



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Perfil epigenético e transcricional de fibroblastos isolados de pele bovina  
cultivados *in vitro* com substâncias desmetilantes de DNA**

**Aluna: Naiara Araújo Borges Schumann**  
**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Perfil epigenético e transcricional de fibroblastos isolados de pele bovina  
cultivados in vitro com substâncias desmetilantes de DNA**

**Aluna: Naiara Araújo Borges Schumann**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutor em Genética e  
Bioquímica.**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S392p  
2019 Schumann, Naiara Araújo Borges, 1991  
Perfil epigenético e transcricional de fibroblastos isolados de pele bovina cultivados in vitro com substâncias desmetilantes de DNA [recurso eletrônico] / Naiara Araújo Borges Schumann. - 2019.

Orientador: Maurício Machaim Franco.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1258>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Clonagem. 3. Ácido desoxirribonucleico. 4. Metilação de DNA. I. Franco, Maurício Machaim, 1965, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Perfil epigenético e transcricional de fibroblastos isolados de pele bovina  
cultivados *in vitro* com substâncias desmetilantes de DNA**

Aluna: Naiara Araújo Borges Schumann

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco (Orientador)

Examinadores: Carlos Ueira Vieira


Denis Prudêncio Luiz

Emília Rezende Vaz

Vívian Alonso Goulart

Data da defesa: 01/04/2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

  
Maurício Machaim Franco

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

*Tua natureza divina não foi feita para ser aprisionada à sombra do sofrimento, fora do alcance de Deus, e sim para expandir, crescer, para assim, reencontrar sua real função.*

*És a flecha que tem por destino ser arremessada ao tronco do conhecimento e, se forças em direção contrária, caís em depressão, por negares ao teu ser a tua real necessidade que é a de estares livre, presente na tua realidade divina.*

*Tens a opção em escolher novamente, sempre que sentires a ausência do teu coração em tuas decisões, ou seja, a ausência da paz de espírito.*

*Desacredita da tua má sorte e põe tua atenção, teu coração no conhecimento que está dentro de ti.*

*Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.*

Dalai Lama

## **Dedicatória**

*a Deus, autor do meu destino, meu amparo nos momentos de desespero, minha fonte de esperança e a paz necessária para minha mente;*

*aos meus pais, por me fornecerem a base da aprendizagem, pelo apoio em cada decisão tomada, pela confiança e amor incondicional;*

*ao meu marido, pela paciência e amor durante minha trajetória.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por abençoar cada passo, por ser presente em cada etapa de minha vida, e ser o verdadeiro Mestre de todas as ciências.

Ao meu pai João Alberto, pela compreensão na minha ausência, sempre apoiando e incentivando minha formação científica acima de tudo, pelo apoio total em qualquer situação, pelo terno amor.

À minha mãe Elca, por me dar suporte a cada dia, estímulo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, pelo amor de Mãe mais fiel, não medindo esforços para me formar a Melhor.

Ao meu marido Gustavo, pelo carinho, confiança e calma, suportando ainda a distância física sem deixar abater o amor.

À toda minha família, pela certeza de minha capacidade.

Ao meu orientador, Maurício, pela oportunidade de desenvolver pesquisa em um ambiente profissional competitivo e altamente capacitado. Grata ao crescimento pessoal e independência em minhas atividades, à minha formação íntegra, com ética e respeito independente de qualquer situação. Obrigada por contribuir terminantemente, me tornando uma profissional competente, realizada e pronta para próximos desafios que venho a galgar.

Aos meus amigos de longa data que compreenderam anos de ausência e às verdadeiras amigadas que construí em Brasília, em especial, no Laboratório de Reprodução Animal (LRA), que proporcionaram momentos de lazer, apoio e compaixão.

À equipe de pesquisadores e alunos do LRA, por terem sido uma escola da vida e contribuindo em minha formação.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura, laboratórios, suporte técnico e oportunidade em realizar pesquisa.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelo Curso de Doutorado.

À CAPES pelo suporte financeiro.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Representação dos dois ciclos de reprogramação de metilação do DNA, durante a gametogênese e a embriogênese inicial. A linha azul representa a reprogramação durante a gametogênese masculina (*Prenatal e Postnatal stages*) e do pronúcleo masculino, após a fecundação (*Embryo development*). A linha rosa representa os mesmos eventos na gametogênese feminina e pronúcleo feminino. Ao nascimento (seta azul) as células germinativas masculinas já se encontram com um alto padrão de metilação, sendo que os ovócitos só recebem e completam seu padrão de metilação após os animais atingirem a puberdade (*Postnatal stage*). Após a fecundação (NF), ocorre a segunda onda de reprogramação, onde o pronúcleo masculino é submetido a um processo de desmetilação ativa (mais rápida) e o pronúcleo feminino um processo de desmetilação passiva dependente de divisão celular, portanto mais lenta. Em bovinos, o processo de metilação *de novo* se inicia quando o embrião atinge o estágio de 8-16 células, sendo que a primeira diferenciação celular, na fase de blastocisto (BI), gera as células do trofoblasto (EET), que originarão a placenta e sendo menos metiladas que as células da massa celular interna (Em), as quais originarão o feto. As linhas horizontais pretas pontilhadas representam os genes *imprinted*, sendo que a linha superior representa os alelos metilados e a inferior, os alelos não metilados. Fonte: Adaptado de Franco, M.M. (2017). Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. Vol. 25(1-2); p.78.

**Figura 2.** Esquema apresentando o processo de desmetilação ativa do genoma masculino (linha azul) e desmetilação passiva do genoma feminino (linha vermelha) que ocorre após a fecundação natural. Em bovinos, o processo de metilação de novo (seta preta indicando o início do processo) acontece quando o embrião se encontra no estágio de 8-16 células. A linha roxa mostra o processo de reprogramação da metilação do DNA em embriões clones. Nestes embriões, a desmetilação é parcial e a metilação de novo inicia-se precocemente. A linha verde pontilhada representa o que se espera como uma reprogramação “normal” de



metilação do genoma da célula doadora de núcleo na transferência nuclear de célula somática (TNCS). Fonte: Modificado de Yang et al., Nature Genetics, 2007.

**Figura 3.** Ovários bovinos com folículos de diferentes tamanhos. Para este estudo, foram aspirados folículos entre 3-8mm. Imagem de arquivo pessoal.

**Figura 4.** Esquema da placa de maturação in vitro. Cada gota com 200 $\mu$ L de meio de maturação in vitro suporta 25-30 complexos cúmulos ovócitos. Imagem: arquivo pessoal.

**Figura 5.** Micromanipulação de ovócitos maturados in vitro e desnudos. Ovócito fixo por pipeta holding exibindo o primeiro corpúsculo polar, para sua posterior remoção, juntamente com aproximadamente 30% do material citoplasmático contendo a placa metafásica, para a remoção de todo o seu material genético. Aumento de 20X em Microscópio Invertido. Imagem: arquivo pessoal.

**Figura 6.** Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos bovino cultivados in vitro durante duas semanas. A - Grupo controle. B - Cultivo suplementado com 1,0 mM de procaína. C - Cultivo suplementado com 1,0 mM de S-Adenosil L-homocisteína (SAH). D - Cultivo suplementado com 1,0 mM de procaína e 1,0 mM de SAH. Ampliação de 100x. Barra: 0,20 mm. Imagem: arquivo pessoal.

**Figura 7.** Média  $\pm$  desvio padrão (n=4 réplicas) do número de células totais para cada tratamento (procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH), procaína associada a SAH e controle). As células foram contadas em câmara de Neubauer.

**Figura 8.** Média  $\pm$  desvio padrão dos níveis de metilação global do DNA em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro por 14 dias com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a combinação das duas substâncias. Os dados foram obtidos a partir de quadruplicatas biológicas e triplicatas técnicas para cada tratamento.

**Figura 9.** Padrão de metilação do DNA para a região Satélite I em fibroblastos bovinos cultivados in vitro durante 14 dias. A – Células do grupo controle. B - Células cultivadas com procaína. C - Células cultivadas com S-Adenosil L-homocisteína (SAH). D - Células cultivadas com procaína e SAH. Cada linha representa um clone individual e cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG (23 CpGs foram analisados). Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os círculos pretos representam citosinas metiladas e “x” representam citosinas que não tiveram seu padrão de metilação analisado.

**Figura 10.** Média  $\pm$  desvio padrão dos níveis de metilação do DNA para a região Satélite I em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro por 14 dias. Foram quatro grupos avaliados: controle, células cultivadas com procaína, células cultivadas com S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e células cultivadas com as duas substâncias.

**Figura 11.** Blastocisto bovino em eclosão produzido por transferência nuclear de célula somática utilizando fibroblasto de pele cultivado in vitro com procaína + S-Adenosil L-homocisteína (SAH) por duas semanas. Imagem: arquivo pessoal.

**Figura 12.** Padrão de metilação do DNA para as regiões Alfa Satélite e Satélite I em embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas, produzidos com fibroblastos tratados com S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e procaína e fibroblastos sem tratamento. A – Padrão de metilação para a região Alfa Satélite em embriões produzidos com fibroblastos tratados com a associação de procaína e SAH. B – Padrão de metilação para a região Alfa Satélite em embriões produzidos com fibroblastos controle (sem tratamento com procaína e SAH). C – Padrão de metilação para a região Satélite I em embriões produzidos com fibroblastos tratados com a associação de procaína e SAH. D – Padrão de metilação para a região Satélite I em embriões produzidos com fibroblastos controle (sem tratamento com procaína e SAH). Cada linha representa um clone individual e cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG (18 CpGs para Alfa Satélite e 23 CpGs para Satélite I). Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os círculos pretos representam citosinas

metiladas e “x” representa citosina que não teve seu padrão de metilação determinado.

**Figura 13.** Média  $\pm$  desvio padrão da metilação do DNA para as regiões Alfa Satélite e Satélite I em embriões clones bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas. Control – embriões produzidos utilizando como doadores de núcleo fibroblastos cultivados in vitro sem adição das substâncias desmetilantes de DNA. Treated – embriões produzidos utilizando como doadores de núcleo fibroblastos cultivados in vitro com a associação de procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH).

**Figura 14.** Curvas de melting para os primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

**Figura 15.** Gel de agarose a 1,5% mostrando os amplicons referentes aos genes avaliados. Coluna 1 - DNMT1 [82 pares de base (pb)]; Coluna 2 – DNMT3A (82 pb); Coluna 3 – DNMT3B (161pb); Coluna 4 – TET1 (167 pb); Coluna 5 – TET2 (157 pb); Coluna 6 – TET3 (200 pb); Coluna 7 – GAPDH (119 pb); Coluna 8 – BACTINA (134 pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb. As linhas de 9-16 representam os controles negativos da PCR sem adição de cDNA.

**Figura 16.** Valores de fold change para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 em fibroblastos de pele cultivados in vitro por 14 dias com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a associação de ambas as substâncias em relação ao grupo controle (valor 0).

**Figura 17.** Quantidade relativa de mRNA para os genes que codificam para as enzimas DNMT (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com as substâncias desmetilantes de DNA, procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 18.** Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in

vitro com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 19.** Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com as substâncias desmetilantes de DNA, Procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 20.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com as substâncias desmetilantes de DNA, procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 21.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET1, TET2 e TET3 determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 22.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET1, TET2 e TET3 determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Figura 23.** (A) Níveis de mRNA para o gene OCT4 determinado por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina tratados com procaína e/ou S-adenosil L-homocisteína (SAH). Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . (B) Níveis de mRNA para o OCT4 determinados por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina tratados com procaína e/ou S-adenosil L-homocisteína (SAH) independentemente dos tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Primers para análises de metilação em sequências repetitivas do DNA de células cultivadas in vitro e embriões clones bovinos.

**Tabela 2.** Genes utilizados para análise de expressão gênica. Identificação do gene, sequência dos primers, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) número de acesso ao Genbank e eficiência de amplificação dos primers.

**Tabela 3.** Número total de fibroblastos de pele bovina cultivados in vitro com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a associação de procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH) contados em câmara de Neubauer.

**Tabela 4.** Produção de embriões clones por transferência nuclear de células somáticas (10 manipulações) utilizando fibroblastos de pele bovino cultivados in vitro com procaína + S-Adenosil L-homocisteína (SAH) por duas semanas

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- A** – Adenina
- Bx** – Blastocisto expandido
- C** – Citosina
- CCOs** – Complexos cumulus-ovócitos
- cDNA** – DNA complementar
- CGP** – Células germinativas primordiais
- CH3** – Metil
- CIV** – Cultivo in vitro
- CO2** – Dióxido de carbono
- Ct** – Ciclo threshold
- DEPC** – Dietilpirocarbonato
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DNase** – Desoxirribonuclease
- DNMT** – DNA Nucleotídeo Metiltransferases
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EDTA** – Ácido etilendiamino tetra-acético
- FIV** – Fecundação in vitro
- G** – Guanina
- g** – gravidade
- GAPDH** – Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase
- HDAC** – Histona Deacetilases
- LB** – Meio Luria-Bertani
- M** – Molar
- mA** – Miliampere
- MCI** – Massa celular interna
- mg** – Miligrama
- MgCl2** – Cloreto de magnésio
- MII** – Metáfase II (ovócitos)
- min.** – Minutos

**MIV** – Maturação in vitro  
**mL** – Mililitro  
**mm** – Milímetro  
**mM** – Milimolar  
**n** – Número  
**NaCl** – Cloreto de sódio  
**NANOG** – Nanog homeobox  
**pb** – Pares de base  
**PBS** – Solução salina em tampão fosfato  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**PIVE** – Produção in vitro de embriões  
**pg** – picograma  
**Procaína** – para-amino-benzoil-dietilamino-etanol  
**RNA** – Ácido ribonucleico  
**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro  
**RNA<sub>se</sub>** - Ribonuclease  
**rpm** – Rotação por minuto  
**RT** – Transcrição reversa  
**s.** – Segundo  
**SAH** – S-adenosil-L-homocisteína  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**SOFaaci** – Fluido do oviduto sintético com aminoácidos, citrato de sódio e mioinositol  
**T** – Timina  
**TBE** – Tampão Tris-Borato-EDTA  
**TCM-199** – Meio de Cultura de Tecidos-199  
**TE** – Tampão Tris-EDTA  
**TET** – Translocação Dez-Onze  
**TNCS** – Transferência Nuclear de Célula Somática

