) e cultivados *in vitro* (CIV) foram classificados de acordo com estes estágios. Utilizando esta classificação, a metilação do DNA e o conteúdo de DNA total foram quantificados. A quantificação do DNA metilado normalizado pelo conteúdo total de DNA mostrou que os pró-núcleos parentais apresentaram dinâmicas de metilação do DNA distintas. No pró-núcleo materno, o nível de metilação foi constante durante o estágio de uma célula, devido a uma metilação de manutenção ao longo da fase-S. Em contrapartida, no pró-núcleo paterno uma desmetilação parcial ocorreu antes da replicação, provavelmente por uma desmetilação ativa do DNA, enquanto uma metilação de manutenção ocorreu durante a fase S. Este estudo mostrou ainda que a dinâmica da metilação do DNA do pró-núcleo paterno pode ser parcialmente alterada pelo ambiente *in vitro*. De um modo geral, esta abordagem

evidenciou que os coelhos estão entre as espécies com desmetilação parcial do pró-núcleo paterno, e mostrou pela primeira vez uma atividade de metilação de manutenção em ambos os pró-núcleos na fase S.

Palavras-chave: zigotos, desmetilação ativa, metilação de manutenção, pró-núcleos.

ABSTRACT

DNA methylation has been considered important for embryonic genome transcriptional activation (EGA), differentiation and embryo development. Its dynamics however seems to differ among species and may be altered by *in vitro* culture. While the rabbit is a pertinent model for species with a delayed EGA because both *in vivo* and *in vitro* developed embryos are easy to obtain, the variation of DNA methylation levels in both parental genomes after fertilization is still controversial. To provide data concerning the dynamics of DNA methylation levels in rabbit zygotes, five pronuclei stages were defined over the first cell cycle. *In vivo* developed (IVD) and *in vitro* cultured (IVC) rabbit zygotes were classified according to these stages. Using this classification, both methylated DNA and total DNA content were quantified over the one cell stage. Quantification of methylated DNA normalized for total DNA content showed that both pronuclei displayed distinct DNA methylation dynamics. In the maternal pronucleus, the methylation level is constant throughout the one cell stage, due to a maintenance methylation over the S-phase. Conversely, in the paternal pronucleus a partial demethylation occurs before replication, probably by active DNA demethylation, while a maintenance methylation takes place over the S-phase. This study showed that the DNA methylation dynamics of the paternal pronucleus is partially altered by the *in vitro* environment. Altogether, our approach evidenced that the rabbit is among species with a partial DNA demethylation in the paternal pronucleus, and showed for the first time a maintenance methylation activity in both pronuclei over the S phase.

Keywords: zygote, active demethylation, maintenance methylation, pronuclei.

1 INTRODUÇÃO

A metilação do DNA desempenha um papel fundamental na regulação da expressão gênica, como nos genes *imprinting* e retrotransposons endógenos (revisto por Morgan et al., 2005) e tem sido considerada essencial para o desenvolvimento inicial do embrião (Li et al., 1992; Tate et al., 1996).

Em camundongos, os genomas parentais sofrem uma modificação assimétrica nos seus níveis de metilação do DNA. Durante o primeiro ciclo celular, o genoma paterno passa por um processo de desmetilação ativa, independente da replicação (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002). Usando anticorpos anti-5-metilcitosina foi demonstrado que esta desmetilação é bastante extensa, pois algumas horas após a fecundação nenhuma marcação pode ser detectada no pró-núcleo paterno (PP) (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002; Beaujean et al., 2004; Park et al., 2007; Zaitseva et al., 2007). Por outro lado, a metilação do pró-núcleo materno (PM), embora frequentemente não analisada por si só, parece ser estável durante o estágio de uma célula e, em seguida, diminui progressivamente ao longo das primeiras clivagens de uma forma passiva, sendo replicação-dependente (Rougier et al., 1998; Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; Dean et al., 2001; Santos et al., 2002). O significado funcional da desmetilação do DNA no embrião inicial, e sobretudo do PP, foi primeiramente questionada quando análises em embriões de ovinos e de coelho forneceram a primeira evidência de que estes eventos poderiam não ser conservados entre espécies (Beaujean et al., 2004). A desmetilação do DNA no PP foi observada em bovinos (Park et al., 2007), caprinos (Park et al., 2007) e ratos (Zaitseva et al., 2007), mas não foi observada em suínos (Jeong et al., 2007; Park et al., 2010; Deshmukh et al., 2011), coelhos e ovinos (Beaujean et al., 2004).

O coelho aparece como um modelo pertinente para a análise dos eventos epigenéticos envolvidos na regulação da ativação transcricional do genoma embrionário (AGE), apresentando uma AGE tardia (Christians et al., 1994) como a maioria dos mamíferos (bovinos, Telford et al., 1990; caprinos, Crosby et al., 1988), exceto camundongos (Schults, 1993). Além disso, nestes animais, embriões desenvolvidos tanto *in vivo* como *in vitro* são de fácil obtenção, o que é de grande interesse, pois eventos epigenéticos e, especialmente, a metilação do DNA parecem ser sensíveis ao ambiente *in*

vitro (Zaitseva et al., 2007) e podem alterar o desenvolvimento embrionário (Shi & Haaf, 2002). Em zigotos de coelhos, a desmetilação do PP é controversa. Uma ausência de desmetilação foi descrita em zigotos desenvolvidos *in vivo* (Beaujean et al., 2004; Shi et al., 2004). Por outro lado, uma desmetilação parcial em comparação ao PM foi relatada em zigotos cultivados *in vitro* (Park et al., 2007) e, no final do estágio de uma célula, em zigotos desenvolvidos *in vivo* (Lepikhov et al., 2008). Park et al. (2007) apresentaram a hipótese que uma desmetilação parcial do PP ocorrida transitoriamente durante o primeiro ciclo celular em bovinos poderia estar acontecendo em coelhos. Isto poderia explicar os resultados controversos nesta espécie em função das diferenças nos momentos do ciclo celular observados. Dessa forma, uma análise da metilação do DNA durante o primeiro ciclo celular é necessária em coelhos.

Este estudo teve como objetivo analisar a dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos pró-núcleos materno e paterno de zigotos de coelhos durante o primeiro ciclo celular. Portanto, primeiro foi definido o perfil da evolução dos pró-núcleos ao longo do ciclo celular e os zigotos foram classificados em cinco estágios pró-nucleares, tendo em conta a fase S. Em seguida, a quantidade de DNA metilado e conteúdo do DNA total foram analisados em ambos os pró-núcleos, para cada estágio pró-nuclear. Então, a dinâmica da metilação do DNA (DM-DNA) de zigotos desenvolvidos *in vivo* (DIV) e cultivados *in vitro* (CIV) foi comparada a fim de verificar um possível efeito do ambiente *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Coelhas da raça New Zealand foram estimuladas com 5 administrações subcutâneas de pFSH (Stimufol®, Merial) por 3 dias antes do acasalamento: duas de 5µg no primeiro dia com 12 horas de intervalo, duas de 10µg no segundo dia com 12 horas de intervalo e uma no terceiro dia, seguida 12 horas mais tarde por uma administração intramuscular de 30 IU hCG (Chorulon, Intervet) imediatamente antes do acasalamento.

2.2 Coleta e cultivo *in vitro* de zigotos de coelhos

Zigotos DIV foram coletados de ovidutos perfundidos com PBS às 14, 16, 18, 20, 22 e 24 *horas post coitum* (hpc). Os zigotos obtidos às 14 e 16 horas foram incubados em meio 199 (Gibco) contendo 5 mg de hialuronidase (Sigma) por 3 minutos a 37°C. Os zigotos CIV foram coletados às 14 hpc e cultivados, após tratamento com hialuronidase, em 500 µL de meio B2 (Laboratoire C.C.D., Paris, France) suplementado com 2,5% (V/V) de soro fetal bovino (SFB, Gibco) por 2, 4 a 8 e 10 horas a 38,5°C com 5% CO₂ em ar. Os zigotos coletados foram utilizados nas fases experimentais representadas na figura 2.1.

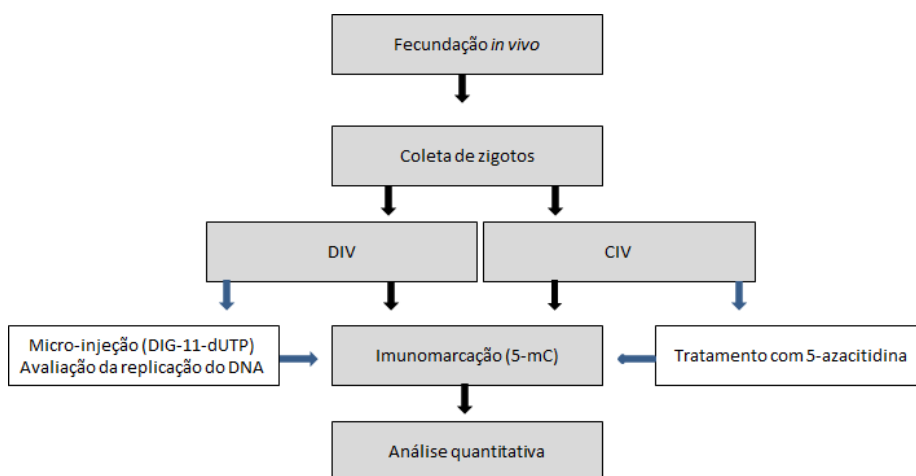


Figura 2.1: Fases experimentais para a análise e a descrição da dinâmica dos níveis de metilação do DNA nos genomas materno e paterno durante o primeiro ciclo celular em zigotos desenvolvidos *in vivo* (DIV) e cultivados *in vitro* (CIV).

2.3 Avaliação da replicação do DNA

Zigotos coletados às 16, 18 e 22 hpc foram injetados com 5pL de 0,02mM de DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate, Roche) em tampão Pipes-KCl e incubados em meio 199 com 10% de SFB por 15 a 25 minutos, antes da fixação e imunomarcção.

2.4 Tratamento de zigotos de coelhos com 5-Azacitidina

Zigotos obtidos às 14 hpc foram cultivados em 500 μ L de meio B2 contendo 10 μ M de 5-Azacitidina (5-Aza, Sigma Aldrich) e suplementado com 2,5% de SFB por 2 e 10 horas a 38,5°C com 5% CO₂ em ar.

