

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DE AGENTES DESMETILANTES SOBRE
A VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO
GÊNICA EM FIBROBLASTOS BOVINOS
CULTIVADOS *IN VITRO***

Thiago Felipe Braga

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DE AGENTES DESMETILANTES SOBRE
A VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO
GÊNICA EM FIBROBLASTOS BOVINOS
CULTIVADOS *IN VITRO***

Thiago Felipe Braga

Orientador : Dr. Maurício Machaim Franco

Co-orientador : Dr. Robson Carlos Antunes

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B813e Braga, Thiago Felipe, 1986-
2012 Efeitos de agentes desmetilantes sobre a viabilidade celular e
 expressão gênica em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* /
 Thiago Felipe Braga. -- 2012.
 101 f. : il.

Orientador: . Maurício Machaim Franco.
Coorientador: Robson Carlos Antunes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Genética do desenvolvimento - Teses. I. Franco, Maurício Machaim. II. Antunes, Robson Carlos, 1968- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

“Por mais que o tempo passe e as estações se movam, ainda será minha estrela, a mais linda, a mais radiante... Será pra mim sempre bela, sempre amiga. Podem todos me crucificar, mas sei que saberás a verdade e com todas suas forças irá me defender como ninguém me defenderia. Está presentes em todos felizes e tristes momentos, está sempre forte para vencer desafios. Por mais que eu cresça e amadureça, sempre serei seu fruto, e orgulho total de minha raiz... Te amo de forma insubstituível, és robusto meu amor, és sincero meu afeto. Trouxe-me ao mundo, agüentou toda dor e sorriu ao me ver pela primeira vez. Com muito carinho estou a pensar em você, pois de carinho me alimenta. É tudo por você e pra você!”

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Cleosomar, que sempre me apoiou nas minhas decisões, que sempre esteve do meu lado e que agora, mesmo ausente, tenho certeza que ilumina os caminhos por onde ando. Sempre te amarei!

Ao meu pai Rafael, que hoje é o melhor exemplo de que pessoas mudam, companheiro indispensável e porto seguro. Te amo!

A minha irmã Fernanda, companheira, amiga, sempre do meu lado com palavras que acalmam e fazem seguir em frente de cabeça erguida. Tudo por você e nada sem você, te amo!

A minha tia Rosângela, que sempre cuidou e continua cuidando de todos nós que não têm um “pingo de juízo”, ou que dão “nó em gota d’água”. Te amo!

A minha prima Carla, que sempre esteve do meu lado, em todos momentos certos e errados.

Aos amigos Wesley Vieira, Leo Vigideo, Paulo Freitas e Rafael Innocentini, que estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida.

A Ana Carolina Portella, Ana Claudia Borges, Juliana Neves e Carmen Silvia que além de amigas são companheiras de profissão, obrigado!

Aos amigos da Embrapa que ajudaram a realizar este trabalho e que foram grandes companheiros fora dos laboratórios.

Ao Dr. Robson Carlos Antunes, exemplo de ser humano e profissional, que me despertou a paixão por suínos e interesse por pesquisa, obrigado!

Ao Dr. Maurício Machaim Franco, por me orientar e me mostrar um mundo que antes não conhecia, pela paciência em ensinar e por acreditar que sou capaz.

A todos pesquisadores do Cenargen, Dra. Margot, Dr. Eduardo, Dr. Ricardo, Dra. Bianca e ao Técnico Regivaldo, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este trabalho e à CAPES pela bolsa de fomento.

Em fim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa da minha vida. Obrigado!

SUMÁRIO

	Páginas
ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1- Epigenética.....	3
2.2- Metilação de DNA.....	6
2.3- Código de Histonas.....	8
2.4- Substâncias Desmetilantes.....	12
2.4.1-Procaína.....	15
2.4.2- S-adenosil-L-homocisteína (SAH).....	16
2.5- O gene OCT4/POU5F1.....	18
2.6- O gene NANOG.....	21
2.7- O gene DNMT1.....	23
2.8- O gene HDAC2.....	25
2.9- Clonagem por Transferência Nuclear.....	26
3- OBJETIVOS.....	29
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1- Cultivo celular de fibroblastos para tratamento com Procaína.....	30
4.2- Cultivo celular de fibroblastos para tratamento com SAH.....	35
4.3- Extração de RNA e Transcrição Reversa.....	36
4.4- PCR em Tempo Real (qPCR).....	36
4.5- Análises estatísticas.....	37
5- RESULTADOS.....	38
5.1- Cultivo celular com Procaína e SAH.....	38
5.2- Expressão gênica.....	41
6- DISCUSSÃO.....	50

7- CONCLUSÕES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

ABREVIATURAS

AZA – 5-Azacitidina

DAC – 5-Aza-2'-deoxicitidina

DMEM – Dubelco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNMTs – DNA metiltransferases

ECGC – Epigallocatequina-3-galato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

HATs – Histonas acetiltransferases

HDACs – Histona desacetilases

HMTs – Histona metiltransferase

HP1 – Heterocromatin Protein 1

ICM – Massa Celular Interna

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

OCT4 – Octamer binding protein 4

PABA – Para-aminobenzóico

pb – Pares de base

PcG – Grupo Polycomb de proteínas de ligação

PTMs – Modificações pós-traducionais

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

SAH – S-adenosil-L-homocisteína

SAM – S-adenosil-L-metionina

SIRT – Sirtuin

TN – Transferência Nuclear

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Modelo de um nucleossomo com caudas de histonas proeminentes. Cada nucleossomo é composto por 147 pares de base de DNA envolto a um octâmero de histonas, duas de cada (H2A, H2B, H3 e H4). (Adaptado de BOGDANOVIC *et al.*, 2011)..... 5
- Figura 2** - Modificações da cromatina que induzem progressivamente o aumento do silenciamento transcricional. Nota-se que a modificação por acetilação é totalmente reversível (Modificado de GALLINARI *et al.*, 2007)..... 10
- Figura 3** - Via da transmetilação e transsulfuração (PANAYIOTIDIS *et al.*, 2009)..... 17
- Figura 4** – Palheta de célula identificada e armazenamento em botijão de nitrogênio líquido (Arquivo Pessoal)..... 30
- Figura 5** – Transferência das células da palheta para tubo de 1,5mL com auxílio de seringa (Arquivo Pessoal)..... 31
- Figura 6** – Garrafa de cultivo contendo células, estufa de cultivo e microscópio para observação de confluência (Arquivo Pessoal)..... 31
- Figura 7** – Adição de 1mL de tripsina, material obtido após centrifugação, *pellet* de células sem o sobrenadante e ressuspensão do *pellet* com 1mL de DMEM (Arquivo Pessoal)..... 32
- Figura 8** – Diluição de 10µL do material celular em azul de Tripán e preparação da placa de Neubauer para contagem de células (Arquivo Pessoal)..... 33
- Figura 9** – Placa preparada para cultivo celular contendo meio de cultivo DMEM com 1 mM de Procaína (Arquivo Pessoal)..... 34
- Figura 10** - Para cada poço de cultivo, um microtubo de 1,5mL foi identificado de acordo com o tratamento, as células tratadas foram transferidas para os tubos e estes foram centrifugados (Arquivo Pessoal)..... 34
- Figura 11** – *Pellet* de células tratadas com Procaína após centrifugação, adição de RNAlater e estoque com todas as réplicas (Arquivo Pessoal)..... 35
- Figura 12** - Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; ΔCP_{alvo} é o desvio de CP da amostra controle – amostra do

gene alvo; ΔCP_{ref} é desvio de CP da amostra controle – amostra do gene referência. 37

Figura 13 – Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos após 72h de cultivo com Procaína. **A-** Grupo controle; **B-** grupo tratado com 1mM de Procaína..... 38

Figura 14 - Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos após 72h de cultivo com SAH. **A-** Grupo controle; **B-** grupo tratado com 2mM de SAH..... 38

Figura 15 – Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, na primeira repetição do tratamento com 1mM de Procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si ($P = 0,0254$)..... 39

Figura 16 - Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, na segunda repetição do tratamento com 1mM de Procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si ($P = 0,00119$)..... 40

Figura 17 – Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, no tratamento com 2mM de SAH..... 41

Figura 18 – Amplificações verificadas por qPCR do gene *Nanog*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína. **A-** primeira repetição, **B-** segunda repetição..... 42

Figura 19 - Amplificações verificadas por qPCR do gene *Oct4*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína. **A-** primeira repetição, **B-** segunda repetição..... 43

Figura 20 – Eletroforese em gel de Agarose 2%, mostrando a presença do amplicon para o gene *Nanog*. **A-** As bandas específicas com 189pb correspondentes às células do grupo controle. **B-** As bandas com 189pb correspondentes às células do grupo tratado com 1mM de Procaína..... 43

Figura 21 – Eletroforese em gel de Agarose 2%, mostrando a presença do amplicon para o gene *Oct4*. **A-** As bandas específicas com 112pb correspondentes às células do grupo controle. **B-** As bandas com 112pb correspondentes às células do grupo tratado com 1mM de Procaína..... 44

Figura 22 - Amplificação verificada por qPCR do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína..... 45

Figura 23 – Confirmação da presença do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína, através da curva padrão obtida na reação de qPCR ($TM = 81,9^{\circ}C$)..... 45

Figura 24 - Amplificação verificada por qPCR do gene *DNMT1*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína..... 45

Figura 25 – Confirmação da presença do gene <i>DNMT1</i> , nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína, através da curva padrão obtida na reação de qPCR (TM = 76,2°C).....	46
Figura 26 - Amplificação verificada por qPCR do gene <i>HDAC2</i> , nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH.....	46
Figura 27 – Confirmação da presença do gene <i>HDAC2</i> , nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH, através da curva padrão obtida na reação de qPCR (81,7°C).....	46
Figura 28 - Amplificação verificada por qPCR do gene <i>DNMT1</i> , nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH.....	47
Figura 29 – Confirmação da presença do gene <i>DNMT1</i> , nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH, através da curva padrão obtida na reação de qPCR (75,8°C).....	47
Figura 30 – Expressão relativa de mRNA dos genes <i>HDAC2</i> e <i>DNMT1</i> em células do grupo controle e tratadas com 1mM de Procaína.....	48
Figura 31 – Expressão relativa de mRNA dos genes <i>HDAC2</i> e <i>DNMT1</i> em células do grupo controle e tratadas com 2mM de SAH.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> , tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento.....	37
---	-----------

EFEITOS DE AGENTES DESMETILANTES SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA EM FIBROBLASTOS BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO

RESUMO - Durante o processo de clonagem por transferência nuclear, as marcas epigenéticas existentes nas células devem sofrer um processo de reprogramação, para que o desenvolvimento embrionário ocorra de forma correta, porém, essa reprogramação não é completamente eficaz. Assim, a utilização de substâncias desmetilantes, como a Procaína e SAH, podem ser de grande valia para facilitar essa reprogramação. Ao avaliar a viabilidade celular e a expressão de genes relacionados à pluripotência e alterações epigenéticas, nos permitiu verificar a atuação de drogas desmetilantes como a Procaína e a SAH em cultivo de células somáticas. Essas drogas podem auxiliar a desprogramação epigenética e serem úteis para uma melhoria do processo de clonagem por TN. Os fibroblastos bovinos tratados com 1mM de Procaína apresentaram menor viabilidade celular em relação ao grupo não tratado (controle), enquanto que as células tratadas com 2mM de SAH não apresentaram diferença em sua viabilidade entre os grupos experimentais. Os genes OCT4 e NANOG foram detectados tanto nas células controle como nas tratadas com 1mM de Procaína. Os genes HDAC2 e DNMT1 foram detectados nos mesmos níveis, tanto nas células tratadas com 1mM de Procaína quanto nas tratadas com 2mM de SAH. Com os resultados obtidos nesse estudo, concluímos que os genes OCT4 e NANOG não são marcadores moleculares para pluripotência celular em bovinos e que com possíveis modificações no cultivo celular, podemos alterar os padrões epigenéticos do DNA das células doadoras de núcleo para a clonagem por TN, contribuindo para o incremento dos resultados da técnica.

Palavras-Chave: clonagem, epigenética, expressão gênica, pluripotência celular, substâncias desmetilantes

EFFECTS OF DEMETHYLATING AGENTS IN THE BOVINE FIBROBLASTS *IN VITRO* CULTURE ON CELL VIABILITY AND GENE EXPRESSION

ABSTRACT - During the process of cloning using nuclear transfer, epigenetic marks in cells must go through a reprogramming process, so that embryonic development can occur appropriately. However, during TN this reprogramming process is not completely efficient. Analysis of cell viability and expression of genes related to pluripotency and epigenetic changes, allowed us to evaluate the action of demethylation drugs such as Procaine and SAH in somatic cell cultures. These substances are potential inducers of epigenetic reprogramming and they could be used to improve the process of cloning by TN. The bovine fibroblasts treated with 1 mM Procaine had lower cell viability compared to the control group (non treated), while the group treated with 2 mM of SAH did not differ from the controls. OCT4 and NANOG genes were detected in control group as well as in the group treated with 1mM Procaine, while HDAC2 and DNMT1 genes were expressed in cells treated with 1 mM of Procaine as in those treated with 2 mM of SAH, showing no significant difference between the experimental groups. In this study we concluded that the OCT4 and NANOG genes are not molecular markers for cellular pluripotency in bovines and we can modify the epigenetic patterns of DNA of the nucleus donor cells for cloning by TN process, contributing to the improving of the results of this technique.

Key-words – cloning, epigenetic, gene expression, cell pluripotency, demethylation substances

1 – INTRODUÇÃO

O processo de clonagem através da transferência nuclear (TN) de células somáticas foi executado com êxito em uma variedade de espécies de mamíferos (camundongos, ovelhas, bovinos, suínos, entre outros) e tem aplicações potenciais para a saúde humana, melhorias nos índices produtivos e reprodutivos dos animais de produção e preservação de espécies ameaçadas de extinção. A geração de animais viáveis através desta técnica, demonstra que o núcleo de células somáticas diferenciadas de mamíferos pode ser reprogramado quando transferido a um ovócito enucleado. Apesar disto, a eficiência da produção de animais vivos e viáveis é bastante baixa (2 – 5%) (GORDON, COLMAN, 1999). Isso ocorre em função de uma elevada perda durante o desenvolvimento embrionário e fetal. Além disso, muitos animais apresentam anormalidades de desenvolvimento como: aumento do peso corporal, placentomegalia, hipertensão pulmonar e problemas respiratórios.

É rotineira a utilização de fibroblastos de pele como célula doadora de núcleo. As características que determinam que uma célula é diferenciada são comandadas por diferentes padrões de metilação de DNA e alterações pós-traducionais das histonas que formam a eucromatina (menos metilada e mais transcricionalmente ativa) e a heterocromatina (mais metilada e menos transcricionalmente ativa) sendo que cada tipo celular tem seu próprio padrão de metilação de DNA e de modificações nas histonas. Para a utilização desse tipo celular na produção de clones, é necessário que a célula sofra uma reprogramação epigenética, ou seja, é preciso que ela perca sua memória epigenética de célula somática e se torne uma célula capaz de gerar todos os tipos celulares de um novo indivíduo.

Atualmente, o grande entrave que dificulta alcançar melhores índices de sucesso na clonagem por TN é a ocorrência de uma reprogramação epigenética incompleta do núcleo das células somáticas doadoras. A estrutura responsável por essa “reprogramação” ou “desprogramação” é o ovócito enucleado, que precisa desmetilar o núcleo transferido até certo ponto em que ele seja capaz de gerar qualquer tipo celular. Porém, este processo não pode afetar os genes *imprinted*, que são genes de expressão monoalélica, marcados

de forma sexo-específica, necessários para um desenvolvimento embrionário normal.

Como o ovócito não consegue desprogramar corretamente o núcleo das células doadoras, o tratamento das células somáticas com substâncias desmetilantes de DNA, pode ser de grande ajuda antes da transferência nuclear. O uso da Procaína e da S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que são substâncias consideradas desmetilantes de DNA, durante o cultivo celular das células doadoras de núcleo é uma alternativa para melhorar o processo de reprogramação nuclear, tendo em vista que vários genes da célula diferenciada necessitam ser silenciados e outros do programa embrionário serem ativados.

Entre estes genes do “programa embrionário”, estão inclusos alguns fatores de transcrição como “Octamer binding protein 4” (OCT4) e NANOG, responsáveis pela aquisição e manutenção do estado pluripotência da célula e de genes relacionados com modificações no padrão de metilação do DNA e acetilação das histonas (DNMT1 e HDAC, respectivamente). É possível que o tratamento de células com substâncias desmetilantes de DNA altere a expressão desses genes podendo favorecer o desencadeamento de um estado de pluripotência com maior facilidade. Assim, acreditando que um processo de desmetilação do DNA anterior à transferência nuclear possa melhorar a eficiência da técnica de clonagem, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes relacionados com a totipotência celular e alterações epigenéticas em fibroblastos bovinos cultivados com substâncias desmetilantes, na busca por marcadores moleculares para a eficiência da TN.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Epigenética

As células somáticas de organismos multicelulares possuem um DNA genômico praticamente idêntico entre si, porém, estes organismos produzem tipos celulares distintos, muitas vezes de forma clonal e hereditária. As diferenças entre os vários tipos celulares, em relação à morfologia, expressão gênica e consequentemente à função, podem ser explicadas por características epigenéticas. Essas características podem ser definidas como “*fenótipos herdáveis, resultantes de mudanças nos cromossomos sem alterações na sequência primária do DNA*” (BERGER *et al.*, 2009). Estas mudanças cromossomais incluem modificações químicas no DNA e nas proteínas cromossomais, que podem ser propagadas por mitose e em alguns casos por meiose (BHAUMIK *et al.*, 2007; LANGE, SCHNEIDER, 2010).

Os eventos epigenéticos mais conhecidos são metilação de DNA, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, nitrilação, ADP-ribosilação, glicosilação, entre outras modificações pós-traducionais (PTMs) que as histonas sofrem (EILERTSEN *et al.*, 2007). Essas alterações são marcas reversíveis e podem ser afetadas por estímulos ambientais como o estado nutricional, no caso de animais, e a temperatura, no caso de plantas (JAENISCH, BIRD, 2003).

O DNA genômico pode ser modificado por metilação e hidroximetilação da citosina, predominantemente no dinucleotídeo CpG (HENDRICH, TWEEDIE, 2003; KRIAUCIONIS, HEINTZ, 2009; TAHILIANU *et al.*, 2009). A metilação do DNA interfere na atividade genômica, reduzindo a atividade transcricional. Um efeito importante sobre a transcrição é mediado pelo reconhecimento específico de DNA metilado por proteínas com domínio tipo *Zinc Finger* que se ligam ao grupo metil do dinucleotídeo CpG, causando repressão transcricional (KLOSE, BIRD, 2006). Os padrões de metilação do DNA variam de acordo com os estágios de desenvolvimento e entre tecidos diferentes (BOGDANOVIC, VEENSTRA, 2009). As proteínas ligadas ao grupamento metil dos dinucleotídeos CpG, possuem várias funções na

repressão transcricional, em interações de longo alcance na cromatina, na estabilidade genômica e na sinalização neural (BOGDANOVIC, VEENSTRA, 2009).

Outro tipo de modificação epigenética envolve as proteínas cromossomais como as histonas. No núcleo, o DNA está disposto em torno de octâmeros de histonas para formar partículas nucleossômicas, sendo que cada estrutura contém duas cópias de cada tipo de histona: H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 1). As caudas N-terminais das histonas são altamente conservadas e se projetam a partir dos nucleossomos, estando sujeitas às várias modificações pós-traducionais (CHI *et al.*, 2010). Essas alterações são encontradas em regiões funcionalmente distintas do genoma, como regiões codificadoras, promotoras e *enhancers*. As modificações das histonas são reconhecidas especificamente por proteínas reguladoras, que mediam os efeitos de compactação e acessibilidade da cromatina aos fatores de transcrição. Portanto, as interações entre proteínas podem ajudar a estabelecer um estado ativo ou inativo da cromatina (BHAUMIK *et al.*, 2007; TAVERNA *et al.*, 2007; CHI *et al.*, 2010).

A cromatina é convencionalmente dividida em duas grandes categorias de acordo com sua atividade, ativa e menos enovelada (eucromatina), e compactada e silenciada (heterocromatina). Entretanto, o perfil de expressão de 53 proteínas da cromatina e quatro marcas nas histonas associados com estados distintos da cromatina em células de *Drosophila*, resultou em uma subdivisão mais precisa da cromatina baseado na sua atividade (FILION *et al.*, 2010). O primeiro tipo e mais abundante dos cinco tipos de cromatina, cobre cerca de 48% do genoma da *Drosophila*, e tem função no silenciamento gênico e está associada a outras proteínas. O segundo e o terceiro tipos de cromatina também estão ligados ao estado heterocromático. A marca do segundo tipo é a presença da SU (VAR) 3-9 (KMT1- H3K9 metiltransferase) juntamente com a *Heterocromatin Protein 1* (HP1), enquanto que o terceiro grupo é caracterizado pela presença do grupo *Polycomb* de proteínas de ligação (PcG) e sua marca é a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3). O quarto e o quinto tipos pertencem à eucromatina e são enriquecidos com marcas permissivas à transcrição como a metilação da H3K4, porém apresentando diferenças significantes no tempo de replicação (FILION *et al.*, 2010).

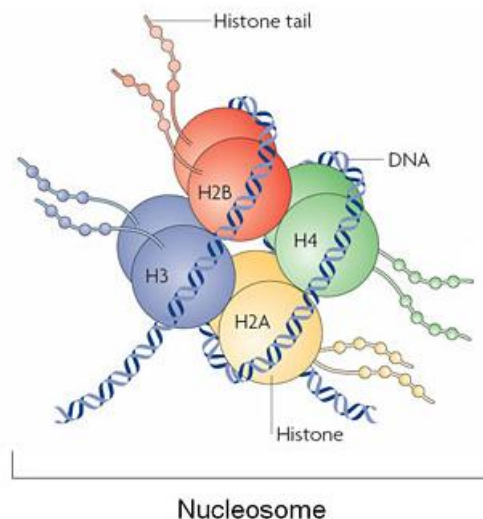


Figura 1-Modelo de um nucleossomo com caudas de histonas proeminentes. Cada nucleossomo é composto por 147 pares de base de DNA envolto a um octâmero de histonas, duas de cada (H2A, H2B, H3 e H4). (Adaptado de BOGDANOVIC *et al.*, 2011)

As modificações epigenéticas afetam a maioria, senão todos os processos dependentes do DNA. Por marcação gênica para ativação ou repressão da transcrição, os mecanismos epigenéticos dividem o genoma de organismos multicelulares em vários “epigenomas” para dar origem a tecidos distintos. Esses diferentes “epigenomas” fornecem explicações para a estabilidade celular, seu potencial e suas limitações na sua competência para responder a sinais de indução. Genes reguladores têm que agir dentro das limitações epigenéticas ou superá-las para impor modificações nas células (BOGDANOVIC *et al.*, 2011). A possibilidade de reprogramar células somáticas a um estado pluripotente através de uma rede de genes que regulam a transcrição e regem a pluripotência e auto-renovação celular, foi um grande avanço nos últimos anos (BOYER *et al.*, 2005). A indução da expressão de vários *major* reguladores como Oct4 e Sox2 juntamente com c-myc e Klf4 pode induzir células somáticas diferenciadas à pluripotência (TAKAHASHI, YAMANAKA, 2006). A expressão ectópica de genes reguladores de pluripotência é uma quebra da barreira epigenética. Em células somáticas, o gene Oct4 / POU5F1 endógeno é normalmente reprimido através de metilação do DNA e metilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me) (FELDMAN *et al.*, 2006; ATHANASIADOU *et al.*, 2010). Além disso, pequenas moléculas que inibem enzimas que modificam a cromatina como as histonas desacetilases (HDACs),

histonas metiltransferases (HMTs) ou DNA metiltransferases (DNMTs), podem melhorar a eficiência com que células somáticas são reprogramadas para induzir a pluripotência (FENG *et al.*, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2011).