**TRIS** – Tris (Hidroximetil) Aminometano

**UI** – Unidades Internacionais

**X-GAL** – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

**°C** – Graus Celsius

**%** – Porcentagem

**$\beta$ -ME**–  $\beta$ -Mercaptoetanol

**$\mu$ g** – Micrograma

**$\mu$ L** – Microlitro

**$\mu$ m** – Micrômetro

**$\mu$ M** – Micromolar

**ng** – Nanograma

**5-caC** – 5-carboxicitosina

**5-fC** – 5-formilcitosina

**5hmC** – 5-hidroximetilcitosina

**5mC** – 5-metilcitosina



## Resumo

A clonagem via transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é uma biotécnica de reprodução assistida em uso comercial, com várias aplicações. Ainda assim é uma técnica de baixa eficiência, possivelmente em consequência do perfil epigenético do genoma somático da célula doadora de núcleo, o que dificulta a reprogramação correta após a transferência nuclear. A memória epigenética da célula diferenciada resulta em alterações na expressão de genes importantes durante o desenvolvimento embrionário. Nesse estudo, analisamos o perfil de metilação do DNA e de expressão gênica de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com drogas desmetilantes de DNA, S-Adenosil-L-Homocisteína e procaína. Com relação ao perfil epigenético, foram quantificados os níveis globais de metilação do DNA, bem como os níveis de metilação em uma região de DNA repetitivo. Além disso, foram produzidos embriões e avaliados os níveis de metilação destes para duas regiões repetitivas satélites. Quanto ao perfil de expressão gênica, determinamos os níveis de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3 e OCT4, os quais estão relacionados à reprogramação da metilação do DNA e estado de pluripotência. Células tratadas com as substâncias desmetilantes apresentaram níveis menores de metilação do DNA, tanto a nível global quanto para a região satélite I. Os embriões clones produzidos a partir de células tratadas apresentaram menores níveis de metilação em relação aos embriões controles para a região Satélite I. Quanto ao perfil transcricional, verificamos que células tratadas com SAH+procaína, apresentaram redução geral nos níveis de DNMTs. Por outro lado, para a enzima TET3 foi observado maior nível de transcritos em comparação ao controle. Nossos resultados mostraram que o uso desses agentes desmetilantes em células doadoras de núcleo foi capaz de alterar os níveis de metilação do DNA, além de alterar o perfil transcricional dos genes envolvidos na maquinaria epigenética. Portanto, sugere-se que o uso dessas substâncias possa contribuir para que o ovócito consiga reprogramar o núcleo doador de uma forma mais eficiente após a transferência nuclear. Assim, sugerimos que o uso de agentes moduladores de cromatina nos protocolos de cultivo celular para uso na clonagem por transferência nuclear possa contribuir para melhorar a eficiência da técnica.

**Palavras-chave:** TNCS, clonagem, epigenética, metilação, DNA, SAH, procaína, expressão gênica, DNMT, TET.

## **Abstract**

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a commercially available technique of assisted reproductive technology with broad applications. It is still a low-efficiency technique, possibly as a consequence of the epigenetic profile of the somatic genome of the donor cell, which carries characteristic marks of differentiated cells, which hampers correct reprogramming after nuclear transfer. This differentiated cell memory leads to changes in DNA methylation patterns as well as changes in the gene expression profile of important genes during embryonic development. In this study, we analyzed the DNA methylation and gene expression profile of bovine fibroblasts cultured in vitro with DNA toxicity drugs of low toxicity, SAH and procaine. Regarding the epigenetic profile, the global levels of DNA methylation were quantified as well as the levels of methylation in a satellite repetitive region of the treated cells. In addition, embryos were produced and their methylation levels were evaluated for two repetitive satellite regions. Regarding the gene expression profile, we determined the mRNA levels for the DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3 and OCT4 genes, which are related to the reprogramming of DNA methylation and pluripotency state. Cells treated with DNA demethylating substances showed lower levels of DNA methylation, both globally and in the satellite region. The embryonic clones produced from treated cells had lower levels of methylation compared to control embryos for the Satellite I region. Regarding the transcriptional profile, we observed that in cells treated with SAH + procaine, they presented a general reduction in the levels of DNMTs. On the other hand, for the TET3 enzyme, a higher level of transcripts was observed in comparison to the control. Our results showed that the use of demethylating agents in nucleating donor cells is capable of altering their epigenetic profile, in order to modify at the transcriptional level the production of enzymes related to methylation, which can lead the cell to a state of less differentiation. We have discussed, in this research study, the use of chromatin modulating agents as a perspective for use in cloning, medical research in cancer and other diseases.

**Keywords:** SCNT, cloning, epigenetics, methylation, SAH, procaine, gene expression, DNMT, TET.

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. Clonagem por transferência nuclear de célula somática .....	1
1.2. Reprogramação Epigenética no Desenvolvimento Inicial .....	8
1.3. Substâncias remodeladoras de cromatina.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral .....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de fibroblastos de pele .....	18
3.2. Tratamento das células em cultivo <i>in vitro</i> com Procaína e SAH .....	18
3.3. Extração de DNA genômico das células e embriões.....	19
3.4. Quantificação da metilação global do DNA em fibroblastos cultivados <i>in vitro</i> com procaína e SAH .....	20
3.5. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....	20
3.6. Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio por PCR.....	20
3.7. Clonagem e sequenciamento.....	21
3.8. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	22
3.9. PCR em tempo real (RT-qPCR).....	23
3.10. Produção de embriões clones por transferência nuclear de células somáticas .....	25
3.10.1. Obtenção dos ovócitos e maturação <i>in vitro</i> .....	25
3.10.2. Transferência nuclear .....	26
3.10.3. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões produzidos por transferência nuclear	27
3.11. Análises estatísticas.....	28
4. Resultados .....	29
4.1. Crescimento celular e morfologia.....	29
4.2. Contagem total de células .....	29
4.3. Análise da metilação global do DNA.....	31
4.4. Perfil da metilação do DNA para a região Satelite I nas células cultivadas <i>in vitro</i>	32
4.5. Produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas.....	33
4.6. Perfil da metilação do DNA para regiões de DNA repetitivo Satélite em embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas .....	34
4.7. Expressão gênica nos fibroblastos cultivados <i>in vitro</i> .....	37
5. Discussão.....	45

<b>6. Conclusão .....</b>	<b>52</b>
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>93</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Clonagem por transferência nuclear de célula somática

Dentre as biotécnicas de reprodução assistida em uso comercial está a transferência nuclear de células somáticas (do inglês, *Somatic Cell Nuclear Transfer*, SCNT) ou clonagem. A produção de clones é de grande interesse, não apenas para a produção animal, mas também em diferentes áreas, como multiplicação de animais geneticamente modificados e também como modelo para a pesquisa básica (Trounson e Pera, 1998; Wilmut, 1998; Campbell, 1999; Gurdon e Colman, 1999; Kikyo e Wolffe, 2000). Além disso, pode contribuir para os programas de conservação de espécies em vias de extinção, multiplicação de animais de alto valor zootécnico e geração de células ou tecidos para fins terapêuticos (Bordignon e Smith, 1998).

A técnica constitui na transferência de um núcleo doador para um ovócito de qual o material genético foi removido, permitindo a criação de animais geneticamente idênticos (Wilmut *et al.*, 2015). Em 1997, foi divulgado o nascimento da ovelha Dolly, sendo o primeiro estudo a demonstrar que a TNCS é capaz de gerar animais viáveis a partir de um mamífero adulto (Wilmut *et al.*, 1997). Essa revolução foi estendida à diferentes espécies, assim, a tecnologia vem sendo utilizada em camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), bovinos (Kato *et al.*, 1998), gato doméstico (Shin *et al.*, 2002), ovinos (Wilmut, 1998), suínos (Polejaeva *et al.*, 2000), coelhos (Chesne *et al.*, 2002), cães (Lee *et al.*, 2005), búfalos (Shi *et al.*, 2007a) e em primatas (Liu *et al.*, 2018). A partir do nascimento da ovelha Dolly e o crescente domínio da técnica ao longo dos anos, as razões para o estudo da clonagem evoluíram. Na agropecuária, a transgenia via clonagem abriu novas perspectivas, como por exemplo, para a produção de gado com resistência a ataque de patógenos (Cheng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015) e a expressão de proteínas recombinantes no leite (Luo *et al.*, 2015).

Por outro lado, a técnica permanece sendo considerada uma metodologia de baixa eficiência (Niemann e Lucas-Hahn, 2012b). Em bovinos, somente 1-5% dos embriões transferidos para as receptoras se desenvolvem e nascem a termo, existindo também uma alta frequência de perda pós-natal (Su *et al.*, 2015). Considerável parte das perdas, geralmente ocorre durante o

desenvolvimento inicial, ocorrendo reabsorção embrionária no útero (Smith *et al.*, 2012). Nas gestações de clones, diversas anormalidades podem ocorrer, como a síndrome do bezerro gigante, crescimento anormal dos órgãos, cordão umbilical grosso e problemas placentários (Farin *et al.*, 2006; Buczinski *et al.*, 2009).

A principal causa do desenvolvimento anormal na maioria dos animais clones, é decorrente de uma metilação aberrante do DNA nos estágios iniciais da embriogênese, na reprogramação epigenética (Bourc'his *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016). Considerando-se que no processo da TN são usadas células somáticas, a severa remodelação e reprogramação que o DNA precisa sofrer é imprescindível para que esse material genético diferenciado seja capaz de retomar a um estágio indiferenciado, favorecendo o desenvolvimento embrionário após a transferência nuclear. Dessa forma, anormalidades são decorrentes, quando a reprogramação do núcleo doador se dá de forma errada ou incompleta, alterando o padrão de metilação e acarretando mudanças no perfil de expressão dos genes (Saini *et al.*, 2017).

### **1.1.1. Histórico**

A técnica SCNT, a princípio foi proposta por Spemann em 1938, com objetivo de estudar a equivalência nuclear, na determinação das modificações sofridas pela cromatina no processo de diferenciação nuclear. A técnica desenvolvida resultou no primeiro relato de um mamífero nascido, descrito em 1986, em ovino, por Willadsen (Prather *et al.*, 1987).

Estabelecer e manter culturas de célula possibilitou seu emprego como doadora de núcleo, sendo assim, o cultivo celular, fundamental para a utilização da técnica, que resultou no nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro clone produzido a partir de células somáticas diferenciadas obtidas de um animal adulto. Em cima desse resultado, Wilmut *et al.* (1997) promoveram uma revolução na ciência, de forma que, além de responder ao questionamento de Spemann (1938), demonstraram que existe viabilidade na clonagem de indivíduos adultos (Wilmut *et al.*, 1997).

No Brasil, foram obtidos clones bovinos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. Em março de 2001, em Brasília - DF nasceu o primeiro clone bovino utilizando célula embrionária, a Vitória da Embrapa. No dia 27 de abril de 2002, em

Monte-Mor – SP, nasceu o primeiro clone advindo de célula diferenciada jovem, o Marcolino da USP, apresentando desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais. Em julho de 2002, em Jaboticabal- SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a Penta (Mello *et al.*, 2003).

Dentro de 20 anos já foi relatado o nascimento de diferentes espécies de mamíferos como bovinos (Green *et al.*, 2007), caprinos (Hosseini *et al.*, 2015), gato selvagem (Gomez *et al.*, 2004), ovinos (Wilmut, 1998), gatos domésticos (Shin *et al.*, 2002) e búfalos (Shi *et al.*, 2007b) por meio da clonagem por SCNT. Por outro lado, a técnica permanece sendo considerada uma metodologia pouco eficiente (Niemann e Lucas-Hahn, 2012a), considerando-se que no processo, são usadas células somáticas, a drástica remodelação e reprogramação do DNA, que o núcleo precisa sofrer é imprescindível para que a seu material genético diferenciado seja capaz de retomar o um estágio indiferenciado, favorecendo o desenvolvimento embrionário após a transferência para um citoplasma receptor. Analisando de forma global, a eficiência da SCNT não se encontra muito diferente nos últimos anos, sendo que em bovinos cerca de 11% dos embriões transferidos resultam em nascimento (Keefer, 2015).

### **1.1.2. Obtenção e Maturação dos ovócitos receptores**

A SCNT é composta essencialmente pela enucleação do ovócito receptor, reconstrução com a célula doadora de núcleo e a ativação desse ovócito para a constituição um provável embrião. Após cultivados *in vitro*, os embriões provenientes desse processo serão transferidos para o útero de fêmeas receptoras, as quais levarão a gestação (Vajta e Gjerris, 2006; Niemann e Lucas-Hahn, 2012a). Dentre diversos fatores que são responsáveis pela eficiência da reprogramação nuclear após a SCNT, como a origem e o *status* das células doadoras, sua capacidade de se reprogramar epigeneticamente, o método da ativação e da fusão, a qualidade do cultivo embrionário, destaca-se a qualidade e condição em que se encontra o citoplasma receptor (ovócito) (Campbell *et al.*, 1996).

Os ovócitos receptores representam um dos importantes componentes na produção de embriões por transferência nuclear, visto que estão contidos neles os fatores responsáveis pela reprogramação nuclear, de forma que a sua qualidade é fundamental para permitir a reprogramação dos núcleos transferidos, bem como



sua capacidade de suportar o período inicial do desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, é imprescindível o conhecimento do estágio do ciclo celular no momento da enucleação e transferência nuclear, sendo essa etapa decisiva para boa relação entre o citoplasma do ovócito receptor com o núcleo transferido (Bordignon e Smith, 1998).

Para SCNT, os ovócitos receptores utilizados, se encontram preferencialmente na fase final da maturação meiótica, na qual estão no estágio de metáfase II (M-II). A maturação até o estágio de metáfase II pode ser feita *in vivo* e os ovócitos recuperados dos ovidutos após a ovulação ou recuperados diretamente dos folículos no momento que antecede a ovulação. A maturação também é ser feita *in vitro*, na qual os ovócitos que se encontram no estágio de prófase I ou vesícula germinativa, são recuperados de folículos antrais e atingem *in vitro*, o estágio de metáfase II (Bordignon e Smith, 1998).

Na esperança de melhorar a eficiência da técnica, alguns trabalhos reportaram que a utilização de ovócitos fecundados ou embriões de 2 células é viável para a produção de embriões clones, a utilização dessas estruturas não é competente a suportar a reprogramação epigenética do núcleo transferido (Campbell *et al.*, 2007).

### **1.1.3. Seleção e preparação das células doadoras de núcleo**

A procedência do núcleo doador a ser usado na transferência nuclear é determinante sobre a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos até o estágio de blastocisto, até mesmo na fase de desenvolvimento fetal pós-implantação. A aquisição do primeiro mamífero a partir de células embrionárias em cultivo (Willadsen, 1986) e de linhagens fetais e adultas (Wilmut *et al.*, 1997), permitiu através de muitas pesquisas, a confirmação que células somáticas de diferentes tecidos e idades são viáveis para uso na transferência nuclear. Mesmo seja possível a produção de embriões clones a partir de diversos tecidos e de indivíduos em variadas idades, aproximadamente 12 de cerca de 200 linhagens celulares existentes tem a capacidade de se “desdiferenciar” e conduzir uma gestação, e o modelo celular mais utilizado, são fibroblastos (Vajta e Gjerris, 2006). As células escolhidas para SCNT, podem ser usadas logo após a coleta do animal

doador (Kubota *et al.*, 2000) ou após cultivo celular, frescas ou após criopreservação (Wilmut *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 2000).

