



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UNB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**IMPACTOS DO USO DA PROCAÍNA COMO AGENTE  
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO  
CELULAR DE BOVINOS**

**Valquíria Alice Michalczechen Lacerda**

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**Março de 2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UNB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**IMPACTOS DO USO DA PROCAÍNA COMO AGENTE  
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE  
BOVINOS**

**Valquíria Alice Michalczechen Lacerda**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília-UnB, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Rumpf**

**Brasília, DF**

**Março de 2010**

**IMPACTOS DO USO DA PROCAÍNA COMO AGENTE  
DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE  
BOVINOS**

**Aprovado pela banca examinadora:**

---

**Dr. Rodolfo Rumpf**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Orientador**

---

**Dr. Maurício Machaim Franco**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

**Dr. Márcio José Poças Fonseca**  
**Universidade de Brasília - UnB**

---

**Dr. Cezar Martins de Sá**  
**Suplente**  
**Universidade de Brasília - UnB**

**Data da defesa: 24 de março de 2010.**

*Não deixe a vida te levar, você leva a sua vida!*

*Autor desconhecido.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Sem Ele, não estaríamos aqui.

A minha mãe Maria Ignez Michalczechen e ao meu irmão Igor E. M. Lacerda por todo apoio, compreensão, carinho e paciência. Amo vocês;

Ao meu pai Naurican L.P. Lacerda, que se pudesse estaria aqui para comemorar mais essa vitória. Estará sempre vivo em meu coração;

A Professora Doutora Íris Ferrari da Universidade de Brasília e Regivaldo Vieira Sousa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por colaborarem com a citogenética realizada nesse trabalho;

A minha amiga Patrícia Fritsch pelos conselhos, companherismo, e ensinamentos em citogenética, como orientanda da Professora Íris;

Aos meus orientadores Rodolfo Rumpf e Maurício Machaim Franco por todos os ensinamentos e pelo voto de confiança. Meu muito obrigada e minha admiração;

Aos pesquisadores e colaboradores do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Aos meus amigos de laboratório Edylaine, Tatiane Mundim, Ana Cláudia, Clarice, Monique, Michele, Tiago, Heitor, Chivas, Nádia, Fernanda Rodrigues, Juliana, Allice, José, Vitor, Antônio, Flávia, Rosana, Isabela, Pablo, e aos que conheci em outros laboratórios da Embrapa, Joyce, Bruna, Larissa, Nicolau, Paula, Thaina, Cristiane, Marcelo, Bruno, André, Eder. Agradeço a todos pela amizade;

A GENEAL, FUNARBE e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo financiamento e estrutura na concretização desse trabalho;

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pela oportunidade de adquirir o grau de mestre e à CAPES pela bolsa de fomento.

A todos os meus amigos que mesmo indiretamente me apoiaram sempre. Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. HIPÓTESES.....	3
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
4.1 Epigenética.....	4
4.2 Metilação de DNA.....	5
4.3 Código das histonas.....	7
4.4 Metodologia para avaliar metilação de DNA.....	8
4.5 Reprogramação nuclear e Genes <i>imprinting</i> .....	10
4.6 Transferência nuclear.....	16
4.7 Sustâncias desmetilantes de DNA.....	19
4.8 A procaína.....	21
4.9 <i>IGF2</i> .....	24
4.10 <i>XIST</i> .....	28
4.11 Referências Bibliográficas.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	50

5.1 Cultivo celular de fibroblastos.....	50
5.2 Congelamento e descongelamento celular.....	51
5.3 Cultivo celular com procaína e viabilidade celular.....	53
5.4 Cariótipo por citogenética convencional.....	54
5.5 Extração de DNA das células.....	55
5.6 Tratamento com bissulfito de sódio.....	56
5.7 Amplificação por PCR e purificação.....	57
5.8 Clonagem dos produtos da PCR e seqüenciamento.....	59
5.9 Análise estatística.....	61
6. RESULTADOS.....	62
6.1 Cultivo celular com procaína e viabilidade celular.....	62
6.2 Cariótipo por citogenética convencional.....	65
6.3 Amplificação por PCR e purificação.....	66
6.4 Clonagem dos produtos de PCR e sequenciamento.....	67
6.5 Metilação de DNA.....	68
7. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÕES.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Célsius
5mC	5-Metilcitosina
µL	microlitro
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca	Cálcio
CGP	Células germinativas primordiais
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTCF	Fator de ligação à sequência CCCTC
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DMR	Região diferencialmente metilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FACS	Separador de células ativadas por fluorescência
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
G	Unidade gravitacional
h	Hora(s)
H19	Histocompatibilidade 19
HDAC	Histonas desacetilases
HTM	Histonas metiltransferases
IA	Inseminação artificial
ICR	Região controladora de <i>imprinting</i>
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IGF2	Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 2
IGF2R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactoside
K	Potássio

KDa	KiloDalton
LB	Meio Luria Bertani
LOS	Síndrome do bezerro grande
MCI	Massa celular interna
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MSCI	Inativação meiótica do cromossomo sexual
MTT	[3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide]
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
pb	Pares de base
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PTM	Modificações pós-traducionais
rpm	Rotações por minuto
RLGS	<i>Restriction Landmark Genomic Scanning</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de um nucleotídeo
TE	Transferência de embriões
TN	Transferência nuclear
TNCS	Transferência nuclear de célula somática
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
XCI	Inativação do cromossomo X ou Cromossomo X inativo
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
<i>XIST</i>	Transcrito específico da inativação do X

XIC	Centro de inativação do X
Xp	Cromossomo X paterno
Xpr	Região de pareamento do cromossomo X
zdC	5-Aza-2-deoxicitidina

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> Modelo ilustrativo para o padrão de metilação de DNA no gene <i>IGF2</i>. A DMR do último éxon encontra-se hipometilada para o alelo materno (círculos brancos), enquanto o alelo paterno possui essa região hipermetilada (círculos pretos). Adaptado de Curchoe et al., (2005) e Gebert et al.,(2006).....</p>	25
<p><b>Figura 2.</b> Modelo ilustrativo para a interação entre as DMR para os genes <i>IGF2</i> e <i>H19</i>. Em ambos os alelos ocorre a formação de uma região com expressão reprimida (área sombreada). No alelo materno, a DMR1 (<i>IGF2</i>) e a DMR (<i>H19</i>) interagem. O gene <i>H19</i> sofre ação dos <i>enhancers</i> (círculos vermelhos) que aumentam a expressão desse gene. A interação no alelo paterno ocorre entre a DMR2 (<i>IGF2</i>) e a DMR (<i>H19</i>), impedindo a expressão do <i>H19</i>. Os <i>enhancers</i> (círculos vermelhos) se aproximam da região promotora e induzem a expressão do <i>IGF2</i>. Adaptado de Murrell et al. (2004) e Fagundes (2009).....</p>	27
<p><b>Figura 3.</b> Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do gene <i>XIST</i>. Se a DMR estiver desmetilada (círculos brancos) permite a expressão do gene <i>XIST</i> que participa da inativação do cromossomo X inativado. Caso a DMR esteja metilada (círculos pretos) a expressão do gene é reprimida correspondendo ao padrão do cromossomo X ativo.....</p>	30
<p><b>Figura 4.</b> Cortes de biópsia da pele de um animal Nelore em placas de cultivo. <b>A-</b> Biópsias secando para uma boa aderência à superfície da placa. <b>B-</b> Material contendo meio adequado para o cultivo de fibroblastos <i>in vitro</i>. Fotos: Arquivo pessoal.....</p>	51
<p><b>Figura 5.</b> Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblasto de bovinos após 72 horas de cultivo <b>A-</b> Grupo controle, <b>B-</b> Suplementação com 0,1 mM de procaína, <b>C-</b> Suplementação com 0,5 mM de procaína, <b>D-</b> Suplementação com 2,0 mM de procaína. Notar o volume celular aumentado e a presença de vacúolos, indicada pela seta. Aumento de 100x. Barra: 500 µm. Fotos: Arquivo pessoal.....</p>	62
<p><b>Figura 6.</b> Média ± desvio padrão do número de células viáveis após adição de azul de tripan no tratamento com procaína; contadas em câmara de Neubauer. NT – grupo controle; [A] 0,1 mM de procaína, [B] 0,5 mM de procaína [C] 2,0 mM de procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si (<math>P \leq 0,01</math>).....</p>	63
<p><b>Figura 7.</b> Média ± desvio padrão da média das 3 réplicas referente ao número de células totais após adição de azul de tripan no tratamento com procaína; contadas em câmara de Neubauer. NT: Não tratado, [A]: 0,1 mM de procaína, [B]: 0,5 mM de procaína, [C]: 2,0 mM de procaína. Letras diferentes estatisticamente entre as colunas diferem entre si (<math>P \leq 0,01</math>).....</p>	64

**Figura 8.** Foto ilustrativa de metáfases de fibroblasto de bovinos. **A-** Grupo controle. **B-** Tratamento com 0,1 mM de procaína. **C-** Tratamento com 0,5 mM de procaína, **D-** Tratamento com 2,0 mM de procaína. A seta indica o cromossomo X. Fotos: arquivo pessoal.. 65

**Figura 9.** Foto ilustrativa de metáfases de fibroblasto de bovinos contendo translocações. **A-** Grupo controle, **B-** Tratamento com 0,5 mM de procaína. Seta branca indica o cromossomo X. Seta preta indica a translocação. Fotos: Arquivo pessoal..... 65

**Figura 10.** Análise eletroforética, em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio, dos produtos amplificados após tratamento com bissulfito de sódio. M- 100 pb DNA Ladder Invitrogen. **A-** Fragmento referente ao gene *IGF2*. Amostras de 1-3 grupo controle, 4-6 tratamento com procaína 0,1 mM, 7-8 tratamento com procaína 0,5 mM. **B-** Fragmento referente ao gene *XIST*. A cada 3 amostras refere-se ao grupo controle, tratamento com 0,1 mM e 0,5 mM respectivamente. De 1-9 réplica 1 e 10-18 réplica 2..... 66

**Figura 11.** Análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídio. **11 A** – Gel a 1% contendo amostras referentes ao produto da digestão dos vetores extraídos para o gene *IGF2*. Fragmento de 438 pb confirma o vetor contendo o inserto. **11 B-** Gel a 1,5% contendo amostras referentes ao produto amplificado para o gene *XIST*. Fragmento de 438 pb confirma o vetor contendo o inserto, enquanto o de 178 pb corresponde ao vetor sem inserto. Cada número refere-se a um clone distinto..... 67

**Figura 12.** Ilustração do alinhamento realizado no programa DNAMAN 4.0 para as sequências. Gene *XIST* com a sequência obtida a partir do *GenBank*. Números 23, 26, 27 são amostras de sequências obtidas no experimento. Setas brancas mostram uma citosina não CG que sofreu conversão do bissulfito e foi convertida posteriormente em timina. Setas pretas indicam uma citosina CG indicando o padrão de metilação, C indica metilação e T indica desmetilação..... 68

**Figura 13.** Análise de metilação da DMR do último éxon do gene *IGF2* em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com procaína (média  $\pm$  desvio padrão). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG (total de 28 CpG). Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco a não metilação de cada citosina avaliada. Seta indica a nova CG encontrada. **A** – Grupo controle. **B-** Grupo tratado com 0,1 mM de procaína, **C-** Grupo tratado com 0,5 mM de procaína. **D-** Gráfico representativo do padrão de metilação encontrado (média  $\pm$  erro padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $P=0,1773$ )..... 69

**Figura 14.** Análise de metilação da DMR do éxon 1 do gene *XIST* em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com procaína (média  $\pm$  desvio padrão). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG (total de 17 CpG). Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco a não metilação de cada citosina avaliada. **A** – Grupo controle. **B**- Grupo tratado com 0,1 mM de procaína, **C**- Grupo tratado com 0,5 mM de procaína. **D**- Gráfico representativo do padrão de metilação encontrado (média  $\pm$  erro padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $P=0,2818$ )..... 70

**ÍNDICE DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1.</b> Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DNA tratado com bissulfito de sódio.....	57
<b>Tabela 2.</b> Número de células viáveis do cultivo <i>in vitro</i> de fibroblasto de bovinos tratados com procaína, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.....	63
<b>Tabela 3.</b> Número de células totais do cultivo <i>in vitro</i> de fibroblasto de bovinos tratados com procaína, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.....	64
<b>Tabela 4.</b> Análise citogenética de fibroblastos suplementados com procaína.....	66

## IMPACTOS DO USO DA PROCAÍNA COMO AGENTE DESMETILANTE DE DNA NO SISTEMA DE CULTIVO CELULAR DE BOVINOS

### RESUMO

Após a fecundação natural ou a clonagem por transferência nuclear, um padrão epigenético preexistente deve sofrer uma reprogramação correta para garantir o desenvolvimento embrionário. Contudo, essa reprogramação é ineficiente na clonagem, pois o carioplasto possui um padrão metilação do DNA diferente dos gametas. Acredita-se num aumento da eficiência da clonagem de mamíferos se os carioplastos utilizados possuírem um DNA hipometilado. Este é o primeiro estudo a utilizar a procaína como agente desmetilante no cultivo *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos de bovinos. Os objetivos foram avaliar os efeitos da procaína no cultivo *in vitro* sobre a viabilidade celular, avaliar a integridade cromossômica e analisar o padrão de metilação no DNA para as regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *imprinting IGF2* e *XIST*, por tratamento com bissulfito de sódio seguido de seqüenciamento, em linhagem celular de *Bos taurus indicus*. O cultivo celular com a procaína apresentou crescimento celular e a suplementação com 0,1 e 0,5 mM levou a um aumento no número de células viáveis em relação ao grupo controle e ao tratamento com 2,0 mM ( $P \leq 0,05$ ). A quantidade de células totais foi menor apenas para o grupo com suplementação de 2,0 mM ( $P \leq 0,01$ ). A citogenética não mostrou diferença entre os grupos. O padrão de metilação não foi diferente para as DMRs dos genes avaliados. Existe um efeito benéfico nas células que receberam os tratamentos com 0,1 mM ou 0,5 mM de procaína, por existir um aumento da quantidade de células viáveis sem apresentar anomalias cromossômicas. Há a possibilidade de ter ocorrido uma desmetilação global, que não foi detectada nas regiões analisadas. A suplementação do meio de cultivo com procaína aumentou a viabilidade de fibroblastos *in vitro* de bovinos, sem alterar a integridade cromossômica. Isso é importante, pois os próximos estudos poderão contribuir, por exemplo, com um aumento dos índices da transferência nuclear de célula somática, maior obtenção de mamíferos transgênicos e possivelmente de células-tronco a partir de células diferenciadas.

**Palavras-chaves:** epigenética, genes *imprinting*, transferência nuclear de célula somática (TNCS)

## IMPACTS OF USING PROCAINE AS A DNA DEMETHYLATING AGENT IN BOVINE CELL CULTURE SYSTEM

### ABSTRACT

After natural fertilization and cloning by nuclear transfer, an epigenetic pattern must be reprogrammed to guarantee viable embryo development. This is the first study to use procaine as a demethylation agent in *in vitro* culture of cattle fibroblast cell line. The aim was to investigate the effects of procaine in fibroblast cell line, to evaluate the chromosome integrity and to analyze DNA methylation patterns for DMRs of *IGF2* and *XIST* genes *imprinting*, by bisulphite treatment followed by sequencing, in *Bos taurus indicus*. The cell culture with procaine was viable and the supplementation with 0.1 and 0.5 mM led to an increase in the number of cells with intact membrane in comparison to control group and to the treatment with 2.0 mM ( $P \leq 0.05$ ). The amount of total cells was lower only for the group supplemented with 2.0 mM ( $P \leq 0.01$ ). Cytogenetics showed no difference between groups. The methylation pattern was not different for the DMR genes evaluated. We notice a beneficial effect on cells that received treatments with 0.1 mM or 0.5 mM procaine, because there is an increase in number of viable cells which did not present chromosomal abnormalities. It may have occurred a global demethylation, which was not detected in the analyzed regions. Supplementation of medium culture with procaine increased the viability of *in vitro* culture of bovine fibroblasts, with no alteration in chromosomal integrity. The results obtained here may contribute to increase the levels of cloning and transgenic mammals and possibly stem cells from differentiated cells.

**Keywords:** epigenetics, *imprinting* genes, somatic cell nuclear transfer (SCNT).

## 1-INTRODUÇÃO

O constante aumento populacional nos leva a aumentar a produção de alimentos sem abrir novas fronteiras agrícolas, preservando o meio ambiente. Para isso, há a necessidade de aumentarmos a produtividade por área utilizada. Atualmente, trabalhos de seleção por melhoramento clássico associados às técnicas de genética molecular e reprodução animal resultaram em um animal muito produtivo.

O desenvolvimento de várias biotecnologias de reprodução, como inseminação artificial (IA), superovulação, coleta e transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIV), clonagem por transferência nuclear (TN) e transgenia são ferramentas indiscutivelmente úteis à pecuária moderna. De acordo com o Relatório da USDA 2009 o Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo e o Relatório Anual da IETS (*International Embryo Transfer Society*) 2008 informa que o Brasil detém 32,8% da produção mundial de embriões bovinos e 86,6% da produção de embriões *in vitro*.

Apesar do grande avanço tecnológico conseguido com as biotécnicas de reprodução, a eficiência ainda é muito baixa. Na TE, a taxa de concepção está em torno de 50%. Com relação à PIV, a taxa de blastocisto varia de 25 a 60% e a taxa de concepção de 30 a 50%. A clonagem por TN apresenta índices de sucesso ainda menores, onde vários fatores podem afetar a eficiência dessa técnica. Na TE, a capacidade de um animal responder à superovulação, a dose de hormônio utilizada, o estado nutricional e a sincronia entre o embrião e a receptora são os principais fatores que interferem na sua eficiência. Com relação à PIV, a manipulação dos ovócitos e embriões e as condições ambientais *in vitro*, como a composição dos meios de cultivo, podem influenciar a eficiência da técnica. Na clonagem, além dos problemas do cultivo *in vitro* já mencionados acima, a correta reprogramação nuclear, que deve acontecer com o genoma a ser clonado, é um dos principais obstáculos para

o sucesso da técnica. Tanto após uma fecundação natural, quanto no caso da clonagem, após a TN, um padrão epigenético preexistente nos gametas ou na célula doadora necessariamente tem que ser desfeito para em seguida ser restabelecido. No entanto, faltam estudos epigenéticos em várias espécies animais, inclusive na bovina para melhor entender a reprogramação epigenética e o processo da clonagem.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar, em fibroblastos bovinos, os efeitos do cultivo *in vitro* com a procaína sobre padrões de metilação do DNA.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Estabelecer o cultivo *in vitro* de fibroblastos em meios com diferentes concentrações de procaína, partindo de informações de Villar-Garea (2005);
- 2) Avaliar o crescimento de fibroblastos *in vitro* na presença dessa substância;
- 3) Analisar o cariótipo das células em cultivo;
- 4) Analisar o padrão de metilação no DNA em duas DMR, que controlam a expressão dos genes *IGF2* e *XIST*, nas células cultivadas com diferentes concentrações de procaína;

### 3. HIPÓTESES

- 1) O cultivo *in vitro* de células com a procaína é viável;
- 2) Fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com a procaína apresentam um padrão de DNA hipometilado em relação ao grupo controle.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Epigenética

Apesar de todas as células, de um organismo multicelular, possuírem o mesmo genoma, esse não se apresenta totalmente ativo. Um determinado tipo celular possui áreas do DNA que estão mais ativas e menos enoveladas (eucromatina), enquanto as outras áreas estão mais compactadas e silenciadas (heterocromatina), desempenhando suas funções. Atualmente, sabe-se que muitos eventos epigenéticos são responsáveis por controlar a expressão de genes ao longo da vida celular (revisado por LUND; van LOHUIZEN, 2004). A epigenética é o campo da ciência que estuda os fatores que se ligam ao DNA, mas que não alteram a sua seqüência ou estrutura primária (revisado por LAIRD et al., 2004), mas são capazes de alterar a expressão gênica e o fenótipo das células (revisado por SASAKI; MATSUI, 2008). Além disso, são marcas transmitidas mitoticamente e meioticamente (revisado por FULKA et al., 2008). Os eventos epigenéticos mais conhecidos são metilação de DNA, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, “sumoylation”, nitrilação, ADP-ribosilação, glicosilação entre outras modificações pós-traducionais (PTMs) que as histonas sofrem (revisado por STRAHL; ALLIS, 2000; JUNUWEIN; ALLIS, 2001; revisado por EILERTSEN et al., 2007). Essas modificações são marcas reversíveis e podem ser afetadas por estímulos ambientais como o estado nutricional, no caso de animais, e a temperatura, no caso das plantas (revisado por JAENISCH; BIRD, 2003).

O padrão epigenético do genoma é determinante para o controle dos genes *imprinted*, para a inativação do cromossomo X, para o silenciamento de elementos repetitivos do genoma, à regulação da expressão gênica, estrutura de cromatina, diferenciação celular

contribuindo para a formação dos tecidos, e ao processo do desenvolvimento embrionário (revisto por BIRD et al., 2002; revisto por BERNSTEIN; LANDER, 2007).

#### **4.2 Metilação de DNA**

Entre os eventos epigenéticos, o mais estudado é a metilação do DNA, correspondendo a um processo dinâmico, que depende da suplementação de grupos metálicos (revisto por ROSS, 2003), e possui uma relação com todas as modificações das histonas (revisto por REIK; WALTER, 2001). Além disso, ela pode conferir a memória celular independentemente da divisão celular, enquanto as modificações das histonas possuem essa capacidade limitada (revisto por EILERTSEN et al., 2007). A metilação é uma ligação covalente ao DNA, estável e ocorre pela inserção de um grupo metil no carbono 5 de citosinas em dinucleotídeos CpG (de mamíferos) (RAMCHANDANI et al., 1999) ou de sequências CpHpG (H=A,T,G) em plantas (revisto por LAIRD, 2010). Ela ocorre em regiões de intensa repetição conhecidas como ilhas CpG (revisto por MIRANDA; JONES, 2007), habitualmente associadas a domínios 5' dos genes com regiões de nucleossomos livres e associados às proteínas (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999). As citosinas do DNA podem sofrer reação de desaminação espontaneamente, formando uracila. Essas são excisadas pela enzima uracil-DNA glicosilase iniciando um processo de mecanismo de reparo. No entanto, as 5- metil-citosinas também sofrem desaminação formando timinas, as quais não sofrem o mesmo mecanismo de reparo, podendo gerar uma mutação espontânea (DUNCAN; MILLER, 1980). Quando ocorre a metilação no DNA, a região está inativada com um empacotamento maior da cromatina (revisto por BIRD, 1986) e os fatores de transcrição não possuem acesso ao DNA bloqueando a expressão gênica local (WATT; MOLLOY, 1988; IGUCHI-ARIGA; SCHAFFNER, 1989).