2.2 – Metilação de DNA

O padrão de metilação do DNA é uma marcação epigenética herdável, que envolve a transferência covalente de um grupo metil na citosina localizada na sequência 5'-CG-3', conhecida como dinucleotídeo CpG, através das DNA metiltransferases (DNMTs) (ROBERTSON, 2005). Mais de 98% da metilação do DNA ocorre em dinucleotídeos CpG em células somáticas, ao contrário das células tronco embrionárias, onde um quarto da metilação total aparece em citosinas não ligadas a guaninas (LISTER *et al.*, 2009).

A metilação do DNA é normalmente removida durante a formação do zigoto e então reestabelecida no embrião aproximadamente no período de implantação em camundongos (ZHU, 2009). A metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal, e tem um papel importante em processos chave como no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X, e possíveis anormalidades durante esse processo, contribuem para o desenvolvimento de doenças como o câncer (ROBERTSON, 2005; GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2009).

A metilação do DNA é regulada pela família das DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (BESTOR *et al.*, 1988; BESTOR, 2000). A DNMT1 preferencialmente metila DNA hemimetilado *in vitro* e está localizada em áreas de replicação durante a fase S (JIN *et al.*, 2011). Tem como função a manutenção do padrão de metilação durante a replicação do DNA nas fitas recém formadas (PROBST, 2009). A ausência dos dois alelos de DNMT1 é letal para embriões de camundongos (LI *et al.*, 1992; LI, 2002). DNMT2 é uma metiltransferase homóloga que não metila DNA, mas tem como alvo a citosina 38 no anticódon localizado no *loop* do RNA de transferência do ácido aspártico (GOLL *et al.*, 2006; JELTSCH *et al.*, 2006; JURKOWSKI *et al.*, 2008; SCHAEFER *et al.*, 2009; MOTORIN *et al.*, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2010). AS DNMT3A e DNMT3B, diferente da DNMT1, possui preferência por

dinucleotídeos CpG desmetilados em ambas as fitas, portanto atuando na metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário. Camundongos com ausência de DNMT3A morrem por volta da quarta semana de idade, enquanto que a falta da DNMT3B provoca morte embrionária entre os dias 14,5 e 18,5 de gestação (OKANO *et al.*, 1999; LI, 2002). Homóloga às DNMT3A e DNMT3B, a DNMT3L auxilia estas aumentando suas habilidades de se ligarem ao grupo doador de metil, a S-adenosil-L-metionina (SAM), estimulando sua atividade *in vivo* (KARETA *et al.*, 2006). No entanto, ela não possui atividade catalítica independente. Camundongos homozigotos nulos para DNMT3L são viáveis, porém embriões heterozigotos derivados de ovócitos DNMT3L nulos morrem por volta do nono dia de desenvolvimento e apresentam metilação *imprinted* materna anormal sendo que, a expressão bialélica de genes *imprinted* é originada do alelo paterno, pois a DNMT3L é um regulador de metilação dos loci *imprinted* de células germinativas (BOURC'HIS *et al.*, 2001). A cooperação entre os diferentes tipos de DNMTs também é necessária para metilar algumas regiões do genoma, principalmente em locais com elementos repetitivos (JIN *et al.*, 2011). Como já mencionado anteriormente, a DNMT1 atua como uma metiltransferase de manutenção durante a síntese de DNA e as DNMT3A e DNMT3B atuam na metilação *de novo* no desenvolvimento. Entretanto, evidências mostram que a DNMT1 também pode ser necessária para a metilação *de novo* do DNA genômico (EGGER *et al.*, 2006) e que as DNMT3A e DNMT3B contribuem para a manutenção da metilação durante a replicação (RIGGS, XIONG, 2004). Em mamíferos, a maioria dos dinucleotídeos CpG são metilados nas citosinas, enquanto que dinucleotídeos CpG dentro de promotores ativos tendem a ser protegidos contra metilação (JIN *et al.*, 2011).

Alterações nos padrões de metilação do DNA estão estreitamente relacionados com câncer, apesar de nenhuma mutação ou deficiência em qualquer DNMT terem sido identificadas como responsáveis por desenvolvimento tumoral. Provavelmente isso pode ocorrer em função do seu papel crítico durante a embriogênese (JIN *et al.*, 2011).

2.3 – Código de histonas

Cromossomos eucariotos são altamente organizados. A cromatina consiste em DNA, histonas e vários complexos de proteínas não histonas que auxiliam na dinâmica das alterações que ocorrem durante a replicação do DNA, progressão do ciclo celular, eventos transcricionais e pós-transcricionais, reparo do DNA e recombinação (VERDONE *et al.*, 2006).

As proteínas histonas desempenham um papel estrutural e funcional importante em todo processo nuclear. Os nucleossomos são as unidades estruturais básicas da cromatina e são evolutivamente conservados em todos os organismos eucariotos (LUGER *et al.*, 1997). As partículas de nucleossomos consistem em duas cópias de cada proteína histona H2A, H2B, H3 e H4, com aproximadamente 146 pb de DNA dispostos ao seu redor. Para os nucleossomos, a fita da cromatina contém uma grande variedade de proteínas acessórias adicionais e inúmeras variações de histonas que não estão distribuídas aleatoriamente, mas são expressas em eventos específicos do desenvolvimento e em padrões de alguns tipos específicos de células (PERSEGHIAN *et al.*, 2000). No centrômero de mamíferos existe uma variação da histona H3 denominada Cse4 / CENP-A, que é essencial para sua montagem e função (HENIKOFF *et al.*, 2000; MELUH *et al.*, 1998). Também é relatado, uma variação da histona H2A, denominada H2A.Z, com uma localização central no nucleossomo e mostrou ter um papel essencial na estabilização estrutural da cromatina (CLARKSON *et al.*, 1999).

A porção amino-terminal das histonas possui um região da cauda altamente flexível e básica, que é alvo de várias modificações (VERDONE *et al.*, 2006). As modificações pós-traducionais das caudas amino-terminais das histonas incluem metilação e acetilação de lisinas, fosforilação de serinas e metilação de argininas entre outras, que desempenham importantes funções de regulação em vários eventos genéticos como na ativação e alongação da transcrição, silenciamento e memória epigenética (STRAHL, ALLIS, 2000; TURNER, 2002). Tais modificações, isoladas ou em combinação, fornecem informações que podem ser usadas para a tradução de sinais durante processos em curso ou como marcas epigenéticas (VERDONE *et al.*, 2006).

Todas as mudanças na cromatina que não envolvem alterações na sequência primária do DNA são definidas como marcas epigenéticas. Além do código genético em si, as funções da cromatina e a expressão gênica, estão sob o controle epigenético do código das histonas. As modificações das histonas podem ser consideradas como “letras” do “alfabeto” histona. Diferentes combinações de modificações, formulam diferentes “palavras” dotadas de diferentes significados biológicos (FISCHLE *et al.*, 2003).

Várias modificações de histonas possuem efeitos funcionais distintos, e são mediados e reconhecidos por proteínas transcricionais regulatórias conservadas (MARMORSTEIN, 2001). Um fato que ainda não está bem esclarecido é como as modificações nos resíduos de aminoácidos da região amino-terminal das caudas das histonas e a conservação dos módulos transcricionais regulatórios, são coordenados (VERDONE *et al.*, 2006). Entre essas modificações, a acetilação é mais estudada (KURDISTANI, GRUNSTEIN, 2003). As lisinas localizadas na região amino-terminal das histonas sofrem acetilação ou desacetilação dependendo das condições fisiológicas (KORNBERG, LORCH, 1999). O equilíbrio entre essas modificações é alcançado através da ação das enzimas histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetiltransferases (HDACs). Essas enzimas catalisam a transferência de um grupo acetil a partir de moléculas de acetil-CoA, para as lisinas do grupo ϵ -amino na cauda N-terminal das histonas ou sua retirada (YANG, 2004).

A desacetilação de histonas reprime a transcrição, através de diferentes mecanismos. Por um lado, esse processo aumenta a densidade das cargas positivas presentes na parte N-terminal das histonas reforçando as interações entre as caudas das histonas e o DNA, bloqueando o acesso da maquinaria transcricional presente no núcleo (YANG, 2004). Além disso, as modificações das histonas são especificamente reconhecidas por proteínas que interagem com a cromatina. Bromo-domínios são encontrados em várias proteínas associadas à cromatina, assim como em alguns membros da família HAT, e são usados para o reconhecimento de lisinas acetiladas (YANG, 2004). A desacetilação de lisinas, pode permitir futuras modificações por histonas metiltransferases (MARTIN, ZHANG, 2005). A proteína HP1 possui um domínio cromo que reconhece especificamente a trimetilação da lisina 9 da histona 3

(H3K9me3), favorecendo a montagem da heterocromatina (LACHNER *et al.*, 2001; BANNISTER *et al.*, 2001; NAKAYAMA *et al.*, 2001). O aumento da heterocromatização ocorre com o recrutamento de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que irão metilar especificamente a citosina localizada na posição 5' a uma guanina (ROBERTSON, 2005). Juntamente com essas modificações pós-traducionais nas histonas, há uma diminuição progressiva da acessibilidade da maquinaria de transcrição ao DNA, e consequentemente, um aumento do silenciamento transcricional (Figura 2).

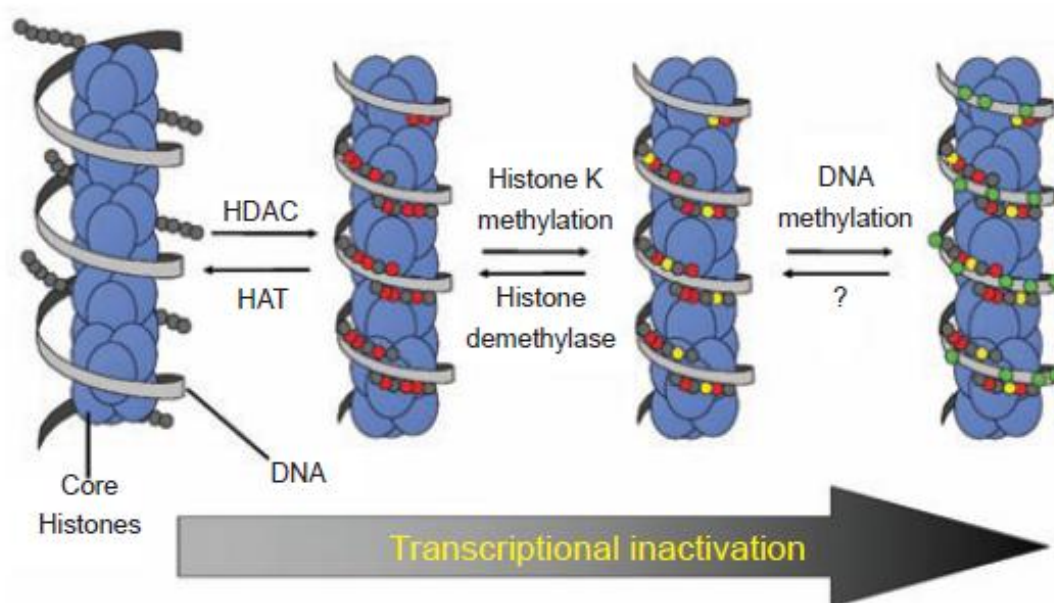


Figura 2-Modificações da cromatina que induzem progressivamente o aumento do silenciamento transcricional. Nota-se que a modificação por acetilação é totalmente reversível (Modificado de GALLINARI *et al.*, 2007).

Além disso, um número crescente de proteínas não ligadas às histonas, também estão relacionadas a acetilação da lisina, várias dessas proteínas são fatores de transcrição, proteínas ligadas ao estresse celular e proteínas estruturais. Geralmente, a acetilação tem importante influência no equilíbrio metabólico e na função biológica das proteínas, semelhante à fosforilação em termos de ser um mecanismo pós-transcricional amplamente utilizado no controle da função protéica (GALLINARI, 2007).

As HATs foram organizadas em famílias de acordo com a homologia da sua estrutura primária. Quatro famílias são as mais estudadas: família GNAT, família p300/CBP, família MYST e a família Rtt109 (NAGY, TORA, 2007;

HODAWWADEKAR *et al.*, 2007; MARMORSTEIN *et al.*, 2009). Outras famílias já foram identificadas, mas não tão bem caracterizadas como as anteriores. As HAT, PCAF e GCN5, são membros da família GNAT e possuem 73% de homologia entre suas sequências. A HAT PCAF acetila a lisina 14 da histona H3 e a lisina 8 da histona H4, esta última no entanto, com menos eficiência (SCHILTZ *et al.*, 1999). Deve-se observar, no entanto, que as HATs são muitas vezes parte de um complexo de proteínas que determinam sua ligação preferencial e sua atividade catalítica (NAGY, TORA, 2007). A família p300/CBP composta pelas HATs p300 (E1-associated protein p300) e CBP possuem 60% de homologia entre suas sequências. A HAT p300 preferencialmente acetila as lisinas 12 e 15 da histona H2B, as lisinas 14 e 18 da histona H3 e as lisinas 5 e 8 da histona H4 (SCHILTZ *et al.*, 1999). A família MYST está intimamente relacionada com o desenvolvimento de câncer (AVVAKUMOV, COTE, 2007). As enzimas p300 e PCAF possuem mínima homologia entre suas sequências e também pouca homologia estrutural (18). A falta de homologia sugere que estas enzimas possuem diferentes funções.

Por outro lado, os membros da família HDAC foram divididos em quatro grupos de acordo com suas estruturas: classe I (HDAC1, 2, 3, e 8), classe II (HDAC4, 5, 6, 7 e 10) e classe IV (HDAC11). As HDACs clássicas são estruturalmente relacionadas e necessitam de uma molécula de Zn^{2+} para se tornarem ativas (deRUIJTER *et al.*, 2003), enquanto que a classe III, *sirtuins* (SIRT1-7), é um grupo de enzimas dependentes de NAD^+ e estruturalmente diferentes das HDACs clássicas (MICHAN, SINCLAR, 2007). Três membros deste grupo, Sirt4, 6 e 7, assim como a variante C da HDAC9 não possuem atividade de desacetilação (HAIGIS *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2000).

As HDACs remodelam a cromatina através da remoção de grupos acetil da cauda das histonas (deRUIJTER *et al.*, 2003; MICHAN, SINCLAR, 2007). Isso favorece a arquitetura da cromatina condensada, limitando o acesso de fatores de transcrição ao DNA. Assim, as HDACs controlam a atividade transcricional através de suas funções epigenéticas, mas também por regulação não epigenética (YAO, YANG, 2011). As HDACs podem desacetilar uma grande quantidade de fatores de transcrição, assim como outras proteínas, modulando assim suas atividades. Além da atividade de desacetilação, dois membros do grupo *sirtuin*, Sirt2 e 3 podem atuar como

mono-ADP-ribosil transferases (FRYE, 1999; SHI *et al.*, 2005). Outros dois, Sirt4 e 6 possuem somente essa atividade e o Sirt7 não possui atividade conhecida (VOELTER-MAHLKNECHT, 2006).

Algumas HDACs podem desacetilar histonas e remodelar a cromatina, porém, sua localização subcelular nem sempre é compatível com essa função. HDAC3 e a classe III, variam sua localização entre o núcleo e o citoplasma, sendo que a HDAC1 e o Sirt1 estão presentes no núcleo, no entanto, sob algumas circunstâncias podem ser exportadas para o citoplasma. A HDAC6 e o Sirt2 são predominantemente encontrados no citoplasma, e os Sirt3 e 5 estão relacionados às funções da mitocôndria (deRUIJTER *et al.*, 2003; MICHAN, SINCLAR, 2007). Além disso, a Sirt4 também é encontrada na mitocôndria e a Sirt7 dentro do nucléolo (MICHAN, SINCLAR, 2007). Para ter essa localização as HDACs precisam de um sinal de localização nuclear (NLS) ou alguma outra estrutura ligada a ela que o possua. Da mesma forma, as HDACs que possuem esse sinal de exportação nuclear podem ser exportadas para o citoplasma (MCKINSEY *et al.*, 2001) utilizando o fator de exportação CRM1 (MCKINSEY *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2010). Mesmo com localização nuclear as HDACs não se ligam diretamente ao DNA, mas desacetilam as histonas através de interações com complexos proteicos ligados ao DNA (JACOB *et al.*, 2011).

Em um estudo recente de Wang *et al.* (2010), foi relatado que tanto as HATs como as HDACs são responsáveis por manter os genes transcricionalmente ativos e propõe que a função das HDACs é redefinir as modificações da cromatina para estabelecer um nível adequado de acetilação e manter os genes ativos. Além disso, baixos níveis de HATs e HDACs foram encontrados em promotores de genes, agindo em conjunto para aumentar e melhorar a ativação gênica.

2.4 – Substâncias desmetilantes de DNA

A descoberta e o desenvolvimento de drogas antagonistas às DNMTs enfrenta desafios significantes. Estas dificuldades incluem: identificação de inibidores que se incorporam ou se ligam ao DNA, efeitos de competição com SAM ou outros cofatores, especificidade dessas drogas e como se

comportarão em ciclos celulares dependentes das funções das DNMTs, do desenvolvimento de mecanismos de resistência a tumores e se alterações globais na metilação causarão instabilidade gênica, desequilíbrio alélico e reativação de retrotransposons (FOULKES *et al.*, 2011).

Historicamente, os primeiros compostos que demonstraram atividade de hipometilação de DNA em células foram os análogos da citidina: 5-Azacitidina/VIDAZA (AZA) e 5-Aza-2'-deoxicitidina/DACOGEN (DAC) (JONES, TAYLOR, 1980). Esses dois compostos são absorvidos pelas células e convertidos a trifosfato ativo (5-Aza-dCTP) e posteriormente incorporados ao DNA. A presença de um nitrogênio na posição 5' da azacitidina resulta em um complexo covalente, ligado irreversivelmente à DNMT1 (SAINT *et al.*, 1984) e inicia sua degradação através de proteossomas (GHOSHAL *et al.*, 2005).

Outros análogos de citidina possuem atividade inibitória de DNMT quando incorporados ao DNA. O 5,6-diidro-AZA, 5-fluor-2-deoxicitidina e o Zebularine demonstraram atividade hipometilante em células, embora com potência várias vezes inferior ao AZA (JONES, TAYLOR, 1980). A baixa atividade desmetilante desses agentes pode ser atribuída à sua ineficiente conversão a trifosfato ativado, levando a uma reduzida incorporação ao DNA (McGREGOR *et al.*, 1989).

O MG98, um oligonucleotídeo antisense de 20pb, foi desenvolvido para inibir a tradução da DNMT1. Sua sequência é complementar a região 3'-UTR do mRNA da DNMT1 e tem demonstrado atividade inibitória de DNMT em modelos pré-clínicos de xenotransplantes (AMATO, 2007).

Apesar da eficiência do AZA e DAC, existem importantes inibidores de DNA que não necessitam estar incorporados ao DNA para realizarem o processo de desmetilação. Esses inibidores oferecem uma grande janela terapêutica em relação à dose-resposta, quando comparados com a AZA e o DAC, que são limitados pela sua toxicidade e queda de incorporação ao DNA quando utilizados em altas concentrações (QIN *et al.*, 2007; HOLLENBACH *et al.*, 2010). Uma série de pequenas moléculas têm sido relatadas como inibidoras de metilação de DNA, tanto *in vitro*, tanto em estudos bioquímicos, quanto em ensaios utilizando células.

A hidralazina, uma droga cardiovascular, foi demonstrada por Cornacchia *et al.* (1988) como sendo um agente desmetilante em células,

porém, sua atividade não foi comprovada *in vitro* através de ensaios bioquímicos (DENG *et al.*, 2003). A Procainamida, uma outra droga cardiovascular, possui aparente ação contra DNMTs, assim como a hidralazina (SEGURA-PACHECO *et al.*, 2003). No entanto, a inibição da metilação de DNA pela Procainamida ainda é discutível (CHUANG *et al.*, 2005). A Procaína, uma molécula semelhante a Procainamida, também vem sendo reportada como um agente desmetilante (VILLAR-GAREA *et al.*, 2003), no entanto seus efeitos ainda não estão confirmados por estudos independentes (STRESEMANN *et al.*, 2003).

A Epigallocatequina-3-galato (ECGC), um dos principais componentes de extratos de chá verde, tem sido reportado como um desmetilante de DNA *in vitro*, possivelmente em função da sua ligação com a DNMT1 (FANG *et al.*, 2003). O RG108, uma pequena molécula inibidora de DNMT1, foi descoberta utilizando uma abordagem de triagem computacional (SIEDLECKI *et al.*, 2006). Essa molécula bloqueia a atividade da DNMT *in vitro* e em células inibiu a metilação da região promotora de alguns genes supressores de tumor. Ao contrário dos nucleosídeos análogos AZA, DAC, Zebularine e ECGC, o RG108 não demonstrou efeitos citotóxicos ou genotóxicos nas células, mesmo quando utilizado em altas concentrações (STRESEMANN *et al.*, 2006).

O antibiótico Mitramicin A foi relatado como um redutor de metilação nas ilhas CpG de genes supressores de tumor, favorecendo a reativação desses genes (FOULKES *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento com essa droga resultou na deleção da DNMT1, bem como na diminuição da mobilidade cancerígena das células (LIN *et al.*, 2007). A Nanaomicin A, um outro antibiótico, foi relatado recentemente como um inibidor seletivo da DNMT3A, inibindo a metilação de citosinas nas células, resultando na reexpressão do gene supressor de tumor RASSF1A (KUCK *et al.*, 2010).

O SGI-1027, um composto derivado da quinolina, mostrou ação contra as DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em ensaios bioquímicos com consequente redução da metilação nas ilhas CpG de genes supressores de tumor (DATTA *et al.*, 2009). Compostos que contêm brometo de etídeo se ligam fortemente as DNMTs em ensaios enzimáticos, porém ainda existe a necessidade de uma caracterização cuidadosa (FOULKES *et al.*, 2011). A abordagem da inibição direta de DNMTs através de inibidores não nucleosídeos oferece uma

oportunidade de se selecionar os membros da família DNMT que se deseja inibir (FOULKES *et al.*, 2011).