#### **1.1.4. Coordenação do ciclo celular da célula doadora e citoplasma receptor**

Para a correta ploidia após a reconstrução, a sincronização do ciclo celular entre o núcleo da célula doadora com o citoplasma do ovócito receptor é fundamental. Durante as fases do ciclo celular, eventos de processos nucleares e citoplasmáticos são responsáveis por determinar perfeita organização entre eles. O ciclo celular é subdividido nas fases G1, síntese (S), G2 e mitose (M). Na fase S, durante a intérfase, ocorre a replicação do DNA nuclear. O intervalo dado entre o término da mitose e o início da síntese de DNA é chamado de fase G1, o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é denominado fase G2. As fases G1 e G2 permitem tempo adicional para o crescimento celular. Em G1, as células não estão realizando a replicação do DNA, podendo assim, interromper seu crescimento durante o ciclo e ficar em um estado especializado de repouso, chamado de G0, no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes de retornar a proliferar (Alberts, 2002).

Para a SCNT, o ovócito receptor deve estar em MII e a célula doadora de núcleo em GO/G1 devem estar em sincronia para melhoria na eficiência da clonagem. O Fator Promotor de Maturação (MPF) é um complexo protéico com duas subunidades catalíticas (proteína cinase p34cdc2, regulada por eventos de fosforilação e desfosforilação de sítios catalíticos, e a ciclina B1, subunidade regulatória), que quando na forma ativa, é responsável por regular a duplicação e divisão celular, envolvendo uma cascata de eventos bioquímicos, de lise do envelope nuclear, condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto e alterações na morfologia da célula, que por fim, culmina em divisões celulares (meiose ou mitose)(Kano *et al.*, 2000; Lefebvre *et al.*, 2002). Quando as células em GO/G1 são introduzidas em um ovócito enucleado em MII, ocorre uma longa exposição do núcleo ao citoplasma com altos níveis do MPF, que promove a ruptura imediata do envelope nuclear e antecipada condensação cromossômica, o que facilita as modificações nucleares essenciais para reprogramação e

desenvolvimento (Wakayama *et al.*, 1998), sendo então, nesse estágio, consideradas mais adequadas para a reprogramação (Verma *et al.*, 2015).

Células somáticas diferenciadas podem ser eficazes na reprogramação epigenética, contudo quanto mais diferenciada e maior período de cultivo dessas células, menor é a eficiência na SCNT. Células pluripotentes como embrionários ou células tronco embrionárias, teoricamente, suportam melhor o desenvolvimento, sendo mais eficientes na SCNT do que as células somáticas (Campbell *et al.*, 2007).

#### **1.1.5. Enucleação**

A SCNT consiste em remover o DNA de ovócitos maturados e inserir a célula doadora de núcleo, normalmente no espaço perivitelino para posterior fusão de suas membranas. No procedimento convencional a enucleação é realizada através de aspiração, por meio de microcirurgia nos ovócitos, com equipamento específico, micromanipulador. Duas pipetas de vidro com suas devidas espessuras, são utilizadas, em que, uma fixa o ovócito na posição desejada (pipeta holding), e a segunda de aspiração, remove o corpúsculo polar adicionando uma porção adjacente do citoplasma, envolvendo assim a placa metafásica (Fulka *et al.*, 2004). Para confirmação da remoção da placa metafásica, muitos dos protocolos utilizam o corante específico de DNA, Fluorocromo Hoechst 33342, o qual sob excitação à luz ultravioleta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação.

#### **1.1.6. Reconstrução dos embriões**

A reconstrução é feita com a deposição da célula doadora de núcleo no espaço perivitelino seguido por eletrofusão, etapa que incorpora o DNA da célula ao citoplasma receptor. Para induzir a retomada da meiose, utiliza-se uma ativação elétrica ou química que irá promover um influxo de cálcio no ovócito que vai estimular a retomada do ciclo celular (Vajta e Gjerris, 2006; Niemann e Lucas-Hahn, 2012a).

As metodologias básicas utilizadas para a realização da reconstrução dos embriões para a transferência nuclear são a microinjeção e a fusão entre as membranas plasmáticas da célula doadora e ovócito receptor (Bordignon e Smith,

1998). Para a reconstrução do embrião após a SCNT, o núcleo de célula doadora é transferido para o interior de um citoplasma receptor. Cada célula doadora isolada individualmente é inserida no espaço perivitelino de um ovócito enucleado, seguido de estímulo com um pulso elétrico, que irá promover a fusão das membranas adjacentes. O pulso elétrico funde a célula somática com o ovócito enucleado e causa liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação, fundamental para o início da reprogramação embrionária (Heyman *et al.*, 2004). Os padrões usuais para a eletrofusão, como a duração, intensidade e quantidade de pulsos, podem ser alterados de acordo com a espécie, o tipo de equipamento e o tipo celular a ser fundido. Para todos os fins, o contato entre a célula doadora e o ovócito receptor exige um perfeito alinhamento paralelo aos eletrodos são essenciais para resultado eficaz da fusão celular (Bordignon e Smith, 1998). Fisiologicamente, na fecundação, o espermatozoide penetra no óvulo, o que leva à deterioração do MPF desencadeando assim o fim da meiose e início do desenvolvimento embrionário. No procedimento *in vitro*, a ativação dos ovócitos é embasada na indução de oscilações de cálcio (Dozortsev *et al.*, 1995). Após a fusão, os embriões reconstruídos por SCNT são submetidos à ativação artificial, a qual mimetiza a ação dos espermatozoides. Na maioria dos mamíferos os ovócitos em MII após a ovulação são fecundados. Durante a maturação ovocitária ocorre a reorganização e redistribuição específica de organelas citoplasmáticas, e os ovócitos obtêm um complemento de moléculas sinalizadoras (Miyazaki *et al.*, 1993). A ativação é um passo fundamental da técnica de SCNT e pode ser adquirida física e/ou quimicamente, através de métodos que podem ou não estar diretamente ligados aos níveis de cálcio intracelular. Quanto aos meios físicos, a injeção de cálcio diretamente no citoplasma promove estímulos elétricos que irão gerar a liberação de concentrações intracelulares de cálcio. A ativação também pode se dar quimicamente, utilizando cálcio ionóforo, A23187 (Cibelli *et al.*, 1998), ionomicina (Hill *et al.*, 2001), cicloheximida (Keefer *et al.*, 2002) ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (Susko-Parrish *et al.*, 1994). Segundo Keefer e *et al.*, (2002) para ruminantes, o uso de cálcio ionóforo seguido por um tratamento com inibidores da atividade de proteínas quinases, bem como a 6-DMAP ou por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclinas por três a seis horas, são os tratamentos mais realizados (Keefer *et al.*, 2002).

### **1.1.7. Cultivo embrionário**

Efetuada a fusão e ativação dos embriões, as estruturas são cultivadas in vitro por sete dias, até a transferência para receptoras. Em meio de cultivo, os embriões são conduzidos até o estágio de blastocisto, o que envolve aplicação de um sistema de cultivo desenvolvido e usado com frequência na produção in vitro (PIVE) de embriões, o co-cultivo, o qual utiliza células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas, é realizado para promover melhor desenvolvimento dos embriões. (Thompson, 2000; Campbell et al., 2007). Em geral, o cultivo in vitro requer uma suplementação de componentes os quais podem auxiliar no desenvolvimento, mas que, por um período longo de exposição, podem alterar negativamente a qualidade do embrião. Dentre estes componentes podem ser citados: soro fetal bovino, soro de cabra/ovelha em estro, albumina sérica bovina (BSA), fatores de crescimento e vitaminas, entre outros (Keefer et al., 2002; Tibary et al., 2005). Dentre diversos meios de cultivo que sustentam o desenvolvimento embrionário, tais como meio sequencial (CR1aa), meio de otimização simples de potássio (KSOM) e Fluido Sintético de Oviduto (SOF), a maioria dos trabalhos utilizam o SOF como meio de cultivo para embriões SCNT, com apenas algumas variações na composição para melhorar os resultados (Arias et al., 2013). Analisando-se a fonte proteica utilizada, se destacam o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA).

### **1.2. Reprogramação Epigenética no Desenvolvimento Inicial**

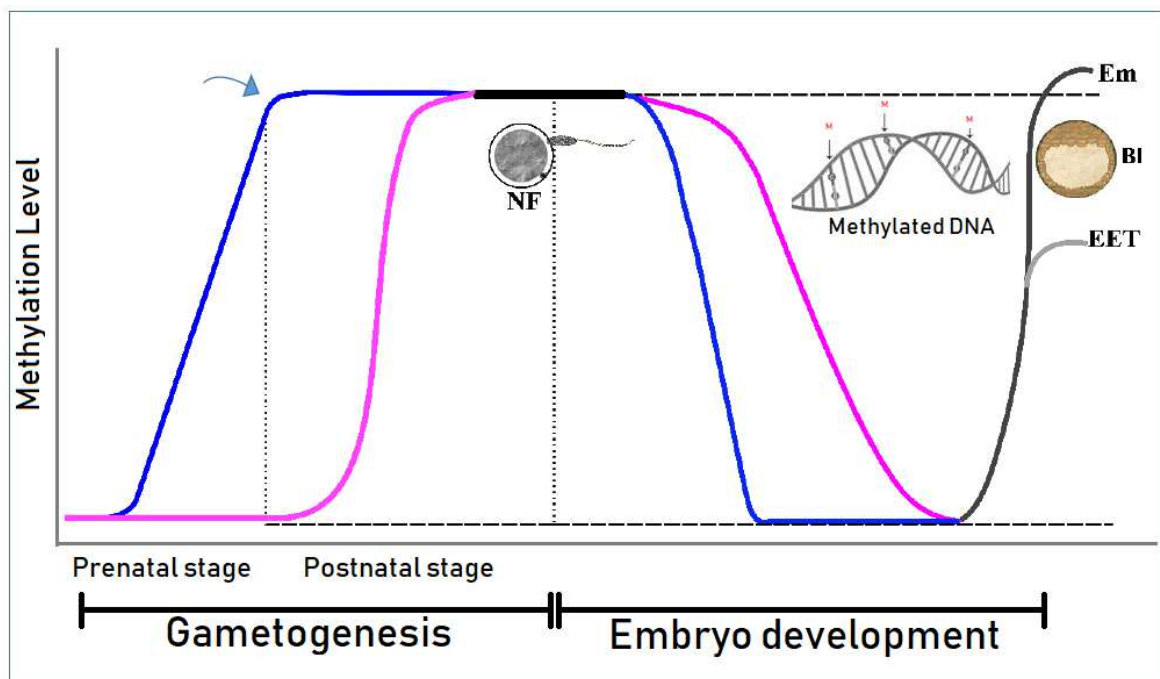
O termo epigenética (do grego *epi*, significa acima ou sobre algo) estuda as alterações herdáveis e estáveis na capacidade dos genes se expressarem diferencialmente durante o desenvolvimento embrionário e proliferação celular (Jaenisch e Bird, 2003), de forma que essas alterações são mantidas durante a divisão celular (Laird, 2010; Margueron e Reinberg, 2010), mantendo-se original a sequência de nucleotídeos do DNA (Singal e Ginder, 1999). Marcas epigenéticas são susceptíveis a influências ambientais, podendo acarretar mudanças fenotípicas que são transmitidas aos descendentes (Pray, 2004).

Certas características diferenciam a epigenética dos mecanismos da genética convencional, como a reversibilidade, os efeitos de posicionamento do nucleossoma, a capacidade de atuar a longas distâncias, superiores a um único gene (Feinberg, 2001). Três dos principais mecanismos epigenéticos são as alterações pós-traducionais das histonas, a metilação do DNA e os pequenos RNA não codificantes (D'alessio e Szyf, 2006). Tais mecanismos agem regulando a acessibilidade da maquinaria transcricional ao DNA (Lund e Van Lohuizen, 2004). Os nucleossomos se relacionam à organização da cromatina, permitindo maior ou menor compactação do DNA, regulando a expressão gênica. Alterações na estrutura da cromatina influenciam a expressão dos genes, estando esses inativos quando a cromatina está condensada e expressos quando a cromatina se encontra aberta, não condensada (Rodenhiser e Mann, 2006). Essa condição dinâmica da cromatina é controlada por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificações das histonas (Feinberg e Tycko, 2004). A cromatina, condensada, inativa, está intensamente correlacionada com a metilação do DNA (Razin e Cedar, 1977). Via de regra, a metilação está relacionada ao silenciamento da expressão dos genes. No DNA que se encontra hipometilado, a cromatina estará descondensada, de forma a favorecer a transcrição dos genes. Por outro lado, quando o DNA se encontra hipermetilado, recruta proteínas que compactam a cromatina, de forma a impedir a atividade da RNA polimerase na molécula e impedir a expressão dos genes (D'alessio e Szyf, 2006). De forma geral, o genoma é igual em todos os diferentes tipos celulares do organismo, contrariamente, o epigenoma é dinâmico e se modifica de um tipo celular para o outro, visto que proteínas associadas e padrões de modificações covalentes do DNA obtidos pela metilação permitem a organização e manutenção dos perfis de expressão dos genes (Feinberg, 2001).

O processo de reprogramação da metilação do DNA em mamíferos é bem descrito e envolve eventos de desmetilação e remetilação do DNA que ocorrem no genoma durante a gametogênese e o desenvolvimento embrionário inicial, sendo essenciais no estabelecimento do padrão epigenético celular e tecido-específico e para a manutenção da herança epigenética (Dean *et al.*, 2001; Reik e Walter, 2001).