2.5 Imunomarcação

Os zigotos foram fixados em 4% de paraformaldeído (PAF, Euromedex) em PBS por 48h a 4°C. Durante a imunomarcação todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente, exceto indicação ao contrário. Os zigotos foram primeiramente lavados em PBS por 1 hora e permeabilizados com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) em PBS por 1 hora. Então os zigotos foram saturados por 1 hora em PBS contendo 2% de BSA e incubados com anticorpos policlonais anti-H3K9me3 (diluição 1:400 em 2% BSA-PBS, Upstate) durante a noite. Em seguida, foram lavados com 0,05% Tween-20 (Sigma) em PBS, pós-fixados em 4% de PAF por 25 minutos e tratados com HCl 2 M por 1 hora. Em seguida foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS (10 minutos). Os zigotos foram incubados com anticorpos monoclonais (camundongo) anti-5-metilcitosina (5-mC, diluição 1:1000 em 2% BSA-PBS; Eurogentec) durante a noite à 4°C. Após a incubação foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS por 30 minutos e incubados por 1 hora com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) conjugado a anticorpo secundário anti-camundongo (diluição 1:200 em 2% BSA-PBS; Jackson ImmunoResearch) e com a Cianina 5 conjugada a anticorpo secundário anti-coelho (diluição 1:100 em 2% BSA-PBS; Jackson ImmunoResearch). Após foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS, pós-fixados em PAF 2% por 20 minutos e lavados em PBS por 5 minutos. Em seguida, o DNA foi contrastado em 0,002 mM Etídio Homodímero-2 (EthD-2, Invitrogen) por 30 minutos a 37°C e os zigotos foram colocados entre lâmina e lamínula com Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

Para os zigotos micro-injetados com DIG-dUTP, os anticorpos anti-5mC foram substituídos por anticorpos anti-digoxigenina (diluição 1:200 em 2% BSA-PBS,

Roche) associados ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) conjugado a anticorpo secundário anti-ovelha (diluição 1:200, Jackson ImmunoResearch).

2.6 Análise quantitativa

Os zigotos foram observados usando microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axio Observer) equipado com ApoTome. As amostras foram observadas na área contendo cada pró-núcleo com uma objetiva de 40x com imersão e secções ópticas digitais foram coletadas usando uma aquisição em intervalos de 0,8 μm de distância.

A análise quantitativa para os níveis de DNA metilado e do conteúdo de DNA total foram estimados pela quantificação dos sinais de fluorescência com o software Image-J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), como segue: 1) a área de cada pró-núcleo foi delimitada manualmente de uma secção equatorial e a intensidade média da fluorescência foi medida para as imagens oriundas da marcação com anti-5-mC e EthD-2; 2) as intensidades médias de fluorescência foram normalizadas pelo tempo de aquisição correspondente a cada sinal; 3) a intensidade total da fluorescência foi calculada pela multiplicação da intensidade média da fluorescência normalizada pelas áreas pró-nucleares. Quando os pró-núcleos apresentavam uma pequena sobreposição, a intensidade média da metilação foi calculada sobre a área sem sobreposição. Além disso, foi verificado que a posição relativa dos pró-núcleos não afetou a quantificação e que poderiam ser estudados independentemente (dados não mostrados).

2.7 Análise estatística

Os grupos experimentais tiveram três réplicas. Os dados de cada réplica foram normalizados pela mediana dos pró-núcleos no estágio 2. Os dados referentes ao conteúdo de DNA metilado, ao conteúdo total do DNA e aos níveis da metilação do DNA para os pró-núcleos materno e paterno foram transformados por \log_2 e analisados por ANOVA e teste de Tukey usando o Systat 13 (Systat Software Inc., Chicago, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Classificação dos zigotos de acordo com a morfologia pró-nuclear

Zigotos no estágio de uma célula foram recuperados a cada duas horas *post-coitum*, de 14 a 24 horas, e apresentaram uma enorme variabilidade na morfologia pró-nuclear. Para superar esta enorme variabilidade, os zigotos foram classificados em 5 estágios pró-nucleares (PN0 a PN4), de acordo com o tamanho relativo dos pró-núcleos paternos e maternos. A fim de não identificar inequivocadamente os pró-núcleos maternos e paternos, foi formulada a hipótese de que o anticorpo anti-H3K9me3 poderia ser usado. Este anticorpo marcou de forma específica o PM em camundongos (Santos et al., 2005). Primeiramente, a marcação de H3K9me3 foi testada em estágio pró-nuclear inicial (PN1), quando o PM e PP são distinguíveis pela suas morfologias, e uma marcação assimétrica também foi observada em coelhos. Uma vez que só o PM foi marcado por esse anticorpo, o mesmo foi usado para identificar o PM durante todo o primeiro ciclo celular (Figura 2.2A). Além disso, independentemente do estágio de desenvolvimento na maioria dos zigotos, o PM apresentou um tamanho inferior ao PP. Os cinco estágios pró-nucleares foram definidos como segue (Figuras 2.2A,B):

- PN0: os zigotos tinham o genoma materno em telófase e a cabeça do espermatozóide em descondensação;
- PN1: corresponde ao primeiro estágio com o estabelecimento pró-nuclear;
- PN2: os pró-núcleos tinham um tamanho superior a PN1, especialmente o PM (o PP foi quase duas vezes maior e PM quatro vezes maior que em PN1, Figura 2.2B);
- PN3: os pró-núcleos atingiram o seu maior tamanho (PP é três vezes maior e PM é quase seis vezes maior que em zigotos no estágio PN1, Figura 2.2B), e
- PN4: ambos os pró-núcleos tinham tamanhos semelhantes daqueles no estágio PN3. Mas, apresentaram uma área com aspecto fibrilar, especialmente o PM. Adicionalmente, paralelo ao aumento de tamanho dos pró-núcleos foi observada a descompactação da cromatina, com a preparação do genoma para a síntese de DNA.

Uma distribuição dos estágios pró-nucleares em relação ao tempo *post-coitum* foi elaborada por meio da análise de 254 zigotos coletados a cada duas horas *post-*

coitum, das 14h às 24 horas (zigotos DIV). Sua distribuição está apresentada em um histograma na Figura 2.2C. Esta distribuição mostrou que a classificação morfológica adotada corresponde à evolução no ciclo celular dos pró-núcleos durante o desenvolvimento no estágio de uma célula. Para verificar a distribuição pró-nuclear para zigotos CIV foram analisados 87 embriões coletados às 14 hpc e cultivados *in vitro* de 2 a 10 horas (Figura 2.2C). A distribuição dos pró-núcleos de zigotos CIV foi ligeiramente diferente daquela observada em zigotos DIV e aponta para um atraso no desenvolvimento dos zigotos induzida pelo ambiente *in vitro*, no que diz respeito à morfologia de seus pró-núcleos. Este efeito ambiental é confirmado pela ausência de embriões no estágio de 2 células às 24 hpc, contrário ao observado nos embriões DIV (Figura 2.2C).

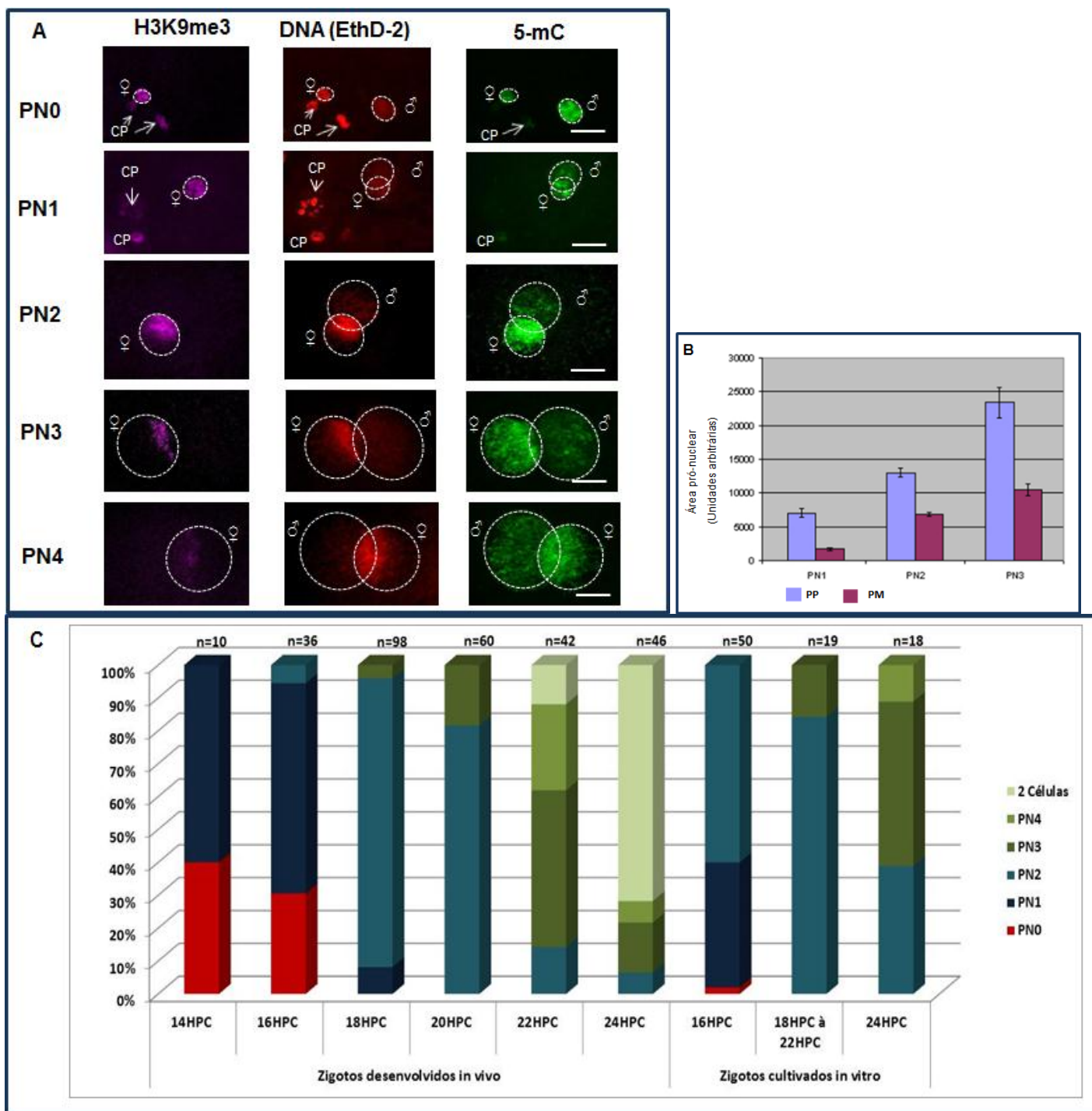


Figura 2.2: Classificação de zigotos de coelhos de acordo com os estágios pró-nucleares. (A) Imagens representativas da reconstrução das secções ópticas de diferentes estágios pró-nucleares, que foram definidos de acordo com a morfologia relativa dos pró-núcleos em 5 estágios (PN0 a PN4). O pró-núcleo materno foi identificado pela imunomarcação com H3K9me3. CP: Corpúsculo polar. Barra de escala=20µm. (B) Evolução das áreas do pró-núcleo materno (PM) e do pró-núcleo paterno (PP) nos estágios PN1, PN2 e PN3. (C) Distribuição dos zigotos desenvolvidos *in vivo* ou cultivados *in vitro* em cinco estágios pró-nucleares relativos ao tempo *post-coitum*. Os números de zigotos observados (n) em cada momento analisado são indicados sobre cada barra no histograma. HPC: horas *post-coitum*.