2.4.1 – Procaína

A procaína (para-amino-benzoil-dietilamino-etanol) foi sintetizada pela primeira vez em 1898 pelo cientista alemão Alfred Einhorn. Ela sofre hidrólise pela procainesterase ou pela 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).

De acordo com Abu-Salah e Gambo (2005), a procaína é capaz de inibir em 50% ATPases dependentes de Na^+ , K^+ (modo competitivo) e Ca^{2+} , Mg^{2+} (modo não competitivo) nas concentrações de 155mM e 130mM 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 150mM. A Procaína inibe a ação enzimática das ATPases por mudar a conformação dessas proteínas, diminuindo também a fluidez de membrana das células (ABU-SALAH, GAMBO, 2005).

Essa substância foi utilizada pela primeira vez como agente desmetilante em linhagem celular 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 do 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. Estudos com células de carcinoma hepatocelular humano tratadas com procaína também resultaram na inibição da proliferação celular e redução da 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 μ M para que a desmetilação seja eficiente (LYKO, BROWN, 2005).

No sistema *in vitro*, a procaína se intercala no DNA exposto alterando a estrutura da forma B para a 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 vêm sendo sintetizadas para inibir as DNMTs e causar desmetilação global no genoma (CASTELLANO *et al.*, 2008).

2.4.2 – S-Adenosil-L-homocisteína (SAH)

A S-adenosil-L-metionina (SAM) e a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) são produtos intermediários do ciclo bioquímico da metionina/homocisteína. Neste ciclo, a metionina é convertida em SAM através da ação da enzima Metionina Adenosiltransferase (MAT). O SAM é o principal doador de grupamento metil, necessário para a síntese de DNA, RNA, fosfolípidos, poliaminas, creatina e outras moléculas biologicamente importantes. Esse grupamento está ligado ao átomo de enxofre e é quimicamente reativo, o que permite a doação desse grupo para substratos aceptores em reações de transmetilação (SCRIVER *et al.*, 2001).

A SAH é o produto desmetilado das reações de transmetilação da SAM e é hidrolizado a homocisteína e adenosina pela enzima SAH hidrolase. A homocisteína pode ser tanto remetilada a metionina, através da via da transmetilação, como pode ser removida irreversivelmente do ciclo pela enzima cistationa sintetase ou ser transulfurada a cisteína, na via de transulfuração e ser biossintetizada (Figura 3) (SCRIVER *et al.*, 2001). Uma interrupção no ciclo da metionina pode causar alterações importantes no metabolismo celular, a diminuição de SAM pode afetar a atividade normal de metilação e a diminuição da síntese de cisteína e glutathione pode prejudicar atividades antioxidantes normais (PANAYIOTIDIS *et al.*, 2009).

A SAH é um inibidor de varias reações de metilação, pois se liga a região catalítica das metiltransferases com muito mais afinidade que a SAM, diminuindo as reações de metilação. Alterações na proporção SAM/SAH, podem causar mudanças no padrão de metilação de DNA e proteínas, na expressão gênica em genomas de mamíferos e desequilíbrio na função normal das células. Um desequilíbrio dessa relação em direção ao aumento nos níveis de SAH, está associado à hipometilação do DNA no fígado, comprovado em estudos que utilizaram tetracloreto de carbono (VARELA-MOREIRAS *et al.*, 1995), ingestão crônica de etanol (HALSTED *et al.*, 1996) e exposição crônica a nicotina (GODIN, CROOKS, 1986). A inibição da enzima SAH hidrolase causa aumento dos níveis intracelulares de SAH e consequentemente um desequilíbrio da relação SAM/SAH (ROUNDS *et al.*, 1998). Assim, a razão entre SAM e SAH celular tem sido freqüentemente utilizada como um indicador do potencial de metilação do DNA (YI *et al.* 2000, CAUDILL *et al.* 2001, CASTRO *et al.* 2005).

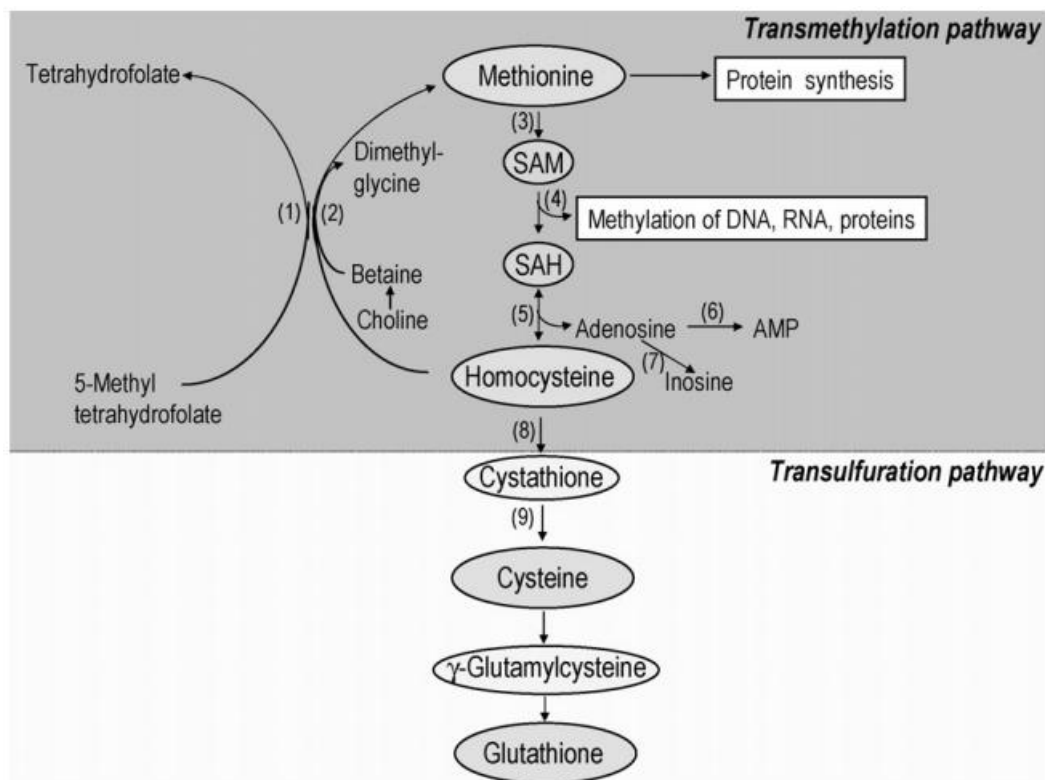


Figura 3- Via da transmetilação e transsulfuração (PANAYIOTIDIS *et al.*, 2009).

2.5 – O gene OCT4/POU5F1

O fator de transcrição OCT4 codificado pelo gene *Oct4*, também conhecido como *Oct3/4* ou *Pou5f1*, pertence à classe V da família POU de fatores de transcrição (SCHOLER, 1991).

O gene *Oct4* foi descrito primeiramente em camundongos e nesta espécie é composto por 5 éxons e está localizado no cromossomo 17 entre as regiões Q e T dentro de um complexo de histocompatibilidade principal (JAMES *et al.*, 2005; CHEW *et al.*, 2005; SCHOLER *et al.*, 1989; YEOM *et al.*, 1991). Estudos da estrutura e localização cromossomal do *Oct4* em humanos e em outros mamíferos mostrou um alto grau de conservação molecular deste gene. O gene *Oct4* em camundongos, humanos e bovinos consiste em 5 éxons e estão localizados em uma região sintética, dentro do complexo de histocompatibilidade maior (TAKEDA *et al.*, 1992; vanEIJK *et al.*, 1999). O gene *Oct4* em bovinos está mapeado no cromossomo 26 e em humanos no cromossomo 6 (TAKEDA *et al.*, 1992; vanEIJK *et al.*, 1999). O nível de homologia entre as sequências de nucleotídeos do gene *Oct4* do éxon 1 ao éxon 5 entre bovinos e camundongos é de 71,0; 95,1; 95,4; 84,9 e 82,8% respectivamente (vanEIJK *et al.*, 1999).

Em contraste com o gene *Oct4* de bovinos e camundongos, duas variantes transcricionais foram descritas em humanos: *Oct3A* e *Oct3B*. Elas são formadas a partir de um *splicing* alternativo. Estes mRNAs são traduzidos em proteínas de 360 e 265KDa respectivamente (TAKEDA *et al.*, 1992).

A importância do gene *Oct4* no desenvolvimento embrionário foi comprovada através de estudos utilizando embriões de camundongos mutantes (*Oct4*^{-/-}), que morreram durante a implantação em função da incapacidade de formar ICM (MEDVEDV *et al.*, 2008). Estes mesmos embriões cultivados *in vitro*, mostraram que a queda da expressão do *Oct4* reduz a capacidade das células em formar a ICM e causa sua diferenciação em células trofodermais. Porém a supressão das funções do gene *Oct4* não afetou a manutenção da pluripotência dos blastômeros após a formação do blastocisto. Esse fato mostra que a transativação dependente de *Oct4* nos primeiros estágios embrionários é necessária para manter o estado indiferenciado das células somente quando a primeira linhagem somática (trofoderma) se separa

do compartimento pluripotente (ICM). Assim, um aumento na expressão de *Oct4* nas células internas da mórula e um decréscimo nas células externas é aparentemente um evento decisivo no desenvolvimento embrionário inicial (NICHOLS *et al.*, 1998; PESCE *et al.*, 1999). De acordo com Kehler e colaboradores (2004), o fator OCT4 suporta a sobrevivência das células germinativas de mamíferos, e a queda da sua expressão nessas células resulta em apoptose.

In vivo o gene *Oct4* é expresso durante o desenvolvimento embrionário inicial (KIRCHHOF *et al.*, 2000; HANSIS *et al.*, 2000; MITALIPOV *et al.*, 2003). A expressão materna deste gene ocorre em ovócitos antes da fecundação. Após a fecundação, a expressão de *Oct4* pára, porém, mRNA e proteínas de OCT4 podem ser detectadas até o estágio de duas células. A expressão embrionária é ativada após o estágio de duas células, aumentando a quantidade de proteínas OCT4 nos blastômeros. No estágio de mórula, altos níveis de expressão de *Oct4* são observados. No entanto, quando as células da parte externa da mórula se diferenciam em trofoderma, o nível de expressão diminui acentuadamente. Após a implantação, a expressão de *Oct4* é estritamente restrita às células germinativas primordiais, que são precursoras de gametas. Em camundongos, altos níveis de expressão de *Oct4* são detectados até o estágio de formação das células precursoras de gametas: prófase da primeira divisão meiótica, nas fêmeas e início da espermatogênese em machos recém-nascidos (KIRCHHOF *et al.*, 2000; HANSIS *et al.*, 2000; OVITT, SHOLER, 1998).

A expressão de *Oct4* em bovinos e suínos é diferente quando comparada a de camundongos (KIRCHHOF *et al.*, 2000). Nestas espécies sua expressão não é restrita a ICM dos blastocistos, sendo observada também em células trofodermais. Um padrão similar de expressão também é observado em humanos e cabras (CAUFFMAN *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006). Essas diferenças de distribuição de expressão do gene *Oct4* estão relacionadas com as particularidades que cada espécie possui durante o desenvolvimento embrionário (MEDVEDEV *et al.*, 2008).

A expressão do gene *Oct4* é regulada a níveis de transcrição e pós-tradução. A regulação transcricional é mediada por elementos *cis*-reguladores localizados na região 5' do gene *Oct4*. A atividade destes elementos

reguladores em diferentes tipos celulares depende de fatores epigenéticos, como metilação de DNA e alterações na estrutura da cromatina. A repressão da expressão do gene *Oct4* em camundongos híbridos, produzidos a partir de células de carcinoma embrionário e fibroblastos é causada pela rápida metilação das ilhas CpG nas regiões promotoras e de *enhancer* proximal do *Oct4*. A metilação de sequências regulatórias, nos *enhancers* proximal e distal, pode desempenhar um importante papel no bloqueio da expressão do gene durante a gastrulação, quando a metilação *de novo* do DNA ocorre nas células somáticas do embrião. A separação das células germinativas primordiais dos tecidos extra-embrionários, como o mesoderma extra-embrionário, pode prevenir a metilação do seu DNA e conseqüente diferenciação em células germinativas (BEM-SHUSHAN *et al.*, 1993).

Analizando a região reguladora do gene *Oct4* em camundongos, observou-se que esta região é hipometilada nas células tronco embrionárias e hipermetilada nas células tronco do trofoblasto, nas quais a expressão de *Oct4* é ausente (HATTORI *et al.*, 2004). A repressão da metilação, em culturas de células tronco do trofoblasto, através do tratamento com agentes desmetilantes ativou o gene *Oct4* (TSUJI-TAKAYAMA *et al.*, 2004).

Estudos de imunoprecipitação de cromatina mostraram que as histonas H3 e H4 das regiões reguladoras do gene *Oct4* estão hiperacetiladas nas células tronco embrionárias, quando comparadas com as células tronco de trofoblasto, indicando que o *status* de acetilação do DNA está intimamente relacionado com a estrutura da cromatina do gene (HATTORI *et al.*, 2004).

Além da regulação transcricional, modificações pós-traducionais, como ubiquitinação e sumoilação, alteram a atividade da proteína OCT4. A enzima ubiquitina-ligase WWP2, interage especificamente com a proteína OCT4 e induz sua ubiquitinação tanto *in vivo* como *in vitro*. Essa modificação causa a diminuição nos níveis de transcrição do gene *Oct4*, por reduzir a capacidade de transativação do fator OCT4 (WEI *et al.*, 2007). Na sumoilação, a proteína OCT4 interage com a enzima UBC9, que cataliza a ligação da proteína SUMO1 com a OCT4. O sítio de ligação para a SUMO1 é encontrado na posição K118, no final da região N-terminal do domínio de transativação da proteína OCT4. Contrastando com a ubiquitinação, a sumoilação aumenta consideravelmente a

estabilidade e melhora a capacidade de ligação do DNA com OCT4 (ZHANG *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2007).

2.6 – O gene NANOG

O gene que codifica o fator de transcrição NANOG, foi primeiramente descrito por Wang e colaboradores (2003) como *Enk* (por homologia aos genes da família *Nk*). O papel deste gene na manutenção da pluripotência celular, foi estabelecido por dois grupos de pesquisa independentes (CHAMBER *et al.*, 2003; MITSUI *et al.*, 2003). Esses autores denominaram este gene como *Nanog* baseado em um mito Céltico que retrata a vontade de se obter a juventude eterna, chamado de *Tir nan Og*.

Ele foi descoberto como um gene de expressão seletiva, expresso nos estágios de pré-implantação do desenvolvimento embrionário e em cultura de células pluripotentes (WANG *et al.*, 2003). Mais tarde seu importante papel na manutenção do estado indiferenciado das células tronco embrionárias foi comprovado (CHAMBER *et al.*, 2003; MITSUI *et al.*, 2003).

O gene *Nanog* em camundongos possui quatro éxons e codifica um mRNA de 2184 nucleotídeos (MITSUI *et al.*, 2003) e está localizado no cromossomo 6. Em humanos o *Nanog* está localizado no cromossomo 12 (HART *et al.*, 2004) e em bovinos no cromossomo 5 (NCBI). Através do BLAST (NCBI), foi encontrado que o gene *Nanog* de camundongos possui homologia de 87% com ratos, 58% com humanos e 59,6% com bovinos. Além disso, foi descoberto no genoma de camundongos, pseudogenes processados, no cromossomo X e no cromossomo 12 (HART *et al.*, 2004). Em humanos, onze pseudogenes *Nanog* foram encontrados e destes, dez são processados e um é resultado da duplicação em tandem (BOOTH, HOLLAND, 2004; PAIN *et al.*, 2005). Ainda, uma variação por *splicing* alternativo dos transcritos deste gene, chamada *NANOG-delta-48* foi encontrada no mesmo genoma (KIM *et al.*, 2005).

O mRNA do gene *Nanog*, é primeiramente detectado no estágio de mórula, e seu sinal é localizado na futura ICM em camundongos. No estágio de blastocisto, a expressão do *Nanog* é limitada à ICM, porém, existem traços no

trofoderma. Em blastocistos tardios, seu mRNA é detectado somente no epiblasto e não é observado no endoderma primitivo (CHAMBERS *et al.*, 2003).

Um padrão incomum de distribuição das proteínas NANOG é observado em embriões de caprinos na fase de pré-implantação. No estágio de 8-16 células, a proteína está localizada no núcleo. Um baixo nível de proteínas NANOG é detectado no nucleoplasma de células do trofoderma. Na fase de blastocisto expandido, a localização nucleolar das proteínas é observada na ICM e nas células do trofoderma. Na ICM, além de estarem presentes no nucléolo, as proteínas também são encontradas no nucleoplasma. A partir do décimo dia de desenvolvimento, não são detectadas proteínas no nucleoplasma das células da ICM, e no nucléolo tanto para as células da ICM quanto para as do trofoderma a detecção é bem discreta (HE *et al.*, 2006).

Células pluripotentes, como células tronco embrionárias e células de carcinoma embrionário, expressam caracteristicamente o gene *Nanog*, no entanto, esses níveis de expressão diminuem drasticamente durante o processo de diferenciação, como resultado da ação do ácido retinóico (HART *et al.*, 2004). Em contraste com a expressão do gene *Oct4*, o *Nanog* inicia sua expressão nos estágios tardios do desenvolvimento embrionário. A ausência deste gene causa a diferenciação em células do endoderma primitivo, enquanto que a repressão da expressão do *Oct4*, causa diferenciação das células em derivados do trofoderma (HART *et al.*, 2004).

A regulação da expressão do gene *Nanog* pode ser realizada através de diferentes mecanismos, podendo envolver outros fatores de transcrição ou processos epigenéticos. O fator de transcrição NANOG, forma um sistema de auto-regulação e regulação mútua com outros fatores, como o OCT4 e o SOX2, formando um complexo que ativa sua transcrição (KURODA *et al.*, 2005; RODDA *et al.*, 2005). O fator de transcrição FOXD3, presente em células tronco embrionárias (SUTTON *et al.*, 1996), ativa a transcrição do gene *Nanog* ligando-se a sua região promotora (PAN *et al.*, 2006). Enquanto que o fator de transcrição TCF3, assim como o FOXD3, também se liga a região promotora do gene *Nanog*, porém, atua de maneira contrária, impedindo a transcrição (PEREIRA *et al.*, 2006).

A partir de processos epigenéticos, o gene *Nanog* é regulado através de mecanismos como metilação de DNA, acetilação e metilação de histonas. Uma

região diferencialmente metilada, descoberta por Hattori e colaboradores (2007), encontra-se hipometilada nas células tronco embrionárias e hipermetilada em células tronco do trofoblasto e fibroblastos de camundongos. A metilação dessa região *in vitro* suprime a atividade da região promotora do gene (HATTORI *et al.*, 2007). Altos níveis de acetilação das histonas H3 e H4 e hipermetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4), foi observada no *lôcus* do gene *Nanog* em células tronco embrionárias, em contraste com as células tronco do trofoblasto, em que se observou hipoacetilação das histonas e hipometilação da H3K4. Nestas células também foi relatado hipermetilação da H3K9 e H3K27 (HATTORI *et al.*, 2007).

2.7 – O gene DNMT1

A Dnmt1 foi a primeira enzima com atividade DNA metiltransferase de mamíferos a ser clonada (BESTOR *et al.*, 1988) e bioquimicamente caracterizada. Ela demonstra maior preferência por DNA hemimetilado em relação ao DNA não metilado (FATEMI *et al.*, 2001; GOYAL, REINHARDT, JELTSCH, 2006) e está localizada no local de replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular (LEONHARDT *et al.*, 1992). Estas propriedades conferem a ela o papel de metiltransferase de manutenção, responsável por preservar os padrões de metilação durante as divisões celulares através da metilação dos dinucleotídeos CpG hemimetilados produzidos na replicação do DNA.

Deficiências no gene *Dnmt1* em camundongos resultam em uma extensa desmetilação do genoma e letalidade embrionária logo após a gastrulação, indicando a função essencial da Dnmt1 no desenvolvimento embrionário inicial (LI, BESTOR, JAENISCH, 1992). Além disso, mutações na Dnmt1 ou sua ausência, leva a perda de *imprinting* genômico (LI, BEARD, JAENISCH, 1993; HOWEL *et al.*, 2001) e alterações na inativação do cromossomo X (BEARD, LI, JAENISCH, 1995; SADO *et al.*, 2000; PANNING, JAENISCH, 1996), sugerindo que a Dnmt1 é importante para a manutenção dos sinais *imprinting* e estabilidade da inativação do cromossomo X.

Células tronco embrionárias que não possuem a *Dnmt1* não apresentam crescimento ou morfologia anormais, apesar do seu estado de metilação ser bastante reduzido (LI, BESTOR, JAENISCH, 1992). No entanto, estas células morrem quando induzidas à diferenciação e também mostram instabilidade genômica, com elevados índices de recombinação mitótica, levando a perda de cromossomos e rearranjos (CHEN *et al.*, 1998). A ausência do gene *Dnmt1* em células de carcinoma colorretal resulta em perda da proliferação e severos defeitos mitóticos, seguido de morte celular progressiva (CHEN *et al.*, 2007), em fibroblastos provoca inúmeras divisões aberrantes seguida de apoptose (JACKSON-GRUSBY *et al.*, 2001) e células germinativas quando submetidas a *knockdown* desse gene sofrem apoptose imediata (TAKASHIMA *et al.*, 2009). Estes fatos indicam o papel crucial da *Dnmt1* no desenvolvimento normal dos mamíferos, assim como na proliferação e sobrevivência celular. Além disso, a perda da função da *Dnmt1*, está diretamente ligada ao aumento da susceptibilidade a tumores e instabilidade cromossômica, (GAUDET *et al.*, 2003; EDEN *et al.*, 2003) o que leva a reativação de elementos retrovirais endógenos (HOWARD *et al.*, 2008).

A *Dnmt1* está altamente expressa nas células em estado de proliferação, representando a maior atividade DNA metiltransferase em tecidos somáticos durante o desenvolvimento dos mamíferos e nas células que não estão em divisão está presente, porém, em níveis muito baixos (ROBERTSON *et al.*, 1999). A quantidade de mRNA da *Dnmt1* varia de acordo com o ciclo celular, alcançando sua máxima expressão durante a fase S (LEE *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 2003).

A localização subnuclear se altera dinamicamente durante o ciclo celular. Durante a intérfase está distribuída difusamente no núcleo, quando as células não estão replicando. No início e meio da fase S localiza-se nas regiões de replicação, em células que estão sintetizando ativamente DNA, criando uma característica padrão (MERTINEIT *et al.*, 1998). Diferentes isoformas da *Dnmt1* já foram identificadas. Além da *Dnmt1*, que está presente na maioria das células somáticas (por isso, algumas vezes denominada *Dnmt1s*), existem duas variações tecido-específicas, a *Dnmt1o* (*Dnmt1* ovócito) e a *Dnmt1p* (*Dnmt1* paquíteno), descrita em espermatozóides (MERTINEIT *et al.*, 1998).