A reprogramação epigenética em mamíferos ocorre nos dois genomas parentais, durante ondas de reprogramação em dois diferentes estágios de desenvolvimento (Mayer *et al.*, 2000). A primeira onda acontece durante a gametogênese, a partir da formação das células germinativas primordiais (CGP) ainda na fase fetal. Ocorre nesse estágio a perda do padrão de metilação global do DNA, inclusive nas regiões *imprinted*, e uma subsequente metilação *de novo* nos gametas, com novos padrões *imprinted* específicos de acordo com o sexo do indivíduo (Lee *et al.*, 2002; Ungerer *et al.*, 2013). O primeiro ciclo acontece nas CGP, para a formação dos gametas. As células derivadas do epiblasto na migração e colonização da crista gonadal durante a embriogênese inicial vão perdendo seu padrão de metilação, assumindo um padrão bastante desmetilado, caracterizando um padrão unipotente (Molyneaux *et al.*, 2004). Em camundongos, nas células germinativas masculinas – proespermatogônias – a remetilação acontece ainda na fase fetal, sendo que ao nascimento o indivíduo possui, em todas as suas células germinativas, praticamente o padrão epigenético do gameta masculino (Bowles e Koopman, 2007; Macdonald e Mann, 2014). Já os ovócitos parados na prófase da meiose I apresentam níveis de metilação basais, semelhantes aos das CGP, sendo que os gametas femininos apenas começam a adquirir um padrão de metilação ovócito-específico a partir do recrutamento dos folículos primordiais para crescimento, sendo que ele se completa somente após a maturação do ovócito (Fagundes *et al.*, 2011; Mendonca Ados *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017). O segundo ciclo de reprogramação inicia após a fecundação, com a desmetilação de ambos os pró-núcleos, com o propósito de remover a memória epigenética dos gametas, de forma que no pró-núcleo masculino essa desmetilação acontece de forma ativa – por meio de enzimas TETs que oxidam a 5-mC – e no feminino de forma passiva – através da remoção da DNMT1o do núcleo das células, perdendo sua capacidade de metilação de manutenção ao longo das divisões mitóticas (Dean *et al.*, 2001; Reik e Walter, 2001; Macdonald e Mann, 2014). Durante a embriogênese inicial os genomas paterno e materno passam a adquirir padrões específicos de metilação, a chamada metilação *de novo*. Em bovinos, a remetilação do DNA inicia-se no estágio embrionário de 8-16 células (Maalouf *et al.*, 2008) e a partir desse momento inicia-se o primeiro evento de diferenciação celular do embrião, correspondendo a formação da massa celular interna (MCI), que originará as células do futuro feto, e

do trofoectoderma (TE), que dará origem à placenta, sendo que este último adquire níveis mais baixos de metilação do que a MCI (Dean *et al.*, 2001; Reik e Walter, 2001; Morgan *et al.*, 2005). O mecanismo de remetilação do DNA é essencial para dar início ao processo de diferenciação celular e formação dos diferentes tecidos do organismo (Shemer *et al.*, 1990; Del Arco e Izquierdo, 1993). As ondas de metilação durante o desenvolvimento inicial, estão representadas na Figura 1.



**Figura 1.** Representação dos dois ciclos de reprogramação de metilação do DNA, durante a gametogênese e a embriogênese inicial. A linha azul representa a reprogramação durante a gametogênese masculina (*Prenatal e Postnatal stages*) e do pronúcleo masculino, após a fecundação (*Embryo development*). A linha rosa representa os mesmos eventos na gametogênese feminina e pronúcleo feminino. Ao nascimento (seta azul) as células germinativas masculinas já se encontram com um alto padrão de metilação, sendo que os ovócitos só recebem e completam seu padrão de metilação após os animais atingirem a puberdade (*Postnatal stage*). Após a fecundação (NF), ocorre a segunda onda de reprogramação, onde o pronúcleo masculino é submetido a um processo de desmetilação ativa (mais rápida) e o pronúcleo feminino um processo de desmetilação passiva dependente de divisão celular, portanto mais lenta. Em bovinos, o processo de metilação *de novo* se inicia quando o embrião atinge o estágio de 8-16 células, sendo que a primeira diferenciação celular, na fase de blastocisto (BI), gera as células do trofoblasto (EET), que originarão a placenta e sendo menos metiladas que as células da massa celular interna (Em), as quais originarão o feto. As linhas horizontais pretas pontilhadas representam os genes *imprinted*, sendo que a linha superior representa os alelos metilados e a inferior, os alelos não metilados. Fonte:

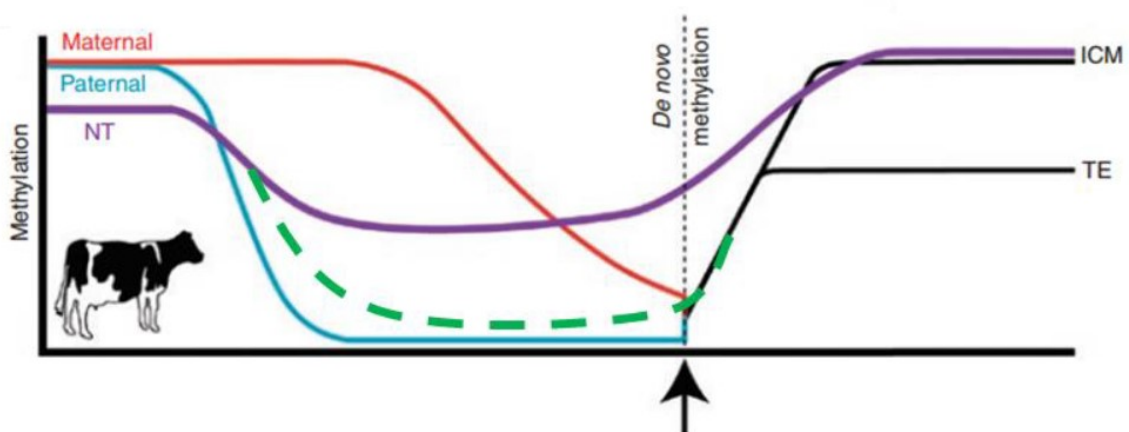


Além disso, a metilação do DNA é indispensável para o silenciamento de elementos repetitivos (Papin *et al.*, 2017), tais como DNA satélites, elementos transponíveis (DNA transposons e retrotransposons), conservando a estabilidade do genoma (Janssen *et al.*, 2018). Os elementos de DNA repetitivos, compreendem aproximadamente 40% do genoma e eram anteriormente referidos, de forma equivocada, como “junk DNA” (Jafari *et al.*, 2018). Porém, com os avanços obtidos no sequenciamento de genomas, foi comprovado que em determinados contextos biológicos os transcritos de elementos repetitivos possuem funções importantes no genoma (Garcia-Perez *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016). Como exemplo, o DNA satélite alfa, que é transcrito em RNA não codante repetitivo, possui papel essencial na estabilidade do genoma, incluindo o recrutamento de proteínas do centrômero e cinetócoro e a participação na formação da heterocromatina (Mcnulty e Sullivan, 2018).

Sendo a reprogramação da metilação do DNA essencial para a embriogênese inicial de mamíferos, alterações na estrutura do DNA estão relacionadas a essas modificações. A desmetilação passiva acontece quando as fitas de DNA recém-sintetizadas durante a replicação não são metiladas, pela ausência da maquinaria de metilação de manutenção, diminuindo assim os níveis de 5mC a cada ciclo de replicação do DNA (Wu e Zhang, 2017). Já o processo de desmetilação ativa é realizado por um mecanismo enzimático. Os mecanismos envolvidos no processo de desmetilação ativa do genoma não eram bem estabelecidos até a descoberta da família *Ten-eleven-translocation (Tet)*, composta pelas *Tet1*, *Tet2* e *Tet3* (Tahiliani *et al.*, 2009). Proteínas *Tet* de mamíferos catalisam a oxidação sucessiva de 5mC para produzir 5-hidroximetil-citosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxi-citosina (5caC) (Ko *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011). As proteínas *Tet* utilizam Fe (II) e  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG) como cofatores para ativar o oxigênio molecular, então a descarboxilação de  $\alpha$ KG é acoplada à oxidação dos substratos TET, 5mC e seus dois derivados intermediários oxidados, 5hmC e 5fC (Loenarz e Schofield, 2008) e o produto de oxidação final é 5caC. Quando as proteínas *Tet* são expressas em células, a região catalítica é

capaz de oxidar 5mC no genoma (Tahiliani *et al.*, 2009). As proteínas *Tet* também potencializam a desmetilação passiva, visto que os produtos de oxidação são capazes de interferir na manutenção de metilação antagonizando a ligação do DNA a DNMT1 (Valinluck e Sowers, 2007; Hashimoto *et al.*, 2012). Consistente com seu papel na modificação do *status* de metilação do DNA, os ortólogos da *Tet* são estritamente restritos a organismos metazoários que utilizam a metilação da citosina (Di Cera, 2011).

Padrões aberrantes de metilação do DNA provavelmente são associados a desmetilação global ineficiente do genoma doador, causando reprogramação nuclear incompleta em embriões clonados (Bourc'his *et al.*, 2001; Eilertsen *et al.*, 2007). O padrão altamente diferenciado característico de células somáticas, pode desempenhar papel significativo nas anomalias epigenéticas observadas em animais clonados (Mann *et al.*, 2003). A incorreta reprogramação epigenética está entre as principais causas da baixa eficiência da TNCS. Estudos já demonstraram que o embrião clone desmetila apenas parcialmente o seu genoma e retoma o processo de metilação *de novo* precocemente (Yang *et al.*, 2007) (Figura 2). Este padrão epigenético estabelecido incorretamente altera o perfil global de expressão gênica do embrião, afetando a gestação de clones (Meirelles *et al.*, 2010); (Galli *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Esquema apresentando o processo de desmetilação ativa do genoma masculino (linha azul) e desmetilação passiva do genoma feminino (linha vermelha) que ocorre após a fecundação natural. Em bovinos, o processo de metilação *de novo* (seta preta indicando o início do processo) acontece quando o embrião se encontra no estágio de 8-16 células. A linha roxa mostra o processo de reprogramação da metilação do DNA em embriões clones. Nestes embriões, a desmetilação é

parcial e a metilação *de novo* inicia-se precocemente. A linha verde pontilhada representa o que se espera como uma reprogramação “normal” de metilação do genoma da célula doadora de núcleo na transferência nuclear de célula somática (TNCS). Fonte: Modificado de Yang et al., Nature Genetics, 2007.

Células somáticas apresentam altos níveis da DNA metiltransferase Dnmt1, enzima que na fase de pré-implantação embrionária, deve se expressar em baixas concentrações. Na técnica de transferência nuclear, a fusão de uma célula somática rica em Dnmt1, pode estar agindo na perpetuação dos padrões de metilação somáticos de maneira inadequada nos embriões. Os núcleos das células de embriões clonados na fase de duas a quatro células, apresentam maior taxa de metilação em relação aos embriões provenientes de fecundação. (Bourc'his *et al.*, 2001). A metilação *de novo* é catalisada pelas DNA metiltransferases de DNA Dnmt3a e Dnmt3b, que podem ter funções sobrepostas durante a embriogênese inicial (Watanabe *et al.*, 2002). Padrões determinados ao genoma embrionário por novas Dnmts são mantidos pela Dnmt1 e conduzem a programas predeterminados de expressão de genes durante o desenvolvimento embrionário (Reik *et al.*, 2001). Além de uma incompleta desmetilação, a remetilação que deveria iniciar-se na fase de 8-16 células, inicia-se precocemente em embriões clones.

### **1.3. Substâncias remodeladoras de cromatina**

Diferentes linhas de pesquisa vêm utilizando substâncias adicionadas ao cultivo celular, como por exemplo, tricostatina A (Beebe *et al.*, 2009), 5-aza-2-deoxicitidina (zdC) (Christman, 2002; Sigalotti *et al.*, 2007; Patra e Bettuzzi, 2009), D-Hidralazina (Cornacchia *et al.*, 1988; Segura-Pacheco *et al.*, 2003), procainamida (Altundag *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2016), procaína (Villar-Garea *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2018), S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Jeon *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014) e Scriptaid (Zhang *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015), na tentativa de desprogramar o epigenoma das células. Assim como as células doadoras de núcleo, os embriões também podem ser expostos a modificadores epigenéticos, com o objetivo de aumentar a qualidade e taxa de produção (Jeon *et al.*, 2008). Beebe e colaboradores (2009), cultivando embriões clones com tricostatina A, conseguiram produzir estruturas em quantidade significativamente superior no grupo tratado do que no grupo controle (Beebe *et al.*, 2009).

Dentre as substâncias desmetilantes de DNA, destacam-se a procaína (para-amino-benzoil-dietilamino-etanol) e a SAH (S-adenosil-L-homocisteína), como substâncias não análogas de nucleosídeos, portanto não sendo incorporadas à molécula de DNA e assim não possuindo efeitos citotóxicos como a maioria das substâncias já testadas (Yi *et al.*, 2000; Villar-Garea *et al.*, 2003).

A procaína é um anestésico local, que apresenta baixa toxicidade, com aplicações na medicina e na medicina veterinária (Brunmeir *et al.*, 2009). É uma substância que se intercala com a molécula de DNA alterando sua estrutura e impedindo assim a ligação do DNA com outras proteínas, como as DNMTs (Zacharias e Koopman, 1990). Diferentes estudos com procaína já demonstraram seu efeito sobre o crescimento de células cancerosas humanas, em câncer de pulmão (Gao *et al.*, 2009), câncer de cólon (Sabit *et al.*, 2016), câncer gástrico (Li *et al.*, 2018), de forma que o agente interage com o genoma em regiões ricas em citosinas e guaninas (CpG) e impossibilita a ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (Villar-Garea *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2007).

A S-adenosil-L-metionina (SAM) é um metabólito que se encontra presente naturalmente nos tecidos, disponível no núcleo celular, no citoplasma e meio extracelular e é originada pelo ciclo da metionina, sendo cofator envolvido na transferência de grupamentos metil (Lieber e Packer, 2002). Composta a partir de adenosina trifosfato (ATP) e metionina pela ação da enzima metionina adenosiltransferase, a SAM é utilizada em vias metabólicas para o processo de transmetilação, transulfuração e aminopropilação (Cantoni, 1952). O grupamento metil que está ligado ao átomo de enxofre na SAM é quimicamente reativo, facilitando a doação deste grupo para um substrato receptor em reações de transmetilação. No organismo, diversas reações metabólicas envolvem a transferência de grupos metil da SAM para vários substratos, como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Cantoni 1952). Após a transferência do grupamento metil, a SAM é convertida em S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Fowler, 1997). Dessa forma, SAH é um produto fisiológico da reação de transmetilação, que é natural do organismo. O aumento da concentração intracelular de SAH permite que a substância se ligue ao sítio ativo das DNMTs, causando redução nas reações de metilação (Yi *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2003; Panayiotidis *et al.*, 2009).

Um considerável problema em embriões clones é a incompleta ou incorreta reprogramação epigenética, como alteração na metilação do DNA ou modificações nas histonas (Jafari et al., 2011). Assim, a possibilidade de uso de substâncias que modificam o *status* epigenético, tais como inibidores da metilação do DNA e inibidores das histonas desacetilases (HDAC) podem contribuir para o incremento da eficiência da clonagem por TN (Beltran *et al.*, 2008).