As ilhas CpG correspondem a 3% do genoma total e são foco de pesquisas em câncer, no processo de diferenciação celular e na clonagem de mamíferos. Normalmente as ilhas CpG estão localizadas em regiões promotoras, em domínios diferencialmente metilados (DMR) ou em regiões controladoras de *imprinting* (ICR). A região promotora pode sofrer metilação de DNA para auxiliar o controle da expressão gênica e ser um evento comum aos dois alelos. A DMR pode ocorrer em regiões promotoras, mas necessariamente possui a metilação em apenas um dos alelos; característica muito comum de genes *imprinting*. Se uma DMR estiver localizada fora de uma região promotora, e for responsável pela manutenção de um locus, de genes *imprinting*, refere-se a uma região controladora de *imprinting* (ICR) (GEBERT et al., 2009).

A metilação do DNA ocorre pela reação de transmetilação catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs). O radical metil pode ser proveniente da S-adenosil-L-metionina (SAM), o maior doador de grupamento metil no sistema fisiológico (revisto por DELAGE; DASHWOOD, 2008). Alguns autores afirmam que a DNMT1 mantém o padrão de metilação após cada replicação celular somática (SEN et al., 2010). A fita hemimetilada é reconhecida pela proteína UHRF1 que recruta a DNMT1 sustentando o perfil epigenético (BARRETO et al., 2007). A diminuição dessa enzima pode estar correlacionada a um processo de diferenciação celular, já que mantém o padrão de expressão dos genes e reprime a diferenciação em células-tronco epidermais (SEN et al., 2010). Já as DNMT 3a, 3b e 3L estabelecem o perfil de metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário e sua expressão diminui ao longo do desenvolvimento (KANG et al., 2001; revisto por YANG et al., 2007). Apesar da DNMT 3L não possuir um sítio ativo, auxilia no estabelecimento do *imprinting* materno (BOURC'HIS et al., 2001). No entanto, Kim et al. (2002) e Liang et al. (2002), relatam que não existe distinção entre as DNMTs na metilação *de novo* e na

hemimetilação; as enzimas funcionam como um complexo multiprotéico e trabalham juntas para manter o padrão epigenético de metilação.

### **4.3 Código das histonas**

A informação genética de eucariotos, o DNA, é organizada em unidades estruturais fundamentais conhecidas como nucleossomos. Cada nucleossomo é formado por 8 moléculas de histonas, duas cópias da H3, H4, H2A e H2B sendo envolvido por aproximadamente 146 pb de nucleotídeos da fita de DNA. A ligação dessas unidades do DNA ocorre pela histona H1. Além disso, as extremidades N-terminais das histonas H3, H4, H2A, H2B se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer várias modificações pós-traducionais (PTM) formando uma dinâmica estrutural da cromatina (revisto por JENUWEIN; ALLIS, 2001).

As PTMs mais estudadas em resíduos de lisina são a acetilação e a metilação (mono, di e trimetilação); as argininas podem sofrer mono ou dimetilação simétrica ou assimétrica, enquanto as serinas e treoninas sofrem fosforilação. As modificações ocorrem em resíduos específicos e formam um verdadeiro código das histonas, onde a estrutura final de todas as PTMs irão determinar o grau de compactação da cromatina (revisto por EILERTSEN et al., 2007), influenciando na expressão gênica.

A fosforilação das histonas H1 e H3 é associada com a condensação de cromossomos durante a mitose e meiose (revisto por GARCIA et al., 2007). Segundo o trabalho de Rice et al. (2003), as H3K9me1 e H3K9me2 estão presentes em eucromatina silenciada enquanto a H3K9me3 está localizada nos pericentros de heterocromatina. A metilação de arginina em histonas está envolvida na ativação de genes, e as metilases são recrutadas em regiões promotoras como co-ativadores. Já a atividade da família das lisinas metiltransferases ocorre no silenciamento gênico de heterocromatina. A lisina metilada somada aos resíduos

fosforilados forma uma estrutura que resulta na perda de efetores (FISCHELE et al., 2005). A acetilação específica nos resíduos de lisina da H3 é associada ao processo biológico de transcrição, sendo altamente conservada em H4K5 e H4K12 (revisto por GARCIA et al., 2007).

Muitas são as modificações nas histonas e acredita-se que a especificidade das enzimas ocorre por uma sincronização extremamente organizada. Um evento ocorre primeiro para que a enzima subsequente reconheça seu sítio alvo de maneira dependente das conformações e das modificações presentes em um determinado momento do ciclo celular (revisto por STRAHL; ALLIS, 2000).

A literatura sugere três modelos da interdependência entre a metilação das histonas e a metilação do DNA. O primeiro modelo relata que as DNMTs ao metilarem o DNA, essa nova estrutura recruta proteínas ligantes à metil-CpG, e logo as histonas são desacetiladas por enzimas histonas desacetilases (HDAC), e podem ser metiladas por histonas metiltransferases (HTM). O segundo modelo sugere que a metilação das histonas [metilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9)] ligada a proteínas de heterocromatina podem recrutar DNMTs e metilar o DNA (JACKSON et al., 2002). O terceiro modelo sugere que as proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP e da atividade de DNA helicase aumentem o acesso da estrutura do nucleossomo e facilitem a metilação do DNA e modificações das histonas por ação das DNMTs, HDACs e HTMs (revisto por LI, 2002).

#### **4.4 Metodologias para avaliar metilação de DNA**

Existem várias metodologias para avaliar o padrão de metilação de DNA (revisto por LAIRD, 2010). As primeiras análises foram realizadas ao final dos anos 70 e início dos 80

utilizando enzimas de restrição, eletroforese e *Southern Blot* (GAUTIER et al., 1977; van der PLOEG; Flavel, 1980). As metodologias utilizando hibridização não são capazes de distinguir a citosina metilada da desmetilada. Além disso, a PCR e a clonagem são métodos que geram a perda da marca de metilação, pois nestes processos não estão presentes as DNMTs. Atualmente as técnicas mais utilizadas para verificar metilação de DNA são baseadas em enzimas de restrição, hibridação ou conversão com bissulfato de sódio (revisto por LAIRD, 2010).

A técnica de RLGS (*Restriction Landmark Genomic Scanning*) foi a primeira a diferenciar perfil de metilação de DNA. A detecção ocorre pela diferença de fragmentos gerados por enzimas endonucleases sensíveis à metilação separados por eletroforese em duas dimensões (SMIRAGLIA et al., 2007). Atualmente essa técnica é muito utilizada para localização de *loci imprinted* e sítios de metilação em câncer ou de tecidos específicos (revisto por LAIRD, 2010). No entanto, requer uma grande quantidade de material inicial dos genomas, intensa atividade de laboratório e complexa avaliação bidimensional do padrão de DNA.

A PCR sensível à metilação com iniciadores arbitrários MS AP PCR (*Methylation sensitive Arbitrarily Primed PCR*) descrita por Liang et al. (2002) e Amplificação de Sítios Inter-Metilados (AIMS) ocorre com a digestão do DNA genômico com enzimas isoesquizômeras sensíveis ou resistentes à metilação (revisto por LAIRD, 2010). Após a digestão o material genético é amplificado por PCR utilizando iniciadores arbitrários e com uma baixa temperatura de anelamento. Vários fragmentos de DNA são amplificados e após eletroforese, é possível verificar as DMR entre grupos de interesse e identificá-las por sequenciamento. Essas técnicas são muito utilizadas em linhagens celulares cancerosas (LIANG et al., 2002, LUO et al., 2003). No entanto, existe uma limitação quanto à restrição dos sítios das enzimas sensíveis à metilação, onde a digestão incompleta gera falso-positivos.

Alguns trabalhos analisam metilação global por meio da imunodeteccção utilizando anticorpos monoclonais contra 5 metilcitosina (CASTILHO et al., 1999), ou quantificam a metilação de DNA em ilhas CpG por espectrometria de massa MALDI (TOST, et al., 2003).

Segundo Wang et al. (1980), o bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) pode ser utilizado para avaliar padrões de metilação de DNA. Essa molécula é capaz de transformar citosinas em uracilas por reações de desaminação em DNA desnaturado. Se a citosina estiver metilada, essa reação não acontece de imediato, permanecendo a citosina inalterada. O primeiro trabalho a utilizar essa metodologia foi realizado por Frommer et al. (1992). Após o tratamento com bissulfito de sódio, o material genético pode ser amplificado por PCR, onde as uracilas são substituídas por timinas, o fragmento amplificado é clonado e sequenciado. Algumas das principais técnicas utilizadas para estudos de metilação de DNA encontram-se descritas na revisão de Lair (2010).

#### **4.5 Reprogramação nuclear e genes *imprinting***

Durante o processo reprodutivo de mamíferos, os genomas materno e paterno são necessários para o desenvolvimento embrionário e pós-natal normal (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999). Quando ocorre a união das células germinativas, o zigoto formado é uma célula indiferenciada e totipotente. Ao longo do desenvolvimento embrionário, as células começam a sofrer especificidade e a originar os diversos tecidos do organismo, diminuindo a sua potencialidade de originar outros tipos celulares (revisto por HEMBERGER et al., 2009). Durante esse período, o genoma do indivíduo formado sofre uma desprogramação e programação epigenética global a ser realizada por elementos genéticos do ovócito. Acredita-se que as histonas primeiramente são acetiladas e desmetiladas ao longo das sucessivas mitoses e, à medida que as células se diferenciam, as histonas são desacetiladas e metiladas.

As outras PTMs das histonas provavelmente seguem um padrão em relação à metilação dessas proteínas (revisto por STRAHL; ALLIS, 2000). A metilação do DNA diminui gradativamente chegando a quase não ocorrer, e apesar de existir uma variação entre as espécies, alguns autores afirmam que esse estágio em embriões bovinos e de camundongos corresponde à mórula (BOURC'HIS et al., 2001), enquanto outros defendem que ocorre aproximadamente com 64 horas após a fecundação no estágio de 8-16 células (revisto por REIK et al., 2001; GEBERT et al., 2009), ou ainda no estágio de blastocisto (KANG, 2001; revisto por YANG et al., 2007). Recentemente, Albert e Peters (2009) afirmaram que em embriões de camundongos, os blastômeros no estágio de 8 células iniciam o processo de polarização e compactação, expressando os fatores de transcrição *OCT3* e *OCT4*, *TEAD4* e *CDX2*. A diferença na expressão gênica entre essas células pode estar relacionada ao início da programação epigenética. Após as clivagens simétricas e assimétricas (mórula), as células são divididas pela localização superficial, expressando mais *CDX2*, ou no espaço interno da estrutura, expressando mais *OCT3* e 4. Esses eventos determinariam a primeira especificação de linhagem celular, enquanto a separação celular no estágio de blastocisto seria a segunda linhagem específica (ALBERT; PETERS, 2009).

O pronúcleo masculino sofre uma rápida perda de metilação de DNA por sofrer ação de, por exemplo, *GADD45A* e *B* que interagem com complexos de desmetilases (BARRETO et al., 2007; MA et al., 2009), causando um processo de desmetilação ativa (revisto por REIK; WALTER, 2001), além de ocorrer um aumento da dimetilação na lisina 9 da histona H3 (*H3K9me2*) e *H3K27me3* (revisto por HEMBERGER et al., 2009). Além disso, as protaminas provenientes do gameta masculino precisam ser rapidamente substituídas por histonas acetiladas, originadas do citoplasma do ovócito (revisto por REIK et al., 2001, 2003; revisto por McLAY; CLARKE, 2003; HEIJDEN et al., 2005), para que inicie a duplicação do seu material genético antes do pró-núcleo feminino, na fase S do ciclo celular (KITSBERG et

al., 1993; revisto por REIK et al., 2003). Outros trabalhos também observaram essa diferença entre os 2 genomas parentais na reprogramação e no remodelamento do genoma parental (MAYER et al., 2000; revisto por SANTOS; DEAN, 2004; SANTOS et al., 2005).

O pronúcleo feminino sofre desmetilação passiva, deixando de ser metilado durante as divisões celulares (revisto por REIK; WALTER, 2001) por ocorrer uma saída da DNMT1 de ovócitos de dentro do núcleo, a qual pode voltar em outro momento (DEAN et al., 2001; revisto por HEMBERGER et al., 2009). As primeiras divisões das células embrionárias proporcionam um padrão epigenético específico para o trofoblasto e outro para a massa celular interna (MCI) do embrião durante a fase de blastocisto. O trofoblasto possui menos metilação de DNA, H3K27me3 e acetilação de H3K9 (H3K9ac) em relação à MCI (revisto por HEMBERGER et al., 2009).

Entretanto, não é todo o genoma que sofre essa reprogramação durante a embriogênese. Existe a exceção dos genes *imprinting* (genes de expressão monoalélica, marcados de modo sexo-específico), que devem manter o seu perfil de expressão durante essa fase. Os genes *imprinting* ocorrem tanto em mamíferos quanto em plantas angiospermas e são controlados por fatores epigenéticos (GEHRING et al., 2009). Em mamíferos são importantes para a gametogênese, no desenvolvimento embrionário inicial e na placentação (PEDONE et al., 1999). As ICRs e os retrotransposons são protegidos da desmetilação global pela proteína materna Stella e pela DNMT1o de ovócitos (GEHRING et al., 2009). Estudos com recombinação homóloga em camundongos mostram que DMRs individuais são importantes para a expressão dos genes *imprinted* (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999)

A segunda fase de desprogramação da metilação do DNA refere-se aos genes *imprinted* ocorrendo apenas no genoma das células germinativas primordiais (CGP) (PEDONE et al., 1999) para adquirirem o padrão epigenético adequado ao sexo do indivíduo em desenvolvimento (revisto por REIK; WALTER, 2001). Antes disso, em embriões de

camundongos com 8,5 dias (D8,5), as CGP iniciais possuem uma perda da metilação de DNA e uma diminuição da H3K9me2 concomitante com o aumento de H3K27me3. Essas CGP iniciais também possuem muitas metilações simétricas em arginina 3 das histonas H4 e H2A (H4/H2AR3me2s) e H3K4me2, H3K4me3 e H3K9ac. Logo após, nos embriões em D11,5-13,5, essas células sofrem uma segunda fase de reprogramação onde a metilação de DNA *imprinting* e a metilação de DNA de outras regiões do genoma são apagadas juntas. Nessa fase, as CGPs possuem um núcleo aumentado, perdem ou diminuem a regulação da histona ligante H1, H3K9me3, H3K27me3, H4/H2AR3me2s, H2A.Z e H3R26me2, e os fatores que estão associados à heterocromatina facultativa ou constitutiva desaparecem ou são redistribuídos (revisto por HEMBERGER et al., 2009). Todos esses eventos epigenéticos são importantes para garantir um padrão de expressão gênica único dessas células, a divisão celular por meiose e a integridade dos cromossomos (revisto por SASAKI; MATSUI, 2008).

As duas fitas do DNA que estavam desmetiladas irão receber um novo padrão de metilação dependendo da especificidade celular e do meio ambiente onde se encontram, pelo processo de metilação *de novo*. Esse tipo de metilação ocorre por proteínas específicas ligantes de DNA metilado, as sp1-MeCP, que marcam as ilhas CpG (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999) que devem sofrer ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMT) 3a, 3b e 3L. A expressão dessas enzimas ocorre no início do desenvolvimento embrionário e diminui ao longo da diferenciação celular (KANG et al., 2001; revisto por YANG, et al., 2007). O estágio de 8-16 células coincide com dois eventos importantes em bovinos: 1) ativação transcricional do genoma embrionário onde supõem-se que as enzimas DNMTs 3a e 3b estão ativas nesse estágio (MEMILI; FIRST, 1999). 2) Ocorre a entrada da DNMT1 no núcleo em um ciclo celular para a manutenção da metilação dos genes *imprinting* (HOWELL et al., 2001). Experimentos com nocaute gênico dessas enzimas, em embriões de camundongos, apresentaram desenvolvimento anormal e letalidade (revisto por REIK et al., 2001). De

maneira assimétrica, o genoma materno sofre metilação *de novo* no estágio de zigoto de camundongos logo após a fecundação e antes da primeira replicação (OSWALD et al., 2000). Uma vez que a célula adquiriu um padrão genômico de metilação de DNA, ela irá transmiti-lo a cada divisão celular, pois as fitas hemimetiladas logo sofrem ação de DNMT1 para garantirem o perfil epigenético nas duas fitas do DNA após a replicação. Segundo a revisão de Feil e Khosla (1999), as MeCP2 ligam-se à 5 metC e recrutam um complexo multiproteico que desacetila as histonas e alteram a conformação da cromatina.

O genoma das CGP possui o seu perfil epigenético *imprinting* totalmente estabelecido em períodos diferentes em indivíduos machos ou fêmeas (revisto por REIK, 2007). A reprogramação dos genes *imprinting* é necessária para retirar o perfil epigenético herdado e reduzir as mutações, adquiridas por efeitos ambientais, por meio da desaminação de 5-metilcitosinas (revisto por REIK et al., 2001). Uma vez adquirido os padrões de metilação nas DMRs, essas são mantidas durante todo o desenvolvimento (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999).

O modelo epigenômico *in vivo* dos genes *imprinting* nas CGP ainda não está estabelecido para bovinos (LIU et al., 2008). No entanto, a marcação desses genes pode ocorrer de várias formas. Por exemplo, a repressão dos genes *imprinted* no alelo materno, pode ocorrer por metilação de DNA nas DMRs específicas. Já a repressão dos genes *imprinted* no alelo paterno pode ocorrer por um produto de transcrição *anti-sense*, auxiliando no silenciamento de uma região promotora em *cis*. A metilação de DNA no alelo materno pode levar também à inativação de uma região responsável por transcritos *anti-sense*. Além disso, uma ICR materna metilada pode ser funcional de genes em *clusters* reprimindo os genes em *cis*, enquanto a desmetilação no alelo paterno para a mesma região estaria promovendo a transcrição em *cluster*. Isso acontece, por exemplo, para os genes *IGF2* e *H19*

(revisto por REIK et al., 2001; revisto por FERGUSON-SMITH; SURANI, 2001), que serão explicados posteriormente.

Quando as células germinativas primordiais (CGP) apresentam um padrão de DNA desmetilado, elas se comportam de maneira diferente entre os indivíduos do sexo feminino ou masculino. Essas células com esse perfil epigenético entram em mitose nos machos e em meiose nas fêmeas (revisto por REIK et al., 2001). Após a multiplicação das CGP masculinas, essas sofrem remetilação para iniciar a meiose (revisto por REIK et al., 2001). Além disso, parece existir uma diferença para o período de remetilação nos genes *imprinted* nos alelos masculinos e femininos nas CGP. Acredita-se que essa remetilação ocorre mais cedo nas CGP masculinas, no estágio de pró-espermetogônia em embriões E15-E16 de camundongos. Já nas CGPs femininas, a remetilação começa após o nascimento, durante o crescimento do ovócito (revisto por REIK et al., 2001; revisto por SASAKI; MATSUI, 2008) pela isoforma de DNMT1 que essa célula possui (revisto por REIK et al., 2001; revisto por YANG et al., 2007).

As células gaméticas maturadas de mamíferos são altamente metiladas em relação às células somáticas, podendo ocorrer diferenças em padrões específicos (revisto por REIK et al., 2001). Segundo Fagundes (2009), os ovócitos imaturos de folículos menores que 3 mm de bovinos apresentam um padrão de metilação de DNA menor do que os de folículos maiores ou igual a 8 mm. Além disso, os ovócitos dos folículos de 3 mm maturados *in vitro* apresentaram maior metilação do que os imaturos, enfatizando que ao final da maturação, esses ovócitos ainda não finalizaram o seu perfil epigenético (FAGUNDES, 2009). Mas, existe a possibilidade do processo de metilação do DNA *imprinting* materno ser finalizado mesmo após a fecundação (revisto por REIK et al., 2001).

#### 4.6 Transferência nuclear

Na transferência nuclear de célula somática (TNCS), uma célula doadora de núcleo ou um carioplasto (núcleo celular com um pouco de citoplasma) é introduzido(a) em um ovócito enucleado e sofre uma ativação artificial para o desenvolvimento de um indivíduo geneticamente idêntico ao que doou o núcleo. No entanto, o carioplasto é uma célula diferenciada, possuindo um padrão epigenético muito diferente dos gametas e precisa se tornar indiferenciada novamente para o sucesso da técnica (revisto por JAENISCH; BIRD, 2003; revisto por NIEMANN et al., 2008).

Apesar da utilização e o sucesso das técnicas de reprodução artificial como a PIV, TNCS, elas podem causar alterações de genes *imprinted* e outras modificações epigenéticas (LI et al., 2005). A composição dos meios de cultivo pode afetar de maneira negativa a qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Vários trabalhos mostram o efeito da presença do soro e de aminoácidos sobre a expressão de genes nos embriões (WRENZYCKI et al., 1999; KHOSLA et al., 2001; YOUNG et al., 2001; revisto por FAIRBURN et al., 2002; RINAUDO; SCHULTZ, 2004). Além disso, a concentração de oxigênio no sistema *in vitro* pode estar relacionada com o estresse oxidativo nas células (HARVEY et al., 2004; GARDNER; LANE 2005; CORRÊA et al., 2008). Consequentemente, o cultivo *in vitro* e a utilização de hormônios podem afetar os padrões de metilação no DNA, proporcionando uma alteração na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e de placentação (SHI; HAAF, 2002; LUDWIG et al., 2004; revisto por LUCIFERO et al., 2004; SATO et al., 2007).

É importante que o ovócito a ser utilizado seja de qualidade e contenha toda a maquinaria necessária para a reprogramação epigenética. A maturação do ovócito depende muito do ambiente onde ele se encontra e, alguns trabalhos relatam a diferença entre os que

sofreram maturação *in vivo* e *in vitro* (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000; FULKA et al., 2008; KATZ-JAFFEE et al., 2009). Durante a ovogênese os transcritos maternos devem ser produzidos e armazenados para a complementação da meiose, fecundação, descondensação da cabeça do espermatozóide, garantir as divisões mitóticas no início do desenvolvimento embrionário (KATZ-JAFFE et al., 2009) e a reprogramação epigenética (revisto por SASAKI; MATSUI, 2008) até a ativação do genoma embrionário (revisto por SOLTER, 2000). Além disso, GIOIA et al. (2005), informam que o padrão de desmetilação do ovócito de suínos está relacionado à sua qualidade de maturação. O ovócito maturado *in vivo* possui uma eficiência maior em relação aos maturados *in vitro* para desmetilar o DNA paterno durante o início do desenvolvimento (LIANG et al., 2008).