3.2 Replicação do DNA em zigotos de coelhos

A fim de confirmar a importância biológica da classificação dos pró-núcleos, buscou-se definir a ligação desta classificação com as fases do ciclo celular no estágio de uma célula. Para verificar o período de replicação foi realizada uma marcação com DIG-11-dUTP em zigotos DIV ($n=82$, PN0=8, PN1=18, PN2=21, PN3=27, PN4=8). O sinal associado à DIG-11-dUTP foi encontrado somente nos zigotos nos estágios PN2 e PN3 (Figura 2.3A). No estágio PN2, 71,42% ($n=15$) dos zigotos foram marcados em ambos os pró-núcleos. No estágio PN3, 66,67% dos zigotos apresentaram-se marcados, um terço destes tinham sinal no PM e PP e dois terços somente no PM (Figura 2.3B).

3.3 Dinâmica da metilação do DNA

A dinâmica dos níveis de metilação do DNA foi analisada tanto no PM quanto no PP de zigotos DIV ou CIV, por meio da quantificação da marcação da 5-mC nos estágios de PN1 a PN4. A fim de conhecer o aumento do conteúdo de DNA, devido à fase S durante o primeiro ciclo celular, o DNA foi quantificado com o auxílio da marcação pelo EthD-2. Isso favoreceu a normalização da quantidade de DNA metilado pelo conteúdo de DNA total durante o primeiro ciclo celular. Conforme mostrado na Figura 2.4C,D, o conteúdo de DNA total aumentou significativamente entre os estágios PN1 a PN3, independentemente da origem parental do pró-núcleo.

Em zigotos DIV, o PM apresentou um aumento progressivo e significativo ($P < 0,05$) na quantidade de DNA metilado de PN0 a PN3 (Figura 2.4A). Esta quantidade, em seguida, manteve-se constante entre os estágios PN3 e PN4. A normalização pelo conteúdo de DNA (Figura 2.4E) total mostrou que o nível de metilação do genoma materno aumentou entre PN0 e PN1 e permaneceu constante entre os estágios PN1 e PN4. No PP, a quantidade de DNA metilado aumentou significativamente ($P < 0,05$) de PN1 a PN3 juntamente com o conteúdo de DNA total (Figura 2.4B,D). No entanto, a normalização evidenciou uma significativa diminuição (51,29%) do nível de metilação do DNA no PP entre PN0 e PN2 (Figura 2.3F). Esta desmetilação foi seguida por um aumento da metilação no estágio PN4. Notavelmente, enquanto a desmetilação do DNA

em PN3 foi significativamente mais baixa que aquela verificada em PN1, o nível de metilação de PN4 não diferiu mais de PN1 (Figura 2.4F).

Em zigotos CIV, como naqueles DIV, o nível de metilação do DNA do PM não foi alterado de forma significativa entre PN1 e PN3 (Figura 2.4G). Por outro lado, o nível de metilação do DNA no PP pareceu ser afetado pelo cultivo *in vitro*, pois não foi observada uma diminuição neste nível entre PN1 e PN2 (Figura 2.4H).

3.4 Estabilidade dos níveis de metilação do DNA durante a replicação

Como a replicação ocorreu nos zigotos nos estágios PN2 e PN3 e nenhuma diminuição nos níveis de metilação do DNA foi observada entre esses dois estágios pró-nucleares quer *in vivo* ou *in vitro* (Figuras 2.4E-H), buscou-se analisar a atividade de metilação de DNA nesses zigotos. Portanto, a 5- Azacitidina, um inibidor da metilação do DNA, foi usada em zigotos coletados às 14 hpc e incubados por 10 horas em presença ou ausência deste inibidor. Os níveis de metilação do DNA foram significativamente maiores nos controles que nos zigotos tratados, em ambos os pró-núcleos (Figura 2.5). Isso mostra que a metilação do DNA ocorre durante a replicação do DNA nos pró-núcleos independente da origem parental.

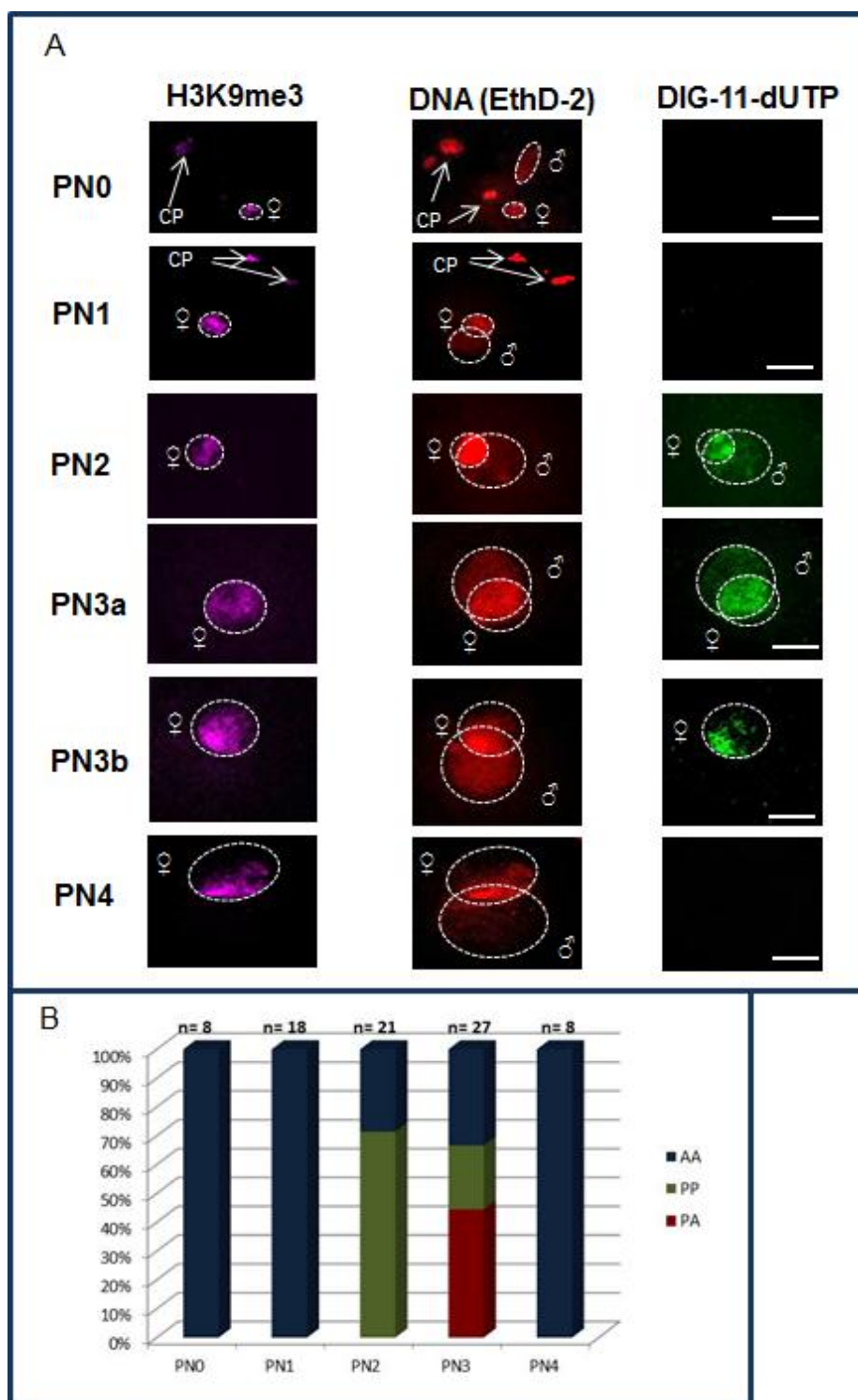
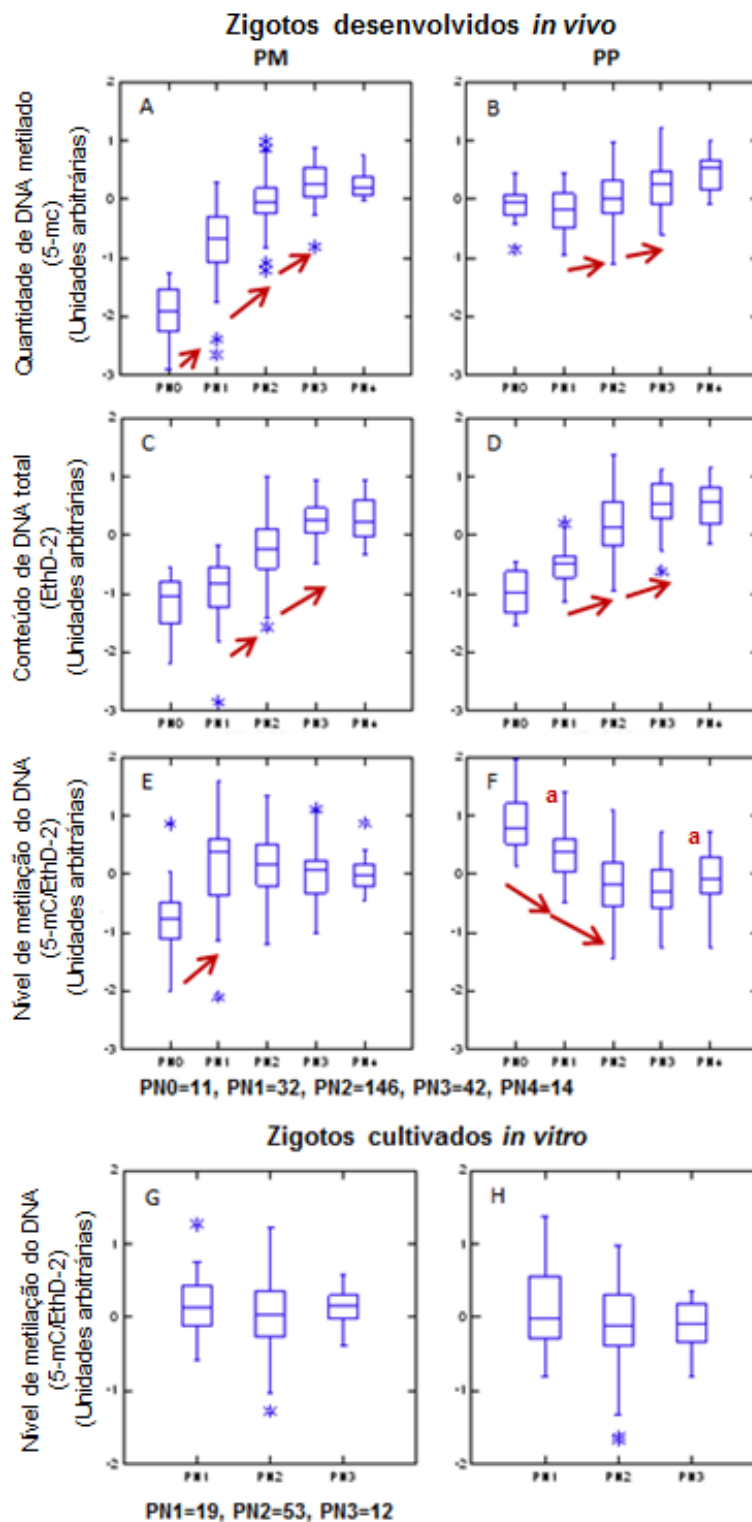