Ainda nesse sentido, o uso de agentes modeladores de cromatina pode conduzir a célula a um estado de pluripotência, a partir da expressão ectópica de diferentes fatores de transcrição, como Oct4 em fibroblastos, mostrando assim que é viável reverter o estado diferenciado de células somáticas de volta a um estado embrionário (Takahashi *et al.*, 2007).

A proposta de uso de diferentes agentes remodeladores epigenéticos não tóxicos/menos tóxicos, no cultivo *in vitro* de células doadoras de núcleos e no cultivo embrionário, oferecem perspectivas muito promissoras no sentido de incrementar a eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear (Eilertsen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Objetivou-se quantificar os padrões globais e específicos de metilação do DNA e expressão de genes envolvidos na reprogramação epigenética em células bovinas cultivadas *in vitro* com substâncias desmetilantes de DNA.

### **2.2. Objetivos específicos**

**a.** Avaliar o efeito da Procaína, S-Adenosylhomocisteína (SAH) e sua associação no cultivo *in vitro* de fibroblastos de pele bovino sobre a viabilidade e morfologia celular;

**b.** Quantificar o nível de metilação global de DNA nas células cultivadas *in vitro* com procaína, SAH e sua associação;

**c.** Quantificar o nível de metilação nas regiões de DNA repetitivo Satelite I e Alfa Satelite nas células cultivadas *in vitro* com procaína, SAH e sua associação e em embriões produzidos com essas células;

**d.** Quantificar os níveis de RNA mensageiro dos genes que codificam para as enzimas DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3 e OCT4 nas células cultivadas *in vitro* com procaína e SAH.

### **3. Material e Métodos**

O experimento 097/16 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEUA / CENARGEN) em reunião realizada em 2 de julho de 2015.

#### **3.1. Cultivo *in vitro* de fibroblastos de pele**

Foram utilizados fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, oriundo de um animal macho da raça Nelore pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, obtidos a partir de uma biópsia de pele. A biópsia foi cortada em partes menores, de 2-3 mm<sup>2</sup> e os explantes foram cultivados em placas de petri em meio Eagle Medium modificado por Dulbecco (DMEM-Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 3,7 g / L de sódio bicarbonato, piruvato a 110 mg/L, 10% de soro fetal bovino (FCS) e antibióticos. Posteriormente, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> a 39°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência em meio DMEM-Gibco®. Após o estabelecimento do cultivo celular, as células foram congeladas em meio de cultivo contendo DMSO (Sigma®) em palhetas de 0,25 mL. Para isso, foram estocadas a -80°C por 24 horas e posteriormente transferidas para nitrogênio líquido, onde ficaram armazenadas até sua utilização.

#### **3.2. Tratamento das células em cultivo *in vitro* com Procaína e SAH**

As células foram tratadas com procaína e SAH de acordo com protocolos já estabelecidos no laboratório de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Resumidamente, as células foram descongeladas, repicadas e cultivadas por duas semanas até atingirem a confluência em meio de cultivo convencional. Neste momento, foram repicadas (terceira passagem) e cultivadas por duas semanas em meio de cultivo contendo 1,0mM de Procaína e/ou SAH. Esta concentração já tinha sido estabelecida no laboratório, não afetando a viabilidade celular (Lacerda, 2010; Azevedo, 2012). No cultivo com SAH, o meio foi trocado a cada 24 horas, pois a SAH é oxidada em meio alcalino. Após esse período, as células foram utilizadas como doadoras de núcleo na transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e também armazenadas para posterior

análises celulares e moleculares. Para extração de DNA, as células foram armazenadas em PBS sem cálcio e magnésio. Para as análises de expressão gênica, as células foram armazenadas em RNAlater (Applied Biosystems®). As células foram avaliadas após a confluência usando um microscópio Axiovert 135 M invertido com ampliação de 10X (ph1) com um sistema óptico CFI60 Nikon e um sistema de iluminação ECO-LED. Para a contagem em câmara de Neubauer, as células foram totalmente individualizadas através de tripsinização. A câmara de Neubauer possui 9 quadrados que medem 1 mm<sup>2</sup> de área e foram usados apenas os quatro quadrados externos na contagem dos fibroblastos. Para a contagem, foi colocada uma lamínula de vidro sobre a câmara, de forma a que o volume determinado por cada quadrado foi equivalente a 0,1 mm<sup>3</sup>. As células contadas em um quadrado, contidas em 1 mL, equivalem ao valor de células contado multiplicado por 10<sup>4</sup> (fator de correção da câmara). O número de células por mL de uma suspensão foi obtido pela equação:  $(Q1+Q2+Q3+Q4) / 4 \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = \text{n}^\circ \text{ de células} / \text{mL}$ . Para a análise de viabilidade celular utilizamos o corante azul de Trypan a 0,2%, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não alteram a coloração e foram utilizadas na contagem. Como as células mortas tem suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula, alterando a coloração para azul, essas células não foram consideradas na contagem.

### **3.3. Extração de DNA genômico das células e embriões**

O DNA genômico das células foi isolado utilizando o kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo 1). Para a extração do DNA dos embriões, a cada *pool* de embriões (2 *pools* contendo 4 embriões cada, no estágio de blastocisto separados por tratamento), foi adicionada a enzima pronase E na concentração final de 10 mg/mL para promover a digestão da zona pelúcida. Em seguida, cada *pool* foi submetido a incubação a 37°C por 30 min. (para degradação da zona pelúcida), seguida de outra incubação a 85°C por 15 min (para a inativação da enzima) em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). A lise celular, para a obtenção do DNA, ocorreu após choque térmico, em que os embriões foram congelados em nitrogênio



líquido e imediatamente aquecidos em termociclador a 95°C por 1 min. Esse processo foi repetido por 5 vezes (Anexo 2).

### **3.4. Quantificação da metilação global do DNA em fibroblastos cultivados *in vitro* com procaína e SAH**

As amostras de DNA genômico das células, em quadruplicatas biológicas e triplicatas técnicas, foram utilizadas para a quantificação da metilação global do DNA utilizando o kit 5-mC DNA ELISA (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo 3). A metilação global do DNA foi detectada usando anticorpo monoclonal Anti-5-Metilcitosina que é sensível e específico para 5-mC e foi quantificada colorimetricamente lendo a densidade óptica a 450 nm em um espectrofotômetro de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EUA). O percentual de 5-mC foi calculado usando equação de regressão de segunda ordem da curva padrão que foi construída com o controle positivo e controle negativo (gerada por DNA de *E. coli* metilado / desmetilado).

### **3.5. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio**

As amostras de DNA genômico extraídas das células e embriões foram tratadas com bissulfito de sódio utilizando o kit EZ DNA Methylation-Lightning™ (Zymo Research, Orange, CA, EUA), de acordo com recomendações do fabricante (Anexo 4). Resumidamente, a técnica se baseia na desnaturação do DNA utilizando hidróxido de sódio e tratamento com bissulfito de sódio, o qual converte citosinas não metiladas em uracilas. Após o tratamento com bissulfito, as amostras de DNA foram armazenadas a -80°C para posterior utilização como molde para PCR.

### **3.6. Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio por PCR**

As amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas à amplificação por PCR. Os *primers* foram desenhados com o software MethPrimer (Li e Dahiya, 2002) para flanquear e amplificar uma ilha CpG nas sequências dos *loci* Satelite Testis bovino *Bos taurus* I (Satelite I) e Satelite I *Bos taurus* alfa (Alfa satélite) (Tabela 1).

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para análises de metilação em sequências repetitivas do DNA de células cultivadas *in vitro* e embriões clones bovinos.

Região Genômica	Sequência do Primer (5'- 3')	Número de acesso ao <i>GenBank</i>	Número de sítios CpG avaliados	Amplicon (pb)
Satelite I*	F: TGTAGATTGGGGATAGGAGAGTTAG R: CCCCTACTTTATCTAAAAAAATTACCTT	AH001157.2	23	347
Satelite I**	F: AGATTGGGGATAGGAGAGTTAGGT R:CTTTATCTAAAAAAATTACCTTC	AH001157.2	23	338
$\alpha$ -Satelite	F: TTTTTTTTGATTTGGATAGGAG R: TATATTTAAAACCAAAATTTTTCC	AJ293510	18	277

F: *forward*; R: *reverse*; pb – pares de bases; \*primers usados para amplificar o DNA obtido das células; \*\* primers usados para amplificar o DNA obtido dos embriões.

A PCR foi realizada com volume final de 20  $\mu$ L utilizando tampão da Taq 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTPs 0,4 mM; Taq Platinum™ 1U (Invitrogen, CA, EUA), 200nM de *primers* (*forward* e *reverse*) e 2  $\mu$ L de DNA tratado com bissulfito de sódio. As seguintes condições de temperatura e tempo foram utilizadas na PCR para os dois pares de *primers*: (1) um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min; e (2) 40 ciclos (para células) e 45 ciclos (para embriões) a 94°C por 40 s, 45°C por 1 min e 72°C por 1 min, e (3) uma extensão final a 72°C por 15 min.

### 3.7. Clonagem e sequenciamento

Após a PCR, os *amplicons* foram purificados a partir de gel de agarose utilizando o Sistema de Purificação de DNA genômico Wizard SV (Promega Corp., Madison, WI, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo 5). Em seguida, os *amplicons* purificados foram clonados no vector de clonagem TOPO TA - (pCRII-TOPO® vector system, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)) (Anexo 6) e transferidos para células DH5 $\alpha$  usando um protocolo de choque térmico (Anexo 7). Após a transformação e crescimento bacteriano, o DNA plasmidial foi isolado utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, EUA) para as amostras de DNA das células (Anexo 8) e para as amostras de DNA dos embriões

foi utilizado um protocolo de minipreparação de DNA plasmidial já estabelecido previamente no Laboratório de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Anexo 9). Para a confirmação da presença do inserto, foi realizada digestão com a enzima ECORI (Anexo 10) e posterior visualização em gel de agarose a 1,5%. Em seguida, os clones individuais foram sequenciados usando o método de Sanger.

A qualidade do sequenciamento foi avaliada utilizando o *software* Chromas<sup>®</sup> e o padrão de metilação foi determinado utilizando o programa QUMA (Copyright<sup>©</sup> 2008-2014 RIKEN Center for Developmental Biology All rights reserved, Japão). As sequências de DNA foram comparadas com uma sequência de referência depositada no *GenBank* (número de acesso na Tabela 1). Foram utilizadas apenas as sequências que se originaram de clones com  $\geq 95\%$  de homologia de sequência e taxa de conversão pelo bissulfito de sódio.

### **3.8. Extração de RNA total e síntese de cDNA**

Aproximadamente  $1 \times 10^5$  células foram descongeladas a temperatura ambiente e o RNA total foi isolado utilizando o kit PureLink<sup>™</sup> RNA Mini (Invitrogen, USA), conforme as instruções do fabricante (Anexo 11). Posteriormente à extração, as amostras de RNA total (2 $\mu$ g) foram novamente tratadas com 2U de RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 $\mu$ L de *Stop Solution* a cada amostra, que foram submetidas a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após o tratamento com DNase, as amostras foram submetidas à transcrição reversa utilizando o kit *GoScript Reverse Transcription System* (Promega, USA). As reações foram realizadas seguindo recomendações do fabricante. Resumidamente, 2  $\mu$ g de RNA foram adicionados a 1  $\mu$ L/reação de *primer* oligo dT e 1  $\mu$ L/reação de *primer* randômico e submetidos a 70°C por 5 min em termociclador e posteriormente incubados por 5 min no gelo. Passada essa etapa, foi adicionado a esse mix tampão 5X; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM de mix de nucleotídeos; 20U de RNAsin e 1 $\mu$ L/reação de enzima transcriptase reversa. Cada reação foi submetida a um ciclo de 25°C durante 5 min, 42°C durante 60 min e 70°C por 15 min, em termociclador. Após a transcrição, o cDNA foi mantido a -20°C até o uso.

### 3.9. PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para a análise da expressão gênica foi realizada RT-qPCR utilizando o Gotaq® qPCR Master Mix (Promega, USA) no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). As reações foram realizadas com volume final de 25µL utilizando 12,5µL do Mix Gotaq; 200nM dos *primers forward* e *reverse*; 1µL de cDNA e 10,5µL de H<sub>2</sub>O *Nuclease-Free*. As condições de amplificação foram 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos e temperatura de anelamento/extensão a 60°C por 30 segundos.

Para avaliar a especificidade da reação, usamos a curva de dissociação ou curva de *melting*. As temperaturas de *melting* são específicas para cada produto específico de PCR gerado, ou seja, cada *amplicon* possui uma temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) específica que é usada para identificar o alvo, bem como a caracterização por um único pico na curva. Para determinação da eficiência de amplificação de cada par de *primers* utilizados foi realizada uma curva de diluição seriada. Foi realizada uma diluição seriada (1:4) e diluições em duplicata como molde para amplificação. As reações foram otimizadas para promover a eficiência máxima de amplificação para cada gene e foram utilizados pares de iniciadores com eficiências de amplificação entre 90-115%. Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e pelo tamanho do *amplicon* em gel de agarose.

As sequências dos *primers*, tamanho do produto amplificado e eficiência de amplificação dos *primers* para cada gene estão apresentados na Tabela 2. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada ciclo. O *layout* das placas está descrito no Anexo 12.

Foram utilizados dois genes constitutivos, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e  $\beta$ -Actina, para a normalização dos dados utilizando as médias geométricas dos Ct e das eficiências de amplificação de ambos. As amostras do grupo controle foram escolhidas como amostras referências. A especificidade de amplificação 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 a eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo (10mg/mL), utilizando o marcador

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

**Tabela 2.** Genes utilizados para análise de expressão gênica. Identificação do gene, sequência dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) número de acesso ao *Genbank* e eficiência de amplificação dos *primers*.