O embrião proveniente da TN além de se reprogramar em um espaço de tempo mais curto que no sistema natural (revisto por SOLTER, 2000; revisto por SASAKI; MATSUI, 2008), a remetilação do DNA ocorre antes, no estágio de 4 células (DEAN et al., 2001; revisto por REIK et al., 2001; KANG et al., 2001). Consequentemente, as células mantêm um padrão hipermetilado, inviabilizando o desenvolvimento. Mesmo que os embriões consigam se desenvolver até a fase de blastocisto, muitos se perdem após a fase de implantação (revisto por CIBELLI et al., 2002), entre os primeiros 30 a 90 dias de gestação, por exemplo, por problemas de placentação (HILL et al., 2000) ou anormalidade fetais relacionados a expressão alterada, principalmente dos *imprinted* (HAN et al., 2003; revisto por YANG et al., 2007; MOORE et al., 2007; LONG; CAI, 2007; SUTEEVUN-PHERMTHAI et al., 2009). Apenas os embriões que conseguem se reprogramar corretamente são capazes de se desenvolver até a fase adulta (revisto por SASAKI; MATSUI, 2008). Com o avanço do projeto genômico de bovinos é possível estudar os eventos de metilação de DNA de genes *imprinting* e buscar informações sobre a reprogramação na clonagem para melhorar a TN (LIU et al., 2008).

Anomalias como a falta ou o excesso de peso ao nascimento também são observadas em crianças obtidas pelas tecnologias de reprodução assistida (SCHIEVE et al., 2002; revisto por ALLEN; REARDON, 2005). A ineficiência e as alterações encontradas podem ser causadas pela reprogramação epigenética incompleta (DEAN et al., 2001). Alguns trabalhos relatam que bovinos clones que não sobreviveram apresentaram expressão bialélica de genes *imprinting* como o *XIST*, *MAOA*, *H19*, *IGF2* e *IGF2R*, enquanto que os que sobreviveram apresentavam expressão normal (XUE et al., 2002; YANG et al., 2005). Apesar de tudo, a eficiência da TNCS em bovinos é maior do que em qualquer outra espécie, sendo a porcentagem de descendentes transferidos em torno de 10-25% tendo os blastômeros como núcleo doador, 10-20% utilizando fibroblasto fetal, 4-29% de fibroblasto fetal transgênico e 11 % de células adultas. Para outras espécies, como ovinos, suínos e camundongos, as taxas são menores (revisto por KEEFER, 2008).

O tipo de célula doadora de núcleo ou de carioplasto que se utiliza nessa técnica também pode influenciar no sucesso da técnica (POWELL et al., 2004; revisto por KEEFER, 2008). Segundo Liu et al. (2001) as melhores passagens para a TN variam entre P5 e P10. A linhagem celular de fibroblasto fetal de um clone apresenta um percentual da taxa de blastocisto maior do que de fibroblasto adulto (DRIESSEN, 2008). Isso porque as células fetais apresentaram um padrão de metilação menor do que as células adultas para um gene importante durante o desenvolvimento embrionário (MICHALCZECHEN-LACERDA et al., 2009). Além disso, a célula doadora de núcleo e o citoplasma receptor possuem herança mitocondrial diferentes, que também pode influenciar na competência do desenvolvimento (FU et al., 2008).

A coordenação do ciclo celular entre o carioplasto doador e o citoplasma receptor é um ponto crítico para a TNCS. O núcleo e o citoplasma devem estar na mesma fase do ciclo celular para garantir o sucesso da TN. Para isso, testes com ausência de soro (soroprivação), e

substâncias como a roscovitina e o nocodazol, que sincronizam o ciclo celular, já foram utilizados. No entanto, os tratamentos não farmacêuticos como a soroprivação ou a subconfluência celular em torno de 90-95% causam a parada no ciclo celular em G0, e essas células mostram-se mais eficientes na TN. Além disso, o tipo de ativação artificial a ser utilizada influencia no sucesso da técnica. Após a fecundação natural ocorre um aumento de cálcio, inibição de fosforilação e síntese de proteínas que ativam o desenvolvimento embrionário. Substâncias como a 6-dimetilaminopurina ou ciclohaximida promovem o aumento de fatores que promovem a maturação de proteínas quinases ativadas por mitógenos para reconstruir o zigoto a formar os “pró-núcleos” e iniciar o desenvolvimento embrionário (revisto por KEEFER, 2008).

Finalmente, tentar entender estes mecanismos epigenéticos, possivelmente susceptíveis às agressões dos sistemas de produção *in vitro*, e tentar controlá-los é de fundamental importância para se obter um bom núcleo doador, almejando melhores índices de produção de embriões clones em animais (revisto por EILERTSEN et al., 2007).

#### **4.7 Substâncias desmetilantes de DNA**

Vários trabalhos vem utilizando diferentes substâncias adicionadas ao cultivo celular para desmetilar o genoma, como por exemplo, a 5-aza-2-deoxicitidina (zdC), a D-Hidralazina, a procainamida, a procaína, a S-adenosil-L-homocisteína (SAH). A zdC é um análogo de nucleosídeo e poderoso inibidor da metilação do DNA, sendo incorporado às moléculas de DNA das células em divisão inibindo a ação das DNMTs. Alguns trabalhos mostram que sua utilização é capaz de reativar genes supressores de tumor e induzir a morte celular, revertendo a situação clínica do câncer (APARICIO et al., 2003; VILLAR-GAREA, 2005). A procainamida é uma amida com o 2-(dietilamino) etilamina, derivada do ácido 4-

aminobenzóico considerado um inibidor não nucleosídeo da metilação do DNA. Já foi comprovado o seu efeito na reativação da transcrição do gene RAR $\beta$ 2 supressor de tumores (VILLAR-GAREA et al., 2003), apesar do mecanismo de ação ainda não estar determinado. Acredita-se que haja competição entre a procainamida e o DNA pelo sítio de ligação das enzimas trasmetilases (DENG et al., 2003). A zdC, a procainamida são inibidores de metilação de DNA, mas a primeira se mostra com uma eficácia maior (VILLAR-GAREA, 2005). Outras substâncias desmetilantes de DNA não análogas de nucleosídeo são a procaína e a S-adenosil-L-homocisteína (SAH). A procaína possui efeito inibitório sobre o crescimento de células cancerosas humanas (VILLAR-GAREA et al., 2003; TADA et al., 2007), interagindo ao genoma em regiões ricas em CpG e impedindo a ação das DNMTs (revisto por KORKMAZ; REITER, 2008). A procaína é um composto semelhante à procainamida, mas elas possuem ações distintas em suas interações com proteínas, DNA e outras biomoléculas. Já a SAH é produto da reação de transmetilação envolvendo a S-adenosil-L-metionina (SAM) sendo encontrada no núcleo celular, no citoplasma e meio extracelular. O aumento de SAH faz essa molécula ligar-se ao sítio ativo das DNMTs, diminuindo as reações de metilação (JEON et al., 2008). A razão entre SAM/SAH funciona com um indicador do potencial de metilação local (CASTRO et al., 2005). Além disso, Jeon et al. (2008), ao utilizarem SAH em meio de cultivo de células doadoras de núcleo de bovinos para realizar a TN, obtiveram uma indução da desmetilação global, reativação parcial do cromossomo X inativo e um aumento significativo de blastocistos e blastocistos expandidos. Um importante fato é que a procaína, assim como outras substâncias não análogas de nucleosídeos, não é incorporada à molécula de DNA e não possuem efeitos citotóxicos como a zdC..

A SAM é considerada o principal doador de grupamento metil no organismo. Após a sua degradação existem duas vias bioquímicas que recuperam a metionina a partir da homocisteína: 1) a do ácido fólico, utilizando metiltetrahidrofolato; 2) a da betaína (produto

da oxidação enzimática da colina. Seguindo a via bioquímica, a metionina entra na composição da SAM, doa o grupo metil para reações de metilação, liberando SAH a qual é degradada em L-homocisteína e adenosil. A L-homocisteína é recuperada em metionina e inicia o ciclo novamente (KLEE et al., 1961). Em mamíferos, o metabolismo de um carbono depende do fornecimento do grupo metil, de doadores e de cofatores, como o folato, a metionina, a vitamina B12, a colina e a betaína, que podem influenciar indiretamente nos níveis de SAM/SAH na célula, e conseqüentemente no percentual de metilação de DNA (revisto por DELAGE; DASHWOOD, 2008). Segundo o trabalho de Kovacheva et al. (2007), excesso de SAM na dieta camundongos fêmeas em período de gestação, não foi capaz de induzir uma hipermetilação de DNA no genoma dos embriões, mas garantiu o padrão epigenético fisiológico. No entanto, os animais que foram submetido às altas concentrações de SAH no mesmo período de prenhes, em primeiro momento ocorreu uma hipometilação de DNA nos embriões, mas nos estádios mais tardios do desenvolvimento observaram um DNA hipermetilado. A hipometilação de DNA inicial pode promover a expressão das DNMTs, e essas enzimas acabam metilando o DNA de maneira alterada devido à restrição alimentar (KOVACHEVA et al., 2007).

#### **4.8 A procaína**

A procaína (para-amino-benzoil-dietilamino-etanol) foi sintetizada pela primeira vez em 1898 pelo cientista alemão Alfred Einhorn. Ela sofre hidrólise por procainesterase ou por pseudocolinesterase, a qual é sintetizada no fígado e possui atividade enzimática no plasma e no fígado (USUBIAGA; WIKINSKI, 1964). Após a degradação os produtos liberados são o

ácido para-aminobenzóico (PABA) e o álcool dietilamino (princípio ativo da procaína) (FIALHO, 1986; MASSONE, 1988; FANTONI et al., 2006). Sua propriedade anestésica foi descoberta em 1905, quando também se iniciou a sua utilização em clínicas médicas. É uma substância solúvel em água ou álcool, e não apresenta ação como anestésico superficial (FIALHO, 1986). Todo anestésico local possui sua fórmula constituída de três partes: 1) radical aromático (ácido paraminobenzóico - PABA) que se une aos lipídeos de membrana do tecido nervoso; 2) cadeia intermediária, que pode ser um éster ou amida unindo as outras duas estruturas, mas que neste caso trata-se de um éster; 3) grupo ionizável, podendo ser uma amina secundária ou terciária, ligando-se às proteínas de membrana celular (MASSONE, 1988).

Por ser de baixa toxicidade, a procaína é utilizada pela medicina e pela medicina veterinária no tratamento de arritmia cardíaca por causar hipotensão arterial. A maioria dos anestésicos locais são bases fracas e o éster tem duração de ação curta, mas pode ter efeito prolongado se for adicionado de um vasoconstritor (WHITE; KATZUNG, 2006). O seu mecanismo de ação consiste no bloqueio de canais de sódio regulados por voltagem, na membrana celular de um axônio. Os anestésicos locais ligam-se a receptores próximos da extremidade intracelular dos canais de sódio abertos e os bloqueiam de forma tempo e voltagem dependente. Durante a excitação elétrica, os canais de sódio se abrem e causam uma despolarização de membrana por esses íons. Logo, os canais de sódio são inativados (fecham) e os de potássio se abrem para repolarizar a membrana em seu estado inicial. Os canais de sódio voltam ao estado de repouso e a membrana mantém o gradiente de íons através da bomba de sódio e potássio (WHITE; KATZUNG, 2006). O aumento de cálcio no meio extracelular antagoniza a ação dos fármacos por aumentar o potencial de superfície de membrana, favorecendo o estado de repouso de baixa afinidade (WHITE; KATZUNG, 2006).

De acordo com Abu-Salah e Gambo (2005) a procaína é capaz de inibir em 50% ATPases dependentes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (modo competitivo) e  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  (modo não competitivo) nas concentrações de 155 mM e 130 mM respectivamente, em membranas de eritrócitos humanos. Esse fármaco inibe a ação dessas enzimas de maneira dose dependente. Além disso, foi capaz de inibir em 92% o transporte de fosfato na concentração de 150 mM. A procaína inibe a ação enzimática das ATPases por mudar a conformação dessas proteínas, diminuindo também a fluidez de membrana das células utilizadas no experimento (ABU-SALAH; GAMBO 2005).

Essa substância foi utilizada pela primeira vez como agente desmetilante em linhagem celular cancerosa de mama de humanos MCF7 (VILLAR-GAREA et al., 2003). Por não ser incorporada ao DNA, não precisa de uma replicação para começar a interferir no processo de metilação de DNA. Além disso, é uma substância que apresenta baixa toxicidade, sendo capaz de reativar genes silenciados por hipermetilação (VILLAR-GAREA et al., 2003). Em células cancerosas ela induz a parada do ciclo celular em mitose (VILLAR-GAREA, 2005), e induz desmetilação de DNA à medida que se aumenta o período de tratamento e a concentração utilizada. Os estudos com carcinoma hepatocelular humano tratado com procaína também inibem a proliferação celular e a metilação de DNA (TADA et al., 2007). A procaína também possui efeito desmetilante de DNA em ensaios celulares e em tumores xenoinxerto em camundongos. Contudo, são necessárias concentrações em torno de 100–150  $\mu\text{M}$  para que a inibição da metilação seja eficiente (revisado por LYKO; BROWN, 2005).

No sistema *in vitro*, a procaína intercala no DNA exposto alterando a estrutura de forma B para forma Z. Essa ligação, no sistema fisiológico, deve interferir com a interação estrutural entre proteínas e DNA, incluindo a ligação de DNMTs (ZACHARIA; KOOPMAN, 1990). No entanto, parece que o anel benzeno e o grupo de nitrogênio da procaína também inibem o sítio ativo das DNMTs. Após essa descoberta, novas substâncias análogas,

utilizando a estrutura da procaína vem sendo sintetizadas para inibir as DNMTs e causar desmetilação global no genoma (CASTELLANO et al., 2008).

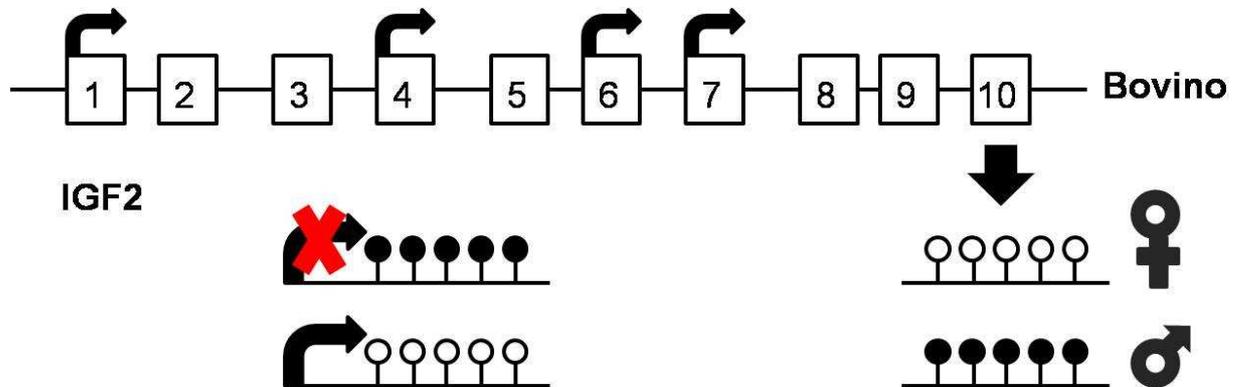
Contudo, não existem relatos da utilização da procaína como agente desmetilante de DNA em linhagens celulares somáticas ou células doadoras de núcleo com objetivo de desmetilar o genoma a fim de aumentar a eficiência da clonagem por transferência nuclear.

#### **4.9 IGF2**

O fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF2*) é um gene com 18618 pb, possui 10 éxons, localizado no cromossomo 29 de bovinos no *locus* 29qter. Codifica uma proteína com 72 resíduos de aminoácidos de aproximadamente 7 KDa (revisto por MOHAN; BAYLINK, 2002). Foi o primeiro gene *imprinting* a ser descoberto em camundongos (DeChiara et al., 1991), sendo importante para a regulação do crescimento e diferenciação celular (revisto por CHAO; D'AMORE, 2008) e encontra-se bem conservado entre as espécies de mamíferos (OHLSSON et al., 1993; RAINIER et al., 1993; FEIL et al., 1998; McLAREN ; MONTGOMERY, 1999; NEZER et al., 1999; DINDOT et al., 2004).

Uma das formas de controle da expressão desse gene ocorre por metilação de DNA na DMR da região promotora. O alelo paterno possui essa região hipometilada, promovendo a expressão do gene, enquanto o alelo materno possui essa mesma região com padrão hipermetilado, induzindo a repressão gênica (HARK et al., 2000; DINDOT et al., 2004). Para auxiliar no controle do *imprinting* nessa região promotora, foi constatado que no último éxon, encontra-se uma outra DMR importante (DINDOT et al., 2004). Em espermatozóides essa DMR do éxon 10 encontra-se completamente metilada, enquanto no ovócito essa região está

parcialmente metilada para as espécies bovina e suína (GEBERT et al., 2006; HAN et al., 2008; PARK et al., 2009; Fagundes, 2009)(Figura 1).



**Figura 1.** Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do DNA no gene *IGF2*. A DMR do último éxon encontra-se hipometilada para o alelo materno (círculos brancos), enquanto o alelo paterno possui essa região hipermetilada (círculos pretos). Adaptado de Curchoe et al., (2005) e Gebert et al., (2006).

Segundo Murrel et al. (2001), quando essa região intragênica apresenta-se metilada promove um aumento na expressão do gene *IGF2*. Além disso, existe uma região de 54 pb dentro dessa DMR que aumenta a expressão do *IGF2* nos alelos paternos de camundongos (MURREL et al., 2001), apresentando-se conservada em bovinos e podendo possuir efeito similar (GEBERT et al., 2006). Estudos realizados mostram que a deleção dessa região de 54 pb é capaz de reduzir a expressão gênica, sendo associado ao retardo do crescimento fetal em camundongos (MURREL et al., 2001). No entanto, essa deleção não é capaz de reduzir o *imprinting* (MURREL et al., 2004).

Após a fecundação, essa DMR possui 28% de metilação no estágio de zigoto, enquanto que em embriões de 4 células esse padrão diminui para 6%, e aumenta para 10% de metilação no estágio de blastocisto de bovinos em embriões PIV (GEBERT et al., 2009). Os embriões D7 produzidos *in vivo* por meio da superovulação e por TNCS possuem uma epigenética diferente entre os sexos, onde os machos apresentaram um padrão de metilação de

DNA maior em relação às fêmeas para DMR do último éxon do gene *IGF2* (GEBERT et al., 2009).

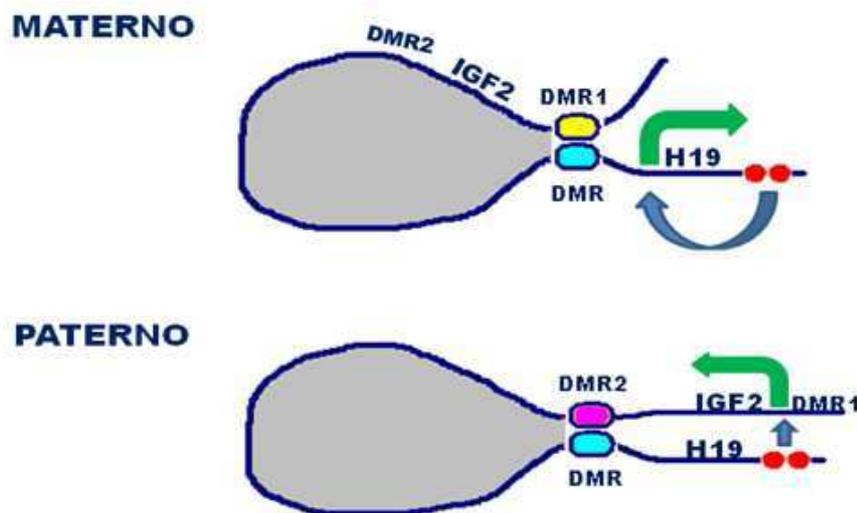
Apesar da expressão do gene *IGF2* ser monoalélica em alguns tecidos adultos e nos gametas, a expressão apresenta-se bialélica no estágio de blastocisto em camundongos (SZABO; MANN, 1995; LI et al., 2005). Já foi comprovado que a metilação proveniente de espermatozóide das DMRs do gene *IGF2* é perdida no zigoto, mas a diferença da metilação é reestabelecida no início do estágio de implantação (revisto por REIK et al., 2001). Em camundongos e em bovinos, o padrão de metilação de genes *imprinting* em ovócitos é adquirido de acordo com o tamanho do folículo (revisto por YANG et al., 2007; FAGUNDES, 2009).

Em camundongos, o gene *IGF2* possui 3 DMRs bem definidas. Duas estão localizadas na porção 5' do gene, sendo considerados pseudogenes, e uma está no último éxon (6) (FEIL et al., 1994). Em bovinos, esse gene possui 4 regiões promotoras, que regulam a sua transcrição formando vários *splicing* alternativos (CURCHOE et al., 2005).

A produção de embriões bovinos através da FIV e da TNCS tem sido relacionada a um crescimento anormal do feto, mais conhecida como a síndrome do bezerro grande (LOS), que pode estar relacionada a uma incorreta reprogramação epigenética dos alelos parentais na DMR intragênica do gene *IGF2* (revisto por RIDEOUT et al., 2001). Esse gene possui vários transcritos em bovinos, os quais já foram identificados e relacionados quanto à idade e ao tipo de tecido. Os que apresentam a transcrição iniciando a partir do quarto promotor foram associados a tecidos fetais, diminuindo sua expressão com o avançar da idade. Uma lista relacionada ao tamanho do transcrito, com a combinação dos éxons detectados foi descrita por CURCHOE et al. (2005).

O gene *IGF2* também é regulado por um gene vizinho, o *H19*, que também é um gene *imprinting*, e divide os mesmos elementos reguladores de expressão (*enhancers*) (BELL;

FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000; revisto por CHAO; D'AMORE, 2008. O gene *H19* possui o alelo paterno silenciado enquanto o materno é expresso, transcrevendo um RNA que irá auxiliar no silenciamento do gene *IGF2*. Existe uma DMR na região 5' do gene *H19* que regula a expressão dos genes *H19* e *IGF2*. Caso essa DMR esteja desmetilada, fatores ligantes de região CCCTC, mais conhecidos como CTCFs (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999), ligam-se à essa região, impedindo a metilação local e induzindo a expressão do *H19* (revisto por ARNEY, 2003; MURRELL et al., 2004, 2006). Se a DMR 5' do *H19* estiver metilada, os CTCFs não conseguem se ligar à essa região e impedem a expressão do gene *H19*, correspondendo ao alelo paterno na Figura 2 (MURRELL et al., 2004; KURUKUTI et al., 2006).