A Dnmt1 é responsável pelo reestabelecimento da metilação do DNA após sua replicação, ou seja, ela possui um papel de manutenção da metilação. Além disso, sua atividade também é importante na metilação *de novo*. Nessa função, ela apóia a Dnmt3a e a Dnmt3b, usando sítios de CG hemimetilados gerados pela enzima Dnmt3 como substrato, como acontece *in vitro*. (FATEMI *et al.*, 2002). Ela ainda desempenha funções em conjunto com outros elementos da maquinaria epigenética, como as histonas desacetilases (HDAC1 e HDAC2) (FUKS *et al.*, 2000), fatores de transcrição (E2F1 e Rb) (ROBERTSON *et al.*, 2000), histonas metiltransferases (Suv39H1, SET7/9, G9a e EZH2) (VIRE *et al.*, 2006) e efetores de silenciamento (HP1 e MeCP2) (KIMURA, SHIOTA, 2003).

2.8 – O gene HDAC2

A classe I de histonas desacetilases (HDAC1, 2, 3 e 8) são enzimas altamente conservadas, presentes no núcleo das células, que têm como função auxiliar a modulação dos níveis de expressão gênica (YANG, SETO, 2008). O substrato melhor caracterizado das HDACs são as caudas N-terminais das histonas nucleares H2A, H2B, H3 e H4 (DOVEY *et al.*, 2010). A desacetilação da cauda destas histonas causa o “fechamento” da cromatina, devido ao potencial eletrostático de resíduos de lisina não acetilados para promover interações internucleossomais (LUGER, RICHMOND, 1998; ROBINSON *et al.*, 2008) e perda de um sítio de ligação para elementos transcricionais que contêm um bromo-domínio (JACOBSON *et al.*, 2000).

As HDAC1 e 2 são as mais similares, com aproximadamente 83% de aminoácidos idênticos, compartilhando um sítio catalítico central praticamente idêntico e uma cauda C-terminal conservada (BRUNMEIR, LAGGER, SEISER, 2009). Nas células de mamíferos as HDAC1 e HDAC2 interagem juntas (TAPLIK *et al.*, 2001) para formar um núcleo catalisador, juntamente com outros complexos como, Sin3, NuRD, CoREST e NOD1 (YANG, SETO, 2008). Esses complexos são direcionados para a cromatina por fatores de transcrição sequência-específicos (às vezes, célula-específicos) para reprimir a transcrição, cooperando com outros modificadores de cromatina, como as

deacetilases lisina-específicas, no complexo CoREST (HUMPHREY, *et al.*, 2001; HAKIMI *et al.*, 2002). Como parte desse complexo multiproteico, a atividade das HDAC1 e HDAC2 tem sido associada à regulação da progressão do ciclo celular, através de agentes supressores de tumor (BREHM *et al.*, 1998; LUO, POSTIGO, DEAN 1998), diferenciação (LIU *et al.*, 2009; MONTGOMERY *et al.*, 2009), envelhecimento celular (PEGORARO *et al.*, 2009), e câncer (ROPERO *et al.*, 2002).

A deleção de HDAC1 em linhagens de células germinativas de camundongos provoca desenvolvimento anormal e morte embrionária precoce (MONTGOMERY *et al.*, 2007). Em contraste, a ausência de HDAC2 não é letal aos embriões, porém, em alguns experimentos os produtos morreram logo após o nascimento (MONTGOMERY *et al.*, 2007).

2.9 - Clonagem por Transferência Nuclear

Na clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS), uma célula doadora de núcleo ou um carioplasto (núcleo celular com um pouco de citoplasma) é introduzido em um ovócito enucleado e sofre uma ativação artificial para o desenvolvimento de um indivíduo geneticamente idêntico ao que doou o núcleo, com aplicações potenciais tanto na agricultura como na medicina regenerativa, porém, sua ineficiência torna-se um fator limitante ao uso mais amplo dessa técnica.

Em bovinos, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstruídos, ainda durante o período de cultivo *in vitro*, têm-se mostrado bastante variáveis, desde inferiores a 5% até superiores a 65% (WESTHUSIN *et al.*, 2001), e os resultados de obtenção de gestação a termo a partir de embriões reconstruídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (CIBELLI *et al.*, 1998, WELLS *et al.*, 1999). As falhas no desenvolvimento da placenta estão entre as causas mais comuns de perdas durante a gestação de clones (HILL *et al.*, 2000). Perdas iniciais são atribuídas à inadequada transição de nutrientes do saco vitelínico para o alantóide, em razão da baixa vascularização do mesmo (De SOUZA *et al.*, 2001), à rejeição imune (HILL *et al.*, 2002), e as alterações

placentárias (placentomegalia e reduzido número de placentômeros) (HILL *et al.*, 1999).

A viabilidade pós-natal dos animais oriundos de transferência nuclear é igualmente reduzida. As disfunções mais observadas após o nascimento são: problemas músculo-esqueléticos (WELLS *et al.*, 2004), problemas cardíacos (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004), disfunções imunes (RENARD *et al.*, 1999), distúrbios renais (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004), alterações hepáticas e respiratórias (HILL *et al.*, 1999; HEYMAN *et al.*, 2002), síndrome da cria gigante (WILSON *et al.*, 1995; YOUNG, FAIRBURN, 2000; HEYMAN *et al.*, 2002), entre outras.

No entanto, estas anormalidades não são herdáveis (TAMASHIRO *et al.*, 2002; WELLS *et al.*, 2004; WELLS *et al.*, 2005); com isso percebe-se que essas deficiências não residem em alterações cromossômicas ou mutações do DNA, mas em falhas de reprogramação das características epigenéticas das células somáticas, causando alterações na expressão gênica global e nos genes *imprinted* (WELLS *et al.*, 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 *XIST*, *MAOA*, *H19*, *IGF2* e *IGF2R*, enquanto que os que sobreviveram apresentavam expressão normal (XUE *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2005). 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). Segundo e colaboradores (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 apresentam um padrão de metilação menor que as células adultas para um gene importante durante o desenvolvimento embrionário (MICHALCZECHEN-LACERDA *et al.*, 2009). Além disso a célula doadora do 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 TNSC. 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 utilizadas. No entanto, os tratamentos não farmacêuticos como a soroprivação ou a subconfluência celular em torno de 90-95% causam a parada do ciclo celular em G0, e essas células mostram-se mais eficientes na TN. Além disso, o tipo de ativação artificial a ser utilizado 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 e formar os “pró-núcleos” e iniciar o desenvolvimento embrionário (KEEFER, 2008).

Diferente da clonagem reprodutiva, a clonagem terapêutica refere-se à produção de células tronco embrionárias a partir da transferência nuclear sem a necessidade de envolver implantação uterina. Essa linhagem celular tem capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula adulta, com grande potencial terapêutico (HOCHEDLINGER, JAENISCH, 2003). Em camundongos e bovinos, células tronco embrionárias derivadas de transferência nuclear foram obtidas a partir de blastocistos clonados (WAKAYAMA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2005). No entanto, esta derivação para humanos ainda provoca grandes debates científicos, éticos e religiosos, por envolver a produção e destruição de embriões. Além disso, a associação da clonagem com a transgenia gerou vários avanços em diversos campos, como a produção de biofármacos, melhoria de características zootécnicas e geração de modelos animais para estudo de doenças humanas e os xenotransplantes (KUES, NIEMANN, 2004; SALAMONE *et al.*, 2006).

3 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade celular, a detecção de genes relacionados a pluripotência celular (OCT4 e NANOG) e a expressão dos genes HDAC2 e DNMT1 em fibroblastos bovinos cultivados com diferentes substâncias desmetilantes, na busca por marcadores moleculares.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Cultivo celular de fibroblastos para tratamento com Procaína

Foram utilizados fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, oriundos de biópsia da inserção da cauda de uma fêmea bovina, da raça Junqueira (*Bos taurus taurus*), com oito anos de idade. As células foram cultivadas de acordo com a técnica de cultivo primário, estabelecida no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após o cultivo primário e duas repicagens (P2), as células foram congeladas em meio de cultivo (DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), acondicionadas em palhetas de 0,25mL, devidamente lacradas, identificadas (quanto à passagem, data de congelação, raça e identificação do animal e nome do manipulador) e armazenadas em nitrogênio líquido (Figura 4).



Figura 4 – Palheta de célula identificada e armazenamento em botijão de nitrogênio líquido (Arquivo Pessoal).

O descongelamento foi feito expondo a palheta à temperatura ambiente por 5seg e imediatamente submergindo-a em água destilada aquecida a 39°C por 2min. O volume da palheta foi transferido para um microtubo de 1,5mL, com auxílio de uma seringa (Figura 5), para retirar todo conteúdo. Posteriormente foi adicionado 1mL de DMEM (GIBCO) (Gibco), com auxílio de uma pipeta e a amostra foi homogeneizada e depois centrifugada por 5min a 200xg para remoção do DMSO (crioprotetor) que é tóxico para as células.

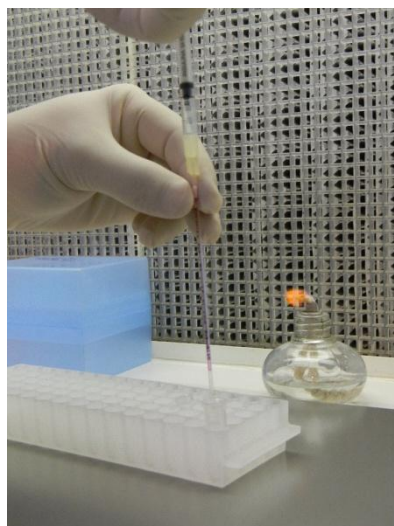


Figura 5 – Transferência das células da palheta para tubo de 1,5mL com auxílio de seringa (Arquivo Pessoal).

O sobrenadante foi descartado e logo após, 1mL de DMEM (GIBCO) foi adicionado para ressuspender as células. O material foi transferido para uma garrafa de cultivo (Corning®) de 25cm² contendo 3mL de DMEM (GIBCO). A garrafa foi mantida em estufa de cultivo a 39°C, com 5% de CO₂, 20% de O₂ e umidade saturada por 7 dias. Durante este período as células foram observadas em microscópio invertido AXIOVERT 135M (ZEISS Germany) até atingirem confluência (Figura 6).



Figura 6 – Garrafa de cultivo contendo células, estufa de cultivo e microscópio para observação de confluência (Arquivo Pessoal).

Após entrarem em confluência, o meio de cultivo foi retirado e adicionou-se 1mL de tripsina/EDTA (GIBCO™) previamente aquecida a 39°C, durante 5min. Neste período, a garrafa permaneceu dentro da estufa, sob as mesmas condições de cultivo, para que as células aderidas à garrafa de cultivo se soltassem. O material obtido (células + tripsina/EDTA) foi transferido para

um microtubo de 1,5mL, centrifugado por 5min a 200xg, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de meio DMEM (GIBCO) (Figura 7).

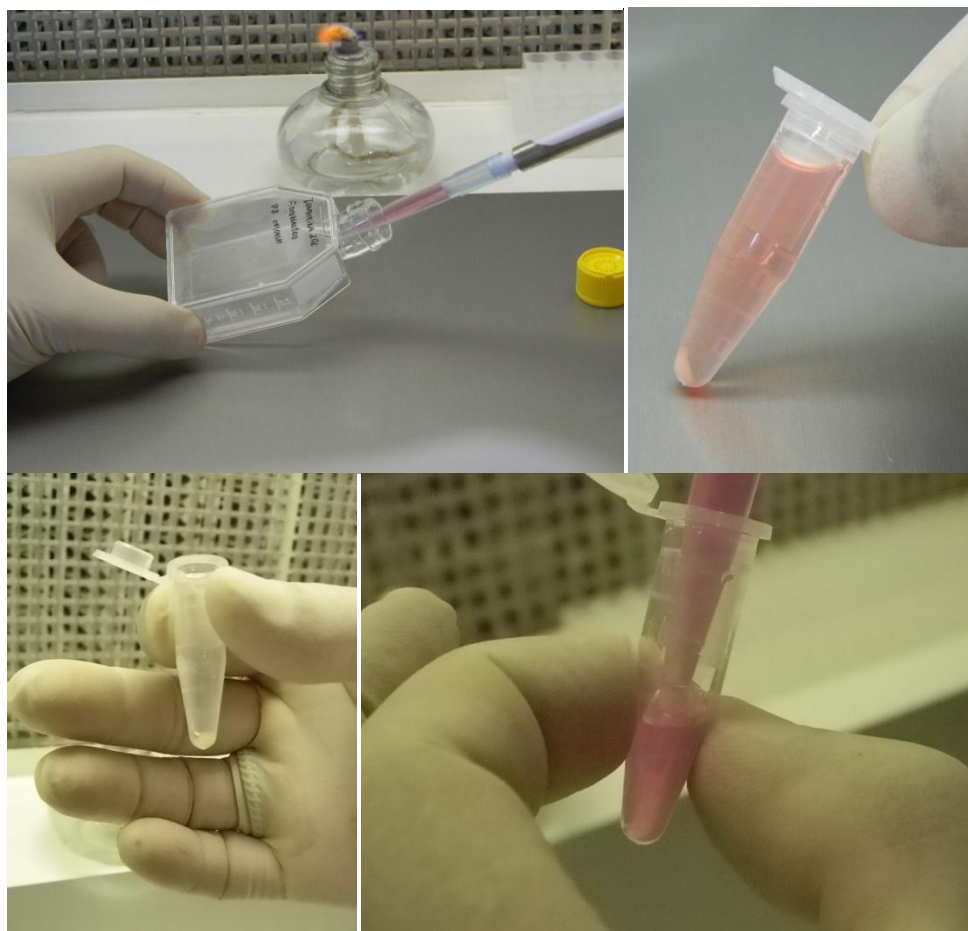


Figura 7 – Adição de 1mL de tripsina, material obtido após centrifugação, *pellet* de células sem o sobrenadante e ressuspensão do *pellet* com 1mL de DMEM (GIBCO) (Arquivo Pessoal).

Uma alíquota de 10 μ L foi diluída em azul de tripan 0,4% (SIGMA) na proporção de 1:1 para realização da contagem celular, em câmara de Neubauer 0,100mm e de profundidade e 0,0025mm² (Optik Labor) em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). As células brancas e azuis dos quatro quadrantes externos foram contadas. As células brancas correspondem às viáveis, pois as que se coram em azul possuem sua membrana celular lesionada e permeável ao azul de tripan (Figura 8). O restante do material permaneceu na estufa. Posteriormente as células foram alíquotadas para o cultivo com Procaína.

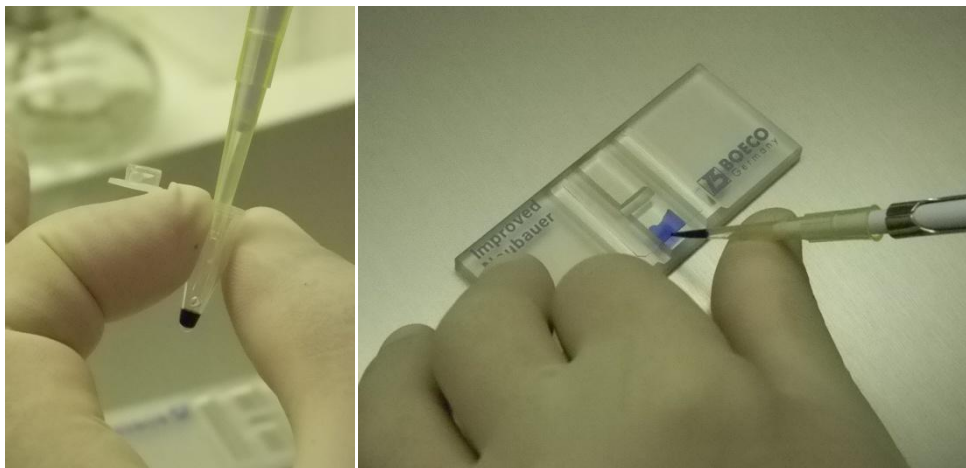


Figura 8 – Diluição de 10 μ L do material celular em azul de Tripán e preparação da placa de Neubauer para contagem de células (Arquivo Pessoal).

A Procaína (SIGMA-ALDRICH®), encontrava-se a uma concentração de 100mM, e para este ensaio, sua concentração foi de 1mM, para isso, a solução estoque concentrada foi diluída. Foram usados 10 μ L da solução estoque a 100mM em 990 μ L de DMEM (GIBCO). Após a diluição, a solução foi filtrada em filtro (MILLEX®GV Filter unit) de 0,22 μ m e armazenada até o momento do uso.

O cultivo foi realizado em placas de 4 poços (Nunclon™ Surface) de 66x66mm, sendo 2 placas para cada réplica e dois tratamentos (controle não tratado e tratado com 1mM de Procaína) e 4 réplicas. Após a contagem das células da garrafa, uma quantidade aproximada de 9.000 células foi transferida para cada poço das placas e adicionado 500 μ L de meio DMEM (GIBCO), sendo considerado o primeiro dia de cultivo (Figura 9). No segundo dia o meio de cultivo de todos os poços foi retirado e as células foram lavadas com 500 μ L de PBS suplementado com gentamicina (NUTRICELL). Após, retirou-se o PBS e foi adicionado, para aqueles do grupo tratado, 500 μ L de DMEM (GIBCO) suplementado com 1mM de Procaína, concentração esta que foi baseada em trabalhos prévios realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e para os do grupo controle 500 μ L de DMEM (GIBCO). O tratamento teve duração de 72h e neste período, apenas foi observado a confluência das células, porcentagem de células suspensas e presença ou ausência de contaminação. Ao fim do tratamento, observou-se o grau de confluência das células de todos os poços e o meio de cultivo juntamente com as células suspensas foi eliminado.



Figura 9 – Placa preparada para cultivo celular contendo meio de cultivo DMEM (GIBCO) com 1 mM de Procaína (Arquivo Pessoal).

Posteriormente, foi adicionado 500µL de tripsina/EDTA (GIBCO™) previamente aquecida a 39°C durante 5min. Neste período as placas permaneceram dentro da estufa, sob as mesmas condições de cultivo, para que as células aderidas à garrafa de cultivo se soltassem. O conteúdo dos poços foi transferido para microtubos de 1,5mL, adicionou-se 400µL de meio DMEM (GIBCO) para inativação da tripsina e as amostras foram centrifugadas por 5min a 200xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 500µL de PBS (SIGMA®) (Figura 10).



Figura 10 - Para cada poço de cultivo, um microtubo de 1,5mL foi identificado de acordo com o tratamento, as células tratadas foram transferidas para os tubos e estes foram centrifugados (Arquivo Pessoal).

Uma alíquota de 10µL foi diluída em azul de tripan 0,4% (SIGMA®) na proporção de 1:1 para realização da contagem celular, em câmara de Neubauer 0,100mm e de profundidade e 0,0025mm² (Optik Labor) em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), com o mesmo princípio explicado anteriormente. As amostras foram centrifugadas por 5min a 200xg, o máximo

de sobrenadante foi retirado e adicionou-se o dobro do volume restante no tubo de RNA*later* (Applied Biosystems®), para armazenamento das células. O material foi acondicionado a 4°C durante 24h e depois transferido para -20°C até o próximo procedimento. Todas as amostras foram mantidas a -20°C até a produção da última réplica (Figura 11).



Figura 11 – Pellet de células tratadas com Procaína após centrifugação, adição de RNA*later* e estoque com todas as réplicas (Arquivo Pessoal).

4.2 - Cultivo celular de fibroblastos para tratamento com S-adenisil-L-homocisteína (SAH)

As células utilizadas para o cultivo tratado com SAH, foram fibroblastos de uma fêmea da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), a biópsia, cultivo primário, armazenamento, descongelação e cultivo celular para obtenção das células utilizadas para o tratamento, mantiveram o mesmo padrão descrito para as células utilizadas no tratamento com Procaína.

O protocolo de cultivo celular para o tratamento das células com SAH foi o mesmo descrito no item anterior para a Procaína, mas foi usada a concentração final de 2mM no cultivo celular. Este tratamento também teve a duração de 72 horas, sendo que, a cada 24 horas os meios eram trocados, tanto o meio do grupo controle quanto o meio suplementado com 2mM de SAH do grupo tratado, pois o SAH sendo um substrato natural no metabolismo celular, é degradado perdendo a sua ação.

4.3 - Extração de RNA e Transcrição Reversa

As células armazenadas em RNA/later (Applied Biosystems®) foram descongeladas à temperatura ambiente e o RNA foi isolado utilizando o kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®), conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações já estabelecidas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em seguida às extrações, as amostras de RNA total foram submetidas à transcrição reversa utilizando 200 U de *SuperScript III* (200U μ L⁻¹; Invitrogen®) e 0,5 μ g de Oligo-DT₁₂₋₁₈ primer (0,5 μ g/ μ L; Invitrogen®). As reações foram realizadas utilizando 65°C por 5min, 42°C por 52min e 70°C por 15min para a inativação da enzima.

4.4 - PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a análise da expressão gênica foi realizado qPCR utilizando o protocolo de amplificação do kit Power SYBR® Green PCR Master Mix Fast (Applied Biosystems®) em um ABI Prism 7500 Sequence Detection System Fast (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas com volume final de 25 μ L e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 5 min, 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 15 seg; anelamento/extensão: 1min), seguido de curva de dissociação padrão. As sequências dos *primers*, tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento para cada gene estão apresentados na Tabela 1. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene.

Os valores de expressão foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH e calculados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método de Pfaff, 2001 (Figura 12). A identidade dos produtos da qPCR foi confirmada primeiramente pela curva de *melting* no qPCR. Em seguida pelo tamanho do amplicon em gel de agarose, onde uma alíquota do produto amplificado no qPCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio (10mg/mL) utilizando o marcador de

100pb DNA Ladder (Invitrogen®). O gel foi visualizado e fotografado utilizando um fotodocumentador Image Capture 300 (GE).

Tabela 1. Sequência dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência	Tamanho	Temperatura de anelamento
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118pb	60°C
OCT4	F: TTC AGC CAA ACG ACT ATC TGC CGT R: TCT CGT TGT TGT CAG CTT CCT CCA	112pb	60°C
NANOG	F: ACA ACT GGC CGA GGA ATA GCA ATG R: AGT GGT TGC TCC AAG ACT GAC TGT	189pb	60°C
HDAC2	F: TTA TTT GAA AAT TTA CGC ATG TT R: TTG CTC CTT TCT TAT GAT CAG TC	229pb	56°C
DNMT1	F: GCG AGA GCG CCT CAG CTA R: AAA CAT GGG TGA TAG GAG GAG AGA	72pb	60°C

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

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

Figura 12- Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; ΔCP_{alvo} é o desvio de CP da amostra controle – amostra do gene alvo; ΔCP_{ref} é desvio de CP da amostra controle – amostra do gene referência.

4.5 - Análises Estatísticas

A viabilidade celular e a expressão gênica foram avaliadas utilizando análise de variância e teste de T (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.

5 – RESULTADOS

5.1 – Cultivo celular com Procaína e S-adenosil-L-homocisteína (SAH)

Após as 72h de tratamento, foi observado que as células de todos os poços atingiram confluência e durante todo o cultivo não foram observadas diferenças morfológicas, tanto no grupo tratado com 1mM de Procaína (Figura 13), quanto no grupo tratado com 2mM de SAH (Figura 14).