<b>Gene</b>	<b>Sequências do primer</b>	<b>Tamanho amplicon (pb)</b>	<b>Número de acesso ao <i>GenBank</i></b>	<b>Eficiência dos <i>primers</i></b>
DNMT1	F: TTG GCT TTA GCA CCT CAT TTG CCG R: TCC TGC ATC ACG CTG AAT AGT GGT	82	NM_182651.2	91,244%
DNMT3A	F: TTT CCA ATG TGC CAT GAC AGC GAC R: GGG CCC ACT CGA TCA TTT GTT TGT	82	NM_001206502.1	114,726%
DNMT3B	F: CAA CAA GCA ACC AGA GAA TAA G R: CAA CAT CCG AAG CCA TTT G	161	NM_181813.2	112,048%
TET1	F: GTA TGC TCC AGC TGC TTA TC R: CCA CTG TGC TCC CAT TAT TC	167	XM_015469834.1	108,166%
TET2	F: GTA GGG ACA TTT CCT CCT TAT TC R: CAG CTG CAC TGT AGT TAT GG	157	XM_010828077.2	105,302%
TET3	F: GTA ACC CAG GTG ATT CTG ATA C R: CAG CAG CCT ATC TGC TAA TC	200	XM_015465317.1	101,853%
OCT4	F: TTC AGC CAA ACG ACT ATC TGC CGT R: TCT CGT TGT TGT CAG CTT CCT CCA	112	AY490804.1	90,941%
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	119	NM_001034034.2	101,988%
B-ACT	F: GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA R: ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA	134	NM_173979.3	109,929%

F: foward; R: reverse; pb – pares de bases

### 3.10. Produção de embriões clones por transferência nuclear de células somáticas

#### 3.10.1. Obtenção dos ovócitos e maturação *in vitro*

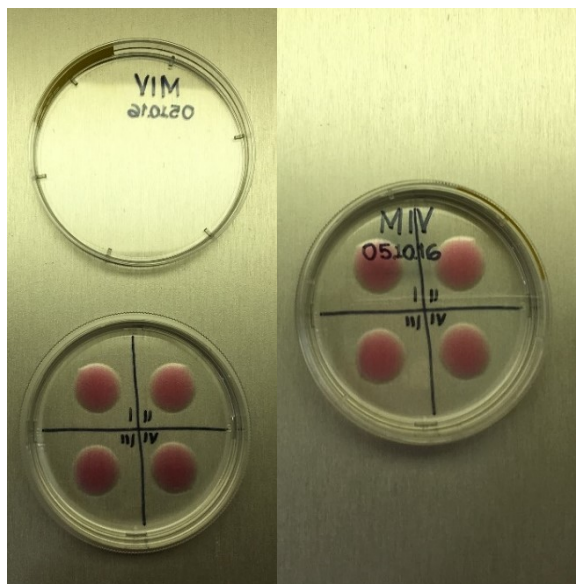
Foram utilizados ovócitos oriundos de aspiração folicular *in vivo* e ovócitos obtidos de ovários de abatedouro, ambos oriundos de vacas aneloradas. As seções de aspiração folicular para a obtenção dos ovócitos *in vivo* foram realizadas na Fazenda Experimental Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia localizada no Distrito Federal e os ovócitos foram transportados até o Laboratório de Reprodução Animal (LRA) em meio de lavagem (LAV) à temperatura de 35°C. No caso dos ovários de abatedouro, estes foram transportados em solução salina (NaCl 0,9%) suplementado com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 ng/mL) a 35°C. Complexos Cúmulo-Ovócito (CCOs) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro (Figura 3). Somente os CCOs que apresentaram citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do cumulus foram utilizados para a maturação *in vitro*.



**Figura 3.** Ovários bovinos com folículos de diferentes tamanhos. Para este estudo, foram aspirados folículos entre 3-8mm. Imagem de arquivo pessoal.

Os CCOs selecionados (graus I e II) foram transferidos em número de 20-25 para uma gota de 200 µL de meio de maturação, coberta com óleo de silicone e incubados por 18-20 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar (Figura 4). Após 18 - 20 horas

de MIV, os ovócitos foram desnudados utilizando hialuronidase (Sigma® Carlsbad, CA, USA). Os ovócitos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar (CP) sob estereomicroscópio (ZEISS®- Stemi SV11) e apenas os que apresentaram CP foram utilizados para a transferência nuclear (TN).



**Figura 4.** Esquema da placa de maturação *in vitro*. Cada gota com 200µL de meio de maturação *in vitro* suporta 25-30 complexos cúmulos ovócitos. Imagem: arquivo pessoal.

### 3.10.2. Transferência nuclear

Após trinta minutos de incubação em solução SOFaaci (fluido sintético do oviduto com aminoácidos) contendo 0,001 mg de citocalasina D (Sigma® Carlsbad, CA, USA) e 0,003 mg de Hoechst 3342 (Sigma® Carlsbad, CA, USA), os ovócitos maturados foram separados em grupos de 16 a 20 e submetidos a transferência nuclear. Os ovócitos foram fixados individualmente com pipeta *holding* e posicionados de forma que o corpúsculo polar permanecesse na posição de 4 horas (Figura 5). O corpúsculo polar e uma porção do citoplasma adjacente a ele foram retirados por aspiração, sem que a membrana citoplasmática fosse rompida, etapa denominada de enucleação. Baseando-se nos resultados do cultivo celular, metilação de DNA e expressão gênica nas células, optamos por produzir embriões utilizando apenas as células controle e as células tratadas com procaína/SAH. Na sequência, um fibroblasto cultivado *in vitro* foi depositado no espaço perivitelino para a reconstrução. Em seguida, as estruturas foram

submetidas ao processo de eletrofusão em fonte ECM 200 (BTX®), através da geração de dois pulsos elétricos com carga de 2,1kVA/cm, com 30µs de duração, em solução de D-Manitol (Sigma® Carlsbad, CA, USA) a 0,28M contendo 0,1mM de MgSO<sub>4</sub> (Sigma® Carlsbad, CA, USA) em câmara de fusão por 30 min. Em seguida foi realizada a ativação, onde as estruturas fusionadas foram submetidas à incubação por 5 min em solução SOFaaci contendo Ionomicina 5 µM (Sigma® Carlsbad, CA, USA) e posteriormente a 4 horas em solução SOFaaci contendo 6DMAP 2mM (Sigma® Carlsbad, CA, USA).



**Figura 5.** Micromanipulação de ovócitos maturados *in vitro* e desnudos. Ovócito fixo por pipeta *holding* exibindo o primeiro corpúsculo polar, para sua posterior remoção, juntamente com aproximadamente 30% do material citoplasmático contendo a placa metafásica, para a remoção de todo o seu material genético. Aumento de 20X em Microscópio Invertido. Imagem: arquivo pessoal.

### **3.10.3. Cultivo *in vitro* dos embriões produzidos por transferência nuclear**

Após todo o processo de reconstrução, eletrofusão e ativação, as estruturas foram co-cultivadas por 7 dias sob monocamada de células do cumulus, em estufa de cultivo à temperatura de 39°C e atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> em



ar. Os embriões foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento com 48h de cultivo (D2) para verificação da clivagem e com 170h (D7) para verificação da taxa de blastocistos. Os embriões em estágio de blastocisto foram armazenados a -80°C em PBS sem cálcio e magnésio para posterior análises de metilação do DNA. Todos os meios utilizados na produção de embriões foram adquiridos da empresa Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, Brasil.

### **3.11. Análises estatísticas**

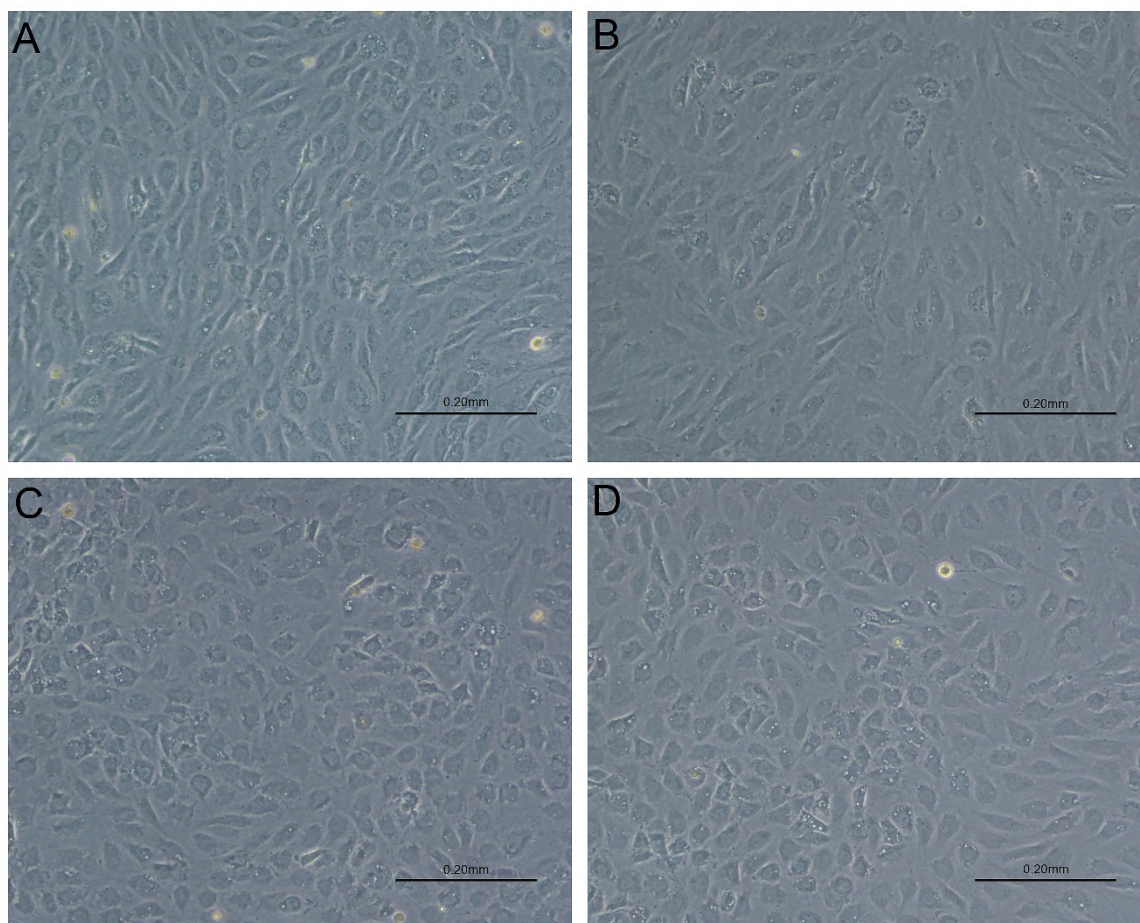
Para comparações entre os grupos foi usada análise de variância para as variáveis contínuas, quando respeitaram as premissas de normalidade e homocedasticidade. Os dados de normalidade foram rodados com o teste de Shapiro-Wilk. Caso contrário, testes não paramétricos foram empregados. O estudo comparativo entre variáveis binomiais foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado ou regressão logística.

Nas análises de metilação global e específica, os dados foram comparados entre os grupos experimentais usando ANOVA e teste de *Tukey* ou os testes de *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* para dados que mostram ou não mostram normalidade, respectivamente. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para as análises de comparação dos níveis de mRNA dos genes estudados, foram realizados testes estatísticos não paramétricos; o teste de *Mann-Whitney* para análise comparativa entre duas amostras, e para as comparações múltiplas, o teste de *Kruskal-Wallis*. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), considerando  $p < 0,05$  como diferenças significativas.

## 4. Resultados

### 4.1. Crescimento celular e morfologia

Após o cultivo *in vitro*, as células de todos os tratamentos apresentaram crescimento celular normal e atingiram a confluência próximo ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, sendo mantidas em cultivo por 2 semanas. Não foram observadas alterações morfológicas durante o cultivo para nenhum dos tratamentos (Figura 6).



**Figura 6.** Fotomicrografia de linhagem celular de fibroblastos bovino cultivados *in vitro* durante duas semanas. A - Grupo controle. B - Cultivo suplementado com 1,0 mM de procaína. C - Cultivo suplementado com 1,0 mM de S-Adenosil L-homocisteína (SAH). D - Cultivo suplementado com 1,0 mM de procaína e 1,0 mM de SAH. Ampliação de 100x. Barra: 0,20 mm. Imagem: arquivo pessoal da autora.

### 4.2. Contagem total de células

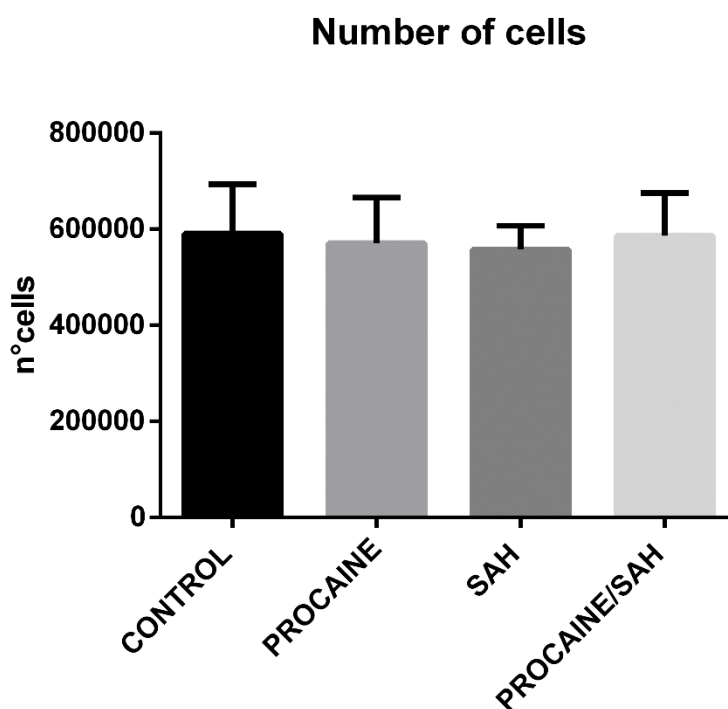
As células foram contadas separadamente após o tratamento com procaína, SAH e procaína associada a SAH em câmara de Neubauer. O número de células para cada tratamento, obtidos em quadruplicatas, foram  $58,75 \times 10^4$

células para o grupo controle;  $57 \times 10^4$  células para o grupo tratado com Procaína;  $55,5 \times 10^4$  células para o grupo tratado com SAH e  $58,5 \times 10^4$  para o grupo tratado com a associação de Procaína e SAH. Os dados de cada réplica estão mostrados na Tabela 3 e na Figura. 7. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ( $P = 0,0899$ ) (Figura 7).

**Tabela 3.** Número total de fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a associação de procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH) contados em câmara de Neubauer.