**Figura 2.** Modelo ilustrativo para a interação entre as DMR para os genes *IGF2* e *H19*. Em ambos os alelos ocorre a formação de uma região com expressão reprimida (área sombreada). No alelo materno, a DMR1 (*IGF2*) e a DMR (*H19*) interagem. O gene *H19* sofre ação dos *enhancers* (círculos vermelhos) que aumentam a expressão desse gene. A interação no alelo paterno ocorre entre a DMR2 (*IGF2*) e a DMR (*H19*), impedindo a expressão do *H19*. Os *enhancers* (círculos vermelhos) se aproximam da região promotora e induzem a expressão do *IGF2*. Adaptado de Murrell et al. (2004) e Fagundes (2009).

Recentemente, Curchoe et al. (2009), identificaram a região da DMR 5' do gene *H19* em bovinos e detectaram que clones apresentam essa DMR alterada em relação ao grupo controle.

#### 4.10 *XIST*

O silenciamento do cromossomo X em fêmeas de mamíferos é controlado por uma região de aproximadamente 1 Mbp de DNA conhecida como centro de inativação do X (XIC). Esse centro interage com a região homóloga e aguarda a determinação de quantos cromossomos X existem na célula. Logo após, o XIC escolhe um cromossomo para inativar e iniciar a transcrição monoalélica do transcrito específico da inativação do X (*XIST*). Concomitantemente o outro alelo ativa uma transcrição *anti-sense*, relativo ao gene *TSIX* para manter o cromossomo ativo, inibindo a transcrição do gene *XIST* em *cis*. Sendo assim, esses dois *loci* (*XIST* e *TSIX*) precisam interagir de maneira correta para manter um padrão fisiológico. Além disso, a relação entre uma região chamada Xpr (região de pareamento do X) e o acúmulo de grande quantidade de RNA de *XIST*, sugere a hipótese de que ela é capaz de aumentar a expressão monoalélica do *XIST*, proporcionando uma eficiente inativação cromossômica (revisto por CASCI, 2008).

O gene *XIST* possui 36421pb, 8 éxons e transcreve um RNA *anti-sense* não-codificante que auxilia no início da inativação desse cromossomo. O acúmulo desse transcrito aproxima-se do cromossomo a ser inativado e sinalizações bioquímicas determinam marcas epigenéticas para manter um padrão de silenciamento local (revisto por BROCKDORFF, 2002). Essa inativação cromossômica ocorre para equalizar a dosagem de genes ligados ao X em fêmeas, em relação dos machos Y (KALANTRY et al., 2009) e foi descoberto por Lyon (1961).

Apesar dos espermatozóides maduros possuírem um genoma muito compactado, contendo protaminas no lugar de histonas, há expressão gênica em espermátides (NGUYEN; DISTECHE, 2006). As que contêm o cromossomo X são capazes de reativar genes em *loci*

com múltiplas cópias em palíndrome ou em *tandem*. As espermátides contendo Y conectadas às que possuem X, podem receber os produtos desses genes (revisto por DISTECHE, 2008), que parecem ser importantes antes e depois da meiose (MUELLER et al., 2008). Isso requer atenção, pois os indivíduos machos apresentam um pareamento de braço curto da divisão celular. Na meiose, esse fato leva ao silenciamento das áreas que inicialmente não são pareadas, sendo conhecido como inativação meiótica do cromossomo sexual (MSCI) (MUELLER et al., 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário as células que originarão a placenta possuem o cromossomo X inativado de herança paterna (Xp), enquanto o materno permanece ativo. Já as células da massa celular interna (MCI) possui inativação do cromossomo X ao acaso. Em camundongos, a XCI-Xp parece ser uma continuação da MSCI ou tem uma metilação *de novo* induzida por *XIST* para iniciar a inativação (revisto por DISTECHE, 2008). Na literatura existem diferentes modelos que explicam esse processo para as espécies de camundongos e bovinos (HUYNH; LEE, 2003; OKAMOTO et al., 2005; FERREIRA, 2009).

O primeiro trabalho a caracterizar a inativação do cromossomo X, por meio da expressão do gene MAO-A, durante o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos, foi realizado por Ferreira et al. (2010). Os embriões com 4, 8 e 16 células e no estágio de blastocisto expandido possuem expressão bialélica do gene MAO-A, enquanto os embriões nos estádios de mórula e blastocisto possuem a expressão desse gene apenas no alelo materno. Contudo, os cromossomos X materno e paterno são ativos nos embriões com 4, 8, 16 células, o Xp é inativado no estágio de mórula e blastocisto, e reativado em blastocisto expandido (FERREIRA et al., 2010).

Após a inativação os tecidos extra-embrionários mantêm a inativação do cromossomo X (XCI). As células embrionárias da MCI reativam o Xp inativado e logo após a inativação ocorre ao acaso. Em outro estudo, o Xp que é submetido à XCI *imprinting* em células-tronco

do trofoblasto (MAK et al., 2002) não se proliferam se o Xp é reativado antes de inativar o cromossomo (KALANTRY et al., 2006). Em embriões clones bovinos, a escolha para a XCI é ao acaso. O gene *XIST*, possui metilação normal no início do desenvolvimento, mas se perde nas células da MCI (revisto por REIK et al., 2001).

No início da inativação do cromossomo X as PTMs das histonas também são alteradas, principalmente nas histonas H3 e H4. Ocorre um aumento de H3K27me3, H3K9me2, ubiquitinação de H2A e H4K20me1 além de outros complexos protéicos para inativar o cromossomo. Além disso, eventos tardios como a associação da histona variante macro H2A e metilação de DNA às ilhas CpG das extremidades 5' são observadas (revisto por CHOW; HEARD, 2009).

A conservação do gene *XIST* foi observada pela primeira vez em bovinos por Dindot et al. (2004). Esse gene possui uma DMR bem caracterizada no éxon 1, que auxilia no controle da sua expressão. A hipometilação dessa DMR está correlacionada com a inativação do cromossomo X, enquanto que a hipermetilação corresponde ao padrão encontrado no cromossomo X ativo (revisto por GOTO; MONK, 1998; revisto por HEARD, 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** Modelo ilustrativo para o padrão de metilação do gene *XIST*. Se a DMR estiver desmetilada (círculos brancos) permite a expressão do gene *XIST* que participa da inativação do cromossomo X inativo. Caso a DMR esteja metilada (círculos pretos) a expressão do gene é reprimida correspondendo ao padrão do cromossomo X ativo.

Em camundongos, as regiões promotoras dos genes *XIST* e *TSIX* possuem ilhas CpG que auxiliam no controle da expressão desses genes. No entanto nenhuma região similar foi observada em bovinos (DINDOT et al., 2004). Existe um indício de que essa espécie possui um padrão diferente para a expressão alélica tecido-específica desses genes (DINDOT et al., 2004). Curiosamente, o gene *TSIX* em humanos é um pseudogene que tem expressão, mas não é funcional (CHOW et al., 2007). Além disso, as células somáticas não recrutam *XIST* para manter o cromossomo X inativo, pois herdaram o perfil de metilação e apenas o mantêm ao longo das divisões celulares (CHOW et al., 2007).

O RNA *XIST* induz o silenciamento local, mas provavelmente deve existir um mecanismo múltiplo que inicie a *ICX imprinted* (KALANTRY et al., 2009). A hipoacetilação da lisina 9 da histona H3 (K9H3) induz a inativação bidirecional do cromossomo a ser inativado (CSANKOVSKI et al., 2001). Além disso, Kalantry et al. (2009), também afirmam que o silenciamento de genes ligados ao Xp podem ocorrer no estágio de 8-16 células na ausência do *XIST-Xp*, mostrando esse gene não se faz necessário para iniciar a XCI, mas que é importante para estabilizar o silenciamento. Os tecidos extra-embrionários também são capazes de manter o XCI na ausência do *XIST* (KALANTRY et al., 2009).

#### 4.11 Referências Bibliográficas

- ABU-SALAH, K.; GAMBO, A.H. Na explanation for the efficacy of procaine in the treatment of sickle cell anaemia. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 835-841, 2005.
- ALBERT, M.; PETERS, H.F.M. Genetic and epigenetic control of early mouse development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, p. 1-9, 2009.
- ALLEN, C.; REARDON, W. Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology Review**, v. 112, p. 1589–1594, 2005.
- APARICIO, A.; EADS, C.A.; LEONG, L.A.; LAIRD, P.W.; NEWMAN, E.M.; SYNOLD, T.W.; BAKER, S.D.; ZHAO, M.; WEBER, J.S. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Chemotherapy & Pharmacology**, v. 51, n. 3, p.231-239, fev. 2003.
- ARNEY, K.L. *H19* and *IGF2* – enhancing the confusion? **Trends in Genetics**, v. 19, n.1, p.17-23, jan. 2003.
- BARRETO, G.; SCHÄFER, A.; MARHOLD, J.; STACH, D.; SWAMINATHAN, S.K.; HANDA, V.; DÖDERLEIN, G.; MALTRY, N.; WU, W.; LYKO, F.; NIEHRS, C. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. **Nature**, v. 445, p. 671–675, fev. 2007.
- BELL, C.A.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *IGF2* gene. **Nature**, v. 405, p. 482–485, 2000.
- BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The Mammalian Epigenome. **Cell Review**, v. 128, p. 669–681, 2007.
- BIRD, A.P. CpG-rich island and the function of DNA methylation. **Nature Review**, v. 321, p. 209-213, 1986.

- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6–21, 2002.
- BOURC'HIS, D.; XU, G.L.; LIN, C.S.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T.H. Dnmt3L and the Establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, p. 2536-2539, 2001.
- BROCKDORFF, N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *XIST* RNA. **Trends in Genetics Review**, v. 18, p. 352-358, 2002.
- CASCI, T. Sensing Double. **Nature Review Genetics**, Research Highlights, v. 9, p. 2305, fev. 2008.
- CASTELLANO, S.; KUCK, D.; SALA, M.; NOVELLINO, E.; LYKO, F.; SBARDELLA, G. Constrained analogues of procaine as novel small molecule inhibitor of DNA methyltransferase-1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2321-2325, 2008.
- CASTILHO, A.; NEVES, N.; RUFINI-CASTIGLIONE, M.; VIEGAS, W.; HESLOP-HARRISON, J.S. 5-Methylcytosine distribution and genome organization in triticales before and after treatment with 5-azacytidine. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 4397-4404, 1999.
- CASTRO, R.; RIVERA, I.; MARTINS, C.; STRUYS, E.A.; JANSEN, E.E.W.; CLODE, N.; GRAÇA, L.M.; BLOM, H.J.; JAKOBS, C.; ALMEIDA, I.T. Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, p. 831-836, 2005.
- CHAO, W.; D'AMORE, P.A.D. *IGF2*: epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n.2, p. 111-120, 2008.
- CHOW, J.C.; HALL, L.L.; BALDRY, S.E.; THOROGOOD, N.P.; LAWRENCE, J.B.; BROWN, C.J. Inducible *XIST*-dependent X-chromosome inactivation in human somatic cells is reversible. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10104-10109, 2007.
- CHOW, J.; HEARD, E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, p. 359-366, 2009.

- CIBELLI, J.B.; CAMPBELL, K.H.; SEIDEL, G.E.; WEST, M.D.; LANZA, R.P. The health profile of cloned animals. **Nature Biotechnology Commentary**, v. 20, p. 13-14, 2002.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.
- CSANKOVSKI, G.; NAGY, A.; JAENISCH, R. Synergism of *XIST* RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. **Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 4, p. 773-784, mai. 2001.
- CURCHOE, C.; ZHANG, S.; BIN, Y.; ZHANG, X.; YANG, L.; FENG, D.; O'NEIL, M.; TIAN, C. Promoter-specific expression of the imprinted *IGF2* gene in cattle (*Bos Taurus*). **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1275-1281, jun. 2005.
- CURCHOE, C.L.; ZHANG, S.; YANG, L.; PAGE, R.; TIAN, C. Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted *IGF2* and *H19* genes in cloned cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 213-225, fev. 2009.
- DeCHIARA, T.M.; ROBERTSON, E.J.; EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 849-859, fev. 1991.
- DELAGE, B.; DASHWOOD, R.H. Dietary Manipulation of Histone Structure and Function. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 347-366, 2008.
- DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, nov. 2001.
- DENG, C.; LU, Q.; ZHANG, Z.; RAO, T.; ATTWOOD, J.; YUNG, R.; RICHARDSON, B. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signalling. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48 n. 3, p. 746-756, 2003.

- DINDOT, S.V.; KENT, K.C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J.A. Conservation of genomic imprinting at the *XIST*, *IGF2* and *GTL2* loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, p. 966-974, 2004.
- DISTECHE, C.M. The not-so-silent X. **Nature Genetics Comment on**, v. 40, n. 6, p. 689-690, jun. 2008.
- DRIESSEN, K. **Reclonagem usando fibroblasto fetal em bovinos: índices técnicos e avaliação molecular dos embriões**. 2008, 47p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília- UnB, 2008.
- DUNCAN, B.K.; MILLER, J.H. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. **Nature**, v. 287, p. 560-561, 1980.
- EILERTSEN, K.J.; POWER, R.A.; HARKINS, L.L.; MISICA, P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science Review**, v. 98, p. 129-146, 2007.
- FAGUNDES, N.S. **Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene *IGF2* em ovócitos e células do cumulus de vacas Nelore**. 2009. 55 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.
- FAIRBURN, H.R.; YOUNG, L.E.; HENDRICH, B.D. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? **Current Biology Review**, v. 12, p. R68-R70, 2002.
- FANTONI, D.T.; CORTOPASSI S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos locais. In: SPINOSA, HS, GÓRNIK, SL, BERNARDI, MM. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4 ed., p144-151., 2006.
- FEIL, R.; WALTER, J.; ALLEN, N.D.; REIK, W. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *IGF2* and *H19* genes. **Development**, v. 120, n. 10, p. 2933-2943, 1994.
- FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allelespecific gene expression in parthenogenetic sheep, **Mammalian Genome**, v. 9, p. 831-834, 1998.

- FEIL, R.; KHOSLA, S. Genomic imprinting in mammals an interplay between chromatin and DNA methylation? **Science**, v. 15, n.11, p. 431-435, 1999.
- FERGUSON-SMITH, A.C.; SURANI, M.A. Imprinting and epigenetic asymmetry between parental genomes. **Science Viewpoint**, v. 293, p. 1086-1089, 2001.
- FERREIRA, A.R. **Estabelecimento do padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos in vitro**. 2009. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ciências Animais. Universidade de Brasília, 2009.
- FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O.; CARVALHO, J.O.; RUMPF, R.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Allele-specific expression of X chromosome-linked gene MAO-A during pre-implantation development in bovine embryo In: IETS, 2010, Córdoba. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n.1, p. 277, 2010.
- FIALHO, S.A.G. Fármacos que promovem anestesia geral e local. In: **Anestesiologia Veterinária, Guia prático de anestesia para pequenos e grandes animais**. São Paulo: editora Nobel, 2 ed. p.64-65, 1986.
- FISCHELE, W.; TSENG, B.S.; DORMANN, H.L.; UEBERHEIDE, B.M.; GARCIA, B.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; FUNABIKI, H.; ALLIS, C.D. Regulation of HP-1 chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature**, v. 438, p. 1116-1122, 2005.
- FU, J.; GUAN, P.; ZHAO, L.; LI, H.; HUANG, S.; ZENG, F.; ZENG, Y. Effects of donor cells on in vitro development of clone bovine embryos. **Journal of Genetics & Genomics**, v. 35, p. 273-278, 2008.
- FULKA, H.; JOHN, J.C.S.; FULKA, J. Chromatin in early mammalian embryos: achieving the pluripotent state. **Differentiation**, v. 76, p. 3-14, 2008.
- GARCIA, B.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology Review**, v. 11, p. 66-73, 2007.

- GARDNER, D.K.; LANE, M. *Ex vivo* early embryo development and effects on gene expression and imprinting. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p.361-370, 2005.
- GAUTIER, F.; BUNEMANN, H.; GROTJAHN, L. Analysis of calf-thymus satellite DNA: evidence for specific methylation of cytosine in C-G sequence, **European Journal of Biochemistry**, v. 80, p. 175- 183, 1977.
- GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; REINHARDT, R.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.; LEHRACH, H.; NIEMANN, H.; The bovine *IGF2* gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA, **Genomics**, v. 88, p. 222–229, 2006.
- GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; THIEL, J.; REINHARDT, R.; LEHRACH, H.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics**, v. 94, p.63–69, 2009.
- GIOIA, L.; BARBONI, L.; TURRIANI, M.; CAPACCHIETTI, G.; PISTILLI, M.G.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 29-39, jun. 2005.
- GOTO, T.; MONK, M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 362–378, 1998.
- HAN, D.W.; SONG, S.J.; UHUM, S.J.; DO, J.T.; KIM, N.H.; CHUNG, K.S.; LEE, H.T. Expression of *IGF2* and IGF receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. **Zygote**, v. 11, p. 245-252, ago. 2003.
- HAN, D.W.; IM, Y.B.; DO, J.T.; GUPTA, M.K.; UHM, S.J.; KIM, J.H.; SCHÖLER, H.R.; LEE, H.T. Methylation status of putative differentially methylated regions of porcine *IGF2* and *H19*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 777-784, 2008.

- HARK, A.T.; SCHOENHERR, J.; KATZ, D.J.; INGRAM, R.S.; LEVORSE, J.M.; TILGHMAN, S.M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/IGF2* locus. **Nature**, v. 405, p. 486-489, mai. 2000.
- HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1108-1119, 2004.
- HEARD, E. Recent Advances in X-Chromosome Inactivation. **Current opinion in Cell Biology Review**, v. 16, p. 247-255, 2004.
- van der HEIJDEN, G.W.; DIEKER, J.W.; DERIJCK, A.A.; MULLER, S.; BERDEN, J.H.; BRAAT, D.D.; van der VLAG, J.; de BOER, P. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 9, p. 1008-1022, set. 2005.
- HEMBERGER, M.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 526-537, 2009.
- HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.
- HOWELL, C.Y.; BESTOR, T.H.; DING, F.; LATHAM, K.E.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J.M.; CHAILLET, J.R. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. **Cell**, v. 104, p. 829-838, 2001.
- HUYNH, K.D.; LEE, J.T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**, v. 426, p. 857-862, 2003.
- IGUCHI-ARIGA, S.M.M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **Genes Development**, v. 3, p. 612-619, 1989.

- JACKSON, J.P.; LINDROTH, A.M.; CAO, X.; JACOBSEN, S.E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. **Nature**, v. 416, p. 556-560, 2002.
- JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics Review**, v. 33, p. 245-254, mar. 2003.
- JEON, B.G.; COPPOLA, G.; PERRAULT, S.D.; RHO, G.J.; BETTS, D.H.; KING, W.A. S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. **Reproduction**, v. 135, n. 6, p. 815–828, jun. 2008.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science Review**, v. 293, p. 1074-1080, 2001.
- KALANTRY, S.; MILLS, K.C.; YEE, D.; OTTE, A.P.; PANNING, B.; MAGNUSON, T. The polycomb group protein Eed protects the inactive X-chromosome from differentiation-induced reactivation. **Nature Cell Biology**, v. 8, p. 195-202, 2006.
- KALANTRY, S.; PURUSHOTHAMAN, S.; BOWEN, R.B.; STARMER, J.; MAGNUSON, T. Evidence of *XIST* RNA-independent initiation of mouse imprinted X-chromosome inactivation, **Nature**, v. 460, p.647-651, jul. 2009.
- KANG, Y.K.; KOO,D.B.; PARK, J.S.; CHOI, Y.H.; CHUNG, A.S.; LEE, K.K. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature Genetics**, v. 28, p. 173-178. jun. 2001.
- KATZ-JAFFE, M.G.; MCCALLIE, B.R.; PREIS, K.A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D.K. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, p. 939-941, 2009.
- KEEFER, C.L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). **Theriogenology Review**, v. 69, p. 48 - 54, 2008.

- KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 918-926, 2001.
- KIM, G.D.; NI, J.; KELESOGLU, N.; ROBERTS, R.J.; PRADHAN, S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferase. **EMBO Journal**, v. 21, p. 4183-4195, 2002.
- KITSBERG, D., SELING, S., BRANDELS, M., SIMON, I., KESHET, I., DRISCOLL, D.J., NICHOLLS, R.D., CEDAR, H. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. **Nature**, v. 364, p. 459-463, 1993.
- KLEE, W.A.; RICHARDS, H.H.; CANTONI, G.L. The synthesis of methionine by enzymic transmethylation. VII. Existence of two separate homocysteine methylphrases on mammalian liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, n. 54, p. 157-164, 1961.
- KORKMAZ, A.; REITER, R.J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? **Journal of Pineal Research Mini-review**, v. 44, p. 41-44, 2008.
- KOVACHEVA, V.P.; MELLOTT, T.J.; DAVISON, J.M.; WAGNER, N.; LOPEZ-COVIELLA, I.; SCHNITZLER, A.C.; BLUSZTAJN, J.K. Gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression, **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31777-31788, oct. 2007.
- KURUKUTI, S.; TIWARI, V.K.; TAVOOSIDANA, G.; PUGACHEVA, E.; MURRELL, A.; ZHAO, Z.; LOBANENKOV, V.; REIK, W.; OHLSSON, R. CTCF binding at the *H19* imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *IGF2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10684-10689, jul. 2006.
- LAIRD, C.D.; PLEASANT, N.D.; CLARK, A.D.; SNEEDEN, J.L.; HASSAN, K.M.A.; MANLEY, N.C.; VARY, JR. J.C.; MORGAN, T.; HANSEN, R.S.; STÖGER, R. Hairpin-bisulfite PCR: Assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 204-209, 2004.

- LAIRD, P.W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. **Nature Review Genetics**, AOP, fev. 2010, doi:10.1038/nrg2732.
- LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, v. 3, p. 662-673, set. 2002.
- LI, T.; VU, T.H.; ULANER, G.A.; LITTMAN, E.; LING, J.Q.; CHEN, H.L.; HU, J.F.; BEHR, B.; GIUDICE, L.; HOFFMAN, A.R. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an *IGF2-H19* imprinting epigenetic switch. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 9, p. 631-640, 2005.
- LIANG, G.; GONZALGO, M.L.; SALEM, C.; JONES, P.A. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Methods**, v. 27, p. 150-155, 2002.
- LIANG, X.W.; ZHU, J.Q.; MIAO, Y.L.; LIU, J.H.; WEI, L.; LU, S.S.; HOU, Y.; SCHATTEEN, H.; LU, K.H.; SUN, Q.Y. Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, p. 16–21, 2008.
- LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 598–607, 2008.
- LIU, L.; SHIN, T.; PRYOR, J.H.; KRAEMER, D.; WESTHUSIN, M. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 51-58, 2001.
- LONG, J.E.; CAI, X. *IGF2R* expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, v. 388, p.125-134, 2007.
- LUND, A.H.; van LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. **Genes & Development Review**, v. 18, n. 19, p.2315-2335, 2004.
- LUCIFERO, D.; CHAILLET, J.R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 3-18, 2004.