Figura 2.3: **(A)** Imagens representativas da reconstrução das secções ópticas do sinal de DIG-11-dUTP nos diferentes estágios pró-nucleares. CP: Corpúsculo polar. Barra de escala=20 μ m. **(B)** Distribuição da imunomarcagem com DIG-11-dUTP nos diferentes estágios pró-nucleares. Marcação com DIG-11-dUTP: AA: ausência em ambos os pró-núcleos; PP: presença em ambos os pró-núcleos; PA: presença no pró-núcleo materno e ausência no paterno. Os números de zigotos observados (n) em cada momento analisado são indicados sobre cada barra no histograma.



Figuras 2.4: Dinâmica da metilação do DNA em zigotos de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) (A-F) ou cultivados *in vitro* (CIV) (G,H). Quantificação dos níveis de 5-mC, nível de DNA metilado (A,B) e EthD-2, conteúdo do DNA total (C,D) e nível da metilação do DNA (5-mC/EthD-2; E-H) nos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP) de zigotos DIV e CIV. Os asteriscos (*) representam valores extremos. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre dois estágios de desenvolvimento pró-nuclear consecutivos.

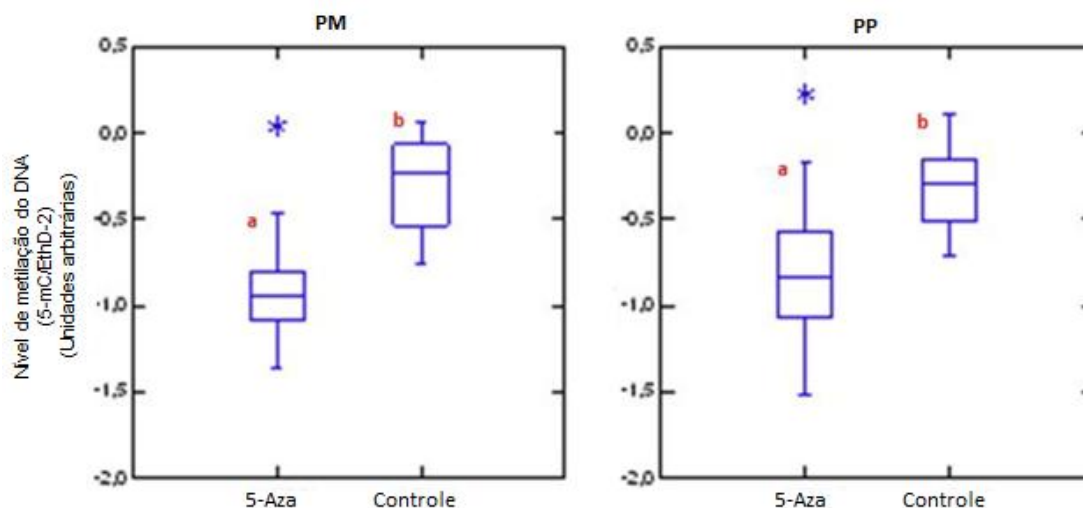


Figura 2.5: Nível normalizado da metilação do DNA (5-mC/EthD-2) nos pró-núcleos materno (PM) e paterno (PP) após 10 horas de cultivo (24 hpc) em presença (n=17, 24 hpc grupo 5-Aza) ou ausência (n=15, 24 hpc grupo controle) de 5-Azacitidina. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes denotam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre grupos em ambos os pró-núcleos.

4 DISCUSSÃO

No coelho a ovulação é induzida pelo acasalamento e ocorre de 11,5 a 14 hpc (Dahm-Kähler et al., 2006). Além disso, os ovócitos são aptos à fecundação entre 12 e 19 hpc (Oprescu & Thibault, 1965; Szollozi, 1966). Isso provavelmente explica a enorme variabilidade que foi observada na morfologia pró-nuclear quando foram recuperados zigotos de diferentes coelhas e em momentos diferentes, mas regulares (a cada duas horas) após o *coitum*. Neste sentido, a estratégia adotada utilizando um elevado número de zigotos, recuperados a cada duas horas durante um período de dez horas e classificados segundo seu estágio pró-nuclear, tornou possível a realização de uma análise quantitativa da DM-DNA durante o primeiro ciclo celular em coelhos.

A fase S ocorreu entre os estágios PN2 e PN3 e termina provavelmente mais cedo no PP que no PM. A relação entre classificação dos pró-núcleos e as fases do ciclo celular, juntamente com a distribuição de estágios pró-nucleares de acordo com o

tempo *post-coitum* reforça a pertinência da classificação adotada. Além disso, o conteúdo de DNA total aumentou de acordo com os resultados de replicação do DNA.

Os resultados obtidos no presente trabalho são compatíveis com os estudos prévios realizados em coelho. Beaujean et al. (2004) e Shi et al. (2004) analisaram zigotos que correspondem aos estágios pró-nucleares mais avançados deste estudo. Assim, a ausência de desmetilação do PP, por eles relatada, pode ser devida ao ligeiro aumento do nível da metilação do DNA observado em PN4, tornando os níveis de metilação entre PN1 e PN4 estatisticamente parecidos no PP. Lepikhov et al. (2008) relataram uma desmetilação significativa no PP, mas em "estágios pró-nucleares avançados". Este processo foi quantificado entre 6-8 horas após a fecundação nos estágios PN3-4. No entanto, de acordo com sua descrição este estágio corresponde provavelmente ao estágio PN2 deste estudo. Dessa forma, a desmetilação do PP que eles observaram corresponderia à desmetilação relatada neste trabalho entre os estágios PN1 e PN2. Por último, a DM-DNA descrita neste estudo comprovou a transitoriedade da desmetilação conforme hipótese proposta por Park et al. (2007), a partir da observação de zigotos de coelhos às 18 hpc, nos quais observaram desmetilação do PP, em comparação com dados de outros autores às 19 hpc (Beaujean et al., 2004) e às 24 hpc (Shi et al., 2004), quando a desmetilação do PP foi relatada como ausente.

Estes resultados estabelecem o coelho entre as espécies com uma desmetilação ativa do PP, antes da duplicação (entre PN0 e PN1). Porém, a análise com 5-Azacitidina também estabeleceu a presença de uma atividade de metilação do DNA no PP durante a fase S. A 5-Azacitidina bloqueia a ação de DNMT1 (Christman et al., 2002). Esta enzima é responsável pela manutenção dos padrões de metilação pré-existentes (revisto por Bestor, 2000) e o inibidor poderia ter bloqueado os mecanismos de manutenção da metilação. Nessas condições, a diminuição do nível de metilação de DNA ainda observado entre os estágios PN1 e PN2, quando a síntese de DNA começou, poderia ter resultado de uma desmetilação ativa concomitante com o início de uma metilação de manutenção ao longo do ciclo celular.

A desmetilação do DNA no PP tem sido relatada em camundongos (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002), ratos (Zaitseva et al., 2007) e bovinos (Park et al., 2007), mas não foi relatada no PP de suínos (Jeong et al., 2007; Park et al., 2007; Deshmukh et

al., 2011). No entanto, nenhuma destas análises incluiu um alto número de zigotos classificados em estágios pró-nucleares. Em ovinos, a ausência de desmetilação foi previamente relatada em zigotos desenvolvidos *in vivo* por Beaujean et al. (2004), embora uma desmetilação parcial tenha sido mais recentemente relatada em zigotos produzidos *in vitro* (Hou et al., 2008). Em caprinos, a desmetilação do DNA foi descrita em ambos os genomas parentais, mas no estágio de duas células (Park et al., 2010). No entanto, análises anteriores mostraram desmetilação parcial do DNA no PP (Park et al., 2007). Assim, pode parecer que a desmetilação do DNA paterno é mais conservada entre espécies do que se acreditava anteriormente. Nestes sentido, as diferenças relatadas entre as espécies para a “extensão” da desmetilação do PP poderiam ser explicadas pelos tempos relativos à desmetilação ativa e à fase S associados à atividade de metilação de manutenção. Essas diferenças foram evidenciadas experimentalmente pela ausência total (camundongo) ou pela diminuição da intensidade do sinal de fluorescência obtido após imunomarcação para 5-mC (Park et al., 2007).