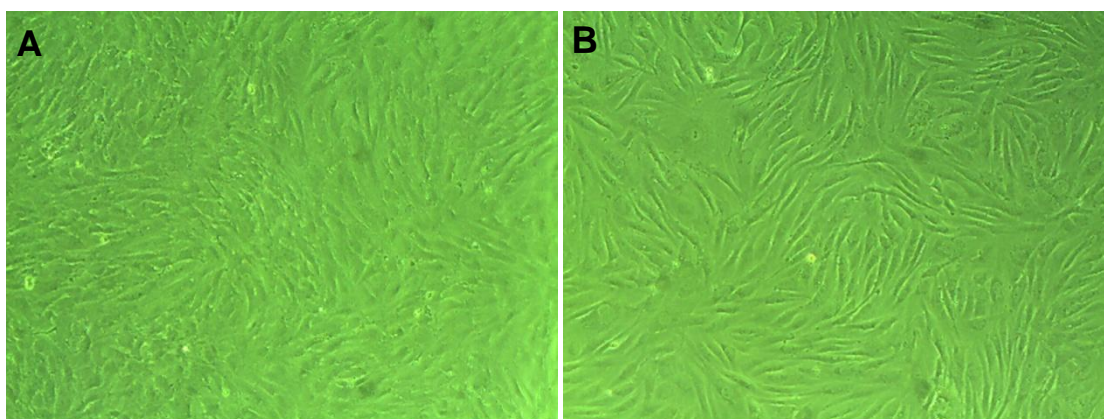


Figura 13 – Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos após 72h de cultivo com Procaína. **A**- Grupo controle; **B**- grupo tratado com 1mM de Procaína (Arquivo Pessoal).

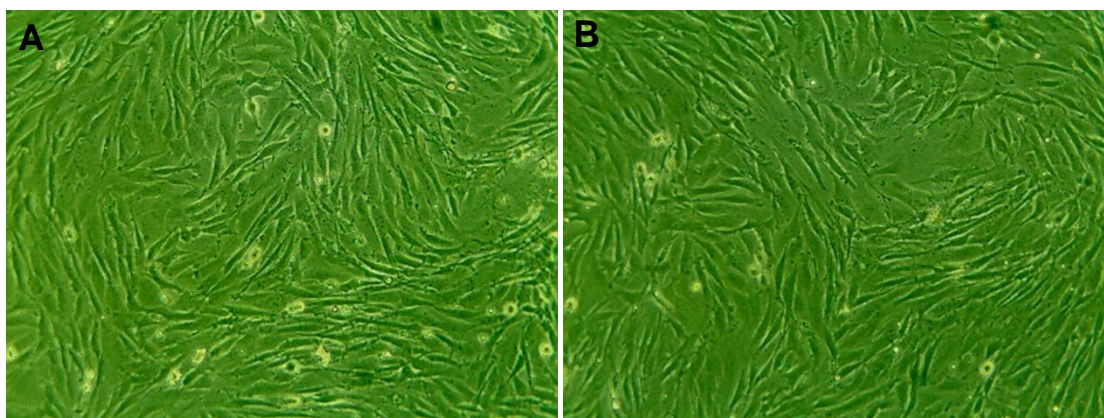


Figura 14 - Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos após 72h de cultivo com SAH. **A**- Grupo controle; **B**- grupo tratado com 2mM de SAH (Arquivo Pessoal).

Após o cultivo, as células foram contadas utilizando azul de tripan 0,4%, como explicado anteriormente no item 4.1 e analisadas quanto à sua viabilidade. No experimento realizado com Procaína, todo o processo de cultivo (produção das 4 réplicas) foi realizado duas vezes, para a primeira repetição, o cultivo foi realizado em apenas uma placa com quatro poços, ou seja, 2 poços para cada tratamento experimental e a segunda repetição em duas placas de quatro poços, somando 4 poços para cada tratamento. Para este tratamento, foi observado uma diferença significativa ($P = 0,0254$, para a primeira repetição e $P = 0,00119$, para a segunda repetição), na quantidade de células viáveis entre o grupo controle e o grupo tratado com 1mM (Figuras 15, 16). Esses dados foram obtidos a partir da soma do número de células viáveis. Para a primeira réplica o grupo controle apresentou média de 85.125 células com desvio padrão de $\pm 12.236,1$ células, enquanto que o grupo tratado apresentou 68.754 células de média e desvio padrão de ± 12.935 células. Já a segunda réplica apresentou no grupo controle média de 138.333 células com desvio padrão de ± 31.968 células e o grupo tratado apresentou média de 103.817 com desvio padrão de ± 14.673 células.

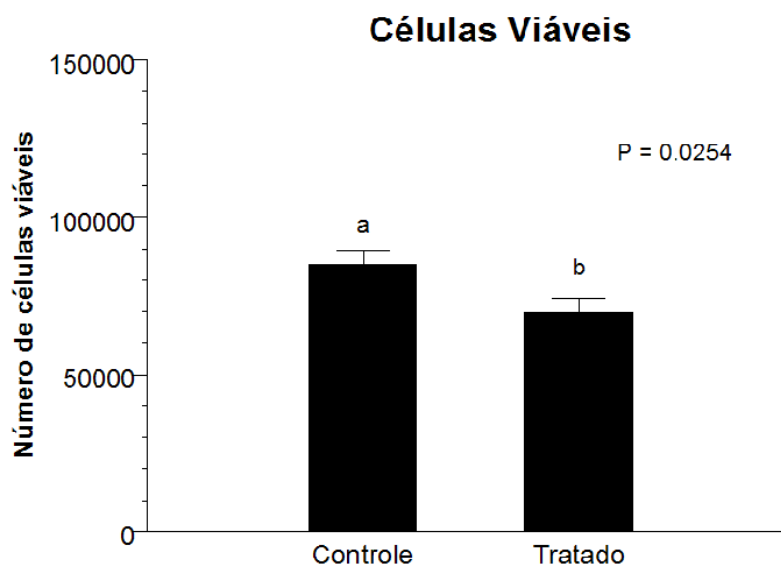


Figura 15 – Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, na primeira repetição do tratamento com 1mM de Procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si ($P = 0,0254$).

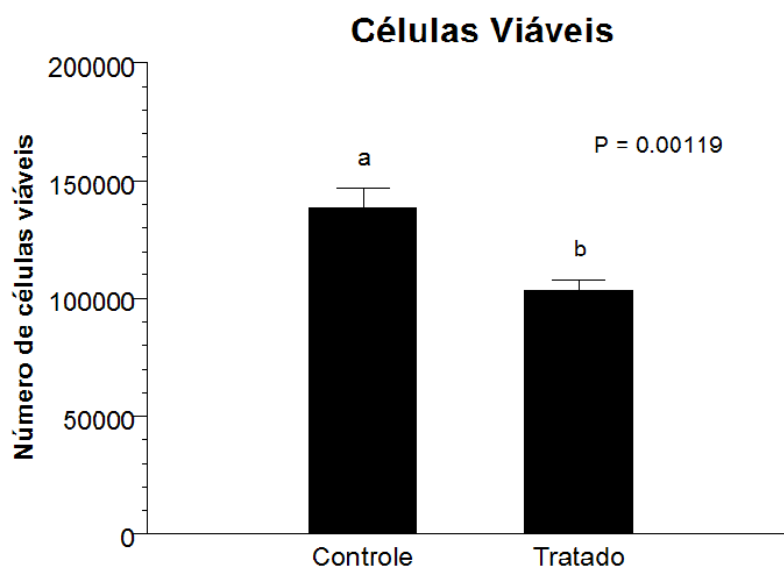


Figura 16 - Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, na segunda repetição do tratamento com 1mM de Procaína. Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si (P = 0,00119)

Para as células tratadas com 2mM de SAH, não foi observado diferença significativa entre os tratamento experimentais, o que está mostrado na Figura 17. Esses dados também foram obtidos a partir da soma das células viáveis presentes em cada réplica, o grupo controle apresentou média de 540.000 células e desvio padrão de ± 238.596 , já o grupo tratado apresentou média de 361.000 células e desvio padrão de ± 207.007 células.

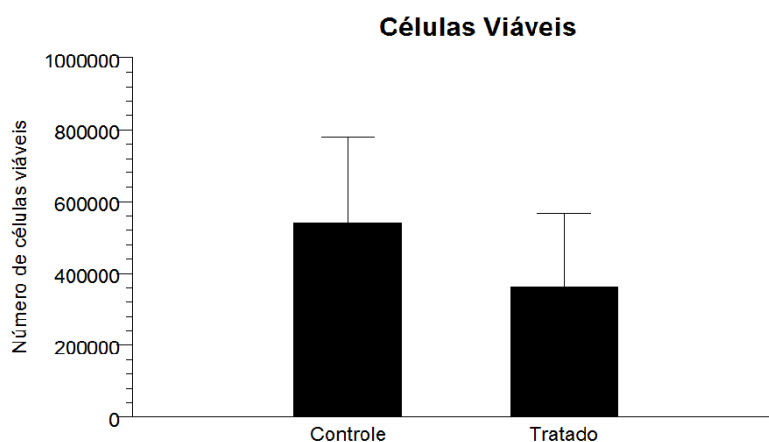


Figura 17 – Média \pm desvio padrão do número de células viáveis, no tratamento com 2mM de SAH.

5.2 – Expressão gênica

Os genes *Oct4* e *Nanog* foram detectados por qPCR, tanto nas células controle quanto nas células tratadas com 1mM de Procaína (Figuras 18 e 19). Os produtos da qPCR foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose 2% para confirmar o tamanho de cada amplicom específico e os resultados estão mostrados nas Figuras 20 e 21.

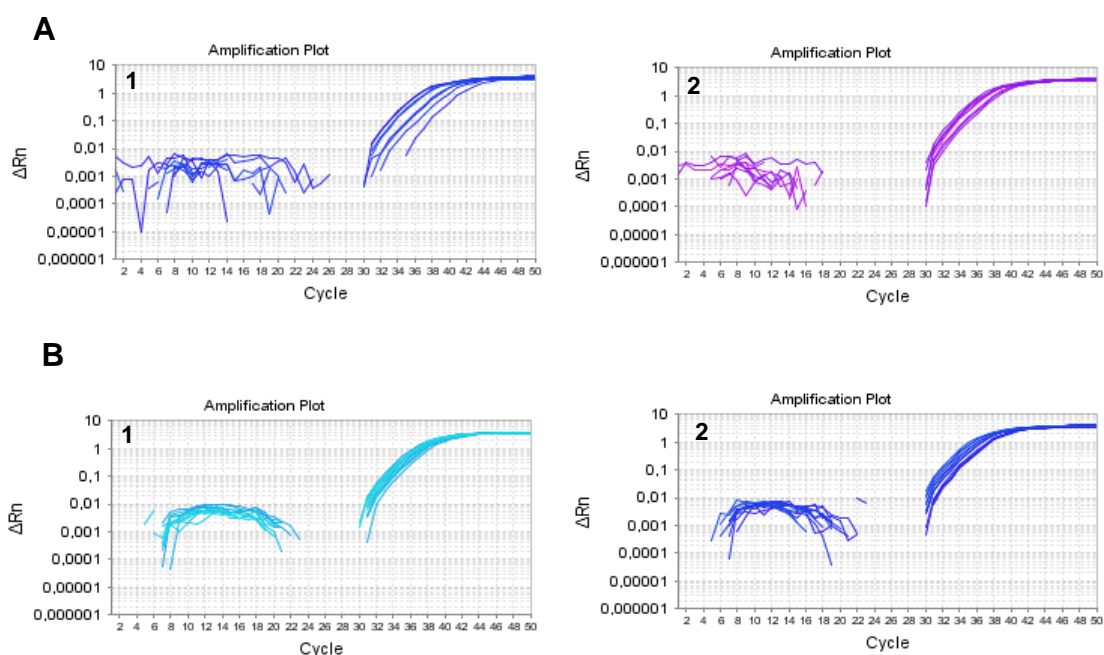
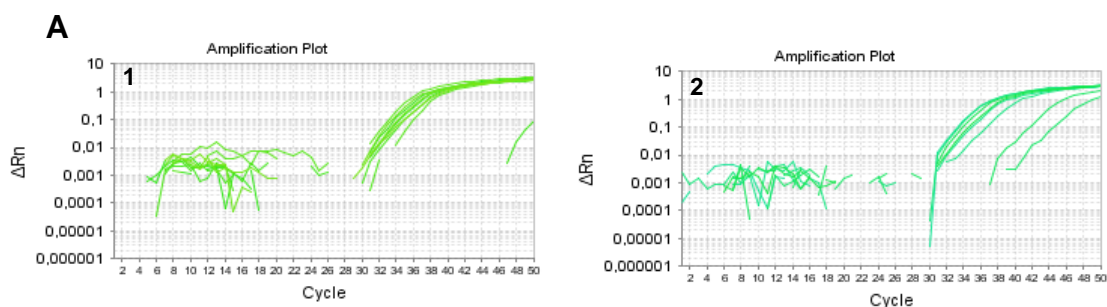


Figura 18 – Amplificações verificadas por qPCR do gene *Nanog*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 1mM de Procaína. **A**- primeira repetição, **B**- segunda repetição.



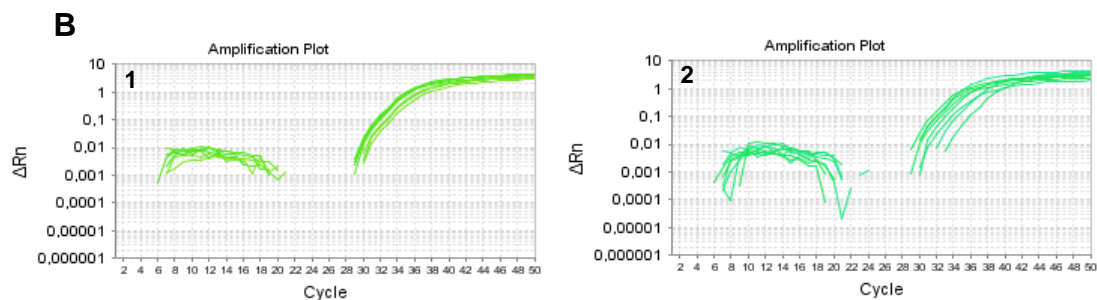


Figura 19 - Amplificações verificadas por qPCR do gene *Oct4*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 1mM de Procaina. **A**- primeira repetição, **B**- segunda repetição.

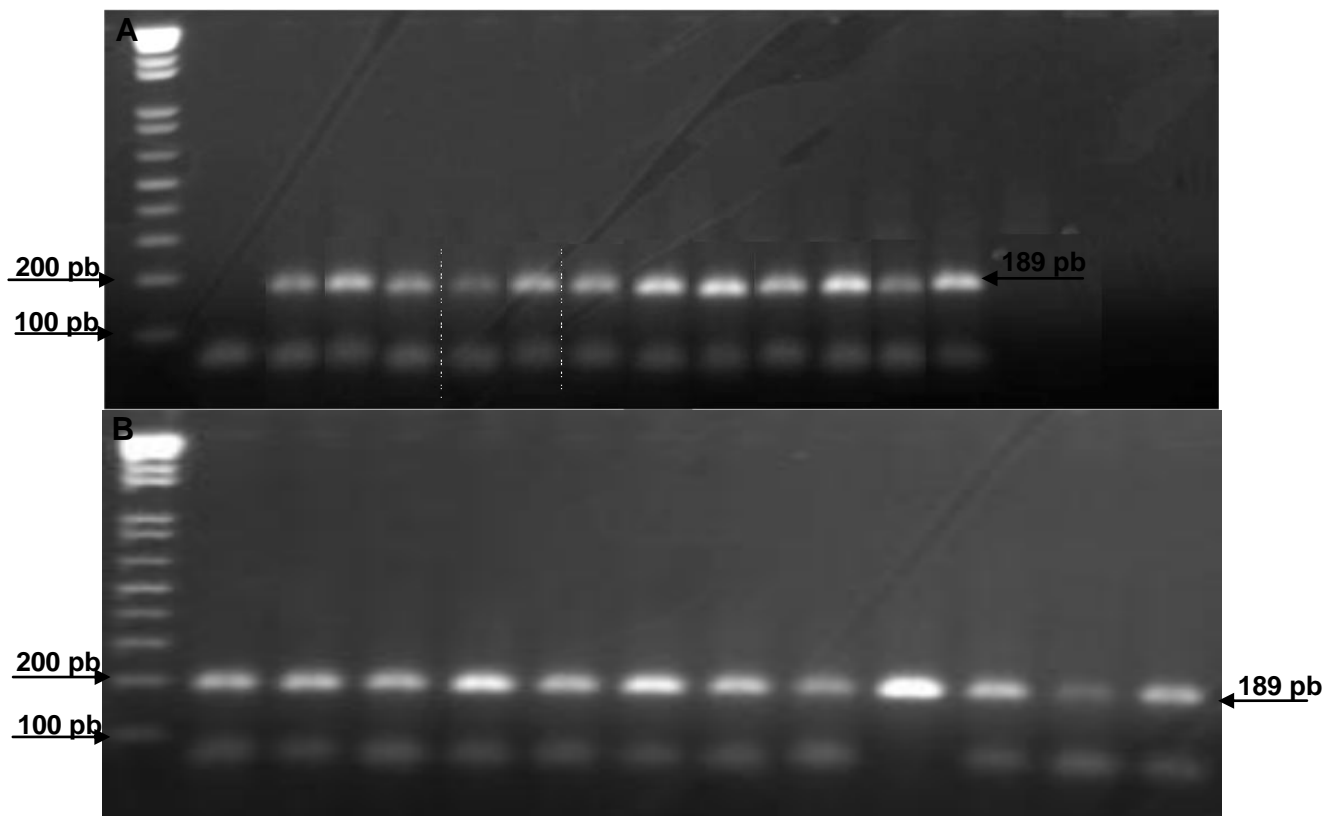


Figura 20 – Eletroforese em gel de Agarose 2%, mostrando a presença do amplicon para o gene *Nanog*. **A**- As bandas específicas com 189pb correspondentes às células do grupo controle. **B**- As bandas com 189pb correspondentes às células do grupo tratado com 1mM de Procaina.

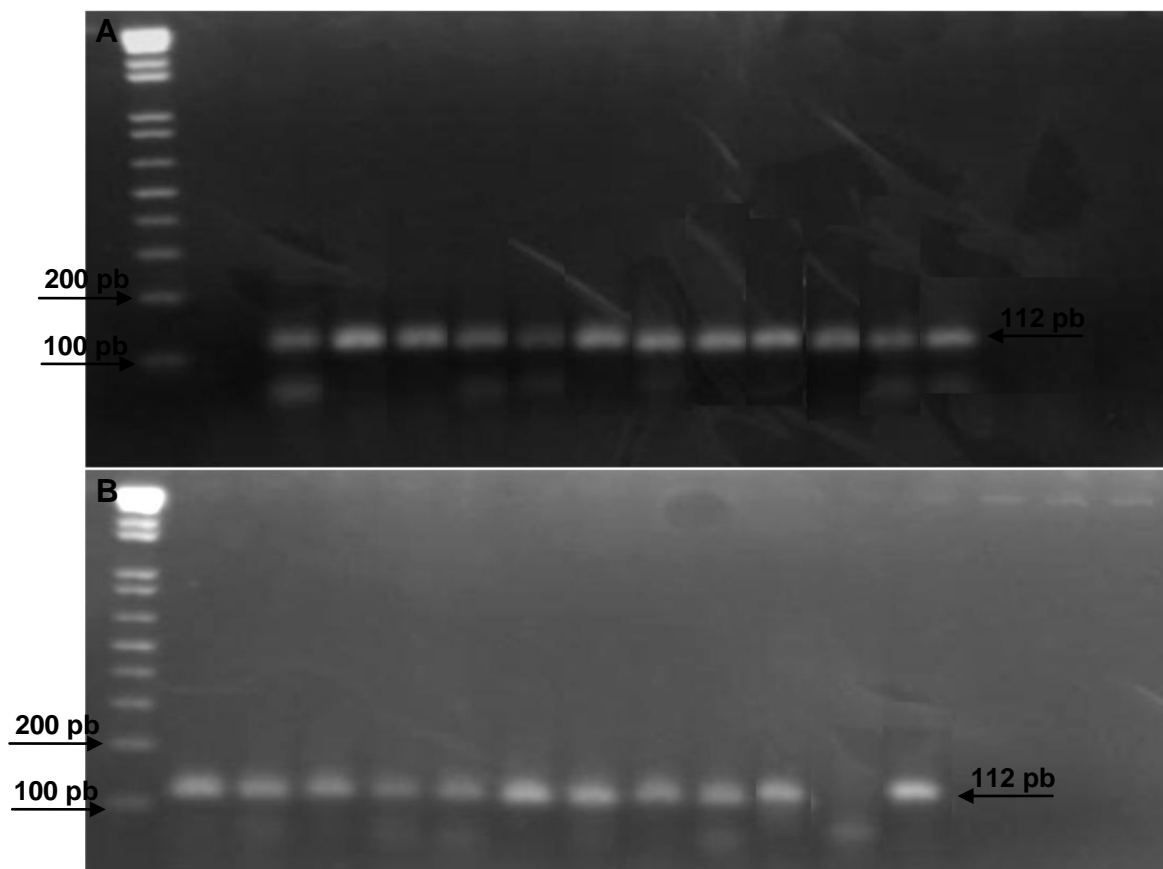


Figura 21 – Eletroforese em gel de Agarose 2%, mostrando a presença do amplicon para o gene Oct4. **A-** As bandas específicas com 112pb correspondentes às células do grupo controle. **B-** As bandas com 112pb correspondentes às células do grupo tratado com 1mM de Procaína.

A detecção da expressão dos genes *HDAC2* e *DNMT1* foi realizada tanto nas células tratadas com 1mM de Procaína como nas células tratadas com 2mM de SAH e em seus controles (Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29).

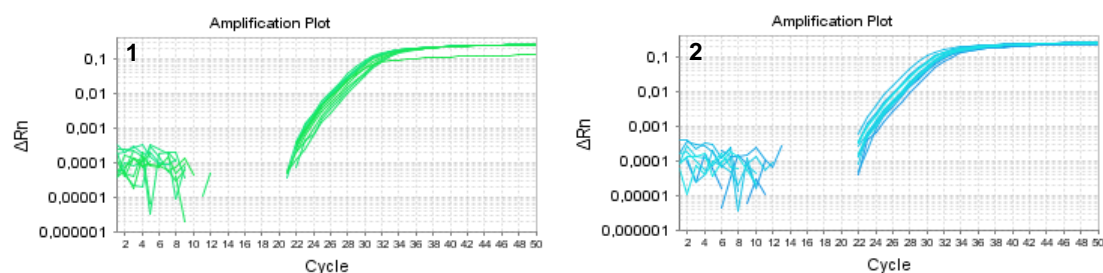


Figura 22 - Amplificação verificada por qPCR do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 1mM de Procaína.