- LUDWIG, M.; KATALINIC, A.; GROSS, S.; VARON, R.; HORSTHEMKE, B. Increased prevalence of imprinting defects in Angelman Syndrome (AS) patients born to infertile couples. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. S49, 2004.
- LUO, L.; LI, B.; PRETLOW, T.P. DNA Alteration in human aberrant *CRYPT* foci and colon cancer by random primed polymerase chain reaction. **Cancer Research**, v. 63, p. 6166-6169, 2003.
- LYKO, F.; BROWN, R. DNA methyltransferases inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. **Journal of the National Cancer Institute Review**, v. 97, n. 20, p. 1498-1506, out. 2005.
- LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 190, p. 372-373, 1961.
- MA, D.K.; JANG, M.H.; GUO, J.U.; KITABATAKE, Y.; CHANG, M.I.; POW-ANPONGKUL, N.; FLAVELL, R.A.; LU, B.; MING, G.L.; SONG, H. Neuronal activity-induces GADD45B promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1074-1077, 2009.
- MAK, W.; BAXTER, J.; SILVA, J.; NEWALL, A.E.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Mitotically stable association of polycomb group proteins Eed and Enx1 with the inactive X chromosome in trophoblast stem cells. **Current Biology**, v. 12, p.1016-1020, 2002.
- MASSONE, F. Anestesia Local, In: **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1 ed. p. 34-39, 1988.
- MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER J.; FAGUNDES, R.; HAAF, T. Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, p. 501-502, 2000.
- McLAREN, R.J.; MONTGOMERY, G.W. Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 588-591, 1999.
- McLAY, D.W.; CLARKE, H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction Review**, v. 125, n. 5, p. 625 - 633, mai., 2003.

- MEMILI E.; FIRST, N.L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biology of reproduction**, v. 61, p. 1198-1207, 1999.
- MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; DRIESSEN, K.; FAGUNDES, N.S.; SOUSA, R.V.; MELO, E.O.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M. Efeito da recloneagem na metilação de DNA do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF2R*) em bovinos In: 55 ° CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2009, Águas de Lindóia-SP. **Resumos do 55 ° Congresso Brasileiro de Genética**, 2009, GA215
- MIRANDA, T.B.; JONES, P.A. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. **Cellular Physiology Mini-review**, v. 213, p. 384-390, 2007.
- MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and –independent mechanisms. **Journal of Endocrinology Review**, Beyond carrier proteins, v. 175, p. 19-31, 2002.
- MOORE, K.; KRAMER, J.M.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.J.; YELICH, J.V.; DROST, M. Insuline-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced in vitro or by nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 68, p. 717-727, jun. 2007.
- MUELLER, J.L.; MAHADEVAIAH, S.K.; PARK, P.J.; WARBURTON, P.E.; PAGE, D.C.; TURNER, J.M.A. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. **Nature Genetics**, v. 40, p. 794–799, jun. 2008.
- MURRELL, A.; HEESON, S.; BOWDEN, L.; CONSTÂNCIA, M.; DEAN, W.; KELSEY, G.; REIK, W. An intragenic methylated region in the imprinted *IGF2* gene augments transcription, **EMBO Reports**, v. 2, n. 12, p. 1101-1106, dec. 2001.
- MURRELL, A.; HEESON, S.; W. REIK. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *IGF2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. **Nature Genetics**, v. 36, p. 889–893, 2004.
- NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B.; COPPIETERS, W.; DETILLEUX, J.; HANSET, R.; KARIM, L.; KVASZ, A.; LEROY, P.; GEORGES, M. An imprinted QTL

with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs. **Nature Genetics**, v. 21, n. 2, p. 155-156, fev. 1999.

NGUYEN, D.K.; DISTECHE, C.M. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. **Nature Genetic**, v. 38, p.47-53, 2006.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21–34, 2000.

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

OHLSSON, R.; NYSTROEM, A.; PFEIFER-OHLSSON, S.; TOEHOENEN, V.; HEDBORG, F.; SCHOFIELD, P.; FLAN, F.; EKSTROM, T. J. *IGF2* is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith–Wiedemann syndrome, **Nature Genetics**, v. 4, n. 1, p. 94-97, mai. 1993.

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

ORSTAVIK, K.H.; EIKLID, K.; van der HAGEN, C.B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 218–219, 2003.

OSWALD J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology** Brief communication, v. 10, p. 475-478, 2000

PARK, C.H.; KIM, H.S.; LEE, S.G.; LEE, C.K. Methylation status of differentially methylated regions at *IGF2/H19* locus in porcine gametes and preimplantation embryos. **Genomics**, v. 93, p. 179–186, 2009.

- PEDONE, P.V.; PIKAART, M.J.; CERRATO, F.; VERNUCCI, M.; UNGARO, P.; BRUNI, C.B.; RICCIO, A. Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the *H19* and *IGF2* genes. **FEBS Letters**, v. 458, p. 45-50, 1999.
- van der PLOEG, L.H.; FLAVEL, R.A. DNA methylation in the human  $\gamma\delta$ -globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. **Cell**, v. 19, p. 947-958, 1980.
- POWELL, A.M.; TALBOT, N.C.; WELLS, K.D.; KERR, D.E.; PURSEL, V.G.; WALL, R.J. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.210-216, mar. 2004.
- RAINIER, S.; JOHNSON, L. A.; DOBRY, C. J.; PING, A. J.; GRUNDY, P. E.; FEINBERG, A. P. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 747-749, abr. 1993.
- RAMCHANDANI, S.; BHATTACHARYA, S.K.; CERVONI, N.; SZYF, M. DNA methylation is a reversible biological signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 6107-6112, 1999.
- REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Review Genetics**, v. 2, p. 21-32, jan. 2001.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science Review**, v. 293, p. 1089-1093, ago. 2001.
- REIK, W.; SANTOS, F.; MITSUYA, K.; MORGAN, H.; DEAN, W. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 358, p.1403-1409, jul. 2003.
- REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature Review**, v. 447, p. 425-432, mai. 2007.
- RICE, J.C.; BRIGGS, S.D.; UEBERHEIDE, B.;BARBER, C.M.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; SHINKAI, Y.; ALLIS, C.D. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. **Molecular Cell**, v. 12, p. 1591-1598, 2003.

- RINAUDO, P.; SCHULTZ, R.M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. **Reproduction**, v. 128, p. 301-311, 2004.
- RIDEOUT III, W.M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science Review**, v. 293, p. 1093-1098, 2001.
- ROSS, S.A. Diet and DNA methylation interaction in cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 983, p. 197-207, 2003.
- SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetics reprogramming during early development in mammals. **Reproduction Review**, v. 127, p. 643-651, 2004.
- SANTOS, F.; PETERS, A. H.; OTTE, A. P.; REIK, W. Dynamic chromatin modification characterise the first cell cycle in the mouse. **Development Biology**, v. 280, p. 225-236, 2005.
- SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Review Genetics**, v. 9, p. 129-140, 2008.
- SATO, A.; OTSU, E.; NEGISHI, H.; UTSUNOMIYA, T.; ARIMA, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n.1, p. 26-35, 2007.
- SCHIEVE, L.A.; MEIKLE, S.F.; FERRE, C.; PETERSON, H.B.; JENG, G.; WILCOX, L.S. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 731-737, 2002.
- 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, jan. 2010.
- SHI, W.; HAAF, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 329-334, 2002.

SMIRAGLIA, D.J.; KAZHIYUR-MANNAR, R.; OAKES, C.C.; WU, Y.Z.; LIANG, P.; ANSARI, T.; SU, J.; RUSH, L.J.; SMITH, L.T.; YU, L.; LIU, C.; DAI, Z.; CHEN, S.S.; WANG, S.H.; COSTELLO, J.; IOSHIKHES, I.; DAWSON, D.W.; HONG, J.S.; TEITELL, M.A.; SZAFRANEK, A.; CAMORIANO, M.; SONG, F.; ELLIOTT, R.; HELD, W.; TRASLER, J.M.; PLASS, C.; WENGER, R. Restriction Landmark genomic scanning (RLGS) spot identification by second generation virtual RLGS in multiple genomes with multiple enzyme combinations. **BMC Genomics**, v. 8, n. 446, p. 1-18, 2007.

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

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

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

SZABO, P.E.; MANN, J.R. Allele-specific expression and total expression levels of imprinting mechanism. **Genes Development**, v. 9, n.24, p. 3097-3108, 1995.

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

TOST, J.; SCHATZ, P.; SCHUSTER M.; BERLIN, K.; GUT, I.G. Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 9, p. e 50 1-10, 2003.

USUBIAGA, J.E.; WIKINSKI, J.A. Bases clínicas e farmacológicas para o emprego da procaína endovenosa. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, ano 14, n.1, jan/mar. 1964.

- VILLAR-GAREA, A.; FRAGA, M.F.; ESPADA, J.; ESTELLER, M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 4984–4989, 2003.
- VILLAR-GÁREA, A. **Epigenetic transcriptional repression of tumor supresor genes and its reversion by drugs**. 2005. Tese de doutorado- Departamento de laboratório de epigenética, Universidade de Valencia, Espanha. 2005.
- WANG, R.Y.H.; GEHRKE, C.W.; EHRLICH, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 20, p. 4777-4790, 1980.
- WATT, F.; MOLLOY, P. L. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. **Genes Development**, v. 2, p. 1136-1143, 1988.
- WHITE, P.F.; KATZUNG, B.G. Anestésicos Locais, In: KATZUNG, B.G **Farmacologia Básica e Clínica**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 9 ed. p. 351, 2006.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 8–18, 1999.
- XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216-220, 2002.
- YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinting genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 431-438, 2005.
- YANG, X.; SMITH, L.S.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics Review**, v. 29, n. 3, p. 295-302, mar. 2007.

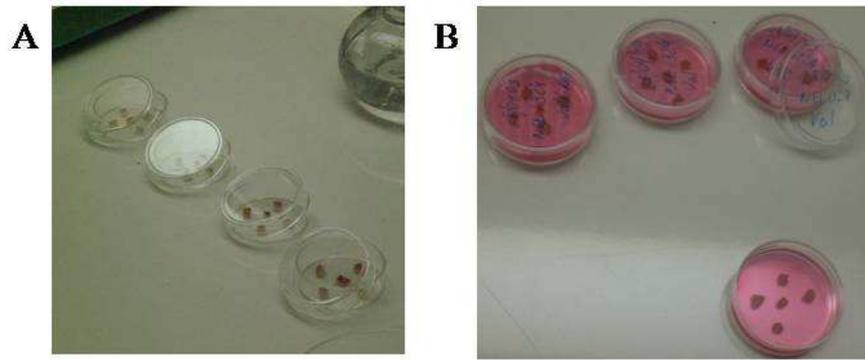
YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVORY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, p. 153-154, 2001.

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

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Cultivo celular de fibroblasto

Foram utilizados fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, de um animal fêmea da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) através de técnica de cultivo primário, já bem estabelecida no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A biópsia foi retirada da inserção da cauda realizando uma tricotomia numa área de 3x3 cm, lavando bem o local com escova e sabão, álcool iodado e álcool 70%. Todo material utilizado não estéril foi mergulhado em álcool 70%. Após a higienização das mãos e retirada da biópsia, o material foi higienizado em placa de petri de 90x15 cm com PBS suplementado, penicilina G (100UI/ mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), amicacina (0,075 mg/mL) e nistadina (20 mg/mL), para retirada do sangue. A amostra foi colocada em um tubo de 50 mL, contendo o mesmo PBS suplementado, e transportada para o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen. Os pêlos e outros tecidos foram retirados dentro do fluxo laminar vertical e a amostra fragmentada em cubos de 1mm com auxílio da pinça e bisturi. Cinco cortes foram colocados em placas de petri de 35 mm com a camada interna da pele voltada para o fundo da placa, secados, totalizando 4 placas de cultivo. Após a aderência desse material, adicionou-se 4 mL de DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (Gibco) com penicilina G (100UI/ mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e amicacina (50 µg/mL) (Figura 4). As placas foram transferidas para estufa estabilizada a 39 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de oxigênio e umidade saturada (Thermo Scientific).



**Figura 4.** Cortes de biópsia da pele de um animal Nelore em placas de cultivo. **A-** Biópsias secando para uma boa aderência à superfície da placa. **B-** Material contendo meio adequado para o cultivo de fibroblastos *in vitro*. Fotos: Arquivo pessoal.

Após sete dias, as biópsias foram retiradas das placas com uma pinça estéril e o meio de cultivo substituído. Novamente, as placas foram mantidas na estufa por mais sete dias para completar a formação da monocamada de células. Ao final desse cultivo, as células foram transferidas para garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. O volume celular total de 2 placas de 35 mm foram transferidas para uma garrafa, resultando em 2 garrafas. Para isso, o meio de cultivo de cada placa foi removido, adicionou-se 0,5 mL de solução de Tripsina/ EDTA 0,05% (Gibco) para lavar a placa. Após a remoção desse volume, 1 mL de solução de Tripsina /EDTA foi adicionado a cada placa e mantida por 5-10 min. na estufa a 39 °C. Os volumes foram transferidos para tubos de 1,5 mL, centrifugados a 200x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante e a quantidade de 1 mL de DMEM / células foi adicionada à 3 mL de DMEM contidos na garrafa de cultivo, para que as células crescessem por mais 7 dias. Todos os procedimentos com animais foram autorizados pelo comitê de ética animal da Universidade de Brasília – UnB.

## 5.2 Congelação e descongelação celular

Ao final da terceira passagem, as células foram suspensas por tripsina e congeladas em meio de cultivo contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em palhetas de 0,25 mL,

lacradas, identificadas quanto à passagem celular, com data de congelação, identificação do animal, da raça e nome do manipulador. De cada garrafa foram obtidas 5 palhetas, totalizando 15 palhetas em P3. Em seguida foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e transferidas para nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas. As células foram descongeladas retirando uma palheta do nitrogênio líquido, segurando por 5 s no ar e imediatamente colocadas em água aquecida a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min. O volume da palheta foi transferido para um tubo de 1,5 mL, adicionou-se 1 mL de DMEM, homogeneizou-se e as amostras foram centrifugadas por 5 min. a  $200\times\text{ g}$ . O sobrenadante foi descartado e 1 mL de DMEM foi adicionado para ressuspender as células e transferi-las para 2 garrafas de cultivo de  $25\text{ cm}^2$  contendo 3 mL de DMEM adicionados. As garrafas foram colocadas em estufa de cultivo a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$  e 20% de  $\text{O}_2$  por 7 dias. As células foram observadas em microscópio invertido AXIOVERT 135M (ZEISS Germany) com aumento de 100 vezes para confirmação de confluência. O sobrenadante foi retirado do frasco de cultivo e adicionou-se 0,5 mL de solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO) previamente aquecida a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta solução foi descartada para adicionar-se 1 mL de solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO) sendo mantido na estufa  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , umidade saturada por 10 min. A solução celular foi transferida para um tubo de 1,5 mL, centrifugado a  $200\times\text{ g}$  por 5 min. e transferido para uma garrafa de cultivo conforme já descrito. Após entrarem em confluência, as células foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, centrifugadas a  $200\times\text{ g}$  por 5 min. e uma alíquota de  $30\text{ }\mu\text{L}$  foi diluída em azul de tripan 0,4% (SIGMA) na proporção 1:1 enquanto o restante do volume celular permaneceu na estufa. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer  $0,100\text{ mm}$  de profundidade e  $0,0025\text{ mm}^2$  (Optik Labor) em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) para determinar a viabilidade celular inicial.

### 5.3 Cultivo celular com procaína e viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, o cultivo foi realizado em placas de cultivo com 24 poços de 2 cm<sup>2</sup> (TPP). Dez mil células viáveis foram adicionadas em cada poço e cultivadas em 400 µL de DMEM por 24 h. O meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS suplementado com antibiótico e as concentrações de procaína diluídas em meio DMEM a partir de Villar-Garea (2005). Ao total foram 4 tratamentos, três cultivos suplementados com procaína (SIGMA) com concentração final 0,1 mM, 0,5 mM ou 2,0 mM e o controle não foi suplementado. Após o período de 72 h, as células sobrenadantes, de cada tratamento, foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, centrifugadas a 200x g por 5 min. e diluídas num volume de 30 µL. As células aderidas foram retiradas da placa por solução de tripsina/EDTA 0,05% (Gibco), centrifugadas e o *pellet* foi diluído conforme já descrito. Uma alíquota (30 µL) das células aderidas e o volume das células em suspensão de cada tratamento foram coradas com azul de tripan 0,4 % (Sigma) com diluição 1:1 e contadas em câmara de Neubauer 0,100 mm de profundidade e 0,0025 mm<sup>2</sup> (Optik Labor) em microscópio óptico no aumento de 100x (Nikon Eclipse E200). As células brancas e azuis dos quatro quadrantes externos foram contadas. As células brancas correspondem às viáveis, enquanto a soma das células brancas e azuis referem-se às células totais. Ao final do tratamento, as células sobrenadantes foram contadas separadamente das células aderidas e que sofreram a ação da tripsina. As amostras referentes às concentrações 0,1 mM e 0,5 mM e ao grupo controle foram centrifugadas a 200x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µL de Trizol® (Invitrogen) em cada tubo. O conteúdo das triplicatas foi agrupado em um tubo do respectivo tratamento. Para garantir que todo o material foi realmente recuperado, os tubos referentes a cada grupo foram lavados com um único volume de 50 µL de Trizol® (Invitrogen) adicionais, transferido para a respectiva amostra e armazenadas em congelador a

-80 °C para futura extração de DNA. Os tratamentos foram realizados por três vezes em diferentes períodos.

#### **5.4 Cariótipo por citogenética convencional**

Para verificar a integridade cromossômica, as células foram cultivadas em placas conforme descrito anteriormente e utilizou-se o protocolo de citogenética convencional. Após o período de 48 h de tratamento, o meio de cultivo foi substituído, contendo 100 µL de colchicina a 16 µg/mL (concentração final a 0,4 µg/mL). Os cultivos celulares foram incubados em estufa a 39 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> e umidade saturada por 24 h. Ao final do tratamento, o meio foi descartado e o volume de 200 µL de solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO) foi inserido em cada poço de cultivo celular de 2 cm<sup>2</sup> permanecendo por 10 min. em estufa a 39 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> e umidade saturada. As células foram observadas, em microscópio invertido AXIOVERT 135M (ZEISS Germany) com aumento de 100 vezes, para confirmação da ação enzimática, ou seja, as células apresentam morfologia arredondada e estão suspensas no meio de cultivo. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL, adicionou-se 200 µL de DMEM nos poços de cultivo, para resgatar o restante das células, e esse conteúdo foi transferido para o respectivo tubo de 15mL. Foram cultivados 4 poços para cada grupo. As amostras foram centrifugadas a 200x g por 5 min., o sobrenadante descartado para adição de solução hipotônica de KCl 0,075M, sendo previamente aquecida na mesma temperatura da estufa em banho-maria, e as amostras foram então incubadas por 15 min. em banho-maria a 39 °C. Realizou-se 3 vezes o procedimento da solução fixadora de metanol (Merk) e ácido acético (Merk) 3:1(v/v) e uma vez com solução de metanol e ácido acético 1:1(v/v). Após a montagem das lâminas, o material foi corado com

solução Giemsa 4% e observado em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) no aumento de 1000 X, sendo fotografado com Moticam 2000 (Motic®), utilizando o programa Motic Image Plus 2.0 ML (Motic®). Para cada tratamento foram montadas 3 lâminas com a contagem dos 60 cromossomos bovinos dos núcleos celulares em metáfase.

### **5.5 Extração de DNA das células**

Para avaliar o padrão de metilação de DNA, foram utilizadas as amostras congeladas dos grupos formados na contagem da viabilidade celular. O protocolo para extração de DNA genômico da linhagem celular de fibroblastos foi baseado no protocolo do *Trizol Reagent* (Invitrogen), com modificações. As amostras foram retiradas do congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , adicionou-se 10  $\mu\text{g}$  de glicogênio (Invitrogen), homogeneizou-se em agitador mecânico por 15 s, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck) e o material foi mantido no gelo por 2 min. Logo após, os tubos foram centrifugados a 12000x g por 15 min. a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante, correspondente ao RNA, foi transferida para outro tubo para adição do mesmo volume de isopropanol 100 % gelado e livre de RNase (aproximadamente 150  $\mu\text{L}$ ). As amostras foram homogeneizadas e mantidas em congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do RNA total. O volume restante do tubo de onde foi retirado o sobrenadante foi aproveitado para o procedimento de extração de DNA. Para isso, recebeu uma quantidade adicional de 10  $\mu\text{g}$  de glicogênio (Invitrogen) e foi homogeneizado, permanecendo em temperatura ambiente por 3 min. Logo após, 150  $\mu\text{L}$  de etanol 100 % gelado foram adicionados, as amostras homogeneizadas, mantidas por 5 min. em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 9510x g por 4 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por duas vezes o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio 0,1 M com 10% de etanol e as amostras foram mantidas em

temperatura ambiente por 30 min. e centrifugadas a 9510x g por 5min. a 4 °C. Após o sobrenadante ser descartado acrescentou-se 300 µL de etanol 70 %, as amostras foram mantidas por 10 min. em temperatura ambiente, centrifugadas a 2380 xg por 3 min. à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, centrifugou-se por mais 10 s para que o excesso de sobrenadante fosse retirado. O *pellet* permaneceu secando por um período de 10 min. para ser diluído num volume de 20 µL de NaOH 8 mM a uma temperatura de 55 °C em banho-maria. Ao final, a qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e a quantificação realizada em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®).

### **5.6 Tratamento com bissulfito de sódio**

Para verificar o padrão de metilação do DNA, 500 ng de DNA genômico foram tratados com o Kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research) de acordo com as recomendações do fabricante. Apenas a temperatura de conversão foi alterada para 55 °C, pois segundo o estudo realizado por Grunau et al. (2001) essa é a temperatura ideal para uma eficiente conversão de todas as citosinas não metiladas. Além disso, Kovacheva et al. (2007), utilizaram o mesmo kit para avaliar a metilação de DNA alterando para a temperatura citada e utilizada nesse experimento.

Basicamente, este tratamento consistiu na conversão mediada pelo bissulfito de sódio das citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas não são convertidas. As amostras foram diluídas em 20 µL e armazenadas a -70 °C, para posterior amplificação por

reação em cadeia da polimerase (PCR). Esse procedimento foi repetido três vezes com três amostras diferentes para cada tratamento experimental.