Estes resultados estabeleceram a dinâmica dos níveis de metilação do DNA tanto no PP quanto no PM de coelhos, o qual exibiu um nível de metilação estável ao longo do primeiro ciclo celular, apresentando uma atividade de metilação durante a fase S. O aumento do nível de metilação do DNA observado no genoma materno, presente neste trabalho entre os estágios PN0 e PN1, foi relatado em camundongos por Howlett & Reik (1991). Esta análise também evidenciou os efeitos do ambiente *in vitro* sobre a cinética de evolução pró-nuclear e a metilação do DNA no PP. Considerando que a fecundação ocorre de 11,5-14 após a administração de hCG (Dahm-Kähler et al., 2006), este estudo pode ter selecionado os zigotos “mais velhos”, ao recuperá-los às 14 hpc: isto explicaria a menor proporção de PN0 e maior proporção de zigotos no estágio PN2 às 16 hpc para os zigotos CIV comparados aos DIV recuperados às 16 hpc. Apesar de partir de uma população de zigotos “mais velhos”, embriões no estágio de duas células não foram observados às 24 hpc, o que indica um retardo induzido pelo ambiente *in vitro*. Uma alteração no padrão de desmetilação do DNA do PP, entre os estágios PN1 e PN2, foi observada quando os zigotos foram cultivados *in vitro*. Tais perturbações iniciais têm sido relatadas em zigotos de camundongos (Zaitseva et al., 2007). No entanto, se elas

estão associadas às diferenças observadas em termos de expressão gênica (Doberty et al., 2000) permanece a ser analisado.

5 CONCLUSÕES

O perfil da dinâmica da metilação do DNA foi diferente entre os pró-núcleos materno e paterno de zigotos desenvolvidos *in vivo*, mas foi semelhante entre os pró-núcleos de zigotos cultivados *in vitro*, demonstrando que as condições de cultivo *in vitro* podem modificar os níveis de metilação do DNA em zigotos. Além disso, este estudo revelou uma atividade de manutenção de metilação do DNA durante a fase-S nos pró-núcleos, independente da origem parental.

A análise quantitativa dos níveis de metilação do DNA considerando o conteúdo de DNA total, tendo em vista a fase de síntese, permitiu uma avaliação mais precisa da variação da metilação do DNA.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUJEAN, N.; HARTSHORNE, G.; CAVILLA, J.; TAYLOR, J.; GARDNER, J.; WILMUT, I.; MEEHAN, R.; YOUNG, L. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. **Curr Biol.**, v.14, p. R266-R267, 2004.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Gen.**, v.9, n.16, p. 2395-2402, 2000.
- CHRISTIANS, E.; RAO, V. H.; RENARD, J. P. Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. **Dev Biol.**, v.164, p.160-172, 1994.
- CHRISTMAN, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene.** v.21, n.35, p.5483-95, 2002.
- CROSBY, I.; M.; GANDOLFI, F.; MOOR, R. M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. **J Reprod Fertil.**, v.82, p.769-775, 1988.
- DAHM-KÄHLER, P.; LÖFMAN, C.; FUJII, R.; AXELSSON, M.; JANSON, P.O.; BRÄNNSTRÖM, M. An intravital microscopy method permitting continuous long-term observations of ovulation in vivo in the rabbit. **Hum Reprod.**, v.21, n.3, p.624-31, 2006.
- 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. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.13734-13738, 2001.
- DESHMUKH, R.S.; OSTRUP, O.; OSTRUO, E.; VEJLSTED, M.; NIEMMANN, H.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v.6, n.2, p.1-11, 2011.
- DOHERTY, A.S.; MANN, M.R.W.; TREMBLAY, K.D.; BARTOLOMEI, M.S.; SCHULTZ, R.M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1526-1535, 2000.
- HOU, J.; LIU, L.; ZHANG, J.; CUI, X.H.; YAN, F.X.; GUAN, H.; CHEN, Y.F.; AN, X.R. Epigenetic modification of histone 3 at lysine 9 in sheep zygotes and its relationship with DNA methylation. **BMC Dev Biol.**, v. 29, 8:60, 2008.

- HOWLETT, S.K.; REIK, W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. **Development**, v.113, p.119-127, 1991.
- JEONG, Y.S.; YEO, S.; PARK, J.S.; KOO, D.B.; CHANG, W.K.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. DNA methylation state is preserved in the sperm-derived pronucleus of the pig zygote. **Int J Dev Biol.**, v.51, n. 8, p:707-14, 2007.
- LEPIKHOV, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAO, R.; YANG, F.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; WOLF, E.; WALTER, J. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. **Epigenetics Chromatin**, 1:8, doi: 10.1186/1756-8935-1-8, 2008.
- 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.
- MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v.403, p.501-502, 2000.
- MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet.**, v.14, n.1, p.R47-R58, 2005.
- OPRESCU, S.; THIBAUT, C. Duplication de l'ADN dans les oeufs de lapine après la fécondation. **Annls Biol. anim. Biochim. Biophys.**, v.5, p.151-156, 1965.
- OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Curr Biol.**, v.10, p.475-478, 2000.
- PARK, J.S.; JEONG, Y.S.; SHIN, S.T.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. **Dev Dyn.**, v.236, p.2523-2533, 2007.
- PARK, J.S.; LEE, D.; CHO, S.; SHIN, S.T.; KANG, Y.K. Active loss of DNA methylation in two-cell stage goat embryos. **Int J Dev Biol.**, v.54, n.8-9, p.1323-8, 2010.
- ROUGIER, N.; BOURCHIS, D.; GOMES, D.M.; NIVELEAU, A.; PLACHOT, M.; PÁLDI, A.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. **Genes Dev.**, v.12, n.14, p.2108-13, 1998.
- SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol.**, v.241, p.172-182, 2002.
- SANTOS, F.; PETERS, A.H.; OTTE, A.P.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. **Dev Biol.**, v.280, n.1, p.225-36, 2005.

- SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **Bioessays**, v.15, p.531-538, 1993.
- SHI, W.; DIRIM, F.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAAF, T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. **Biol Reprod.**, v.71, p.340-347, 2004.
- SHI, W.; HAAF, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. **Mol Reprod Dev.**, v.63, p.269-72, 2002.
- SZOLLOSI, D. Time and duration of DNA synthesis in rabbit eggs after sperm penetration. **Anat Rec.**, v.54, n.2, p.209-12, 1966.
- TATE, P.; SKARNES, W.; BIRD, A. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. **Nat Genet.**, v.12, n.2, p.205-8, 1996.
- TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev.**, v.26, p.90-100, 1990.
- ZAITSEVA, I.; ZAITSEV, S.; ALENINA, N.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. **Mol Reprod Dev.**, v.74, p.1255-1261, 2007.

CAPITULO 3

Dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro*

Reis e Silva, A.R.^{1,2}, Bruno C.¹, Fleurot R.¹, Daniel N.¹, Adenot P.¹, Archilla C.¹, Peynot N.¹, Lucci, C.M.², Beaujean, N.¹, Duranthon V.¹

1. INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France.
2. Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brasil

RESUMO

Durante a pré-implantação embrionária, os genomas parentais passam por extensas modificações epigenéticas tais como o processo de metilação do DNA. No entanto, alterações na dinâmica deste processo têm sido atribuídas ao cultivo *in vitro* e podem modificar o desenvolvimento normal do embrião. Em coelhos, a dinâmica da metilação do DNA (DM-DNA) não foi analisada durante a pré-implantação em embriões desenvolvidos *in vivo* (DIV) e, conseqüentemente estudos comparativos entre embriões DIV e cultivados *in vitro* (CIV) não são possíveis. Para disponibilizar dados referentes à DM-DNA em embriões de coelhos, embriões DIV e CIV foram avaliados nos estágios de 2, 4, 8 e 16 células, mórula e blastocisto. Embriões CIV foram cultivados em meio B2, suplementado ou não com soro fetal bovino (SFB), a 38,5°C com 5 % CO₂ em ar. Os embriões foram imunomarcados para 5-mC e o DNA marcado pelo EthD-2. Os resultados mostraram que uma desmetilação passiva ocorre durante as clivagens celulares em embriões de coelhos DIV e CIV. Mas, a cinética deste processo foi diferente entre embriões DIV e CIV, com a desmetilação iniciando mais cedo (de 2 a 8 células) em embriões CIV que naqueles DIV (de 4 a 16 células). Além disso, embriões CIV atingiram um nível mais baixo de metilação no estágio de 8 células aumentando no estágio de mórula. Adicionalmente, embriões cultivados em presença de SFB apresentaram um maior nível de metilação do DNA em relação àqueles cultivados em sua ausência. No estágio de blastocisto, a massa celular interna foi mais metilada que o trofocotoderma. Este

estudo em embriões DIV abre perspectivas para uma análise das modificações causadas pelas diferentes condições de cultivo *in vitro* na metilação do DNA.

Palavras-chave: desmetilação do DNA, cultivo *in vitro*, pré-implantação embrionária.

ABSTRACT

During embryo preimplantation the parental genomes undergo extensive epigenetic modifications, such as the process of DNA methylation. Changes in the dynamics of this process, however, have been attributed to *in vitro* culture and may alter normal embryo development. In rabbits, DNA-MD was not analyzed during the preimplantation development of *in vivo*-developed (IVD) embryos and consequently comparative studies between IVD and *in vitro* cultured (IVC) embryos are not possible. To make data available concerning DNA methylation dynamics in the rabbit, IVD and IVC embryos were evaluated at the stages of 2, 4, 8 and 16 cells, morula and blastocyst. IVC embryos were cultured in B2 medium, supplemented or otherwise with fetal calf serum, at 38.5°C and 5 % CO₂ in air. Immunostaining for 5-methyl cytosine and DNA labeling by EthD2 were then performed. The results showed that demethylation took place during cell cleavages in IVD and IVC rabbit embryos. But the kinetics of this process is different between IVD and IVC embryos, with demethylation starting earlier *in vitro* (from 2 to 8 cells) than *in vivo* (from 4 to 16 cells). Moreover, in IVC embryos DNA methylation reached its lowest level at 8 cells, increasing at the morula stage. Additionally, embryos cultured in the presence of serum showed a higher DNA methylation level than those cultured in its absence. In the blastocyst stage, the inner cell mass was more methylated than the trophectoderm. This study in IVD embryos opens up the prospect of an analysis of changes caused by different *in vitro* culture conditions in DNA methylation.