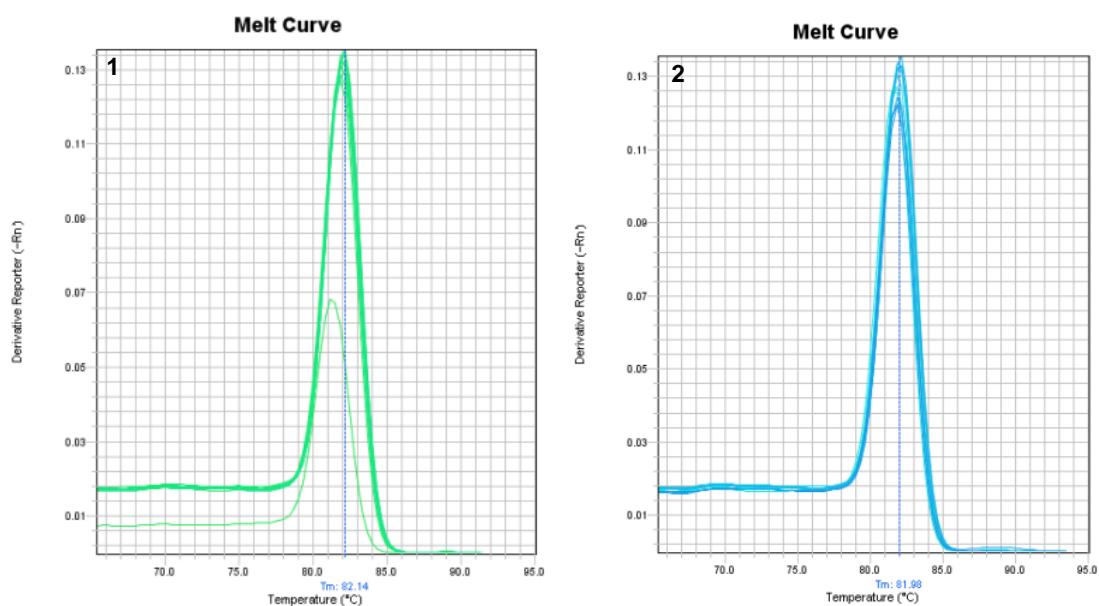


Figura 23 – Confirmação da presença do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 1mM de Procaína, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. (T_m = 81,9°C)

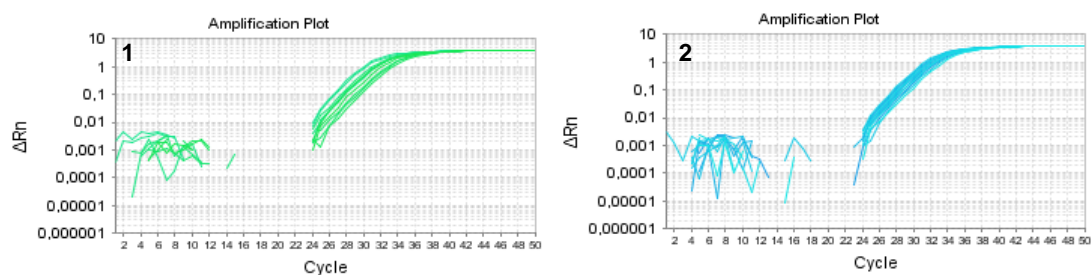


Figura 24 - Amplificação verificada por qPCR do gene *DNMT1*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína.

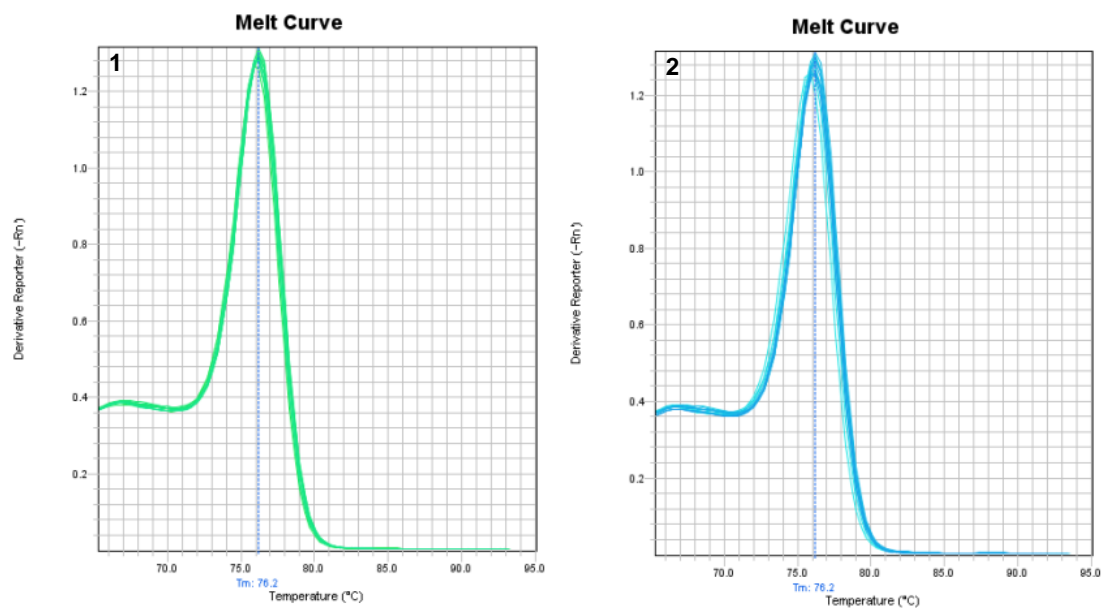


Figura 25 – Confirmação da presença do gene *DNMT1*, nas células do grupo controle e tratado com 1mM de Procaína, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. (TM = 76,2°C).

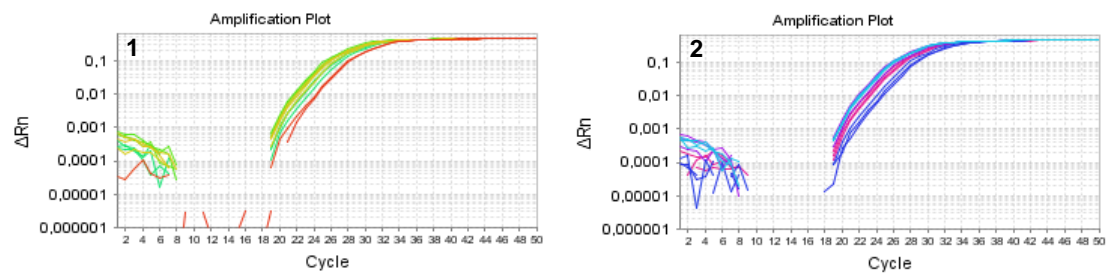


Figura 26 - Amplificação verificada por qPCR do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH.

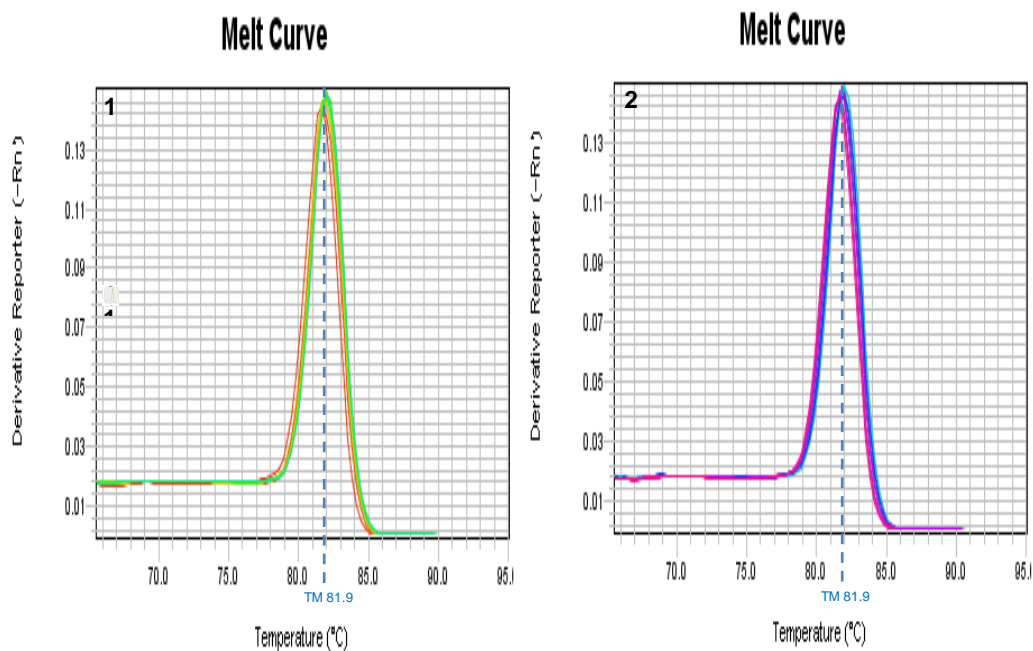


Figura 27 – Confirmação da presença do gene *HDAC2*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. (T_M = 81,9°C).

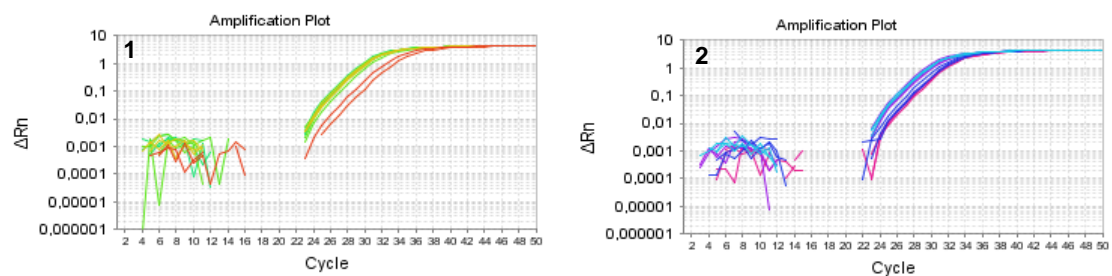


Figura 28 - Amplificação verificada por qPCR do gene *DNMT1*, nas células do grupo controle (1) e tratado (2) com 2mM de SAH.

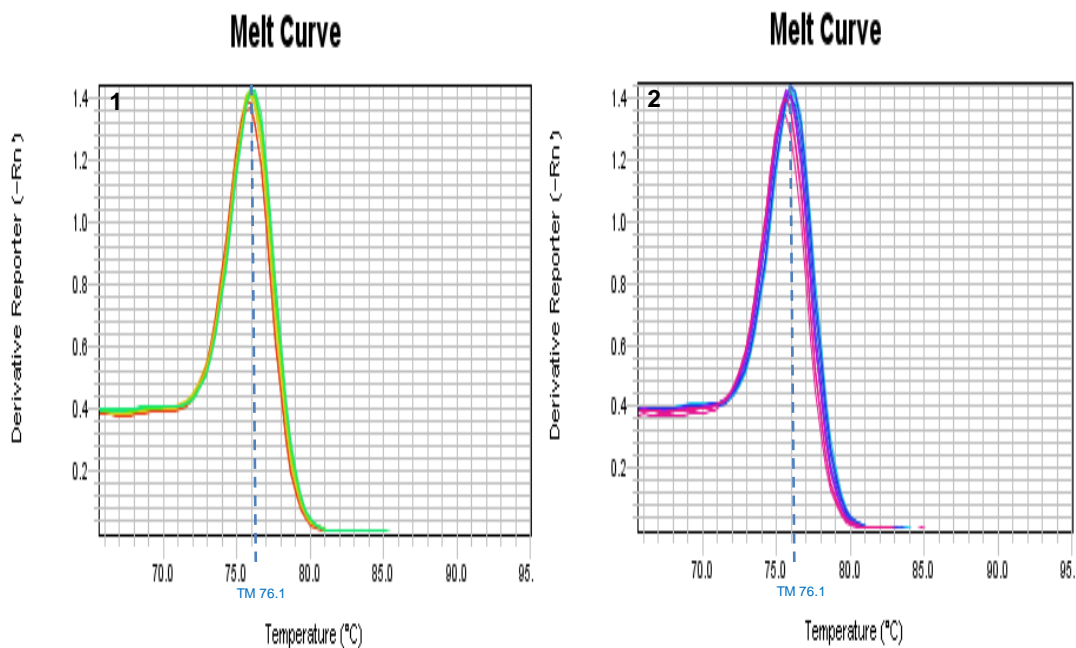
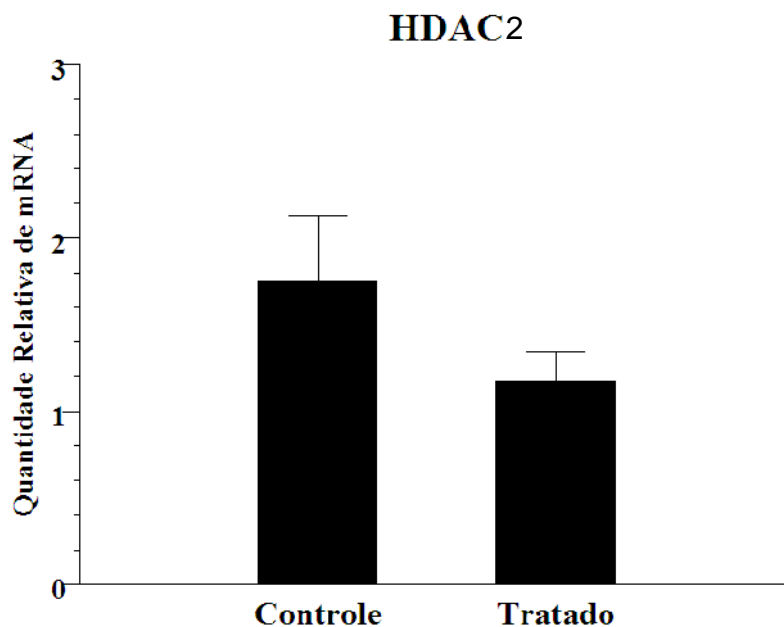


Figura 29 – Confirmação da presença do gene *DNMT1*, nas células do grupo controle e tratado com 2mM de SAH, através da curva de dissociação obtida na reação de qPCR. (T_M = 76,1°C).

As figuras 30 e 31 mostram os resultados da quantificação da expressão desses genes entre os grupos controle e tratados, para as duas substâncias.



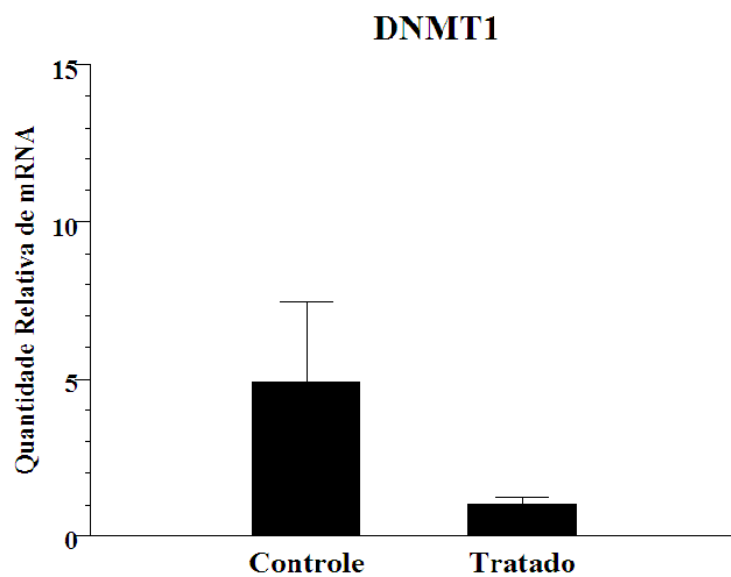
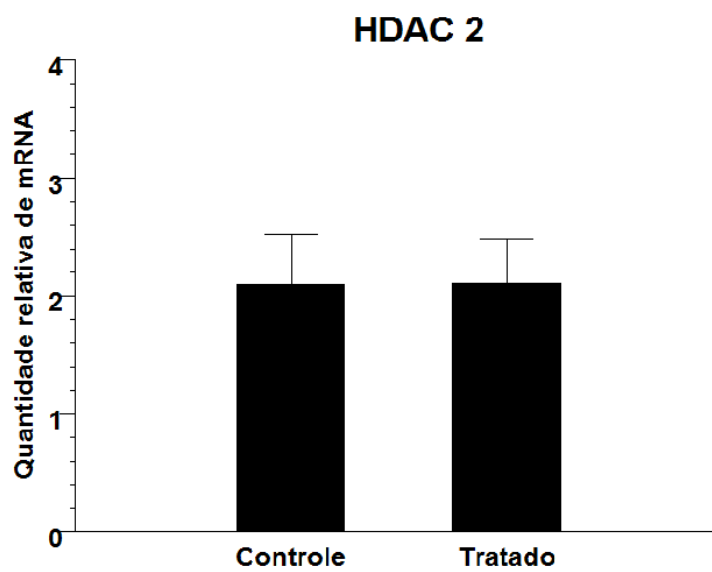


Figura 30 – Expressão relativa de mRNA dos genes *HDAC2* e *DNMT1* em células do grupo controle e tratadas com 1mM de Procaína.



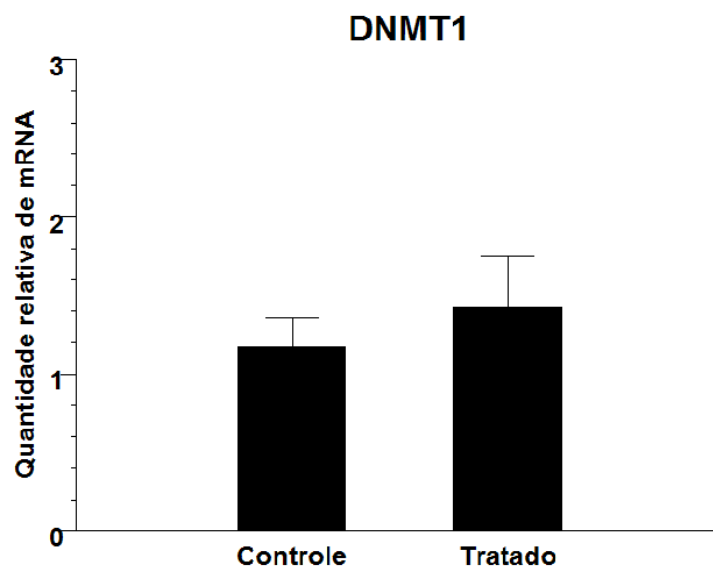


Figura 31 – Expressão relativa de mRNA dos genes *HDAC2* e *DNMT1* em células do grupo controle e tratadas com 2mM de SAH.

6 – DISCUSSÃO

Após o tratamento de fibroblastos bovinos com as substâncias desmetilantes, foi observada uma queda na viabilidade celular para aquelas tratadas com 1mM de Procaína. Constatou-se também, que os genes OCT4 e NANOG, não são bons marcadores moleculares de pluripotência para bovinos, pois foram detectados no grupo controle. Além do mais, mesmo não havendo diferença significativa na expressão dos genes HDAC2 e DNMT1 entre os grupos de cada tratamento, para as células tratadas com 1mM de Procaína, observamos claramente uma tendência de alteração na expressão destes genes.

A produção de animais clones pela técnica de TN, revela que núcleos de células somáticas altamente metilados e diferenciados podem ser reprogramados a um estado de pluripotência, capaz de gerar novos indivíduos. No entanto, falhas gestacionais ou no desenvolvimento neo-natal resultantes da clonagem, sugerem uma possível desregulação do controle epigenético. Há de fato, padrões aberrantes de metilação em animais clonados. O evento inicial de desmetilação ocorre no núcleo da célula doadora logo após a fusão com o ovócito enucleado de forma rápida e imediata (SANTOS, DEAN, 2004) e durante esse processo, o padrão epigenético das células somáticas que é normalmente muito estável deve ser revertido em um curto período de tempo, antes da ativação do genoma zigótico (ZUCCOTTI *et al.*, 2000). No entanto, somente a ação do ooplasma é pouco eficiente para desprogramar o núcleo da célula doadora. Por isso, a utilização de agentes desmetilantes durante o cultivo de células que serão utilizadas como doadoras de núcleo, pode iniciar o processo de reprogramação, melhorando a ação do ooplasma após a fusão com o núcleo somático.

A utilização da Procaína e do SAH como agentes desmetilantes de DNA no cultivo de células doadoras de núcleo para utilização na clonagem por transferência nuclear é uma alternativa técnica ainda não muito utilizada, e com poucos relatos na literatura. Embora não tenha sido observado diferenças morfológicas nas células tratadas com 1mM de Procaína em relação ao grupo controle (Figura 13), a diferença encontrada em relação ao número de células viáveis entre os tratamentos experimentais (Figuras 15 e 16), está de acordo

com os resultados encontrados por Villar-Garea (2005). Estes autores, trabalhando com cultivo de linhagem celular cancerosa de humanos MCF7 também suplementada com 1mM de Procaína, observaram uma diminuição de aproximadamente 40% de células viáveis em relação ao grupo controle durante o período de 72 horas de tratamento.

Tada e colaboradores (2007), utilizando cultivo de uma linhagem celular de hepatoblastoma com a mesma concentração de Procaína, porém com tempo de exposição das células à droga de 96 horas, observaram uma redução significativa na quantidade de células viáveis. No mesmo trabalho, foi observado que a suplementação com 1mM de Procaína no meio de cultivo por 96 horas, aumentou a quantidade de células em fase S e diminuiu a população celular nas fases G2 e M. Esses resultados parecem contraditórios, pois se existem mais células na fase S, isso significa que estão duplicando seu DNA para divisão, mas esses autores encontraram menor número de células no cultivo celular. Já Villar-Garea e colaboradores (2003), relataram que células MCF7 tratadas com a mesma substância interrompem o ciclo celular em G2/M. Esses autores sugerem que isso possa ocorrer porque a Procaína causa parada do ciclo celular, pois genes supressores de tumor voltam a ser expressos, impedindo a multiplicação celular tumoral e causando provável diferenciação celular ou induzindo morte celular (VILLAR-GAREA, 2005).

Michalczechen-Lacerda e colaboradores (2010), utilizando fibroblastos bovinos tratados por 72 horas com diferentes concentrações, observaram que a suplementação com 0,1 e 0,5mM de Procaína aumentou a viabilidade celular em relação ao grupo não tratado e a outro tratado com 2mM, corroborando com os resultados de Villa-Garea (2005), que relatam que o cultivo de MCF7 com 2mM de Procaína inviabiliza o crescimento celular. Nesta última concentração, ainda foi observado diferenças morfológicas, como formação de vacúolos (MICHALCZECHEN-LACERDA *et al.*, 2010). Baseando-se nestes resultados, podemos sugerir que ação da Procaína no cultivo celular é dose-tempo-dependente.