### 5.7 Amplificação por PCR e purificação

A partir das amostras de DNA tratado com bissulfito de sódio das células tratadas com diferentes concentrações de procaína foram realizadas duas reações distintas para a amplificação por PCR. A primeira reação de PCR foi realizada em apenas 1 tubo, enquanto que para a segunda foram 3 tubos. Todas as reações foram realizadas utilizando 20 µL de volume final e maiores informações dos iniciadores utilizados encontram-se na tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DNA tratado com bissulfito de sódio.

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Acesso sequência	Localização do iniciador	ilha CpG	Tamanho do fragmento
<i>IGF2</i> *	F: TGGGTAAGTTTTTTTAATATGATATT	X53553.1	243-268	Éxon 10 (DMR)	455pb
externo	R:TTTAAAACCAATTAATTTTATAACATT		672-697		
<i>IGF2</i> *	F: ACATTTTTAAAAATATTATTCT	X53553.1	257-278	Éxon 10 (DMR)	420 pb
interno	R:TAATATGATATTTGGAAGTAGT		655-676		
<i>XIST</i> **	F: GGGTGTTTTTGTGTTTAGTGIGTAGTA	AJ421481.1	1127-1252	Éxon 1	482 pb
externo	R:CTTTAATACCACCCACTAAAATTAATAC		1581-1608		
<i>XIST</i> **	F:TTGTTATATAGTAAAAGATGGT	AJ421481.1	1169-1190	Éxon 1	405 pb
interno	R: ACCAATCCTAACTAACTAAATA		1552-1573		

\*Gebert et al.,(2006); \*\* Liu et al., (2008).

Para a primeira reação da PCR do gene *IGF2* utilizou-se solução tampão 1X; 2,0 mM de  $MgCl_2$  ; 100  $\mu M$  de cada dNTP; 0,5  $\mu M$  de cada iniciador (GEBERT et al., 2006); 1,0 U da enzima Taq Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 3,0  $\mu L$  de DNA tratado com bissulfito. A reação de PCR para esse gene utilizou uma desnaturação inicial de 94 °C por 3min, seguidos de 45 ciclos com 94 °C por 40s, 45 °C por 1min, 72 °C por 1min, acrescidos de uma extensão final de 72 °C por 15min. A segunda reação da PCR para esse mesmo gene foi realizada utilizando iniciadores internos ao produto amplificado, descritos na tabela 1, sob as mesmas concentrações de reagentes da primeira reação utilizando 0,5  $\mu L$  de produto amplificado na primeira reação. As condições de amplificação também são iguais à primeira, alterando apenas a temperatura de anelamento que foi de 40 °C.

Já para o gene *XIST* utilizou-se solução tampão 1X (Invitrogen®); 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen®); 100  $\mu M$  de cada dNTP; 0,5  $\mu M$  de cada iniciador (LIU et al., 2008)(Tabela 1); 1,0 U da enzima Taq Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 3  $\mu L$  de DNA tratado. A reação utilizou uma desnaturação inicial de 94 °C por 7 min em um termociclador (PXE 0,5 - Thermo), seguidos de 37 ciclos com 94 °C por 45 s, 47 °C por 1min. 30 s, 72 °C por 1min., acrescidos de uma extensão final de 72 °C por 15 min. Logo após uma segunda reação foi realizada utilizando 0,25  $\mu L$  de produto amplificado. Para a segunda reação utilizou-se as mesmas concentrações de reagentes da primeira, com os iniciadores descritos (Liu et al., 2008)(Tabela 1). A reação teve uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min., seguidos de 40 ciclos com 94 °C por 40 s, 42 °C por 45 s, 72 °C por 45 s, seguidos de uma extensão final de 15 min. 72 °C. Todas as reações foram realizadas em termocicladores PXE 0,5 X (Thermo Scientific) e Mastercycler Gradiente (Eppendorf).

O volume total dos produtos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 % corados com brometo de etídio (10 mg/mL) utilizando o marcador de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) (Figura 2). O gel foi visualizado e fotografado utilizando um fotodocumentador

Image Capture 300 (GE). O fragmento amplificado foi recortado do gel e purificado com o kit Gene Clean III (Bio Gene 101 Systems) seguindo as recomendações do fabricante. Logo após realizou-se uma quantificação em espectrofotômetro NanoDrop (ND- 1000) e uma alíquota de 2  $\mu$ L foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10mg/mL) para verificação da qualidade.

### **5.8 Clonagem dos produtos da PCR e sequenciamento**

Os produtos purificados e quantificados em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®) referentes a cada grupo foram inseridos no vetor pGEM®-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante utilizando a razão molar inserto: vetor 8:1. A transformação foi realizada em células XL-1 Blue por choque térmico e o produto foi semeado em placas 90 x 15 mm contendo meio LB Ágar contendo 200  $\mu$ g/mL de ampicilina, 40  $\mu$ L de X-Gal (Sigma) a 20 mg/mL e 6  $\mu$ L IPTG (Sigma) a 0,5 M. As placas foram fechadas, invertidas, vedadas com parafilme e incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. Logo após, as placas foram acondicionadas a 4 °C por 2 horas. Somente as colônias brancas foram selecionadas com um palito de madeira autoclavado e transferidas para crescimento em meio líquido. Este foi realizado em tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio LB com 200  $\mu$ g/mL de ampicilina permanecendo em agitador (New Brunswick Scientific) a 250 rpm, 37 °C por 16 h.

O conteúdo dos tubos que apresentaram turbidez foi transferido para 2 tubos de 1,5 mL. O vetor foi extraído seguindo o protocolo de mini preparação de plasmídeo (Sambrook et al., 1989) e tratadas com RNase 10  $\mu$ g/mL por 30 min em banho maria a 60 °C por 30 min. Logo após realizou-se a purificação com Acetato de amônio 7,5 M. Primeiramente adicionou-se água bidestilada para obter um volume final de 80  $\mu$ L. Logo após foi acrescentado 20  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M. As amostras foram homogeneizadas, adicionou-se o mesmo

volume (1:1) de etanol 100 % gelado (100  $\mu$ L), homogeneizadas novamente e incubadas no congelador a -20 °C por toda a noite. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 17000 xg por 15 min. a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 200  $\mu$ L etanol 70%. Centrifugou-se novamente com a mesma velocidade por 5 min., o sobrenadante foi descartado e a amostra foi diluída em 20  $\mu$ L de água milliQ. Uma nova quantificação foi realizada utilizando o mesmo espectrofotômetro e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para confirmar o inserto no vetor as amostras foram digeridas com enzimas de restrição ou foram amplificadas por PCR. Para a digestão enzimática, uma alíquota de 5  $\mu$ L da amostra não diluída, foi utilizada para ser clivada com 4U da endonuclease ECO RI (Promega), solução tampão a 1X, volume final de 10  $\mu$ L e incubada a 37 °C por toda a noite. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotodocumentados, para confirmação do fragmento inserido. Para a PCR uma quantidade de 400 ng de plasmídeo foi amplificada pela PCR utilizando solução tampão 1X (Invitrogen®); 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®); 100  $\mu$ M de cada dNTP; 0,25  $\mu$ M de iniciadores universais T7 e SP6; 1,0 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen®). A reação utilizou uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min em um termociclador (Mastercycler Eppendorf Gradiente), seguida de 35 ciclos com 94 °C por 20 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 40 s, acrescidos de uma extensão final de 72 °C por 10 min.

As amostras diluídas a 100 ng/ $\mu$ L contendo o fragmento inserido foram encaminhadas para sequenciamento utilizando-se a metodologia de dideoxi com sistema ABI 3130xl e iniciadores universais SP6 e T7. Os dados foram obtidos de três réplicas independentes para o tratamento com bissulfito, amplificação, clonagem e seqüenciamento. As seqüências foram analisadas utilizando os programas Chromas 2.01 (Copyright©, Technelysium Pty Ltd) e DNAMAN 4.0 (Lynnon BioSoft) e comparadas às seqüências do GenBank para cada gene;

(Tabela 1). As citosinas não precedidas de guaninas (não CpG) foram avaliadas quanto à taxa conversão e, apenas as sequências que apresentaram uma eficiência de conversão pelo bissulfito  $\geq 95\%$  foram consideradas. Logo após, essas sequências foram analisadas para o padrão de metilação das CGs.

### 5.9 Análise estatística

A viabilidade celular foi avaliada utilizando análise de variância e teste de Tukey (paramétricos) ou os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (não-paramétricos), dependendo das características dos dados gerados, utilizando o programa Prophet versão 5.0 (NIH, 1996). Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

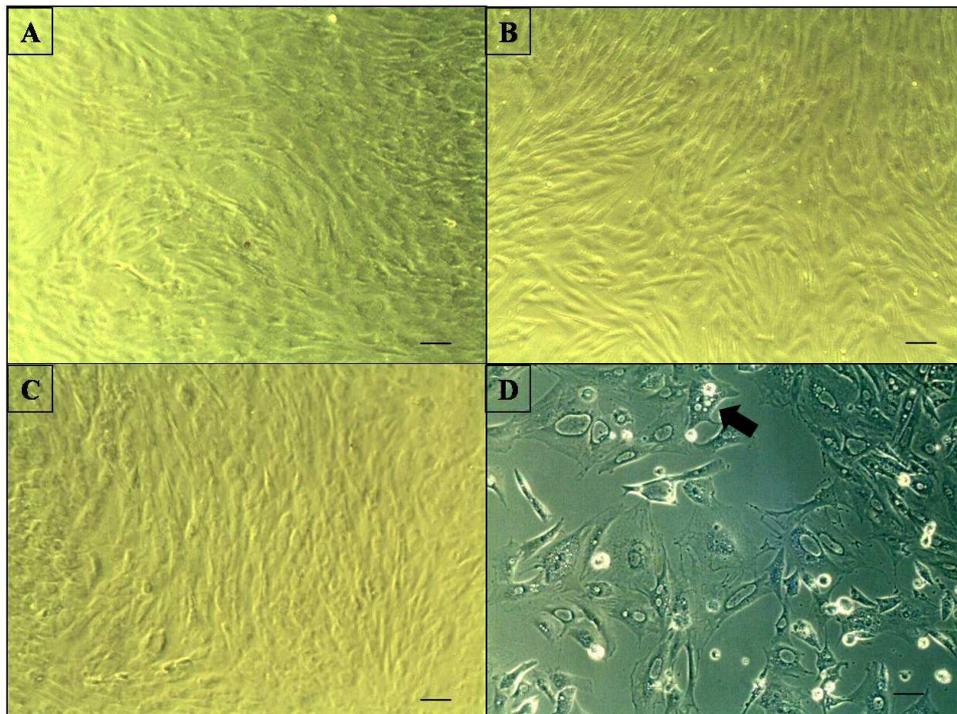
O padrão de metilação foi comparado através da porcentagem de CGs metiladas sobre o seu total em cada sequência usando o teste *t* (paramétricos) ou teste de *Mann-Whitney* (não-paramétricos) dependendo das características dos dados gerados. Todos os dados foram comparados utilizando o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996) e são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

Além disso, realizou-se também uma avaliação descritiva em relação à quantidade de sequências hipo ou hipermetiladas (<50% de sítios CpG metilados ou  $\geq 50\%$  de sítios CpG metilados, respectivamente) em relação a cada grupo, como descrito por Imamura et al. (2005). O experimento foi repetido três vezes em tempos diferentes.

## 6. RESULTADOS

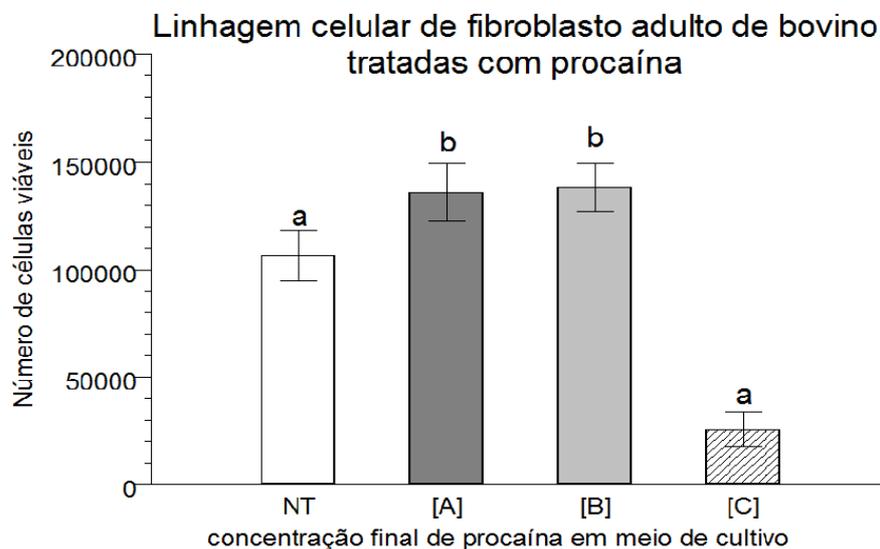
### 6.1 Cultivo celular com procaína e viabilidade celular

Após o cultivo, as células referentes ao tratamento com 0,1 mM, 0,5 mM e o grupo não tratado apresentaram crescimento celular chegando à confluência no período de 72 h. Durante o experimento não foram verificadas diferenças morfológicas, no aumento visualizado em microscópio invertido, entre o grupo controle (figura 5 A) e as células que receberam os tratamentos 0,1 mM, 0,5 mM (Figura 5B-C). No entanto, as células que foram tratadas com 2,0 mM de procaína apresentaram pouco crescimento permanecendo muito espaço entre as células. Além disso, apresentaram muitos vacúolos, os quais aumentaram de tamanho ao longo do tratamento, promovendo um aumento do volume celular (Figura 5D).



**Figura 5.** Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblasto de bovinos após 72 horas de cultivo. **A-** Grupo controle, **B-** Suplementação com 0,1 mM de procaína, **C-** Suplementação com 0,5 mM de procaína, **D-** Suplementação com 2,0 mM de procaína. Notar o volume celular aumentado e a presença de vacúolos, indicada pela seta. Aumento de 100x. Barra: 500  $\mu$ m. Fotos: Arquivo pessoal.

Após o tratamento com procaína, as células foram contadas separadamente. As células viáveis referem-se às células que apresentaram coloração branca (Figura 6) e o grupo de células totais, as células com coloração azul somada ao número de células brancas. Os valores encontrados para cada grupo referente às triplicadas encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os tratamentos com 0,1 mM e 0,5 mM de procaína apresentaram uma quantidade maior de células viáveis ( $P < 0,01$ ) comparando-se aos grupos controle e com 2,0 mM de procaína, mas são iguais entre si.



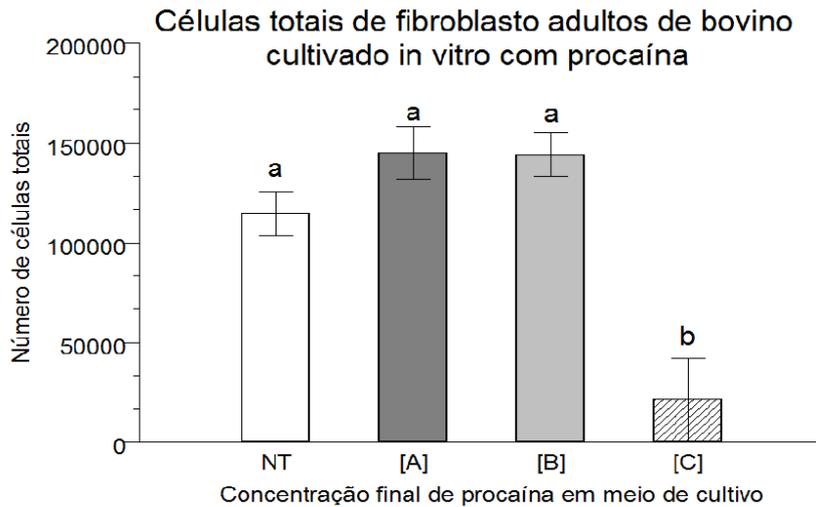
**Figura 6.** Média  $\pm$  desvio padrão do número de células viáveis após adição de azul de tripan no tratamento com procaína; contadas em câmara de Neubauer. NT – grupo controle; [A] 0,1 mM de procaína, [B] 0,5 mM de procaína [C] 2,0 mM de procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si ( $P \leq 0,01$ ).

**Tabela 2.** Número de células viáveis do cultivo *in vitro* de fibroblasto de bovinos tratados com procaína, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

	NT	[A]	[B]	[C]	P
R 1	119700 $\pm$ 6828,6 <sup>A</sup>	151233 $\pm$ 47404,3 <sup>A</sup>	143167 $\pm$ 23773,2 <sup>A</sup>	17200 $\pm$ 9269,8 <sup>B</sup>	$\leq 0,01$
R 2	99533,3 $\pm$ 21537,3	126500 $\pm$ 23562,9	124933 $\pm$ 37475,6	27500 $\pm$ 10280,6	---
R 3	99283,3 $\pm$ 23441,9 <sup>Aa</sup>	129450 $\pm$ 9480,6 <sup>A</sup>	145533 $\pm$ 10542,6 <sup>Bb</sup>	32666,7 $\pm$ 7694,4 <sup>B</sup>	*
Média	106172 $\pm$ 11716,1 <sup>a</sup>	135728 $\pm$ 13508,8 <sup>b</sup>	137878 $\pm$ 11272,7 <sup>b</sup>	25788,9 $\pm$ 7874 <sup>a</sup>	$\leq 0,05$

NT – grupo controle; [A] 0,1 mM de procaína, [B] 0,5 mM de procaína [C] 2,0 mM de procaína. R1- réplica 1, R2- réplica 2, R3- réplica3. \*Valores de P para A e B  $\leq 0,01$ ; valores de P para a e b  $\leq 0,05$ .

Os grupos que receberam o tratamento com 0,1 mM e 0,5 mM não apresentaram diferença em relação ao grupo controle para o número de células totais. Apenas o tratamento com suplementação com 2,0 mM de procaína foi diferente de todos os outros grupos para o número de células totais (Figura 7).



**Figura 7.** Média ± desvio padrão da média das 3 réplicas referente ao número de células totais após adição de azul de tripan no tratamento com procaína; contadas em câmara de Neubauer. NT – grupo controle; [A] 0,1 mM de procaína, [B] 0,5 mM de procaína [C] 2,0 mM de procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si ( $P \leq 0,01$ ).

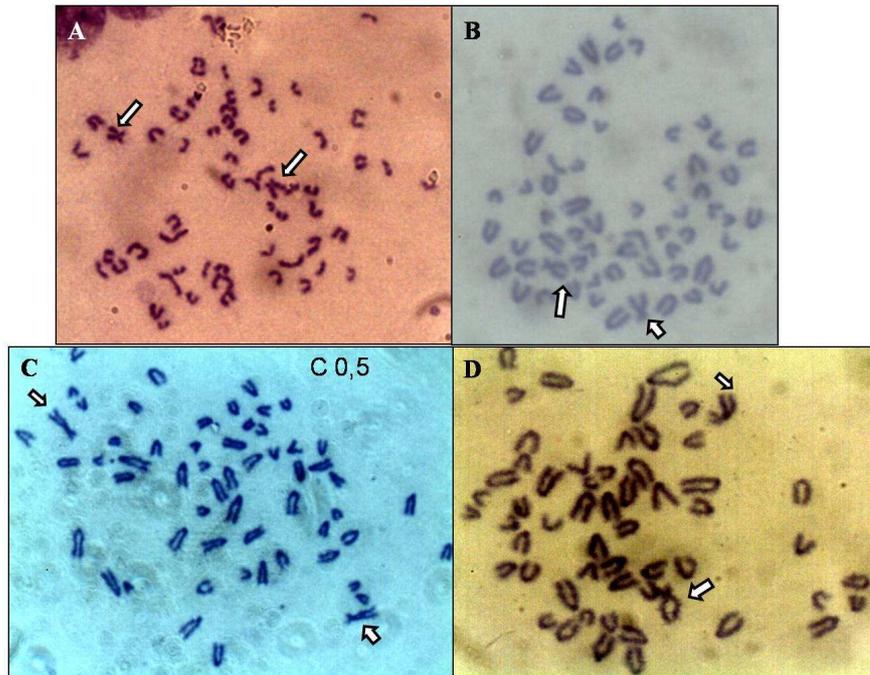
**Tabela 3.** Número de células totais do cultivo *in vitro* de fibroblasto de bovinos tratados com procaína, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

	NT	[A]	[B]	[C]	P
R 1	126633±3707,2 <sup>A</sup>	159933±45456,8 <sup>A</sup>	149967± 23156,9 <sup>A</sup>	23200± 8263,8 <sup>B</sup>	≤0,01
R 2	111600±16055,8 <sup>A</sup>	139267±26807 <sup>B</sup>	131467±39078,2 <sup>A</sup>	41266,7±15827,3 <sup>B</sup>	≤0,01
R 3	105633±19380,2 <sup>Aa</sup>	135783±8626 <sup>B</sup>	151067±13496,8 <sup>Ab</sup>	40800±11091 <sup>B</sup>	*
Média	114622±10821,2 <sup>A</sup>	144994±13054 <sup>A</sup>	144167±11012,3 <sup>A</sup>	21502,5±20665,3 <sup>B</sup>	≤0,01

NT – grupo controle; [A] 0,1 mM de procaína, [B] 0,5 mM de procaína [C] 2,0 mM de procaína. R1-réplica 1, R2-réplica 2, R3- réplica3, \*Valores de P para A e B ≤0,01; valores de P para a e b ≤0,05.

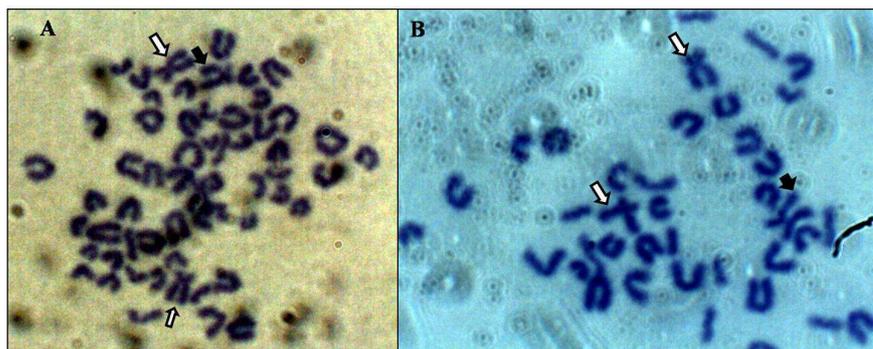
## 6.2 Cariótipo por citogenética convencional

Para todas as metáfases analisadas (tabela 4) os cromossomos observados eram acrocêntricos com exceção do par sexual. Não houve diferença para a ploidia entre o grupo controle e os que receberam os tratamentos com procaína (Figura 8).