Keywords: DNA demethylation, *in vitro* culture, embryo preimplantation.

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento pré-implantação o genoma parental sofre intensas modificações epigenéticas, dentre elas um processo dinâmico de metilação do DNA (revisto por Morgan et al., 2005), o qual tem sido associado à regulação da expressão gênica (Li et al., 1993; Yoder et al., 1997). Este processo ocorre quando o embrião passa por etapas importantes, como a ativação transcricional do genoma embrionário. Além disso, abrange um período de clivagens celulares, durante o qual as células embrionárias perdem sua característica inicial de totipotentes para se tornarem pluripotentes. Neste período, uma correta reprogramação da metilação do DNA é importante para a regulação de genes em momentos específicos (Farthing et al., 2008).

Em camundongos, no momento da fecundação, os genomas ovocitário e espermático são fortemente metilados. Poucas horas após, uma vigorosa desmetilação se produz no pronúcleo paterno (PP) em relação ao materno. Esta desmetilação é dita ativa porque ela se passa antes da replicação do DNA. Em seguida, o nível de metilação cai progressivamente durante as clivagens celulares e atinge um mínimo no estágio de mórula. Esta desmetilação é dita passiva. Então, este nível aumenta no estágio de blastocisto e apresenta uma assimetria: a metilação é mais alta nas células da massa celular interna (MCI) que naquelas do trofotoderma (TF) (Dean et al., 2001; Santos et al., 2002).

A desmetilação passiva do DNA parece não ser conservada entre as espécies. Este processo foi observado nos estágios de 2 a 8 células em bovinos (embriões cultivados *in vitro* - CIV, Dean et al., 2001), ovinos (embriões desenvolvidos *in vivo* - DIV, Beaujean et al., 2004; Young & Beaujean, 2004) e recentemente em suínos (embriões DIV, Deshmukh et al., 2011), mas não foi relatado em embriões de coelhos. Nestes animais, há somente um estudo disponível na literatura, o qual analisou qualitativamente o nível de metilação do DNA em embriões cultivados *in vitro* e relatou a ausência de desmetilação entre os estágios de 2 e 16 células. Além disso, os autores descreveram que as células da MCI seriam menos metiladas que as células do trofotoderma (Shi et al., 2004).

Alterações nos níveis de metilação do DNA têm sido atribuídos à cultura *in vitro* (Zaitseva et al., 2007; Deshmukh et al., 2011) e um padrão aberrante de metilação do DNA no início da pré-implantação tem sido correlacionado a alterações no desenvolvimento embrionário (Li et al., 1992; Shi & Haaf, 2002). Assim, para conhecer as alterações causadas ao embrião pelo ambiente e os resultados de tais alterações no seu desenvolvimento, torna-se interessante retomar estes estudos com maior precisão, de modo a estabelecer uma situação de referência em embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo*.

Nestes sentido, este estudo tem como objetivo a análise da dinâmica da metilação do DNA (DM-DNA) durante o desenvolvimento pré-implantação de embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* (DIV) e cultivados *in vitro* (CIV), por meio de uma análise quantitativa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Coelhas da raça New Zealand foram estimuladas com 5 administrações subcutâneas de pFSH (Stimufol®, Merial) por 3 dias antes do acasalamento: duas de 5µg no primeiro dia com 12 horas de intervalo, duas de 10µg no segundo dia com 12 horas de intervalo e uma no terceiro dia, seguida 12 horas mais tarde por uma administração intramuscular de 30 IU HCG (Chorulon, Intervet) imediatamente antes do acasalamento.

2.2 Coleta e cultivo *in vitro* de embriões de coelhos

Embriões DIV foram coletados de ovidutos perfundidos com PBS às 24, 32, 39, 55, 67 e 91/97 horas *post coitum* (hpc) para obter embriões de 2, 4, 8 e 16 células, mórula e blastocisto, respectivamente. Em seguida, foram incubados em 5mg/mL de Pronase (Sigma) à temperatura ambiente para a remoção da zona pelúcida e envoltório de mucina, exceto os blastocistos, os quais foram seccionados com lâmina de bisturi de

forma a permanecerem juntas as células da MCI e do TF. Embriões coletados às 19 hpc, no estágio de uma célula, foram cultivados em 500 μ L de meio B2 (Laboratoire C.C.D., Paris, France) suplementado com 2,5% (V/V) de soro fetal bovino (SFB, Gibco) por 9, 15, 25, 39, 53, 79 horas a 38,5°C com 5 % CO₂ em ar para recuperar embriões de 2, 4, 8 e 16 células, mórulas e blastocistos, respectivamente. Alguns embriões coletados às 19 hpc foram cultivados em B2 suplementado com 2,5% de SFB (B2S) por 9 e 25 horas para recuperar embriões no estágio de 2 e 8 células, respectivamente.

2.3 Imunomarcção

Os embriões foram fixados em 4% de paraformaldeído (PAF, Euromedex) em PBS por 48 h a 4°C. Alguns embriões foram mantidos em PAF 4% de 1 a 5 dias para permitir a imunomarcção simultânea em todos os estágios (2 células a mórula). Durante a imunomarcção todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente, exceto indicação ao contrário. Depois deste período, os embriões foram lavados em PBS por 1 hora e permeabilizados com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) em PBS por 1 hora. Então foram saturados por 1 hora em PBS contendo 2% de BSA e tratados com HCl 2 M por 1 hora. Em seguida foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS (10 minutos) e incubados com anticorpos monoclonais (camundongo) anti-5-metilcitosina (5-mC, diluição 1:1000 em 2% BSA-PBS; Eurogentec) durante a noite a 4°C. Após a incubação, foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS por 30 minutos e incubados por 1 hora com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) conjugado a anticorpo secundário anti-camundongo (diluição 1:200 em 2% BSA-PBS; Jackson ImmunoResearch). Em seguida, foram lavados com 0,05% Tween-20 em PBS, pós-fixados em PAF 2% por 20 minutos e lavados em PBS por 5 minutos. Em seguida, o DNA foi contrastado em 0,002 mM Etídio Homodímero-2 (EthD-2, Invitrogen) por 30 minutos a 37°C e os embriões foram colocados entre lâmina e lamínula com Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

2.4 Análise quantitativa

Os embriões foram observados usando microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axio Observer) equipado com ApoTome. As amostras foram observadas com uma objetiva de 40x com imersão e secções ópticas digitais foram coletadas usando uma aquisição em intervalos de 1,0µm de distância. Foram analisados todos os núcleos de cada embrião de 2, 4, 8 e 16 células. Para as mórulas (55 a 60 células) foram analisados 20 núcleos em cada. Nos blastocistos foram analisados 25 núcleos na MCI e 25 no TF de cada embrião.

A análise quantitativa para os níveis de DNA metilado e de conteúdo do DNA total foram estimados pela quantificação dos sinais de fluorescência com o software Image-J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), como segue: 1) a área de cada núcleo foi delimitada manualmente e a intensidade média da fluorescência foi medida para as imagens oriundas da marcação com anti-5-mC e Etídio homodímero-2; 2) as intensidades médias de fluorescência foram normalizadas pelo tempo de aquisição correspondente a cada sinal; 3) a intensidade total da fluorescência foi calculada pela multiplicação da intensidade média da fluorescência normalizada pelas áreas nucleares.

2.5 Análise estatística

Os grupos experimentais tiveram três réplicas. Os dados de cada réplica foram normalizados pela mediana do estágio 4 células. Os dados referentes aos níveis normalizados de metilação do DNA (quantidade de DNA metilado/conteúdo de DNA total) dos núcleos foram transformados por \log_2 e analisados por ANOVA e teste de Tukey usando o Systat 13 (Systat Software Inc., Chicago, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Desmetilação do DNA durante clivagens

A dinâmica da metilação do DNA foi analisada em embriões DIV e CIV após a fecundação *in vivo*, por meio da quantificação da marcação da 5-mC em cada blastômero. Para analisar as variações no conteúdo de DNA, devido à fase S em cada blastômero, o conteúdo de DNA total foi definido pela quantificação do sinal de EthD-2. Isto possibilitou a normalização da quantidade de DNA metilado pelo conteúdo do DNA total durante o desenvolvimento pré-implantação.

O nível normalizado da metilação do DNA em embriões DIV (Figura 3.1A) não variou significativamente entre duas e quatro células. Este nível diminuiu progressiva e significativamente ($p < 0,05$) a partir do estágio de 4 células até o de 16 células, em seguida, manteve-se estável entre os estágios de 16 células e mórula. Esta dinâmica de metilação do DNA parece ser modificada pelo cultivo *in vitro*. Em embriões CIV (Figura 3.1B), o nível de metilação do DNA diminuiu do estágio de 2 células até o estágio de 8 células. Em seguida, permaneceu estável entre os estágios de 8 a 16 células e começou a aumentar entre os estágios de 16 células a mórula.

3.2 Metilação diferencial entre a massa celular interna e o trofotoderma

Para quantificar o nível de metilação do DNA na MCI e no TF, embriões DIV às 91 hpc e 97 hpc e embriões CIV às 98 hpc foram seccionados (Figura 3.2A). Em blastocistos DIV e CIV o nível normalizado de metilação na MCI foi significativamente maior ($P < 0,001$) que aquele observado no TF (Figura 3.2B-D). Além disso, em blastocistos DIV esta diferença aumentou com o desenvolvimento, como evidenciado pela comparação de blastocistos às 91 hpc e às 97 hpc (Figura 3.2B-C). Nos blastocistos CIV, a diferença do nível de metilação entre a MCI e o TF foi próxima daquela encontrada em blastocistos DIV às 97 hpc (Figura 3.2C-D).