Tratamentos	CONTROLE	PROCAINA	SAH	PROCAINA + SAH
<b>Réplica 1</b>	$62 \times 10^4$	$65 \times 10^4$	$55 \times 10^4$	$54 \times 10^4$
<b>Réplica 2</b>	$59 \times 10^4$	$60 \times 10^4$	$60 \times 10^4$	$56 \times 10^4$
<b>Réplica 3</b>	$66 \times 10^4$	$51 \times 10^4$	$54 \times 10^4$	$66 \times 10^4$
<b>Réplica 4</b>	$48 \times 10^4$	$52 \times 10^4$	$53 \times 10^4$	$58 \times 10^4$
Média ( $\pm$ desvio padrão)	$58,75 \times 10^4$ ( $\pm 10,2$ )	$57 \times 10^4$ ( $\pm 9,5$ )	$55,5 \times 10^4$ ( $\pm 5,4$ )	$58,5 \times 10^4$ ( $\pm 8,9$ )

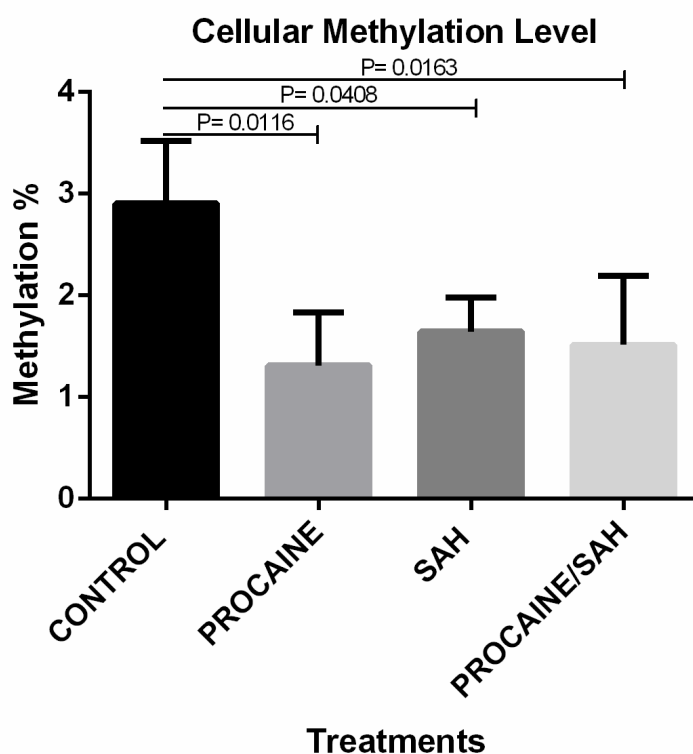
SAH: S-AdenosilL-homocisteína



**Figura 7.** Média  $\pm$  desvio padrão (n=4 réplicas) do número de células totais para cada tratamento (procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH), procaína associada a SAH e controle). As células foram contadas em câmara de Neubauer.

#### 4.3. Análise da metilação global do DNA

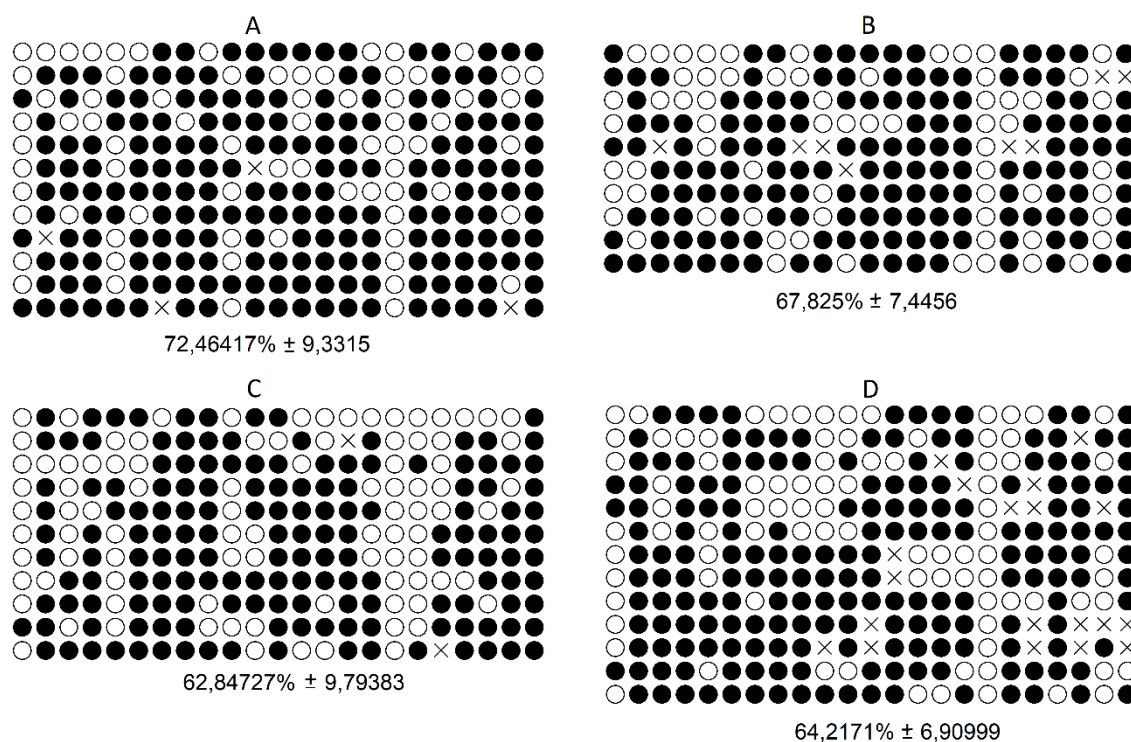
Os resultados mostraram que os níveis de metilação global do DNA foram inferiores em todos os grupos celulares tratados com as substâncias desmetilantes de DNA. Células tratadas com procaína apresentaram taxa de 1,31% de metilação (P = 0,0116), células tratadas com SAH apresentaram 1,64% de metilação (P = 0,0408) e células tratadas com procaína + SAH apresentaram 1,51% de metilação (P = 0,0163), em comparação ao grupo controle com 2,90% de metilação (Figura 8).



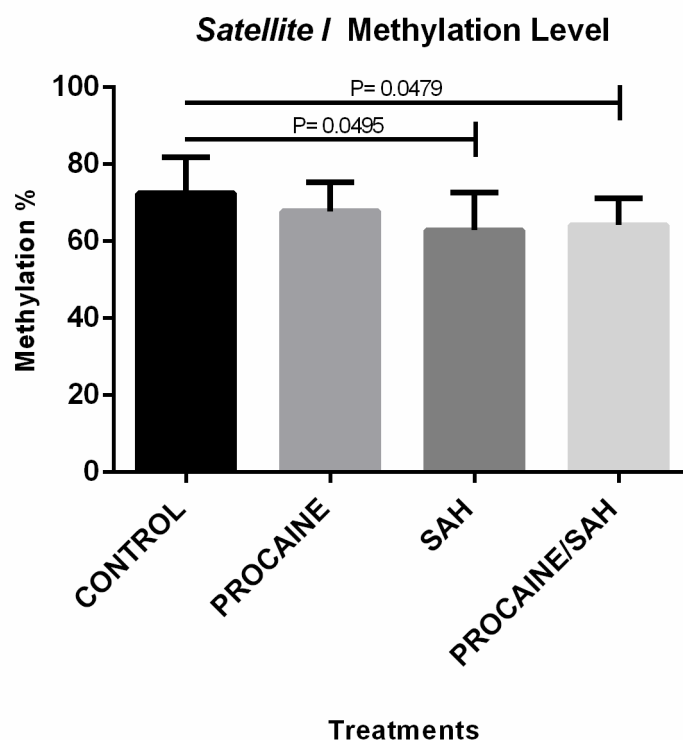
**Figura 8.** Média  $\pm$  desvio padrão dos níveis de metilação global do DNA em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* por 14 dias com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a combinação das duas substâncias. Os dados foram obtidos a partir de quadruplicatas biológicas e triplicatas técnicas para cada tratamento.

#### 4.4. Perfil da metilação do DNA para a região Satellite I nas células cultivadas *in vitro*

O padrão e a porcentagem de metilação do DNA para a região satélite I nas células estão mostrados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Encontramos que a taxa de metilação para a região satélite I no grupo controle foi de 72,46%; no grupo tratado com procaína a taxa foi 67,82%; no grupo tratado com SAH, foi de 62,84% e no grupo tratado com ambas as drogas em associação, a taxa foi de 64,21%. O DNA genômico de fibroblastos de pele cultivados por duas semanas com SAH e associação de procaína e SAH, apresentaram menor nível de metilação em comparação com o grupo controle ( $P = 0,0495$  e  $P = 0,0479$ , respectivamente; Figuras 9 e 10). No entanto, não foram encontradas diferenças para as células cultivadas somente com procaína.



**Figura 9.** Padrão de metilação do DNA para a região Satélite I em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* durante 14 dias. A – Células do grupo controle. B - Células cultivadas com procaína. C - Células cultivadas com S-Adenosil L-homocisteína (SAH). D - Células cultivadas com procaína e SAH. Cada linha representa um clone individual e cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG (23 CpGs foram analisados). Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os círculos pretos representam citosinas metiladas e “x” representam citosinas que não tiveram seu padrão de metilação analisado.



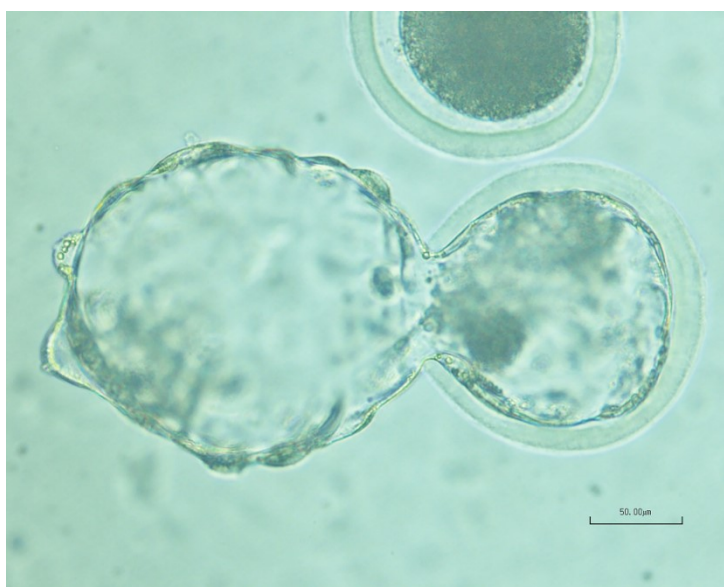
**Figura 10.** Média  $\pm$  desvio padrão dos níveis de metilação do DNA para a região Satellite I em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* por 14 dias. Foram quatro grupos avaliados: controle, células cultivadas com procaína, células cultivadas com S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e células cultivadas com as duas substâncias.

#### 4.5. Produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas

Foram realizadas dez manipulações e os resultados da produção de embriões estão mostrados na Tabela 4. A Figura 11 mostra um embrião TN em eclosão produzido a partir de célula tratada com a associação de procaína + SAH.

**Tabela 4:** Produção de embriões clones por transferência nuclear de células somáticas (10 manipulações) utilizando fibroblastos de pele bovino cultivados *in vitro* com procaína + S-Adenosil L-homocisteína (SAH) por duas semanas.

Tratamento	Número de reconstruções	Taxa de fusão(%)	Embriões produzidos (%)
Controle	262	205 (78,6%)	9 (4,39%)
Procaína/SAH	268	243 (86,9%)	8 (3,29%)

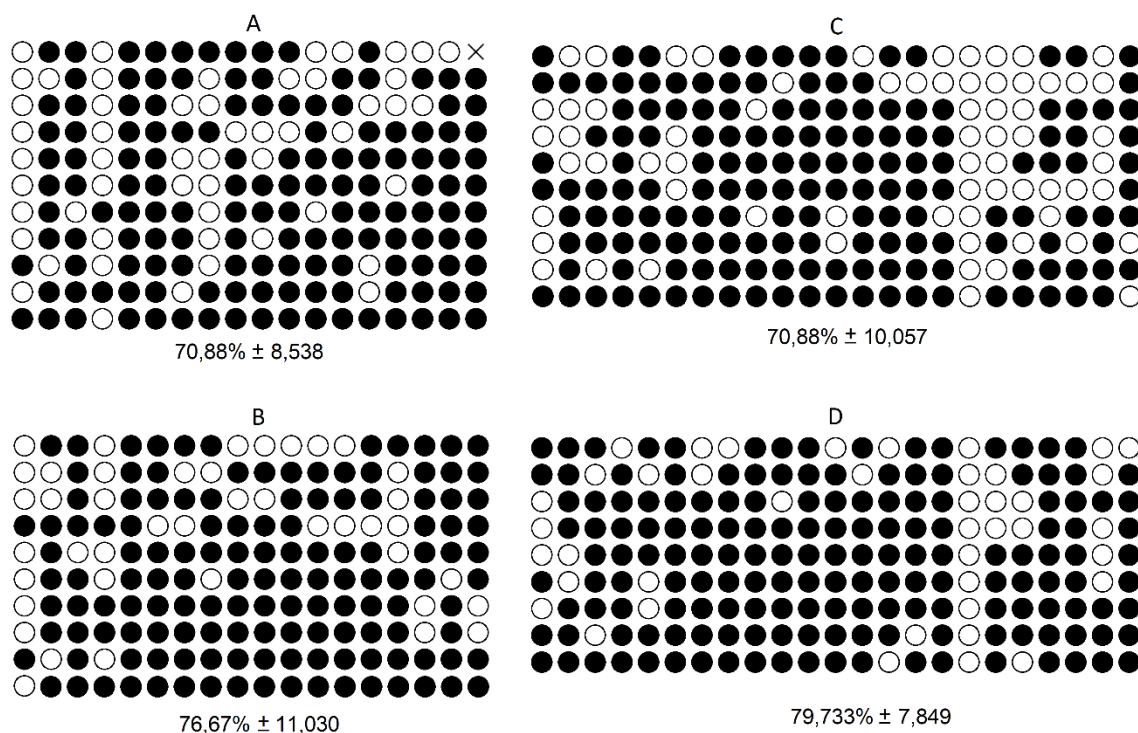


**Figura 11.** Blastocisto bovino em eclosão produzido por transferência nuclear de célula somática utilizando fibroblasto de pele cultivado *in vitro* com procaína + S-Adenosil L-homocisteína (SAH) por duas semanas. Imagem: arquivo pessoal.