Em relação ao cultivo de fibroblastos com 2mM de SAH, não encontramos diferenças na viabilidade celular entre os grupos tratado e o controle analisando o número de células viáveis (Figura 14). Sipkens e colaboradores (2011), utilizando células endoteliais umbilicais humanas em

cultivo por 6 horas e concentrações de SAH inferiores, 0,001mM, 0,01mM e 0,1mM, também não observaram na viabilidade celular. Em dados não publicados deste mesmo autor, o cultivo celular de linfoblastos na presença de SAH, não aumentou os níveis de SAH intracelular, sugerindo que essa substância, quando adicionada ao meio extracelular não tem capacidade de entrar na célula. Esses resultados são contraditórios, pois o tempo de exposição das células à droga e as concentrações utilizadas foram bem inferiores a outros trabalhos que utilizaram a mesma substância. No entanto, o SAH por ser um composto não-nucleosídeo, e não se agregar ao DNA, não possui efeitos citotóxicos (DE CABO *et al.*, 1994; NIETO *et al.*, 2004). Além disso, é um subproduto natural do metabolismo celular, fazendo parte do ciclo da metionina (PANAYIOTIDIS *et al.*, 2009). Estas características podem justificar não termos encontrado diferenças na quantidade de células viáveis entre os grupos tratado e controle neste trabalho (Figura 17; Tabela 4).

Após o tratamento dos fibroblastos bovinos com Procaína e SAH, a presença de transcritos para os fatores de transcrição OCT4 e NANOG foi testada nos grupos controle e tratados. O gene OCT4 é indispensável para a auto-renovação e manutenção do estado indiferenciado das células pluripotentes embrionárias e das células germinativas em mamíferos (TOLKUNOVA *et al.*, 2007) assim como o NANOG (MITSUI *et al.*, 2003). Em camundongos, estes dois genes são marcadores moleculares já estabelecidos para a característica de pluripotência celular (CHAMBERS *et al.*, 2003; CHAMBERS *et al.*, 2007; EMA *et al.*, 2008; FUJIKURA *et al.*, 2002; MASUI *et al.*, 2007; NIWA *et al.*, 2000; NIWA *et al.*, 2005). Pela técnica de qPCR e através de eletroforese em gel de agarose, confirmamos a presença destes dois genes, tanto nas células controle como nas células tratadas. Nossos resultados contrariam os achados literários, que afirmam que a expressão dos genes OCT4 e NANOG é restrita as células da massa celular interna e trofoblasto (HE *et al.*, 2006). Especulamos que esses resultados conflitantes são devidos a diferenças inerentes às espécies. Em função desta detecção em células somáticas, mesmo estes genes sendo relacionados como específicos para pluripotência em outras espécies, para bovinos não podemos utilizá-los como marcadores moleculares para a característica de pluripotência celular.

Isso mostra a necessidade de mais pesquisas para a descoberta de genes de pluripotência específicos para bovinos.

Além dos genes OCT4 e NANOG, a expressão dos genes HDAC2 e DNMT1 também foi avaliada. Esses dois genes são responsáveis por alterações epigenéticas, no qual a DNMT1 é responsável por preservar os padrões de metilação durante as divisões celulares através da metilação dos dinucleotídeos CG hemimetilados produzidos na replicação do DNA (JURKOWSKA *et al.*, 2011) e a HDAC2 provoca repressão transcricional através da deacetilação de histonas (BRUNMEIR *et al.*, 2009). Os tratamentos das células com 1mM de Procaína e 2mM de SAH não foram capazes de alterar a expressão desses dois genes (Figuras 30 e 31). Porém, para as células tratadas com 1mM de Procaína, acreditamos haver uma tendência de alteração na expressão destes genes, como observado nas Figuras 30 representando dois experimentos distintos, além de que essa droga provocou diferença no número de células viáveis. Acreditamos que a ação desmetilante dessa droga possa provocar uma queda na transcrição do gene DNMT1 e conseqüente queda na transcrição do gene *HDAC2*. Isso porque existe uma interrelação entre metilação de DNA e acetilação de histonas, através de proteínas que se ligam a citosinas metiladas recrutando enzimas que desacetilam histonas, provocando silenciamento transcricional (JONES *et al.*, 1998; NAN *et al.*, 1998; NEWELL-PRICE *et al.*, 2000).

O DNA metilado impede a transcrição através de mecanismos de silenciamento gênico com promotores específicos (KASS, PRUSS, WOLFFE, 1997). Proteínas que se ligam ao DNA metilado, como a MePC2 (DNA methyl CpG-binding protein 2), se ligam diretamente à citosina metilada e, posteriormente, iniciam um recrutamento de complexos de histonas desacetilases (HDACs), que são importantes para manter os eventos de remodelamento da cromatina e manter um ambiente transcricionalmente não permissivo (JAENISCH, BIRD, 2003). Assim, poderíamos especular que com a queda da quantidade de transcritos de DNMT1, em função da ação da Procaína, provocando uma queda no número de citosinas metiladas, haveria uma diminuição na ligação de proteínas que possuem afinidade com essas regiões e uma conseqüente queda no recrutamento de histonas desacetilases, diminuindo também o número de transcritos de HDAC2. Demonstrando,

embora não de maneira estatisticamente significativa, a razão da diminuição da quantidade de transcritos destes dois genes analisados.

Quando analisamos a expressão destes genes nas células tratadas com 2mM de SAH, observamos que o padrão de expressão é muito semelhante entre os grupos controle e tratados. Isso faz sentido quando relacionamos os resultados da expressão gênica com a viabilidade celular, que também não apresentou diferença entre os grupos. Podemos justificar esses resultados de expressão com as citações de Sipkens e colaboradores (2011) que sugerem a incapacidade do SAH, quando adicionado no meio extracelular de entrar na célula. No entanto, de acordo com Castro e colaboradores (2005), altas concentrações de SAH ou a diminuição da relação SAM/SAH induz hipometilação global do DNA, RNA, proteínas e fosfolipídeos de células e tecidos, em função da sua alta afinidade aos sítios de ligação das enzimas metiltransferases, inativando sua ação.

Jeon e colaboradores (2008), detectaram altos níveis de desmetilação de DNA em fibroblastos quando cultivados durante dez dias com concentrações de até 1mM de SAH, cerca de 40% em relação ao grupo controle. Hermes e colaboradores (2004), utilizando células HepG2, observaram a redução de 30% no padrão de metilação celular, quando tratadas com 1mM durante 24 horas e Nieto e colaboradores (2004) observaram a mesma queda em porcentagem, com a mesma concentração, porém, com período de tratamento de três dias. Portanto, baseando-se na maioria dos trabalhos da literatura, nossos resultados sugerem que diferentes tipos celulares, reagem de forma diferente ao tratamento com esta droga desmetilantes dependendo também, da concentração utilizada durante o cultivo e do tempo de exposição das células à droga.

7 – CONCLUSÕES

Baseado em nossos resultados, concluímos que os genes OCT4 e NANOG não são marcadores moleculares para pluripotência celular em bovinos. Acreditamos que com possíveis modificações no cultivo celular, como variações no tempo de cultivo e exposição das células às drogas, o uso de diferentes concentrações ou mesmo a associação dessas duas drogas no mesmo cultivo, podemos alterar os padrões epigenéticos do DNA das células doadoras de núcleo para a clonagem por transferência nuclear, contribuindo assim para o incremento dos resultados da técnica de clonagem.

BIBLIOGRAFIA

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.

AMATO, R. J. Inhibition of DNA Methylation by Antisense Oligonucleotide MG98 as Cancer Therapy. **Clinical Genitourinary Cancer**, v.5, p.422–426, 2007.

ATHANASIADOU, R.; DE SOUZA, D.; MYANT, K.; MERUSI, C.; STANCHEVA, I.; BIRD, A. targeting of de novo DNA methylation throughout the OCT-4 gene regulatory region in differentiating embryonic stem cells. **Plos One**, v.5, p.9937, 2010.

AVVAKUMOV, N.; COTE, J. The MYST family of histone acetyltransferases and their links to cancer. **Oncogene**, v.26, p.5395-5407, 2007.

BANNISTER, A. J.; ZEGEMAN, P.; PATRIDGE, J. F.; MISKA; THOMAS, O. J.; ALLSHIRE, C. R.; KOUZARIDES, T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature**, v.401, p.120-124, 2001.

BEARD, C. LI, E. JAENISCH, R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. **Genes Developmental**, v.9, p.2325– 2334, 1995.

BEN-SHUSHAN, E.; PIKARSKY, E.; KLAR, A.; BERGMAN, Y. Extinction of Oct-3/4 Gene Expression in Embryonal Carcinoma X Fibroblast Somatic Cell Hybrids Is Accompanied by Changes in the Methylation Status, Chromatin Structure, and Transcriptional Activity of the Oct-3/4 Upstream Region. **Molecular Cellular Biology**, v.13, p.891–901, 1993.

BERGER, S. L.; KOUZARIDE, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenéticas. **Genes & Development**, v.23, p.781-783, 2009.

BESTOR, T.; LAUDANO, A.; MATTALIANO, R.; INGRAM, V. Cloning and sequencing of cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells: The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v.203, p.971-983, 1988.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v.9, p.2395-2402, 2000.

BHAUMIK, S.R.; SMITH, E.; SHILATIFARD, A. Covalent modifications of histone during development and disease pathogenesis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.14, p.1008-1016, 2007.

BOGDANOVIC, O.; LONG, S. W.; VAN HEERINGEN, S. J.; BRINKMAN, A. B.; GOMEZ-SKARMETA, J. L.; STUNNENBERG, H. G.; JONES, P. L.; VEENSTRA, G. J. C. Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. **Genome Research**, v.21, p.1313-1327, 2011.

BOGDANOVIC, O.; VEENSTRA, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromosoma**, v.118, p.549-565, 2009.

BOOTH, H. A.; HOLLAND, P. W. Eleven Daughters of NANOG. **Genomics**, v.84, p.229–238, 2004.

BOUEC'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.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core

transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v.122, p.947-956, 2005.

BREHM, A.; MISKA, E. A.; McCANCE, D. J.; REID, J. L. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. **Nature**, v.391-601, 1998.

BRUNMEIR, R.; LAGGER, S.; SEISER, C. Histone deacetylase 1 and 2-controlled embryonic development and cell differentiation. **The international Journal of Developmental Biology**, v.53, p.275-289, 2009.

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.

CASTRO, R.; RIVERA, I.; MARTINS, C.; STRUYS, E. A.; JANSEN, E. E.; CLODE, N.; GRACA, L. M.; BLOM, H. J.; JAKOBS, C.; DE 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.

CAUDILL, M. A.; WANG, J. C.; MELNYK, S.; POGRIBNY, I. P.; JERNIGAN, S.; COLLINS, M. D.; SANTOS-GUZMAN, J.; SWENDSEID, M. E.; COGGER, E. A.; JAMES, S. J. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2811–2818, 2001.

CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDE, H.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Oct-4 mRNA and Protein Expression during Human Preimplantation Development. **Molecular Human Reproduction**, v.11, p.173–181, 2005.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v.113, p.643–655, 2003.

CHAMBERS, I.; SILVA, J.; COLBY, D.; NICHOLS, J.; NIJMEIJER, B.; ROBERTSON, M.; VRANA, J.; JONES, K.; GROTEWOLD, L.; SMITH, A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature**, v.450, p.1230-1234, 2007.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LeBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Clinical, hormonal and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology Reproduction**, v.66, p.1596-1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMAN, H.; LAIGRE, P.; HEYMAN, Y.; MIALOT, J-P. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.6, p.94-100, 2004.

CHEN, R. Z.; PETTERSSON, U.; BEARD, C.; JACKSON-GRUSBY, L.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature**, v.395, p.89 –93, 1998.

CHEN, T.; HEVI, S.; GAY, F.; TSUJIMOTO, N.; HE, T.; ZHANG, B.; UEDA, Y.; LI, E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. **Nature Genetics**, v.39, p.391 –396, 2007.

CHEW, J. L.; LOH, Y. H.; ZHANG, W. Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells, **Molecular Cellular Biology**, v.25, p.6031–6046, 2005.

CHI, P.; ALLIS, C. D.; WANG, G. G. Covalent histone modifications – Miswritten and mis-erased in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.457-469, 2010.

CHUANG, J. C.; YOO, C. B.; KWAN, J. M.; LI, T. W.; LIANG, G.; YANG, A. S.; JONES, P. A. Comparison of Biological Effects of Non-Nucleoside DNA Methylation Inhibitors versus 5-Aza- 2'-Deoxycytidine. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.4, p.1515–1520, 2005.

CIBELLI, J.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic clves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v.28, p.1256-1258, 1998.

CLARKSON, M. J.; WELLA, J. R.; GOBSON, F.; SAINT, R.; TREMETHICK, D. J. Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. **Nature**, v.399, p.694-697, 1999.

CORROZZA, M. J.; UTLEY, R. T.; WORKMAN, J. L.; CÔTÉ, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends in Genetics**, v.19, p.321-329, 2003.

DATTA, J.; GHOSHAL, K.; DENNY, W. A.; GAMAGE, S. A.; BROOKE, D. G.; PHIASIVONGSA, P.; REDKAR, S.; JACOB, S. T. A New Class of Quinoline-Based DNA Hypomethylating Agents Reactivates Tumor Suppressor Genes by Blocking DNA Methyltransferase 1 Activity and Inducing Its Degradation. **Cancer Research**, v.69, p.4277–4285, 2009.

De CABO, S. F.; HAZEN, M. J.; MOLERO, M. L.; FERNANDEZ-PIQUERA, J. S-adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. **Experientia**, v.50, p.658-659, 1994.

De RUIJTER, A. J.; VAN GENNIP, A. H.; CARON, H. N.; KEMP, S.; VAN KUILENBURG, A. B. Histone deacetylase (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical journal**, v.370, p.737-749, 2003.

De SOUZA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology Reproduction**, v.65, p.23-30, 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 Signaling. **Arthritis Rheum**, v.48, p.746–756, 2003.

DOVEY, O. M.; FOSTER, C. T.; COWLEY, S, M. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.107, p.8242-8247, 2010.

EDEN, A.; GAUDET, F.; WAGHMARE, A.; JAENISCH, R. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. **Science**, v.300, p. 455, 2003.

EGGER, G.; JEONG, S.; ESCOBAR, S. G.; CORTEZ, C. C.; LI, H. W. T.; SAITO, Y.; YOO, B. C.; JONES, A. P.; LIANG, G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.103, p.14080-14085, 2006.

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.126-146, 2007.

EMA, M.; MORI, D.; NIWA, H.; HASEGAWA, Y.; YAMANAKA, Y.; HITOSHI, S.; MIMURA, J.; KAWABE, Y.; HOSOYA, T.; MORITA, M. Kruppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. **Cell Stem Cell**, v.3, p.555-567, 2008.

FANG, M. Z.; WANG, Y.; AI, N.; HOU, Z.; SUN, Y.; LU, H.; WELSH, W.; YANG, C. S. Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin- 3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v.63, p.7563–7570, 2003.

FATEMI, M.; HERMANN, A.; PRADHAN, S.; JELTSCH, A. The activity of murine DNA methyltransferase DNMT1 is controlled by interaction of catalytic domain with N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. **Journal of Molecular Biology**, v.309, p.1189-1199, 2001.

FATEMI, M.; URIG, S.; GOWHER, H.; HERMAN, A.; BECK, C.; HUMENY, A.; JELTSCH, A. The *Escherichia coli* dam DNA methyltransferase modifies DNA in a highly processive reaction. **Journal of Molecular Biology**, v.319, p.1085-1096, 2002.

FELDMAN, N.; GERSON, A.; FANG, J.; LI, E.; ZHANG, Y.; SHINKAI, Y.; CEDAR, H.; BERGMAN, Y. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of OCT3/4 during early embryogenesis. **Nature Cell Biology**, v.8, p.188-194, 2006.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI S. R. G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos locais. in: SPINOSA, HS, GORNIK, SL, BERNARDI, MM. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 4 ed., p144-151., 2006.

FENG, B.; NG, J. H.; HENG, J. C. D.; NG, H. H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induce pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.4, p.301-312, 2009.

FIALHO, S. A. G. Fármacos que promovem anestesia geral e local. In: **Anestesiologia Veterinária, Guia prático de anestesia para pequenos e grandes animais**, 2 ed., p.64-65, 1986.

FILIOM, G. J.; VAN BEMMEL, J. G.; BRAUNSCHWEIG, U.; TALHOUT, W.; KIND, J.; WARD, L. D.; BRUGMAN, W.; DE CASTRO, I. J.; KERKHOVEN, R. M.; BUSSEMAKER, H. J.; VAN STEENSEL, B. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. **Cell**, v.143, p.212-224, 2010.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C. D. Binary switches and modification cassttes in histone biology and beyond. **Nature**, v.425, p.475-479, 2003.

FOULKES, J. M.; PARNELL, K. M.; NIX, R. N.; CHAU, S.; SWIERCZEK, K.; SAUNDERS, M.; WRIGHT, K.; HENDRICKSON, T. F.; HO, K. K.; McCULLAR, M. V.; KANNER, S. B. Epigenetic drug Discovery: Targeting DNA methyltransferases. **Journal of Biomolecular Screening**, v.X, p.XX, 2011.

FRYE, R. A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p.273–279, 1999.

FUJIKURA, J.; YAMATO, E.; YONEMURA, S.; HOSODA, K.; MASUI, S.; NAKAO, K.; MIYAZAKI JI, J.; NIWA, H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. **Genes Development**, v.16, p.784-789, 2002.

FUKS, F.; BURGERS, W. A.; BREHM, A.; HUGHES-DAVIES, L.; KAUZARIDES, T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. **Nature Genetics**, v.24, p.88-91, 2000.

GALLINARI, P.; DI MARCO, S.; JONES, P.; PALLAORO, M.; STEINKUHLER, C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to câncer therapeutics. **Cell Research**, v.17, p.195-211, 2007.

GAUDET, F.; HODGSON, J. G.; EDEN, A.; JACKSON-GRUSBY, L.; DAUSMAN, J.; GRAY, J. W.; LEONHARDT, H.; JAENISCH, R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. **Science**, v.300, p.489-492, 2003.

GODIN, C. S.; CROOKS, P. A. In vivo depletion of S-adenosyl-L-homocysteine and S-adenosyl-L-methionine in guinea pig lung after chronic S-(-)-nicotine administration. *Toxicology Letters*, v.31, p.23–29, 1986.

GOLL, M. G.; KIRPEKAR, F.; MAGGERT, K. A.; YODER, A. J.; HSIEH, C.; ZANG, X.; GOLIC, G. K.; JACOBSEN, E. S.; BESTOR, H. T. Methylation of tRNA Asp by DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v.311, p.395-398, 2006.

GONZALEZ, F.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Methods for making induced pluripotent stem cells: Reprogramming a la carte. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.231-242, 2011.

GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B. O.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation in development and human disease. **Mutation Research**, v.647, p.30-38, 2008.

GHOSHAL, K.; DATTA, J.; MAJUMDER, S.; BAI, S.; KUTAY, H.; MOTIWALA, T.; JACOB, S. T. 5-Aza-Deoxycytidine Induces Selective Degradation of DNA Methyltransferase 1 by a Proteasomal Pathway That Requires the KEN Box, Bromo- Adjacent Homology Domain, and Nuclear Localization Signal. **Molecular Cell Biology**, v. 25, p. 4727–4741, 2005.

GOURDON, J. B.; COLMAN, A. The future of cloning. **Nature**, v.402, p.743-746, 1999.

GOYAL, R.; REINHARDT, R.; JELTSCH, A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the DNMT1 methyltransferase. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.1182-1188, 2006.

HAIGIS, M. C.; MOSTOSLAVSKY, R.; HAIGIS, K. M.; FAHIE, K.; CHISTODOULOU, D. C.; MURPHY, A. J.; VALENZUELA, D. M.; YANCOPOULOS, G. D.; KAROW, M.; BLANDER, G.; WOLBERGER, C.; PROLLA, T. A.; WEINDRUCH, R.; ALT, F. W.; GUARENTE, L. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells. **Cell**, v.126, p.941–954, 2006.

HALSTED, C.H.; VILLANUEVA, J.; CHANDLER, C. J.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H.; MUSKHELISHVILI, L.; JAMES, S. J.; POIRIER, L. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. **Hepatology**, v.23, p.497–505, 1996.

HAKIMI, M. A.; BOCHAR, D. A.; CHENOWETH, J.; LANE, W. S.; MANDEL, G.; SHIKHATTAR, R. A core-BRA35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neural-specific genes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.99, p.7420-7425, 2002.

HANSIS, C.; GRIFO, J. A.; KREY, L.C. Oct-4 Expression in Inner Cell Mass and Trophectoderm of Human Blastocysts. **Molecular Human Reproduction**, v.6, p.999–1004, 2000.

HART, A.H.; HARTLEY, L.; IBRAHIM, M.; RABB, L. Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human. **Developmental Dynamics**, v.230, p.187–198, 2004.

HATTORI, N.; NISHINO, K.; KO, Y. Epigenetic Control of Mouse Oct-4 Gene Expression in Embryonic Stem Cells and Trophoblast Stem Cells. **Journal Biology Chemical**, v.279, p.17063–17069, 2004.

HATTORI, N.; IMAO, Y.; NISHINO, K. Epigenetic Regulation of Nanog Gene in Embryonic Stem and Trophoblast Stem Cells. **Genes Cells**, v.12, p.387–396, 2007.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A. Developmental Expression of Pluripotency Determining Factors in Caprine Embryos: Novel Pattern of NANOG Protein Localization in the Nucleolus. **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.1512–1522, 2006.

HENDRICH, B.; TWEEDIE, S. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. **Trends Genetics**, v.19, p.269-277, 2003.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; PLATERO, J. S.; STEENSEL, B. Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p.716-721, 2000.

HERMES, M.; OSSWALD, H.; MATTAR, J.; KLOOR, D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. **Experimental Cell Research**, v.294, p.325-334, 2004.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LeBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestational losses from cattle cloned embryos. **Biology Reproduction**, v.66, p.6-13, 2002.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. S.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v.51, p.1451-1465, 1999.

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 Reproduction**, v.63, p.1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology Reproduction**, v.67, p.55-63, 2002.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear transplantation, embryonic stem cell, and the potential for cell therapy. [The New England Journal of Medicine](#), v.349, p.274-286, 2003.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implication for effector design. **Oncogene**, v.26, p.5528-5540, 2007.

HOLLENBACH, P. W.; NGUYEN, A. N.; BRADY, H.; WILLIAMS, M.; NING, Y.; RICHARD, N.; KRUSHEL, L.; AUKERMAN, S. L.; HEISE, C.; MACBETH, K. J. A Comparison of Azacitidine and Decitabine Activities in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. **PLoS One**, v.5, 2010.

HOWARD, G.; EIGES, R.; GAUDET, F.; JAENISCH, R.; EEDEN, A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumor in mice. **Oncogene**, v.27, p.404-408, 2008.

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.

HUMPHREY, G. W.; WANG, Y.; RUSSANOVA, V. R.; HIRAI, T.; QIN, J.; NAKATANI, Y.; HOWARD, B. H. Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain protein CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.6817-6824, 2001.

JACKSON-GRUSBY, L.; BEARD, C.; POSSEMATO, R.; TUDOR, M.; FAMBROUGH, D.; CSANKOVSKI, G.; DAUSMAN, J.; LEE, P.; WILSON, C.; LANDER, E.; JAENISCH, R. Loss of genomic methylation causes p53-

dependent apoptosis and epigenetic deregulation. **Nature Genetics**, v.27, p.31-39, 2001.