3.3 Variação na cinética de desmetilação do DNA com a composição do meio de cultivo

Como foram observadas, durante as clivagens, algumas alterações na cinética de desmetilação do DNA induzidas pelo cultivo *in vitro* de embriões; buscou-se verificar se a composição do meio de cultivo poderia afetar esta desmetilação. Portanto, o nível normalizado de metilação do DNA foi analisado em embriões cultivados em meio B2 suplementado com SFB como previamente descrito ou em B2 sem SFB. A ausência de SFB no meio de cultivo resultou em uma queda mais acentuada no nível metilação entre os estágios de 2 e 8 células, pois os embriões no estágio de 8 células cultivados em B2S apresentaram um nível de metilação significativamente maior ($p < 0,05$) que aqueles cultivados em B2 (Figura 3.3).

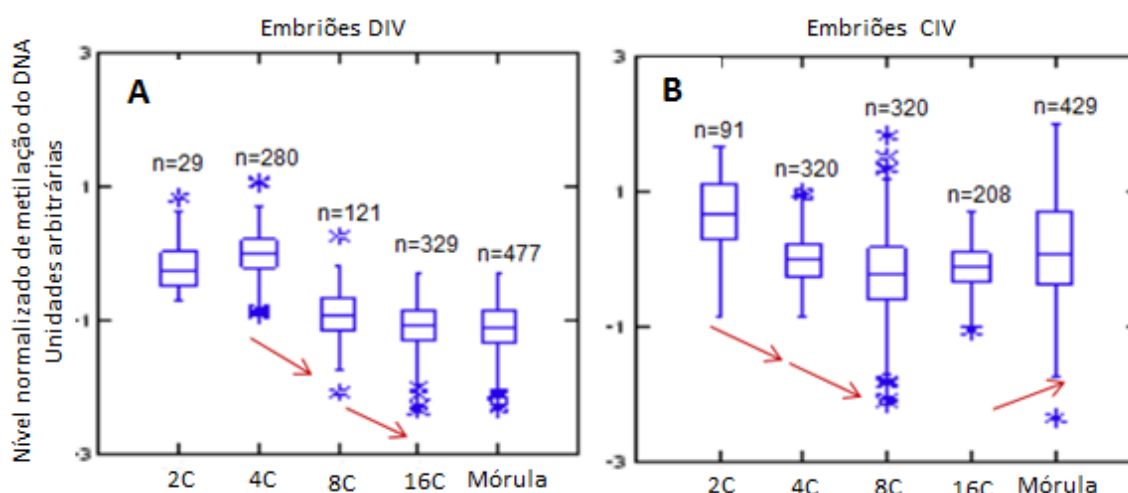


Figura 3.1: Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho desenvolvidos *in vivo* (DIV) ou cultivados *in vitro* (CIV). n= quantidade de blastômeros analisados em cada estágio de desenvolvimento. Os asteriscos (*) representam valores extremos. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre dois estágios de desenvolvimento consecutivos.

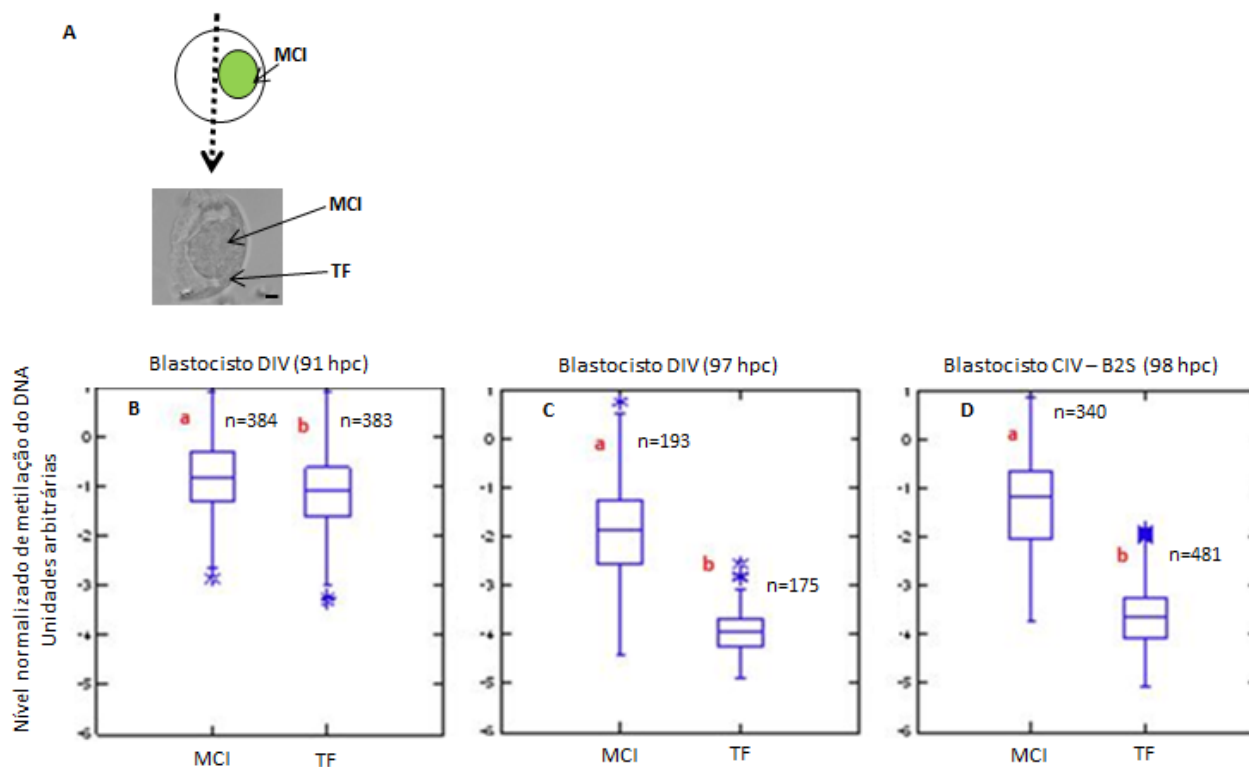


Figura 3.2: (A) Imagem representativa de blastocisto desenvolvido *in vivo* (DIV) seccionado. Barra de escala=20μm. (B-D) Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho desenvolvidos *in vivo* (DIV) ou cultivados *in vitro* (CIV) em meio B2S. n= quantidade de blastômeros analisados. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$) entre a massa celular interna (MCI) e o trofotoderma (TF) para blastocistos DIV às 91 hpc, DIV às 97 hpc ou CIV às 98 hpc.

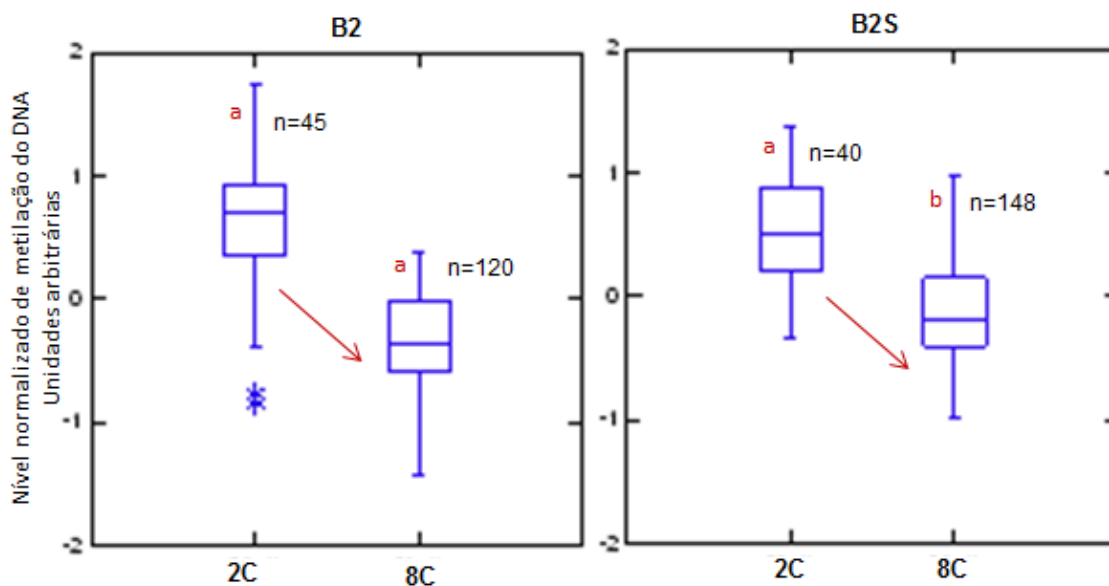


Figura 3.3: Nível normalizado da metilação do DNA em embriões de coelho cultivados *in vitro* em meio B2 e B2 suplementado com soro fetal bovino (B2S). n= quantidade de blastômeros analisados em cada estágio de desenvolvimento. As setas vermelhas indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre estágios de desenvolvimento para o mesmo meio de cultivo. Os asteriscos (*) representam valores extremos. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) para embriões no mesmo estágio de desenvolvimento entre os dois diferentes meios.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, a dinâmica da metilação foi analisada em embriões DIV e CIV de coelho, fecundados *in vivo*, pela quantificação da marcação para 5-mC nos estágios de 2 células a mórula e blastocisto. Além disso, o efeito do meio de cultivo foi analisado na metilação do DNA de forma isolada, tendo em vista que a maturação e a fecundação *in vitro* poderiam interferir na DM-DNA como sugerido para embriões bovinos (Hou et al., 2007). Os resultados mostraram que uma desmetilação gradativa ocorre durante as clivagens celulares em embriões de coelho DIV e CIV, como observado em embriões suínos (Deshmukh et al., 2011) e ovinos (Beaujean et al., 2004; Young & Beaujean, 2004) desenvolvidos *in vivo*. Além disso, este processo foi descrito em embriões de bovinos produzidos *in vitro* (Dean et al., 2001) e de camundongos

desenvolvidos *in vivo* (Dean et al., 2001) ou produzidos *in vitro* (Santos et al., 2002). Em camundongos, essa perda da metilação do DNA foi associada à diminuição da atividade da DNA metiltransferase (Monk et al., 1991).