**Figura 8.** Foto ilustrativa de metáfases de fibroblasto de bovinos. **A-** Grupo controle. **B-** Tratamento com 0,1 mM de procaína. **C-** Tratamento com 0,5 mM de procaína, **D-** Tratamento com 2,0 mM de procaína. A seta indica os cromossomos X. Fotos: arquivo pessoal.

Apenas duas metáfases, uma no grupo controle e uma no tratamento com 0,5 mM apresentaram uma translocação como mostra a figura 9.



**Figura 9.** Foto ilustrativa de metáfases de fibroblasto de bovinos contendo translocações. **A-** Grupo controle, **B-** Tratamento com 0,5 mM de procaína. Seta branca indica o cromossomo X. Seta preta indica a translocação. Fotos: Arquivo pessoal.

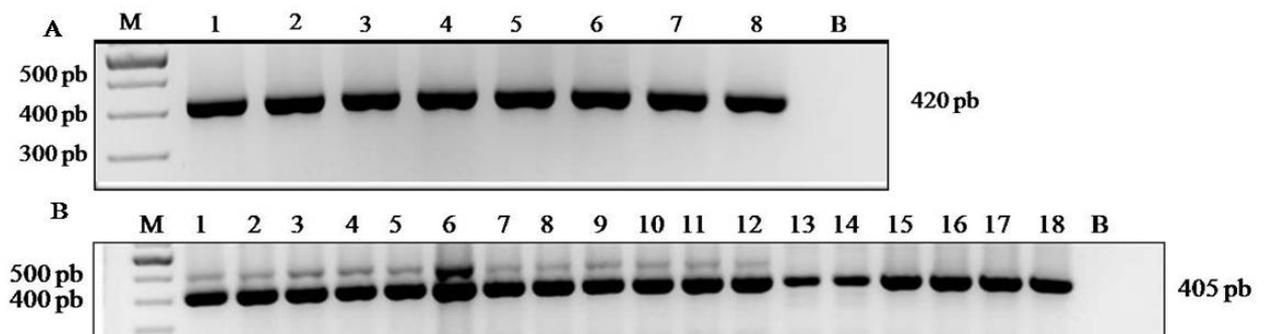
A tabela 4 mostra os resultados das metáfases analisadas.

**Tabela 4.** Análise citogenética de fibroblastos suplementados com procaína.

Tratamento	N de metáfases avaliadas	Morfolologicamente normais
Controle	39	38
0,1 mM	26	26
0,5 mM	26	25
2,0 mM	4	4
Total	95	93

### 6.3 Amplificação por PCR e purificação

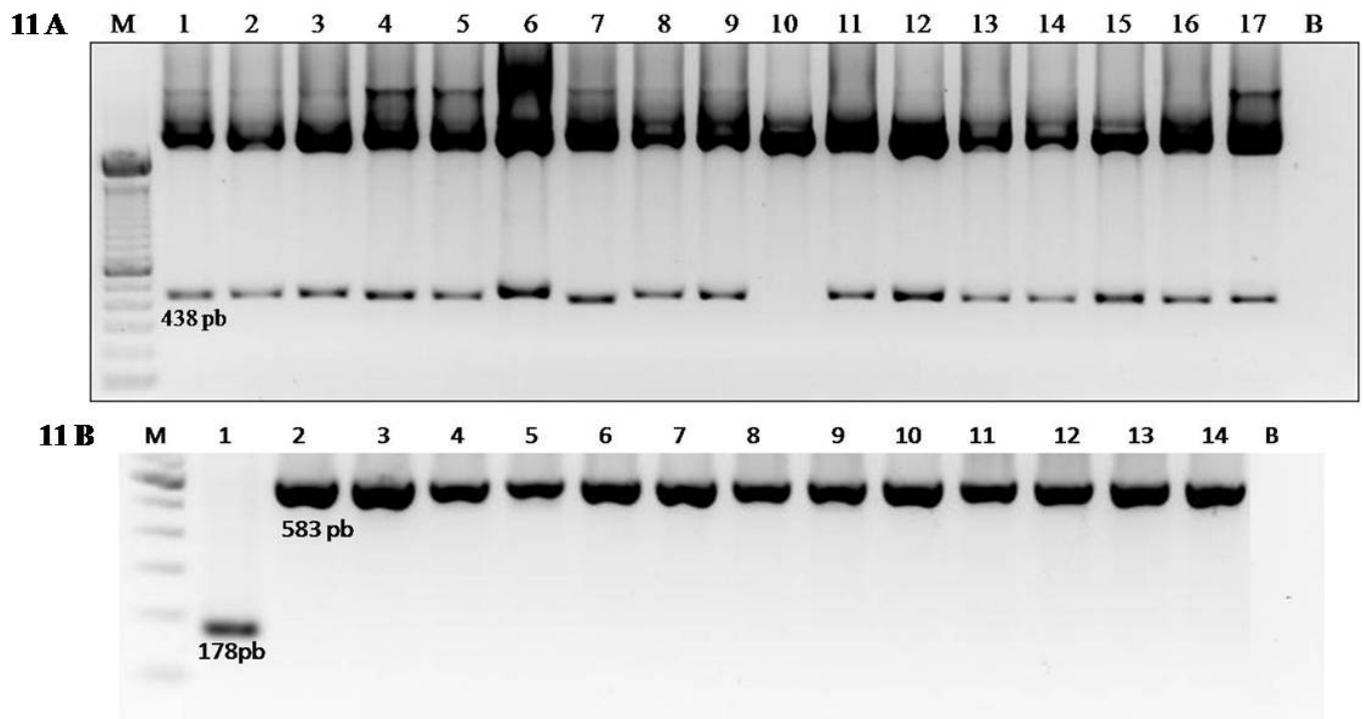
Após a PCR para os genes *IGF2* e *XIST*, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese e fotodocumentados. Os produtos amplificados são observados na figura 10.



**Figura 10.** Análise eletroforética, em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio, dos produtos amplificados após tratamento com bissulfito de sódio. M- 100 pb DNA Ladder Invitrogen. **A-** Fragmento referente ao gene *IGF2*. Amostras de 1-3 grupo controle, 4-6 tratamento com procaína 0,1 mM, 7-8 tratamento com procaína 0,5 mM. **B-** Fragmento referente ao gene *XIST*. A cada 3 amostras refere-se ao grupo controle, tratamento com 0,1 mM e 0,5 mM respectivamente. De 1-9 réplica 1 e 10-18 réplica 2.

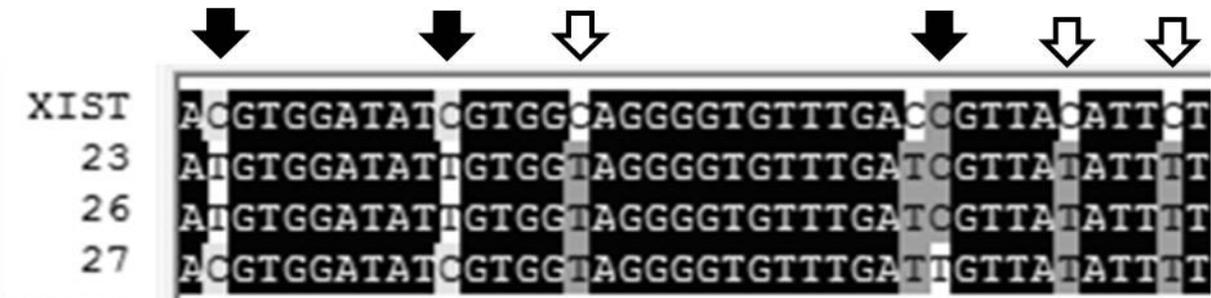
#### 6.4 Clonagem dos produtos de PCR e sequenciamento

Após a clonagem, apenas os plasmídeos que apresentaram o fragmento inserido foram enviadas para o seqüenciamento. Para o gene *IGF2* a confirmação do inserto foi realizada por enzima de restrição como mostra a figura 11A. A confirmação para o gene *XIST* foi realizada por PCR, conforme mostra a figura 11B.



**Figura 11.** Análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídio. **11 A** – Gel a 1% contendo amostras referentes ao produto da digestão dos vetores extraídos para o gene *IGF2*. Fragmento de 438 pb confirma o vetor contendo o inserto. **11 B**- Gel a 1,5% contendo amostras referentes ao produto amplificado para o gene *XIST*. Fragmento de 438 pb confirma o vetor contendo o inserto, enquanto o de 178 pb corresponde ao vetor sem inserto. Cada número refere-se a um clone distinto.

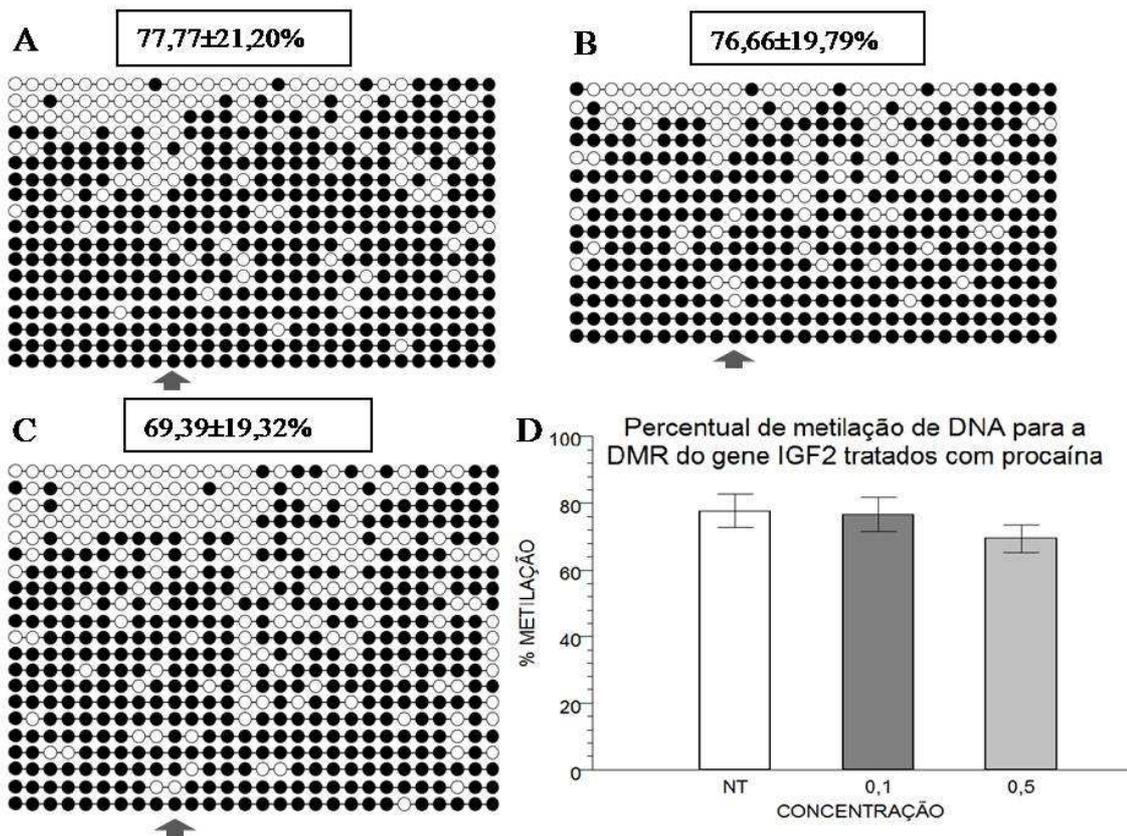
Após o seqüenciamento e alinhando das seqüências com as obtidas no Genbank (Tabela 1) as citosinas não CpG aparecem como timinas (figura 12). As seqüências com percentual de conversão  $\geq 95\%$  foram analisadas para o padrão de metilação (Figura 12).



**Figura 12.** Ilustração do alinhamento realizado no programa DNAMAN 4.0 para as seqüências. Gene *XIST* com a seqüência obtida no *GenBank*. Números 23, 26, 27 são amostras de seqüências obtidas no experimento. Setas brancas mostram uma citosina não CG que sofreu conversão do bissulfito e foi convertida posteriormente em timina. Setas pretas indicam uma citosina CG indicando o padrão de metilação, C indica metilação e T indica desmetilação.

### 6.5 Metilação de DNA

O gene *IGF2* apresentou 28 CpG para cada clone analisado. Não houve diferença para o padrão de metilação de DNA entre os grupos controle ( $77,77 \pm 21,20\%$ ), suplementado com 0,1 mM ( $76,66 \pm 19,79\%$ ) e 0,5 mM ( $69,39 \pm 19,32\%$ ) ( $P=0,1773$ ) (Figura 13).



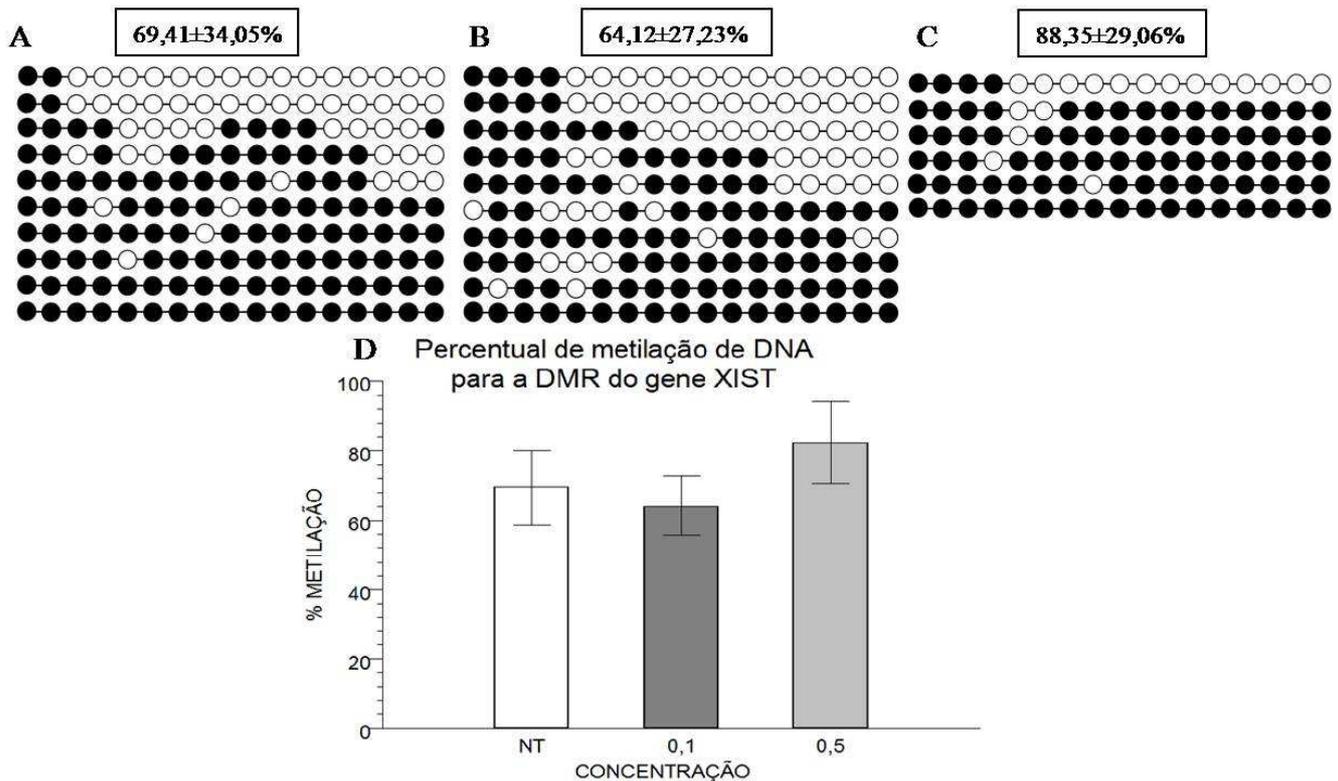
**Figura 13.** Análise de metilação da DMR do último éxon do gene *IGF2* em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com procaína (média  $\pm$  desvio padrão). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG (total de 28 CpG). Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco a não metilação de cada citosina avaliada. Seta indica a nova CG encontrada. **A** – Grupo controle. **B**- Grupo tratado com 0,1 mM de procaína, **C**- Grupo tratado com 0,5 mM de procaína. **D**- Gráfico representativo do padrão de metilação encontrado (média  $\pm$  erro padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $P=0,1773$ ).

As sequências foram obtidas de três réplicas realizadas em momentos diferentes.

Foram obtidas 18 sequências para o grupo controle e todas apresentaram um padrão de metilação diferente. O grupo com suplementação de 0,1 mM de procaína das 15 sequências, 14 possuem um padrão diferente, e o grupo suplementado com 0,5 mM apresentou todas as 21 sequências com padrão diferente.

Comparando as sequências de acordo com Imamura et al. (2005) o grupo controle apresentou 16/18 sequências hipermetiladas (88,89%), o grupo tratado com 0,1 mM 13/15 (86,66%) e o grupo 0,5 mM 17/21 (80,95%) de sequências hipermetiladas.

Todos os clones avaliados quanto ao padrão de metilação do DNA do gene *XIST* apresentaram 17 CpG. Não foi observada diferença no padrão de metilação entre o grupo controle (88, 35±18,29%) e os suplementados com 0,1 mM (63,02±30,32%) e 0,5 mM (88,35±29,06%) ( $P=0,2818$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Análise de metilação da DMR do éxon 1 do gene *XIST* em linhagem celular de fibroblasto de bovino tratada ou não com procaína (média ± desvio padrão). Cada linha representa um clone, onde cada círculo a um dinucleotídeo CpG (total de 17 CpG). Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco a não metilação de cada citosina avaliada. **A** – Grupo controle. **B**- Grupo tratado com 0,1 mM de procaína, **C**- Grupo tratado com 0,5 mM de procaína. **D**- Gráfico representativo do padrão de metilação encontrado (média ± erro padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $P=0,2818$ ).

As seqüências foram obtidas de duas réplicas realizadas em momentos diferentes. O grupo controle apresentou 8 seqüências diferentes para o padrão de metilação de DNA de um total de 10. O grupo tratado com 0,1 mM das 10 seqüências, 9 possuem um padrão diferente e o grupo suplementado com 0,5 mM apresentou todas as 6 seqüências com padrão diferentes.

Comparando as sequências de acordo com Imamura et al. (2005) o grupo controle apresentou 8/10 (80%) de sequências hipermetiladas; o grupo tratado com 0,1 mM 7/10 (70%) e o grupo 0,5 mM 5/6 (83,33%) de sequências hipermetiladas.

## 7. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro experimento utilizando a procaína no meio de cultivo de fibroblasto de bovinos. Atualmente, não existem relatos na literatura com a finalidade de utilizar a procaína como agente desmetilante em células doadoras de núcleo no processo da TNCS. Os resultados foram satisfatórios para a viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas, exceto para 2,0 mM. Este resultado está de acordo com (VILLAR-GAREA, 2005), mostrando que a concentração de 2,0 mM não apresentou crescimento celular normal em linhagem celular cancerosa de humanos MCF7. No mesmo trabalho, a suplementação com 1,0 mM de procaína apresentou uma diminuição de aproximadamente 40% em relação ao grupo controle durante o período de 72 horas e por isso concentrações inferiores a essa concentração foram utilizadas nesse experimento.

A suplementação com 0,1 mM ou 0,5 mM em fibroblasto bovinos *in vitro* apresentou uma quantidade maior de células viáveis em relação ao grupo controle. O azul de tripan é um corante utilizado para avaliar a citotoxicidade de substâncias em meios de cultivos. Ele não atravessa a membrana celular por permeabilidade seletiva, mas penetra nas membranas danificadas de células mortas. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular. Os resultados mostram que a suplementação do meio de cultivo com as concentrações de procaína 0,1 mM ou 0,5 mM não inviabiliza o crescimento celular de fibroblastos de bovinos. Além disso, a qualidade das células com integridade de membrana aumentou, sem apresentar diferença na quantidade de células totais em relação ao grupo controle.

Os fármacos análogos de nucleosídeos e que apresentam alta toxicidade causam apoptose (VILLAR-GAREA, 2005; TADA et al., 2007). Já os não análogos de nucleosídeos, como a procaína, não apresentam essa característica, pois as células MCF7 tratadas com 0,5

mM por 72 horas (VILLAR-GAREA, 2005) e linhagem celular de hepatoblastoma HLE tratadas com 1 mM de procaína por 96 horas (TADA et al., 2007) não apresentaram índices de apoptose pelo método TUNEL. Além disso, o tratamento em células HLE transplantadas em camundongos reduziu em 42,2% o volume tumoral sem efeitos adversos observados (TADA et al., 2007).

Segundo Tada et al. (2007), o tratamento com 1,0 mM de procaína aumentou a população em fase S e diminuiu células em G2/M de linhagem HLE, enquanto o controle negativo não apresentou diferença. Já as células MCF7 tratadas com a mesma substância interrompem o ciclo celular, em G2/M (VILLAR-GAREA et al., 2003). Diferenças podem ocorrer dependendo da especificidade celular (TADA et al., 2007).

Em linhagem celular cancerosa, a procaína e a procainamida atingem efeito máximo entre 24 e 48 horas de tratamento (VILLAR-GAREA et al., 2003). Essas células possuem um genoma global hipometilado (DENG et al., 2006), enquanto as células somáticas normais possuem um padrão epigenético diferenciado e mais estável (revisto por MULERO-NAVARRO; ESTELLER, 2008). Conforme o trabalho de Villar-Garea (2005), a procaína causa parada celular em mitose, pois genes supressores de tumores voltam a ser expressos, impedindo a multiplicação celular tumoral, por causar provável diferenciação ou induzir morte celular. Foi constatado também, por meio de microscopia, um aumento do número de estruturas mitóticas (VILLAR-GAREA, 2005). O fato da linhagem celular de fibroblasto ter aumentando o número de células viáveis, após a suplementação com 0,1 ou 0,5 mM de procaína, pode estar relacionado a uma melhora do cultivo *in vitro*. Acredita-se que um genoma mais desmetilado possa estar ativando genes importantes para a divisão celular, mas são necessários estudos mais específicos para comprovação.

As células que receberam o tratamento com 2,0 mM de procaína apresentaram muitos vacúolos no espaço intracelular e mudanças na morfologia. A mesma observação foi

relatada por Tada et al. (2007) ao final do tratamento de 5 dias com 1 mM de procaína em células HLE. Segundo Yang et al. (1965 *apud* TADA et al., 2007), a procaína induz formação de vacúolos nas células e são capazes de alterar as características de superfície de membrana (CARLSEN et al., 1976; TSONG et al., 1977 *apud* TADA 2007). O tratamento com a concentração de 2,0 mM em linhagem celular HLE e HuH7 também apresentou uma diminuição do crescimento celular de modo tempo dependente, mas a linhagem de hepatócitos primários não sofreu alteração (TADA et al., 2007).