JACOB, C.; CHRISTEN, C. N.; PEREIRA, J. A.; SOMANDIN, C.; BAGGIOLINI, A.; LOTSCHER, P.; OZCELIK, M.; TRICAUD, N.; MEIJER, D.; YAMAGUCHI, T.; MATTHIAS, P.; SUTER, U. HDAC1 and HDAC2 control the transcriptional program of myelination and the survival of Schwann cells. **Nature Neuroscience**, v.14, p.429–436, 2011.

JACOBSON, R. H.; LADURNER, A. G.; KING, D. S.; TIJIAN, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. **Science**, v.381, p.1422-1425, 2000.

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

JAMES, D.; LEVINE, A. J.; BESSER, D.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. TGFbeta/Activin/Nodal Signaling Is Necessary for the Maintenance of Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. **Development**, v.132, p.1273–1282, 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, p.815-828, 2008.

JELTSCH, A.; NELLEN, W.; LYKO, F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferase. **Trends in Biochemical Science**, v.31, p.306-308, 2006.

JIN, B.; YAO, B.; LI, J.L.; FIELDS, R. C.; DELMAS, L. A.; LIU, C.; ROBERTSON, D. K. DNMT1 and DNMT3B modulate distinct polycomb-

mediated histone modifications in colon cancer. **Cancer Research**, v.69, p.7412-7421, 2009.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation: superior or subordinate in epigenetic hierarchy? **Genes & Cancer**, Georgia, v.2, p.607-617, 2011.

JONES, P. L.; VEENTRA, G. J. C.; WADE, P. A.; VERMAAK, D.; KASS, S. U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genetics**, v.19, p.187-191, 1998.

JONES, P. A.; TAYLOR, S. M. Cellular Differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation. **Cell**, v.20, p.85–93, 1980.

JURKOWASKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **ChemBioChem**, v.12, p.206-222, 2011.

JURKOWSKI, T. P.; MEUSBURGER, M.; PHALKE, S.; HELM, M.; NELLEN, W.; REUTER, G.; JELTSCH, A. Human Dnmt2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. **RNA**, v.14, p.1663-1670, 2008.

KARETA, M. S.; BOTELLO, Z. M.; ENNIS, J. J.; CHOU, C.; CHEDIN, F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.25893-25902, 2006.

KASS, S. U.; PRUSS, D.; WOLFFE. How does DNA methylation repress transcription. **Trends in Genetics**, v.13, p.444-449, 1997.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B. Oct4 Is Required for Primordial Germ Cell Survival. **EMBO Reports**, v.5, p.1078–1083, 2004.

KIM, J. S.; KIM, J.; KIM, B. S. Identification and Functional Characterization of an Alternative Splice Variant within the Fourth Exon of Human Nanog. **Experimental and Molecular Medicine**, v.37, p.601–607, 2005.

KIM, J. Y.; SHEN, S.; DIETZ, K.; HE, Y.; HOWELL, O.; REYNOLDS, R.; CASACCIA, P. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. **Nature Neuroscience**, v.13, p.180–189, 2010.

KIMURA, F.; SEIFERT, H. H.; FLORI, A. R.; SANTOURLIDIS, S.; STEINHOFF, C.; SWIATKOWSKI, S.; MAHOTKA, C.; GERHARZ, C. D.; SCHULZ, W. A. Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v.104, p.568–578, 2003.

KIMURA, H.; SHIOTA, K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA Methyltransferase, DNAMT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.4806–4812, 2003.

KIRCHHOF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E. Expression Pattern of Oct-4 in Preimplantation Embryos of Different Species. **Biology Reproduction**, v.63, p.1698–1705, 2000.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the marks and its mediators. **Trends Biochemical Science**, v.31, p.89–97, 2006.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of eukaryote chromosome. **Cell**, v.98, p.1076–1087, 1999.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain, **Science**, v.324, p.929–930, 2009.

KUCK, D.; CAULFIELD, T.; LYKO, F.; MEDINA-FRANCO, J. L. Nanaomycin A Selectively Inhibits DNMT3B and Reactivates Silenced Tumor Suppressor

Genes in Human Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.9, p.3015–3023, 2010.

KURDISTANI, S. K.; GRUNSTEIN, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.4, p.276-284, 2003.

KURODA, T.; TADA, M.; KUBOTA, H. Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. **Molecular Cellular Biology**, v.25, p.2475–2485, 2005.

LACHNER, M.; O CARROL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. **Nature**, v.410, p.116-129, 2001.

LANGE, U. C.; SCHNEIDER, R. What an epigenome remembers. **BioEssays**, v.32, p.659-668, 2010.

LEE, P. J.; WASHER, L. L.; LAW, D. J.; BOLAND, C. R.; HORON, I. L.; FEINBERG, A. P. Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.93, p.10366-10370, 1996.

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

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

LI, E. BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v.366, p.362– 365, 1993.

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

LIU, X.; LI, T.; LIU, Y.; JIA, Z.; LI, Y.; KHANG, C.; CHEN, P.; MA, K.; AFFARA, N.; ZHOU, C. WNT signaling promotes *Nkx2.5* expression and early cardiogenesis via downregulation of *Hdac1*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, v.1793, p.300-311, 2009.

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

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, R. J.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, H. A.; THOMSON A. J.; REN, B.; ECKERE, R. J. Human DNA methylomes at base resolution show wide-spread epigenomic differences. **Nature**, v.462, p.315-322, 2009.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; [SARGENT, D. F.](#); [RICHMOND, T. J.](#) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v.389, p.251-260, 1997.

LUGER, K.; RICHMOND, T. J. The histone tails of the nucleosome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.8, p.140-146, 1998.

LUO, R. X.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. **Cell**, v.92, p.463-473, 1998.

LYKO, F.; BROWN, R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. **Journal of the National Cancer Institute Review**, v. 97, p. 1498-1506, 2005.

MARMORSTEIN, R. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.422-432. 2001.

MARMORSTEIN, R.; CRIEVEL, R. C. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms and specificities. **Biochimic et Biophysica Acta**, v.1789, p.58-68, 2009.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse function of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p.838-849, 2005.

MASSONE, F. Anestesia Local, In: **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**, 1ed., p. 34-39, 1988.

MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; YAGI, R.; TAKAHASHI, K.; OKOCHI, H.; OKUDA, A.; MATOBA, R.; SHAROV, A. A. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v.9, p.625-635, 2007.

McGREGOR, D. B.; BROWN, A. G.; CATTANACH, P.; SHEPHERD, W.; RIACH, C.; DASTON, D. S.; CASPARY, W. J. TFT and 6TG Resistance of Mouse Lymphoma Cells to Analogs of Azacytidine. **Carcinogenesis**, v.10, p. 2003–2008, 1989.

MCKINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; OLSON, E. N. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. **Molecular Cell Biology**, v. 21, p.6312–6321, 2001.

MCKINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; LU, J.; OLSON, E. N. Signaldependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. **Nature**, v.408, p.106–111, 2000.

MEDVEDV, S. V.; SHEVCHENKO, A. I.; MAZUROK, N. A.; ZAKIAN, S. M. OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. **Russian Journal of Genetics**, v.44, p.1377-1393, 2008.

MELUH, B. P.; YANG, P.; GLOWCZEWSKI, L.; KOSHLAND, D.; SMITH, M. M. Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, v.94, p.607-613, 1998.

MERTINEIT, C.; YODER, J. A.; TAKETO, T.; LAIRD, D. W.; TRASLER, J. M.; BESTOR, T. H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. **Development**, v.125, p.889-897, 1998.

MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; RODRIGUES, F. C.; SOUZA, R. V.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Impacts of using procaine as a DNA-demethylating agent *in vitro* culture of bovine cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.132-133, 2010.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v. 404, p.1–13, 2007.

MITALPOV, S. M.; KUO, H. C.; HENNEBOLD, J. D.; WOLF, D. P. Oct-4 Expression in Pluripotent Cells of the Rhesus Monkey. **Biology Reproduction**, v.69, p.1785–1792, 2003.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. **Cell**, v.113, p.631–642, 2003.

MONTGOMERY, R. L.; DAVIS, C. A.; POTTHOFF, M. J.; HABERLAND, M.; FIELITZ, J.; QI, X.; HILL, J. A.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Histone deacetylase 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth and contractility. **Genes & Development**, v.21, p.1790-1802, 2007.

MONTGOMERY, R. L.; HSIEH, J.; BARBOSA, A. C.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Histone deacetylase 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.106, p.7876-7881, 2009.

MOTORIN, Y.; LYKO, F.; HELM, M. 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. **Nucleic Acids Research**, v.38, p.1415-1430, 2010.

NAGY, Z.; TORA, L. Distinct GCN5/PCAF containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global acetylation. **Oncogene**, v.26, p.5341-5357, 2007.

NAKAYAMA, J. C.; RICE, J. C.; STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D.; GREWAL, S. I. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. **Science**, v.292, p.110-113, 2001.

NAN, X.; NG, H. H.; JOHNSON, C. A.; LAHERTY, C. D.; TURNER, B. M.; EISENMAN, R. N.; BIRD, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v.393, p.386-389, 1998.

NEWELL-PRICE, J.; CLARCK, A. J. L.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene Expression. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.11, p.142-148, 2000.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct- 4. **Cell**, v.95, p.379–391, 1998.

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

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v.24, p.372-376, 2000.

NIWA, H.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; STRUMPF, D.; TAKAHASHI, K.; YAGI, R.; ROSSANT, J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. **Cell**, v.123, p.917-929, 2005.

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

OVITT, C. E.; SHOLER, H. The Molecular Biology of Oct-4 in the Early Mouse Embryo. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.1021–1031, 1998.

PAIN, D.; CHIRN, G. W.; STRASSEL, C.; KEMP, D. M. Multiple Retroseudogenes from Pluripotent Cell-Specific Gene Expression Indicates a Potential Signature for Novel Gene Identification, **Journal Biology Chemical**, v.280, p.6265–6268, 2005.

PAN, G.; LI, J.; ZHOU, Y. A Negative Feedback Loop of Transcription Factors That Controls Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal. **FASEB Journal**, v.20, p.1730–1732, 2006.

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

PANNING, B.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. **Genes Development**, v.10, p.1991 – 2002, 1996.

PARSEGHIAN, M. H.; NEWCOMB, R. L.; WINOKUR, S. T.; HAMCALO, B. A. The distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin: distribution in human fetal fibroblasts. **Chromosome Research**, v.8, p.405-424, 2000.

PEGORARO, G.; KUBBEN, N.; WICKERT, U.; GOHLER, H.; HOFFMANN, K.; MISTELI, T. Ageing-related chromatin defects through loss of NURD complex. **Nature Cell Biology**, v.11, p.1262-1267, 2009.

PEREIRA, L.; YI, F.; MERRILL, B. J. Repression of Nanog Gene Transcription by Tcf3 Limits Embryonic Stem Cell Self-Renewal. **Molecular Cellular Biology**, v.26, p.7479–7491, 2006.

PESCE, M.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H. R. Oct-4: Lessons of Totipotency from Embryonic Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v.165, p.144–152, 1999.

PROBST, A. V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, p.192-206, 2009.

QIN, T.; YOUSSEF, E. M.; JELINEK, J.; CHEN, R.; YANG, A. S.; GARCIA-MANERO, G.; ISSA, J. P. Effect of Cytarabine and Decitabine in Combination in Human Leukemic Cell Lines. **Clinical Cancer Research**, v.13, p.4225–4232, 2007.

RENARD, J. P.; CHASTANT, S.; CHESNE, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet**, v.353, p.1489-1491, 1999.

RIGGS, A. D.; XIONG, Z. Methylation and epigenetic fidelity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.101, p.4-5, 2004.

ROBERTSON, K. D.; UZVOLGYI, E.; LIANG, G.; TALMADGE, C.; SUMEGI, J.; GONZALES, F. A.; JONES, P. A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.2291-2298, 1999.

ROBERTSON, K. D.; AIT-SI-ALI, S.; YOKOCHI, T.; WADE, P. A.; JONES, P. L.; WOLFFE, A. P. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. **Nature Genetics**, v.25, p.338-342, 2000.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.597-610, 2005.

ROBINSON, P. J. J.; AN, W.; ROUTH, A.; MARTINO, F.; CHAPMAN, L.; ROEDER, R. G.; RHODES, D. 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. **Journal of Molecular Biology**, v.381, p.816-825, 2008.

RODDA, D. J.; CHEW, J. L.; LIM, L. H. Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. **Journal Biology Chemical**, v.280, p.24731– 24737, 2005.

ROPERO, S.; FRAGA, M. F.; BALLESTAR, E.; HAMELIN, R.; YAMAMOTO, H.; BOIX-CHORNET, M.; CABALLERO, R.; ALAMINOS, R.; SETIEN, F.; PAZ, M.F.; HERRANZ, M.; PALACIOS, J.; ARANGO, D.; ORNTOFT, T. F.; AALTONEN, L. A.; SCHWARTZ JR, S.; ESTELLER, M. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance of histone deacetylase inhibition. **Nature Genetics**, v.38, p.566-569, 2006.

ROUNDS, S.; YEE, W. L.; DAWICKI, D. D.; HARRINGTON, E.; PARKS, N.; CUTAIA, M. V. Mechanism of extracellular ATP- and adenosine-induced apoptosis of cultured pulmonary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology**, v.275, p.L379–L388, 1998.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S. B. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Nature Genetics**, v.25, p.269 –277, 2000.

SADO T.; FENNER, M. H.; TAN, S. S.; TAM, P.; SHIODA, T.; LI, E. X Inactivation in the Mouse Embryo Deficient for *Dnmt1*: Distinct Effect of

Hypomethylation on Imprinted and Random X Inactivation. **Developmental Biology**, v.225, p.294– 303, 2000.

SALAMONE, D.; BARANAO, L.; SANTOS, C.; BUSSMANN, L.; ARTUSO, J.; WERNING, C.; PRYNC, A.; CARBONETTO, C.; DABSYS, S.; MUNAR, C.; SALABERRY, R.; BERRA, G.; BERRA, I.; FERNADEZ, N.; PAPOUCHADO, M.; FOTI, M.; JUDEWICZ, N.; MUJICA, L.; ALVAREZ, S. F.; GONZALEZ, E.; ZIMMERMANN, J.; CRISCUOLO, M.; MELO, C. High level expression of bioactive recombinant human growth factor hormone in the milk of a cloned transgenic cow. **Journal of Biotechnology**, v.124, p.469-472, 2006.

SANTI, D. V.; NORMENT, A.; GARRETT, C. E. Covalent Bond Formation between a DNA-Cytosine Methyltransferase and DNA Containing 5-Azacytosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.81, p.6993–6997, 1984.

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

SCHALFER, M.; HAGEMANN, S.; HANNA, K.; LYKO, F. Azacytidine inhibites RNA methylation at Dnmt2 target system in human cancer cell lines. **Cancer Research**, v.69, p.8127-8132, 2009.

SCHALFER, F.; POLLEX, T.; HANNA, K.; TUORTO, F.; MEUSBURGER, M.; HELM, M.; LYKO, F. RNA mthylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-inducial clivage. **Genes & Development**, v.24, p.1590-1595, 2010.

SCHILTZ, R. L.; MIZZEN, C. A.; VASSILEV, A.; COOK, R. G.; ALLIS, C. D.; NAKATINI, Y. Overlapping but distinct patters of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.1189-1192, 1992.

SCHOLER, H. R.; BALLING, R.; HATZOPOULOS, A. K. Octamer Binding Proteins Confer Transcriptional Activity in Early Mouse Embryogenesis, **EMBO Journal**, v.8, p.2551–2557, 1989.

SCHOLER, H. R. Octamania: The POU Factors in Murine Development. **Trends Genetics**, v.7, p.323–329, 1991.

SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D.; CHILDS, B.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. The Metabolic & Molecular Bases Of Inherited Diseases. **Mcgraw-Hill**, 8 ed., 2001.

SEGURA-PACHECO, B.; TREJO-BECERRIL, C.; PEREZ-CARDENAS, E.; TAJA-CHAYEB, L.; MARISCAL, I.; CHAVEZ, A.; ACUNA, C.; SALAZAR, A. M.; LIZANO, M.; DUENAS-GONZALEZ, A. Reactivation of Tumor Suppressor Genes by the Cardiovascular Drugs Hydralazine and Procainamide and Their Potential Use in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.1596–1603, 2003.

SHI, T.; WANG, F.; STIEREN, E.; TONG, Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. **Journal Biology Chemical**, v. 280, p.13560–13567, 2005.

SIEDLECKI, P.; GARCIA BOY, R.; MUSCH, T.; BRUECKNER, B.; SUHAI, S.; LYKO, F.; ZIELENKIEWICZ, P. Discovery of Two Novel, Small-Molecule Inhibitors of DNA Methylation. **Journal Medicine Chemical**, v. 49, p.678–683, 2006.

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

SUTTON, J.; COSTA, R.; KLUG, M. Genesis, a Winged Helix Transcriptional Repressor with Expression Restricted to Embryonic Stem Cells. **Journal Biology Chemical**, v.271, p.23126–23133, 1996.

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

STRESEMANN, C.; BRUECKNER, B.; MUSCH, T.; STOPPER, H.; LYKO, F. Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v.66, p.2794–2800, 2006.

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.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, p.663-676, 2006.

TAKEDA, J.; SEINO, S.; BELL, G. I. Human Oct3 Gene Family: cDNA Sequences, Alternative Splicing, Gene Organization, Chromosomal Location, and Expression at Low Levels in Adult Tissues. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.4613–4620, 1992.

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

TAHILIANU, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v.324, p.930-935, 2009.

TAKASHIMA, S.; TAKEHASHI, M.; LEE, J.; CHUMA, S.; OKANO, M.; HATA, K.; SUETAKE, I.; NAKATSUJI, N.; MIYOSHI, H.; TAJIMA, S.; TANAKA, Y.; TOYOKUNI, S.; SASAKI, H.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SHINOHARA, T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. **Biology of Reproduction**, v.81, p.155-164, 2009.

TAPLICK, J.; KURTEV, V.; KROBOTH, K.; POSCH, M.; LECHNER, T.; SEISER, C. Homo-oligomerisation and nuclear localization of mouse histone deacetylase 1. **Journal of Molecular Biology**, v.308, p.27-38, 2001.

TAVERNA, S. D.; LI, H.; RUTHENBURG A. J.; ALLIS, C. D.; PATEL, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: Lessons from professional pocket pickers. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.14, p.1025-1040, 2007.

TOLKUNOVA, E.; MALASHICHEVA, A.; PARFENOV, V. N.; SUSTMANN, C.; GROSSCHEDI, R.; TOMILIN, A. PIAS proteins as repressors of OCT4 function. **Journal of Molecular Biology**, v.374, p.1200-1212, 2007.

TSUJI-TAKAYAMA, K.; INOUE, T.; IJIRI, Y. Demethylating Agent, 5-Azacytidine, Reverses Differentiation of Embryonic Stem Cells, **Biochemical Biophysical Research Community**, v.323, p.86–90, 2004.

TURNER, B. M. Cellular memory and histone code. **Cell**, v.111, p.285-291, 2002.

USUBIAGA, J. E.; WIKINSKI, J. A. Bases clínicas e farmacológicas para o emprego da procaina endovenosa. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.14 1964.

van EIJK, M. J.; van ROOIJEN, M. A.; MODINA, S. Molecular Cloning, Genetic Mapping, and Developmental Expression of Bovine POU5F1. **Biology Reproduction**, v.60, p.1093–1103, 1999.

VARELA-MOREIRAS, G.; ALONSO-APERTE, E.; RUBIO, M.; GASSO, M.; DEULOFEU, R.; ALVAREZ, L.; CABALLERIA, J.; RODES, J.; MATO, J. M. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect Of S-adenosylmethionine treatment. **Hepatology**, v.22, p.1310–1315, 1995.

VERDONE, L.; AGRICOLA, E.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Histone acetylation in gene regulation. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v.5, p.209-221, 2006.

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 laboratorio de epigenetica, Universidade de Valencia, Espanha. 2005.

VIRE, E.; BRENNER, C.; DEPLUS, R.; BLANCHON, L.; FRAGA, M.; DIDELOT, C.; MOREY, L.; VAN EYNDE, A.; BERNARD, D.; VANDERWINDEN, J. M.; BOLLEN, M.; ESTELLER, M.; Di CROCE, L.; de LAUNOIT, Y.; FUKS, F. The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. **Nature**, v.439, p.871-874, 2006.

VOELTER-MAHLKNECHT, S.; LETZEL, S.; MAHLKNECHT, U. Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene. **International Journal of Oncology**, v.28, p.899-908, 2006.

WAKAYAMA, T.; TABAR, V.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, F. C. A.; STUDER, C.; MOMBAERTS, P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. **Science**, v.292, p.740-743, 2001.

WANG, S. H.; TSAI, M. S.; CHIANG, M. F.; LI, H. A Novel NK-Type Homeobox Gene, ENK (Early Embryo Specific NK), Preferentially Expressed in Embryonic Stem Cells. **Gene Expression Patterns**, v.3, p.99–103, 2003.

WANG, L.; DUAN, E.; SUNG, L.; JEONG, B.; YANG, X.; TIAN, C. X. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.73, p.149-155, 2005.

WANG, Z.; ZANG, C.; CUI, K.; SCHONES, D. E.; BARSKI, A.; PENG, W.; ZHAO, K. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct function in active and inactive genes. **Cell**, v.138, p.1–13, 2010.

WEI, F.; SCHOLER, H. R.; ATCHISON, M. L. Sumoylation of Oct4 Enhances Its Stability, DNA Binding, and Transactivation. **Journal Biology Chemical**, v.282, p.21551–21560, 2007.

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

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

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

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

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; McCALLA, D. F. Comparison of birthweight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.73-83, 1995.

YANG, X. J. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. **Bioessays**, v. 26, p.1076-1087, 2004.

YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/HDA1 family of lysine deacetylase: From bacteria and yeast to mice and men. **Natre Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.206-218, 2008.

YAO, Y. L.; YANG, W. M. Beyond histone and deacetylase: an overview of cytoplasmic histone deacetylases and their nonhistone substrates. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, p.146-152, 2011.

YI, P.; MELNYK, S.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; HINE, R. J.; JAMES, S. J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma Sadenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.29318–29323, 2000.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic *imprinting*. **Theriogenology**, v.53, p. 617-648, 2000.

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

ZHANG, Z.; LIAO, B.; XU, M.; JIN, Y. Post-Translational Modification of POU Domain Transcription Factor Oct-4 by SUMO-1. **FASEB Journal**, v.21, p.3042–3051, 2007.

ZHU, J. K. Active DNA demethylation mediated by glycosylases. **Annual Review of Genetics**, v.43, p.143-166, 2009.

ZHOU, X.; RICHON, V. M.; RIFKIND, R. A.; MARKS, P. A. Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p.1056–1061, 2000.

ZUCCOTTI, M.; PONCE, R. H.; BOIANI, M.; GUIZZARDI, S.; GOVONI, P.; SCANDROGLIO, R.; GARAGNA, S.; REDI, C. A. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. **Zygote**, v.10, p.73-78, 2002.