Perfis diferentes da DM-DNA foram observados entre embriões DIV e CIV de coelhos, com uma desmetilação iniciando mais cedo nos embriões CIV, seguida de uma metilação *de novo* no estágio de mórula. Estudo desenvolvido com embriões suínos sugeriu que o ambiente *in vitro* pode causar alterações epigenéticas. Neste estudo, os autores relataram uma diferença na reprogramação da metilação do DNA nos estágios de 2 a 8 células entre os embriões DIV e àqueles produzidos *in vitro*, os quais apresentaram aumento no nível da metilação do DNA em relação aos DIV (Deshmukh et al., 2011).

No estágio de blastocisto foram analisados os níveis de metilação do DNA entre as células da MCI e do TF. Resultados preliminares para embriões de coelhos CIV pareceram semelhantes aos da literatura para embriões de cultivo *in vitro* (Shi et al., 2004), apresentando as células da MCI menos metiladas que TF (dados não apresentados). No entanto, estes resultados foram diferentes do observado em camundongos (Santos et al., 2002), bovinos (Dean et al., 2001), ovinos (Beaujean et al., 2004; Young & Beaujean, 2004), humanos (Santos et al., 2010) e suínos (Fulka et al., 2006; Jeong et al., 2007; Deshmukh et al., 2011). Então, talvez eles pudessem estar sendo influenciados por uma falha de penetração de anticorpos nas células da MCI. Neste contexto, os blastocistos foram seccionados e hemi-embriões com MCI e TF oriundos de um mesmo blastocisto foram examinados. Em tais condições, no presente trabalho foi observado o mesmo resultado observado para a maioria das espécies, ou seja, a MCI mais metilada que o TF, confirmando os relatos em blastocistos de coelhos após estudos com restrição enzimática (Manes & Menzel, 1981). Estes resultados são discrepantes de prévias descrições para embriões de primatas produzidos *in vitro* (Yang et al., 2007), onde células da MCI foram menos metiladas que aquelas do TF. No entanto, é possível que esta submetilação tenha sido devida aos efeitos adversos do ambiente *in vitro*. Adicionalmente, em blastocistos DIV foi observado que a diferença do nível de metilação entre a MCI e o TF aumentou acompanhando o estágio de desenvolvimento, como descrito para suínos (Fulka et al., 2006). Além disso, em blastocistos CIV às 98 hpc a

diferença do nível de metilação do DNA entre a MCI e o TF foi próxima aos blastocistos DIV às 97 hpc.

Resultados obtidos em nosso laboratório fornecem evidências de genes em coelhos, como por exemplo retrotransposons e o gene MAT2A, cuja regulação variou em função do meio de CIV, particularmente se o SFB está presente (dados não mostrados). Neste sentido, embriões provenientes de cultivo em meio B2 ou B2 suplementado com SFB (B2S), nos estágios de 2 e 8 células, foram analisados e observou-se que aqueles desenvolvidos em B2S apresentavam um nível mais alto de metilação no estágio de 8 células em relação aos cultivados em B2. Em ovinos, fibroblastos fetais, usados na transferência nuclear de células somáticas, cultivados *in vitro* na ausência de SFB apresentaram um nível de metilação 27% mais baixo que aqueles cultivados em presença de soro (Beaujean et al., 2004). Em camundongos, o cultivo de embriões pré-implantação em presença de SFB alterou a metilação do DNA e influenciou na expressão de genes “imprinted” (Khosla et al., 2001). A composição do soro é de natureza variável e não definida, o que dificulta a identificação do fator ou do conjunto de fatores que está alterando a metilação do DNA e enfatiza a necessidade de se encontrar meios quimicamente definidos que possam “mimetizar” o ambiente *in vivo*.

Neste sentido, alguns componentes do meio de cultivo têm sido estudados. Em embriões bovinos, altas concentrações de homocisteína no meio de cultivo induziram a hipermetilação do DNA genômico, bem como o retardo no desenvolvimento, dando uma “nova percepção à regulação epigenética sensível à nutrição” celular (Ikeda et al., 2010) e que deve ser cuidadosamente avaliada, pois meios de cultivo em condições “subótimas” têm sido associados a alterações epigenéticas aberrantes e levado a severos efeitos a longo prazo (revisto por Fernández-Gonzalez et al., 2007).

As diferenças na dinâmica da metilação do DNA em coelhos observadas neste estudo, em relação aos dados obtidos a partir de embriões DIV ou CIV e a estudos prévios (Shi et al., 2004), podem estar associadas às condições de cultivo *in vitro*, as quais podem modificar o nível de metilação do DNA (Zaitesava et al., 2007). Contudo, resta a ser analisado se estas diferenças estão associadas às aquelas observadas em termos de expressão gênica (Doberty et al., 2000) ou a alterações no desenvolvimento fetal ou pós-

natal (revisto por Young et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Niemann et al., 2002; Wrenzycki et al., 2005).

5 CONCLUSÕES

Embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro* passam por um processo de desmetilação passiva durante as clivagens celulares sucessivas. Além disso, a presença de soro fetal bovino no meio de cultivo pode modificar a cinética de desmetilação do DNA.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUJEAN, N.; TAYLOR, J.; GARDNER, J.; WILMUT, I.; MEEHAN, R.; YOUNG, L. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod.**, v.71, n.1, p.185-93, 2004.
- 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. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.13734-13738, 2001.
- DESHMUKH, R.S.; OSTRUP, O.; OSTRUO, E.; VEJLSTED, M.; NIEMMANN, H.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v.6, n.2, p.1-11, 2011.
- DOHERTY, A.S.; MANN, M.R.W.; TREMBLAY, K.D.; BARTOLOMEI, M.S.; SCHULTZ, R.M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1526-1535, 2000.
- FARTHING, C.R.; FICZ, G.; NG, R.K.; CHAN, C.F.; ANDREWS, S.; DEAN, W.; HEMBERGER, M.; REIK, W. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. **PLoS Genet.**, 4(6): e1000116. doi:10.1371/journal.pgen.1000116, 2008.
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; RAMIREZ, M.A.; BILBAO, A.; DE FONSECA, F.R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. **Mol Reprod Dev.**, v.74, n.9, p.1149-56, 2007.
- FULKA, J.; FULKA, H.; SLAVIK, T.; OKADA, K.; FULKA, J.; JR. DNA methylation pattern in pig in vivo produced embryos. **Histochem Cell Biol.**, v.126, p.213-217, 2006.
- HOU, J.; LIU, L.; LEI, T.; CUI, X.; AN, X.; CHEN, Y. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. **Sci China C Life Sci.**, v.50, n.1, p.56-61, 2007.
- IKEDA, S.; NAMEKAWA, T.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.**, v.313, n.3, p.129-36, 2010.
- JEONG, Y.S.; YEO, S.; PARK, J.S.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Gradual development of a genome-wide H3-K9 trimethylation pattern in paternally derived pig pronucleus. **Dev Dyn.**, v.236, p.1509-1516, 2007.

- KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol. Reprod.**, v.64, p.918- 926, 2001.
- LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v.366, p.362-365, 1993.
- 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.
- MANES, C.; MENZEL, P. Demethylation of CpG sites in DNA of early rabbit trophoblast. **Nature**, v.293, n.5833, p.589-90, 1981.
- MONK, M.; ADAMS, R.L.; RINALDI, A. Decrease in DNA methylase activity during preimplantation development in mouse. **Development**, v.112, p.189-192, 1991.
- MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet.**, v.14, n.1, p.R47-R58, 2005.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro* - produced and nuclear transfer – derived embryos and their implications for early development. **Cloning and Stem Cells**, v.4, n.1, p.29-38, 2002.
- SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol.**, v.241, p.172-182, 2002.
- SANTOS, F.; HYSLOP, L.; STOJKOVIC, P.; LEARY, C.; MURDOCH, A.; REIK, W.; STOJKOVIC, M.; HERBERT, M.; DEAN, W. Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. **Hum Reprod.**, v.25, n.9, p.2387-95, 2010
- SHI, W.; DIRIM, F.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAAF, T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. **Biol Reprod.**, v.71, p.340-347, 2004.
- SHI, W.; HAAF, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. **Mol Reprod Dev.**, v.63, p.269-72, 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. **Hum Reprod.**, v.15, p.68-86, 2000.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, K.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine derived from in

vitro procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, n.2, p.23-35, 2005.

YANG, J.; YANG, S.; BEAUJEAN, N.; NIU, Y.; HE, X.; XIE, Y.; TANG, X.; WANG, L.; ZHOU, Q.; JI, W. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced in vitro. **Biol Reprod.**, v.76, n.1, p.36-42, 2007.

YODER, J.A.; WALSH, C.P.; BESTOR, T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet.**, v.13, p.335-340, 1997.

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

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod.**, v.3, n.3, p.155-63, 1998.

ZAITSEVA, I.; ZAITSEV, S.; ALENINA, N.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. **Mol Reprod Dev.**, v.74, p.1255-1261, 2007.

CAPITULO 4

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este estudo é a primeira descrição detalhada da dinâmica da metilação do DNA nos pró-núcleos materno e paterno e em embriões nos estágios de 2 células a blastocisto desenvolvidos *in vivo* em coelhos.
- O perfil da dinâmica da metilação do DNA foi diferente entre os pró-núcleos materno e paterno de zigotos desenvolvidos *in vivo*.
- Houve uma atividade de metilação de manutenção do DNA durante a fase S nos pró-núcleos, independente da origem parental.
- A dinâmica dos níveis de metilação do DNA foi semelhante entre os pró-núcleos materno e paterno de zigotos cultivados *in vitro*.
- A análise quantitativa dos níveis de metilação do DNA, considerando o conteúdo de DNA total, tendo em vista a fase de síntese, permitiu uma avaliação mais precisa da variação da metilação do DNA.
- O perfil da dinâmica da metilação do DNA foi diferente entre embriões desenvolvidos *in vivo* e cultivados *in vitro*, ressaltando que as condições de cultivo *in vitro*, podem alterar a metilação do DNA.
- O nível de metilação do DNA pode ser modificado pela presença de soro fetal bovino no meio de cultivo.
- O conhecimento do perfil da dinâmica da metilação em embriões de coelhos desenvolvidos *in vivo* abre perspectivas para uma análise das consequências de diferentes condições de cultivo *in vitro* na metilação do DNA.