Agentes desmetilantes de DNA podem causar instabilidade cromossômica quando ocorre uma hipometilação global. No entanto, concentrações baixas (10-50  $\mu$ M) de procaína são capazes de desmetilar o genoma de um modo global sem maiores danos, principalmente por essa molécula não ser incorporada ao DNA e não causar mutagênese. Todas as metáfases analisadas neste experimento apresentaram os cromossomos autossômicos acrocêntricos e o par sexual submetacêntrico característico de *Bos taurus indicus* (KRALLINGER, 1931 *apud* JORGE et al., 2006). As concentrações utilizadas no trabalho realizado não resultaram em alterações cromossômicas. A pequena quantidade de metáfases analisadas em todos os grupos ocorreu por artefato técnico, pois muitas metáfases encontravam-se próximas ou ocorriam perdas cromossômicas, que podem ocorrer durante a fixação do material (YADAV et al., 1991). Além disso, a suplementação com 2,0 mM apresentou pouco crescimento celular, o que dificultou a análise citogenética. As translocações observadas no experimento são comuns após congelamento, descongelamento celular e no sistema de cultivo *in vitro* (revisto por KING et al., 2006).

Alterações na ploidia das células é um evento comum no sistema *in vivo e in vitro*. As biotécnicas de reprodução como a FIV e a TNCS estão associadas a um aumento dessas alterações cromossômicas, pois a maioria das mortes embrionárias ocorre por tetraploidia (4n), triploidia (3n) ou uma mistura das duas nas células. Embriões provenientes de TNCS

apresentam anormalidades na ploidia celular variando entre 0 -75 % dos casos em bovinos (revisto por KING et al., 2006).

Especula-se que as regiões avaliadas neste experimento são mais resistentes ao processo de desmetilação, mesmo utilizando altas concentrações de procaína. Além disso, a linhagem celular utilizada é de fibroblasto de bovinos fisiologicamente normais e isso pode ter afetado a ação da procaína como agente desmetilante. A literatura comprova que essa substância é capaz de desmetilar o DNA de linhagens celulares cancerosas (VILLAR-GAREA et al., 2003; TADA et al., 2007), que já possuem um DNA hipometilado (DENG et al., 2006). Esse fato pode justificar a potencialidade da procaína em desmetilar regiões específicas conhecidas e caracterizadas como hipermetiladas.

As sequências diferentes para o padrão de metilação do DNA são importantes a fim de evitar uma falsa análise. Durante a reação de PCR as condições podem levar a amplificação preferencial de alguns alelos, o que resultaria em sequências idênticas após os ensaios de seqüenciamento (IMAMURA et al., 2005). Os resultados mostram que pelo menos 85,7% das sequências obtidas são diferentes e não ocorreu uma amplificação preferencial durante a PCR, por algum alelo específico.

As concentrações de procaína testadas no sistema de cultivo *in vitro* não interferiram no padrão de metilação do DNA nos genes avaliados. Conforme a revisão de Szyf (2005), cada tipo celular possui um padrão de metilação. Esperava-se que a suplementação causasse uma desmetilação no genoma, principalmente para os genes *IGF2* e *XIST*. Esses genes foram selecionados por apresentarem alterações epigenéticas e na expressão gênica nos embriões durante o cultivo no sistema *in vitro* e nos embriões provenientes da TNCS (XUE et al., 2002, DINDOT et al., 2004, YANG et al., 2005, LIU et al., 2008). No entanto, existe a possibilidade de ter ocorrido uma desmetilação global ou em outras DMR, mas que não foi avaliada, enquanto as DMR avaliadas, as quais devem permanecer inalteradas por serem de genes

*imprinting*, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para a metilação de DNA.

A procaína pode mudar a forma do DNA de B para Z, criando uma barreira estrutural para interações com outras biomoléculas, inclusive de DNMT (ZACHARIAS; KOOPMAN, 1990). Ela também causa hipometilação global do DNA, restaurando a expressão de genes (LIN; ASGARI, 2001). Além disso, foi utilizada pela primeira vez como agente desmetilante de DNA por Villar-Garea et al. (2003) e também foi capaz de desmetilar ilhas CpG controladoras de genes supressores de tumores com padrão hipermetilado em linhagens celulares cancerosas de hepatócitos (TADA et al., 2007).

Ao contrário de reversões genéticas, o silenciamento epigenético por meio da hipermetilação de DNA é um processo mais facilmente reversível. Em experimentos *in vitro*, as reações de desmetilação têm sido propostas para remover o grupo metil das citosinas ou por substituição das 5-metil-citosinas por citosinas através do mecanismo de excisão de bases (revisto por REIK et al., 2001). Segundo Blelloch et al. (2006), cultivar os fibroblastos com agentes desmetilantes aumenta as taxas de blastocistos, sugerindo uma melhor eficiência na técnica da clonagem. Experimentos utilizando 5'-azacitidina ou 5'-aza-2-deoxycitidina no tratamento de células doadoras de núcleo foram realizados (JONES et al., 2001; ENRIGHT et al., 2003, 2005) e mostraram-se capazes de desmetilar o genoma, mas as taxas de blastocistos foram menores ou iguais aos controles. Não houve correlação entre os tratamentos com agentes desmetilantes e taxas de blastocisto. Os resultados obtidos, por esses pesquisadores, podem ser uma consequência de uma desmetilação excessiva ou da citotoxicidade dos fármacos utilizados. Segundo a revisão de Eilertsen et al. (2007), a desmetilação de DNA no genoma de células doadoras de núcleo, utilizando siRNA para a DNMT1, resultou em uma taxa de blastocisto maior do que em relação ao controle. Outro estudo mostra que SAH também é uma substância desmetilante de DNA, não análoga de nucleosídeo, de baixa toxicidade

(JEON et al., 2008). Adicionada ao meio de cultivo de fibroblastos de bovinos é capaz de causar uma desmetilação global, reativar parcialmente o cromossomo X inativo nos carioplastos e, quando utilizadas na TN, aumentam as taxas de blastocisto e blastocisto expandido (JEON et al., 2008).

Para a amplificação da segunda reação de PCR referente ao gene *XIST*, as condições encontravam-se adequadas para o produto específico dos iniciadores utilizados, conforme observado nas amostras 13-18 da figura **10B**. No entanto, a manipulação de diferentes amostras, dos reagentes da PCR e os artefatos técnicos podem ter levado à amplificação de produtos inespecíficos observado nas amostras 1-12 da figura **10B**. Contudo, esses produtos não influenciaram no resultado, pois apenas a banda específica referente ao gene foi retirada do gel para subsequente purificação.

Após o sequenciamento do DNA, foram identificados 28 sítios CpG em cada um dos clones avaliados, diferentemente ao encontrado por Gebert et al., (2006) e a sequência X53553 do GenBank, que possui apenas 27 sítios CpG. No entanto, as sequências obtidas neste trabalho são similares à sequência NM174087 depositada no GenBank, possuindo 28 sítios CpG. O polimorfismo de um nucleotídeo (SNP) proporcionou uma epimutação fazendo surgir um novo dinucleotídeo CpG na sequência, a qual foi diferencialmente metilada entre os grupos avaliados.

Apesar do gene *IGF2* não ter apresentado diferença entre os tratamentos para a DMR2, todos os resultados obtidos são similares aos encontrados em células do cumulus de bovinos ( $80,7 \pm 2,05\%$ ) (FAGUNDES, 2009). Apesar de ser um gene que apresenta expressão alterada na clonagem (HAN et al., 2003; YANG et al., 2005; LIN et al., 2008), Gebert et al. (2009), não encontraram diferença na metilação para essa DMR entre os blastocistos de embriões *in vivo* e provenientes de TNCS. Eles afirmam que a reprogramação é estabelecida

corretamente nesses embriões até o estágio de blastocisto, mas que o padrão é diferente entre machos ( $22\pm 2\%$ ) e fêmeas ( $12\pm 1\%$ ).

Os resultados encontrados neste experimento para o padrão de metilação do DNA na DMR do gene *XIST* são similares aos encontrados por Liu et al. (2008), onde o percentual foi de  $95,3 \pm 2,63\%$  para o grupo controle. As fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, enquanto os machos possuem apenas um. Para adequar-se a uma compensação de dose cromossômica, as fêmeas possuem um dos cromossomos X inativado, e essa informação é transmitida ao longo das divisões celulares (revisado por LUCIFERO et al., 2004). O cromossomo X ativo não apresenta a expressão do *XIST*, logo, a DMR analisada deve apresentar um padrão hipermetilado. Já o cromossomo X inativado em células adultas e diferenciadas, não recruta a expressão do gene *XIST* para mantê-lo silenciado (revisado por KING et al., 2006), justificando o alto percentual de metilação de DNA para essa região. A sua expressão acontece apenas no processo inicial de inativação (DE LA FUENTE et al., 1999 ; XUE et al., 2002). Caso essa região estivesse hipometilada nas células doadoras de núcleo e, elas fossem utilizadas na TNCS, as marcas dos cromossomos X paterno e materno estariam alteradas, o que poderia dificultar o reconhecimento de origem parental durante o processo da inativação do cromossomo X, ao longo do desenvolvimento embrionário. Além disso, a hipometilação nesta mesma região pode resultar na expressão bialélica do gene *XIST*, e dificultar a inativação *imprinted* do cromossomo de origem paterna nas células que dão origem à placenta (XUE et al., 2002; DINDOT et al., 2004).

A incorreta metilação de DNA pode ser deletéria e resultar na morte do embrião no início do desenvolvimento (revisado por BIEMONT, 2010). A literatura enfatiza que existem diferenças entre a metilação global no início do desenvolvimento entre embriões *in vivo* e os provenientes da TNCS, mas não existem estudos relacionados à identificação desses genes (revisado por KEEFER, 2008). Alguns autores afirmam que a DNMT1 presente na célula

doadora do núcleo pode interferir parcialmente na reprogramação epigenética (BOURC'HIS et al., 2001). Outros explicam que o embrião clone não consegue passar pela desmetilação ativa e passiva assim como os embriões *in vivo* (XUE et al., 2002; YANG et al., 2005). Contudo, a revisão realizada por Yang et al. (2007), afirma que existe diferença individuais na qualidade dos ovócitos. Além disso, essa diferença na qualidade dos ovócitos pode resultar numa maior tolerância sobre os efeitos deletérios que ocorrem na clonagem, como a que acontece durante a enucleação e a fusão elétrica (revisto por KEEFER, 2008). Além disso, os clones possuem uma herança mitocondrial da célula doadora e do ovócito. Isso influencia na modificação do núcleo doador e na competência da reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário (FU et al., 2008). No entanto, faltam estudos comparativos entre os mamíferos em geral, para estabelecer um modelo do processo epigenético. Assim será possível um melhor entendimento das alterações do sistema *in vitro* sobre os processos biológicos.

Muitos genes envolvidos no crescimento celular são regulados por fatores epigenéticos, e os genes *imprinting* são encontrados em *cluster* (revisto por IDERAABDULLAH et al., 2008). Eles desempenham função de crescimento e diferenciação, e são fatores importantes em doenças hereditárias e carcinogênese em humanos (revisto por FEIL; KHOSLA, 1999). As alterações nos genes *imprinted* durante a gestação podem desequilibrar o controle materno para a distribuição do alimento e resultar em anormalidades como a síndrome do bezerro grande ou em problemas de placentação (CONSTANT et al., 2006). A perda do controle epigenético do *imprinted* por alteração do *cluster* do gene *IGF2* em humanos estão relacionados à Síndrome de *Beckwith-Weidemann* (ORSTAVIK et al., 2003). Apesar de alguns genes serem *imprinted* nos gametas, eles podem não manter esse mesmo perfil em outras células de tecidos específicos (revisto por REIK et al., 2001).

Atualmente, objetiva-se desenvolver protocolos que visem a proteger o genoma de possíveis efeitos danosos durante o cultivo celular *in vitro*. No caso da TNCS, submeter a célula doadora de núcleo a um tratamento para sofrer uma desprogramação epigenética antes da clonagem pode aumentar a eficiência da técnica. A procaína não precisa de uma replicação do DNA para começar a inibir as DNMTs, já que é uma molécula não nucleosídica, não sendo incorporada ao material genético. Essa característica resulta numa ação mais rápida do que drogas análogas de nucleosídeos como a zdC (5 aza-2-deoxicitidina). Acredita-se que a procaína, desmetilando o genoma do núcleo doador, seja capaz de aumentar a eficiência da clonagem de mamíferos e conseqüentemente da produção de animais transgênicos e da produção de células-tronco a partir de células diferenciadas. No entanto existem outras vias bioquímicas que a procaína pode alterar para causar a desmetilação do DNA, mas que não são conhecidas. Um exemplo disso ocorre com a hidralazina, que altera a via MAPK diminuindo a expressão de DNMT1 e DNMT3A (DENG et al., 2003). O que se tem conhecimento é que a procaína e procainamida são bloqueadores de canais iônicos, mas ainda não existem estudos relacionando as vias bioquímicas inibindo as DNMTs. São necessários mais estudos com relação às concentrações e quanto ao tempo de cultivo com a substância desmetilante. Os ensaios com MTT, FACS ou avaliações por técnicas de microscopia também são importantes para uma melhor caracterização de ciclo ou estrutura celular. As avaliações globais com anticorpo contra 5metcitosina são recomendadas, e se possível associadas a análises de microarrajo. Logo após essas avaliações, os genes específicos que apresentarem uma diferença podem ser submetidos a análises de metilação de DNA, nas DMRs específicas, e ensaios de expressão gênica por PCR quantitativo podem auxiliar a comprovação dos resultados. Além disso, as células doadoras de núcleo tratadas com diferentes concentrações de procaína precisam ser utilizadas na TNCS para que sejam realizadas as avaliações nos

embriões. Acredita-se que a procaína seja capaz de desmetilar o genoma a fim de aumentar a eficiência da clonagem de mamíferos por transferência nuclear.

## 8. CONCLUSÕES

O cultivo de linhagem celular de fibroblasto de bovinos com diferentes concentrações de procaína, como agente desmetilante de DNA, foi viabilizado. Além disso, as concentrações de 0,1 mM e de 0,5 mM de procaína apresentaram uma qualidade melhor das células adquiridas após o tratamento. A presença desse fármaco não proporciona alterações cromossômicas pela citogenética convencional. Apesar do efeito desmetilante no DNA não ter sido observado nos genes avaliados, acredita-se que a utilização da procaína na técnica de transferência nuclear contribuirá com melhores índices na clonagem de mamíferos. Além disso, experimentos futuros com outras concentrações de procaína, aumentando o período de tratamento, e realizando avaliações de metilação de DNA global, associados a ensaios de expressões gênicas, são necessários para um melhor entendimento da epigenética de mamíferos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIEMONT, C. Inbreeding effects in the epigenetic era. **Nature Review Genetics**, Correspondence, 2010. doi:10.1038/nrg2664-c1.
- BLELLOCH, R.; WANG, Z.; MEISSNER, A.; POLLARD, S.; SMITH, A.; JAENISCH, R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. **Stem cells**, v. 24, p. 2007-2013, 2006.
- BOURC'HIS, D.; Le BORHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J.P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, v. 11, p. 1542-1546, 2001.
- CARLSEN, A.S.; TILL, J.E.; LING, V. Modulation of membrane drug permeability in chinese hamster ovary cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 900-912, 1976.
- CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J.L.; RENARD, J.P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late pregnancies complicated by hydrallantois. **Biology of Reproduction**, v. 75, p.122-130, 2006.
- DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (*XIST*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.
- DENG, C.; LU, Q.; ZHANG, Z.; RAO, T.; ATTWOOD, J.; YUNG, R.; RICHARDSON. B. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signalling. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 746-756, 2003.
- DENG, G.; NGUYEN, A.; TANAKA, H.; MATSUZAKI, K.; BELL, I.; MEHTA, K.R.; TERDIMAN, J.P.; WALDMAN, F.M.; KAKAR, S.; GUM, J.; CRAWLEY, S.; SLEISENGER, M.H.; KIM, Y.S. Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 118, p.2999-3005, 2006.

- DINDOT, S.V.; FARIN, P.W.; C.E.; ROMANO, J.; WALKER, S.; LONG, C. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 470-478, 2004.
- EILERTSEN, K.J.; POWER, R.A.; HARKINS, L.L.; MISICA, P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potencial, and improve somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science Review**, v. 98, p.129-146, 2007.
- ENRIGHT, B.P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X.C. Epigentig characterist and development of embryos cloned from donor cells treated with trichostatin A or 5 aza-2'deoxyctidine. **Biology of Reproduction**, v. 69, p.896-901, 2003.
- ENRIGHT, B.P.; SUNG, L.-Y.; CHANG, C.-C.; YANG, X.; TIAN, X.C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'deoxyctidine. **Biology of Reproduction**, v. 72, p.944-948, 2005.
- FAGUNDES, N.S. **Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene *IGF2* em ovócitos e células do cumulus de vacas Nelore**. 2009. 55 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.
- FEIL, R.; KHOSLA, S. Genomic imprinting in mammals an interplay between chromatin and DNA methylation? **Science Review**, v. 15, n.11, p. 431-435, 1999.
- FU, J.; GUAN, P.; ZHAO, L.; LI, H.; HUANG, S.; ZENG, F.; ZHENG, Y. Effect of donor cells on in vitro development of cloned bovine embryos. **Journal of Genetics & Genomics**, v. 35, p. 273-278, 2008.
- GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; REINHARDT, R.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.; LEHRACH, H.; NIEMANN, H. The bovine *IGF2* gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. **Genomics**, v. 88, p. 222–229, 2006.
- GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; THIEL, J.; REINHARDT, R.; LEHRACH, H.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics**, v. 94, p.63–69, 2009.

- GRUNAU, C.; CLARK, S.J.; ROSENTHAL, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 13, p. e65 1-7, jul. 2001.
- HAN, D.W.; SONG, S.J.; UHUM, S.J.; DO, J.T.; KIM, N.H.; CHUNG, K.S.; LEE, H.T. Expression of *IGF2* and IGF receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. **Zygote**, v. 11, p. 245-252, ago. 2003.
- IDERAABDULLAH, F.Y.; VIGNEAU, S.; BARTOLOMEI, M.S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. **Mutation Research Review**, v. 647, p.77-85, 2008.
- IMAMURA, T.; KERJEAN, A.; HEAMS, T.; KUPIEC, J.; THENEVIN, C.; PÁLDI, A.; Dynamic CpG and Non-CpG methylation of the *Peg1/Mest* gene in the mouse oocytes and preimplantation embryo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20171-29175, 2005.
- JEON, B.G.; COPPOLA, G.; PERRAULT, S.D.; RHO, G.J.; BETTS, D.H.; KING, W.A. S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. **Reproduction**, v. 135, n. 6, p. 815–828, jun. 2008.
- JONES, K.L.; HILL, J.; SHIN, T.Y.; LUI, L.; WESTHUSIN, M. DNA hypomethylation of karyoplast for bovine nuclear transplantation. **Molecular Reproduction Development**, v. 60, p. 208-213, 2001.
- JORGE, W.; ISSA, E.C.; SERENO, F.T.P.S.; SERENO, J.R.B. **Caracterização Genética de Bovinos por meio de estudos cromossomo Y e do DNA mitocondrial**. Embrapa Cerrados, 1 ed. 74 p. Planaltina, DF, 2006.
- KEEFER, C.L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). **Theriogenology Review**, v. 69, p. 48-54, 2008.
- KING, W.A.; COPPOLA, G.; ALEXANDER, B.; MASTROMONACO, G.; PERRRAULT, S.; NINO-SOTO, M.I.; PINTON, A.; JOUDREV, EM. The impact of chromosomal alteration on embryo development. **Theriogenology Review**, v. 65, p. 166-177, set. 2006.

- KOVACHEVA, V.P.; MELLOTT, T.J.; DAVISON, J.M.; WAGNER, N.; LOPEZ-COVIELLA, I.; SCHNITZLER, A.C.; BLUSZTAJN, J.K. Gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31777-31788, oct. 2007.
- KRALLINGER, H.F. Cytologische na oinigen Haussaugetieren. **Archiv Fuer Tierernahrung**, Switzerland, v. 5, p.127-187, 1931.
- LIN, X.; ASGARI, K.; PUTZI, M.J.; GAGE, W.R.; YU, X.; CORNBLATT, B.S.; KUMAR, A.; PIANTADOSI, S.; DEWEESE, T.L.; DE MARZO, A.M.; NELSON, W.G. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. **Cancer Research**, v. 61, p. 8611-8616, 2001.
- LIN, L.; LI, Q.; ZHANG, L.; ZHAO, D.; DAI, Y.; LI, N. Aberrant epigenetic changes and the gene expression in cloned cattle dying around birth. **BMC Developmental Biology**, v.8 n.14, 2008, doi:10.1186/1471-213X-8-14.
- LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA Methylation Imprints in Aborted Bovine Clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 598–607, 2008.
- LUCIFERO, D.; CHAILLET, J.R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 3-18, 2004.
- MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human câncer: The time is now. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 68, n.1, p.1-11, abr., 2008.
- ORSTAVIK, K.H.; EIKLID, K.; van der HAGEN, C.B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 218–219, 2003.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science Review**, v. 293, p. 1089-1093, ago. 2001.

- SZYF, M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. **Biochemistry Review**, v. 70, p. 533-549, 2005.
- TADA, M.; IMAZEKI, F.; FUKAI, K.; SAKAMOTO, A.; ARAI, M.; MIKATA, R.; TOKUHISA, T.; YOKOSUKA, O. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. **Hepatology International**, v. 1, p. 355-364, 2007.
- TSONG, T.Y.; GREENBERG, M.; KANEHISA, M.I. Anesthetic action of membrane lipids. **Biochemistry**, v. 16, p. 3115-3121, 1977.
- VILLAR-GAREA, A.; FRAGA, M.F.; ESPADA, J.; ESTELLER, M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 4984-4989, 2003.
- VILLAR-GAREA, A. **Epigenetic transcriptional repression of tumor supresor genes and its reversion by drugs**. 2005. Tese de doutorado - Departamento de laboratório de epigenética, Universidade de Valencia. Espanha. 2005.
- XUE, F.; TIAN, C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L.V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216-220, jun. 2002.
- YADAV, B.R.; KING, W.A.; XU, K.P.; POLLARD, J.W.; PLANTE, L. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured in vitro. **Genetics Selection Evolution**, v. 23, p. 191-196, 1991.
- YANG W.C.; STRASSE F.F.; POMERAT, C.M. Mechanism of drug induced vacuolization in tissue culture. **Experimental Cell Research**, v. 38, p. 495-506, 1965.
- YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinting genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 431-438, 2005.
- YANG, X.; SMITH, L.S.; TIAN, X. C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics Review**, v. 29, n. 3, p. 295-302, mar. 2007.

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