#### **4.6. Perfil da metilação do DNA para regiões de DNA repetitivo Satélite em embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas**

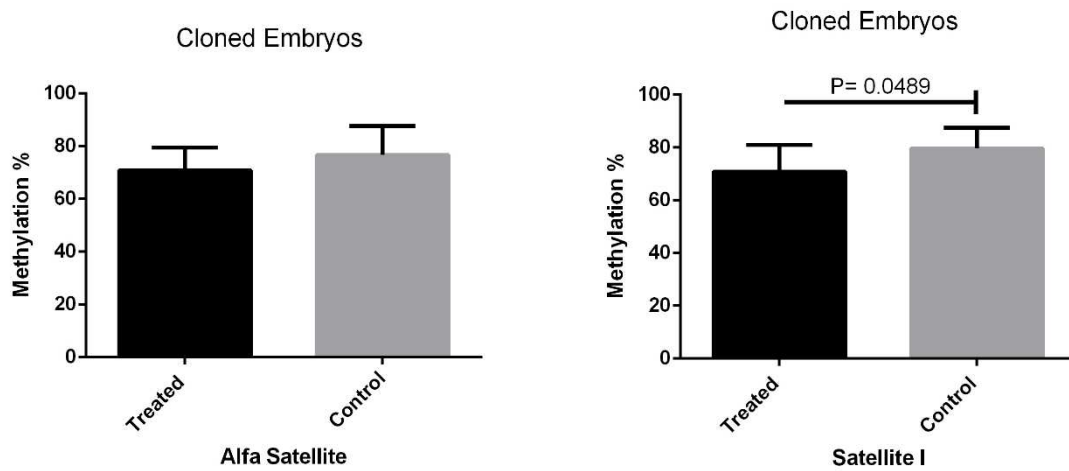
O padrão e a porcentagem de metilação do DNA para as duas regiões satélites avaliadas nos embriões estão mostrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. O DNA genômico dos embriões produzidos com células tratadas com procaína e SAH em associação apresentaram menor nível de metilação (P=

0.0489) em comparação com os embriões controle para região Satélite I. Para a região Alfa Satélite não houve diferença entre os grupos (Figuras 12 e 13).



**Figura 12.** Padrão de metilação do DNA para as regiões Alfa Satélite e Satélite I em embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas, produzidos com fibroblastos tratados com S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e procaína e fibroblastos sem tratamento. A – Padrão de metilação para a região Alfa Satélite em embriões produzidos com fibroblastos tratados com a associação de procaína e SAH. B – Padrão de metilação para a região Alfa Satélite em embriões produzidos com fibroblastos controle (sem tratamento com procaína e SAH). C – Padrão de metilação para a região Satélite I em embriões produzidos com fibroblastos tratados com a associação de procaína e SAH. D – Padrão de metilação para a região Satélite I em embriões produzidos com fibroblastos controle (sem tratamento com procaína e SAH). Cada linha representa um clone individual e cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG (18 CpGs para Alfa Satélite e 23 CpGs para Satélite I). Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os círculos pretos representam citosinas metiladas e “x” representa citosina que não teve seu padrão de metilação determinado.





**Figura 13.** Média  $\pm$  desvio padrão da metilação do DNA para as regiões Alfa Satélite e Satélite I em embriões clones bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas. *Control* – embriões produzidos utilizando como doadores de núcleo fibroblastos cultivados *in vitro* sem adição das substâncias desmetilantes de DNA. *Treated* – embriões produzidos utilizando como doadores de núcleo fibroblastos cultivados *in vitro* com a associação de procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH).

#### 4.7. Expressão gênica nos fibroblastos cultivados *in vitro*

A Figura 14 mostra as curvas de *melting* para cada gene estudado, apresentando apenas um pico, o que confirma a alta especificidade dos *primers* utilizados.

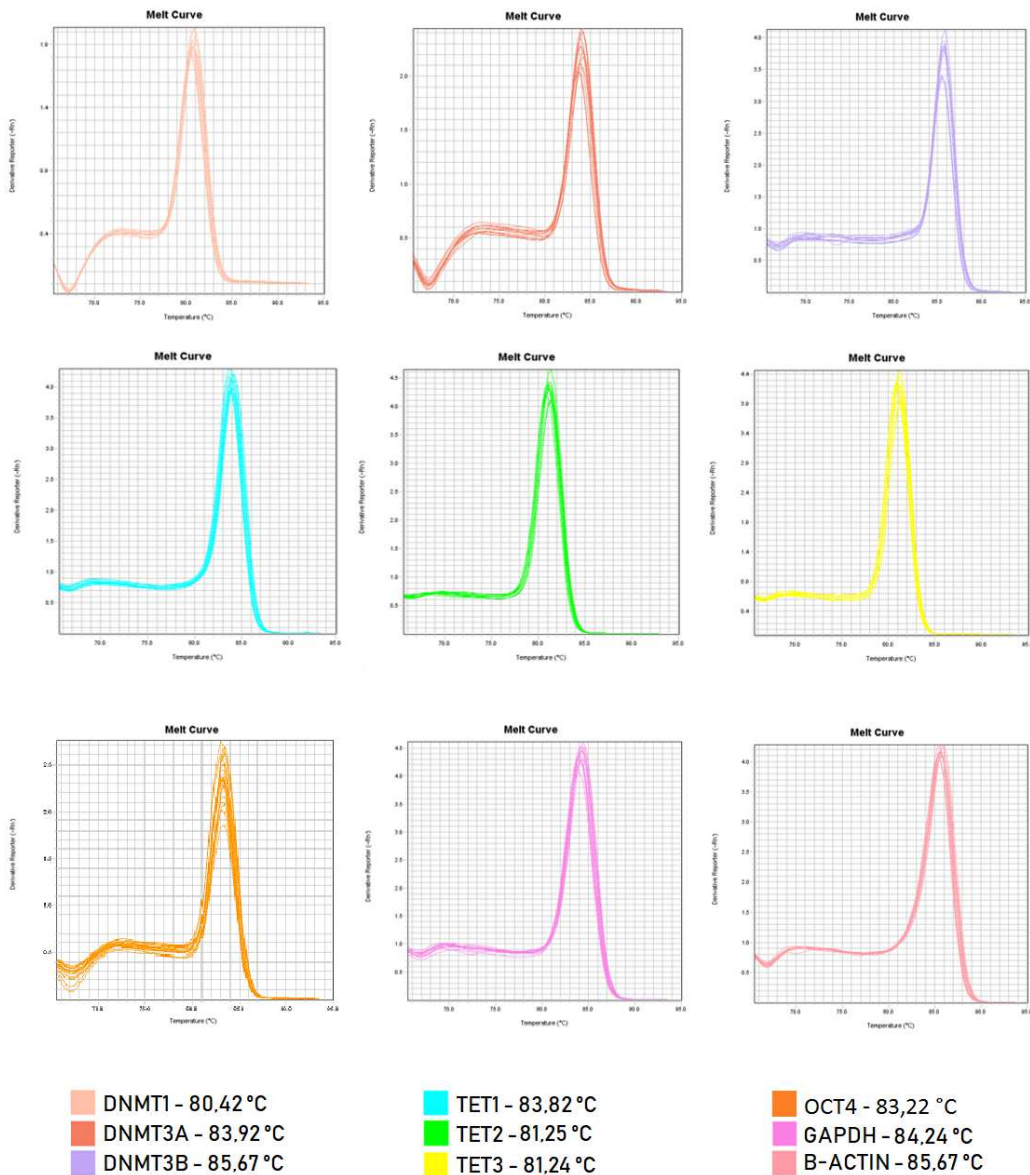
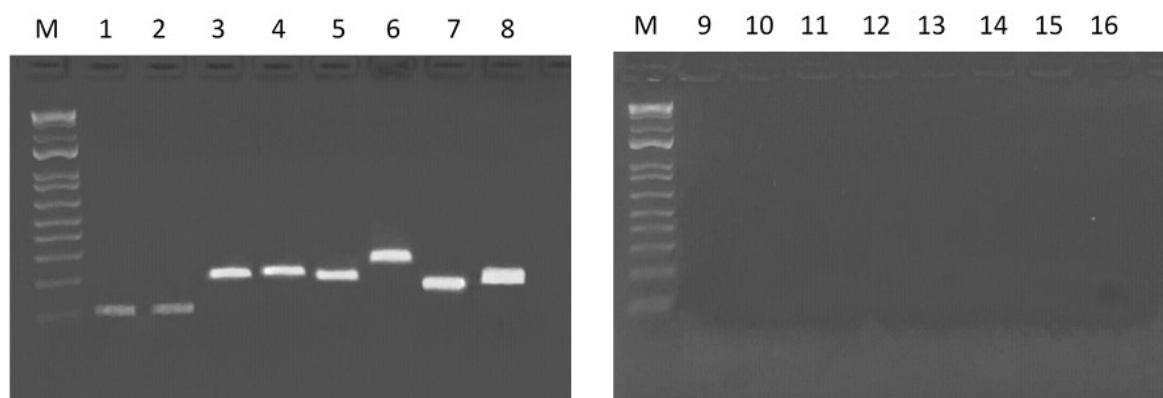


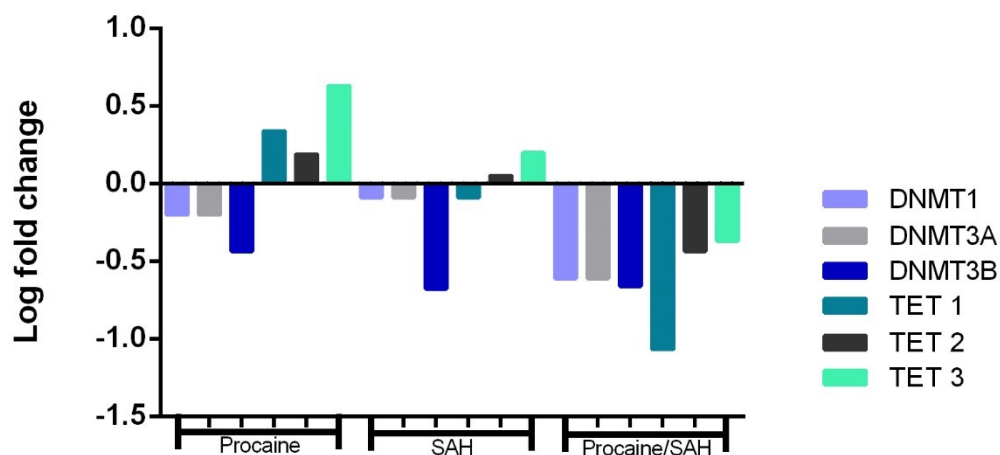
Figura 14. Curvas de *melting* para os *primers* utilizados nas reações de RT-qPCR.

Além da curva de *melting* (Figura 14), a especificidade das reações de PCR foi também confirmada submetendo os produtos da amplificação à eletroforese em gel de agarose. Para todos os genes foram obtidos *amplicons* com os tamanhos esperados (Figura 15).

O comportamento dos genes estudados, em relação ao grupo controle, para cada tratamento, está mostrado na Figura 16. Os valores de expressão estão apresentados como *log fold change*, de forma que valores acima de 0 estão *upregulated* e valores abaixo estão *downregulated* em relação ao grupo controle que tem valor 0 (Figura 16). Analisando os dados obtidos, de uma maneira geral, as DNMTs, se apresentaram *downregulated*, bem como as TETs no grupo tratado com a associação de procaína e SAH, enquanto que as TETs, nos outros grupos mostram um padrão *upregulated* (Figura 16).

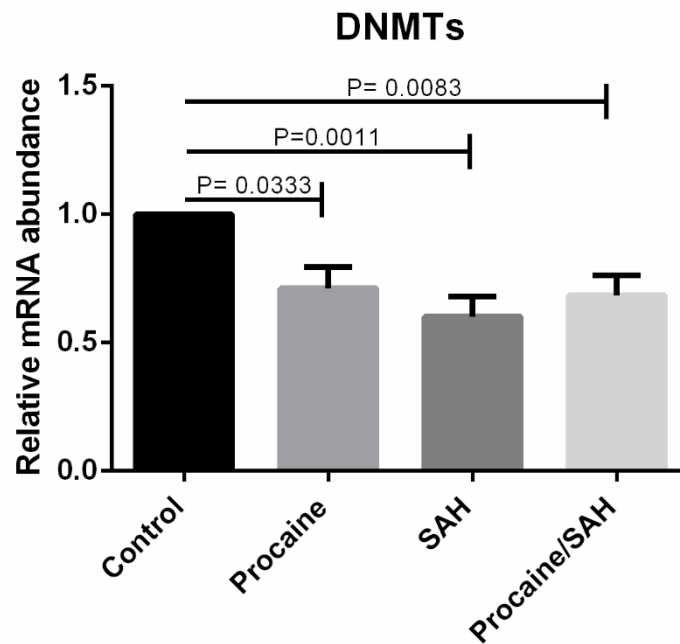


**Figura 15.** Gel de agarose a 1,5% mostrando os *amplicons* referentes aos genes avaliados. Coluna 1 - DNMT1 [82 pares de base (pb)]; Coluna 2 – DNMT3A (82 pb); Coluna 3 – DNMT3B (161pb); Coluna 4 – TET1 (167 pb); Coluna 5 – TET2 (157 pb); Coluna 6 – TET3 (200 pb); Coluna 7 – GAPDH (119 pb); Coluna 8 – BACTINA (134 pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb. As linhas de 9-16 representam os controles negativos da PCR sem adição de cDNA.



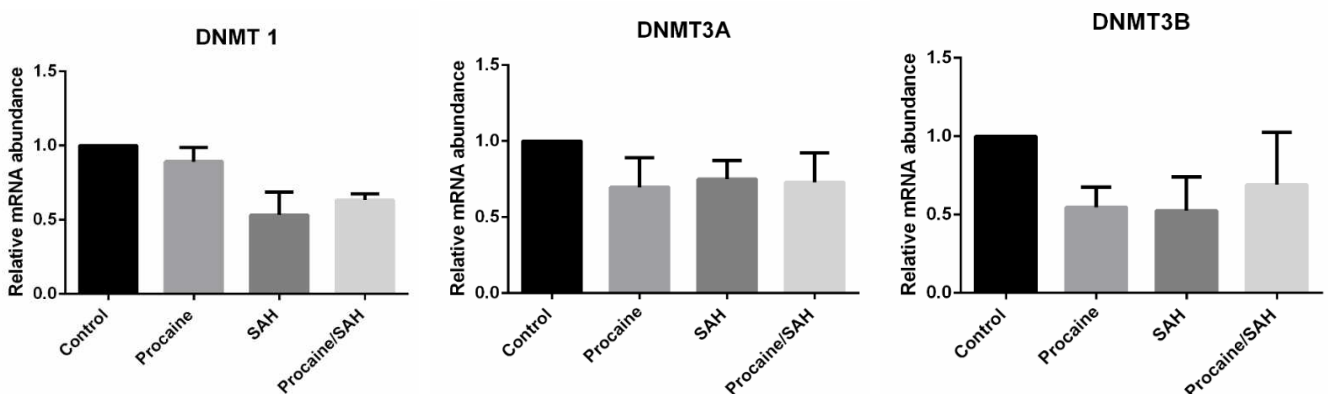
**Figura 16.** Valores de *fold change* para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 em fibroblastos de pele cultivados *in vitro* por 14 dias com procaína, S-Adenosil L-homocisteína (SAH) e com a associação de ambas as substâncias em relação ao grupo controle (valor 0).

Considerando a expressão dos genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em conjunto, os resultados mostraram que o uso da procaína e/ou SAH no cultivo celular reduziu o nível de expressão dessas enzimas em relação ao grupo controle (Figura 17).



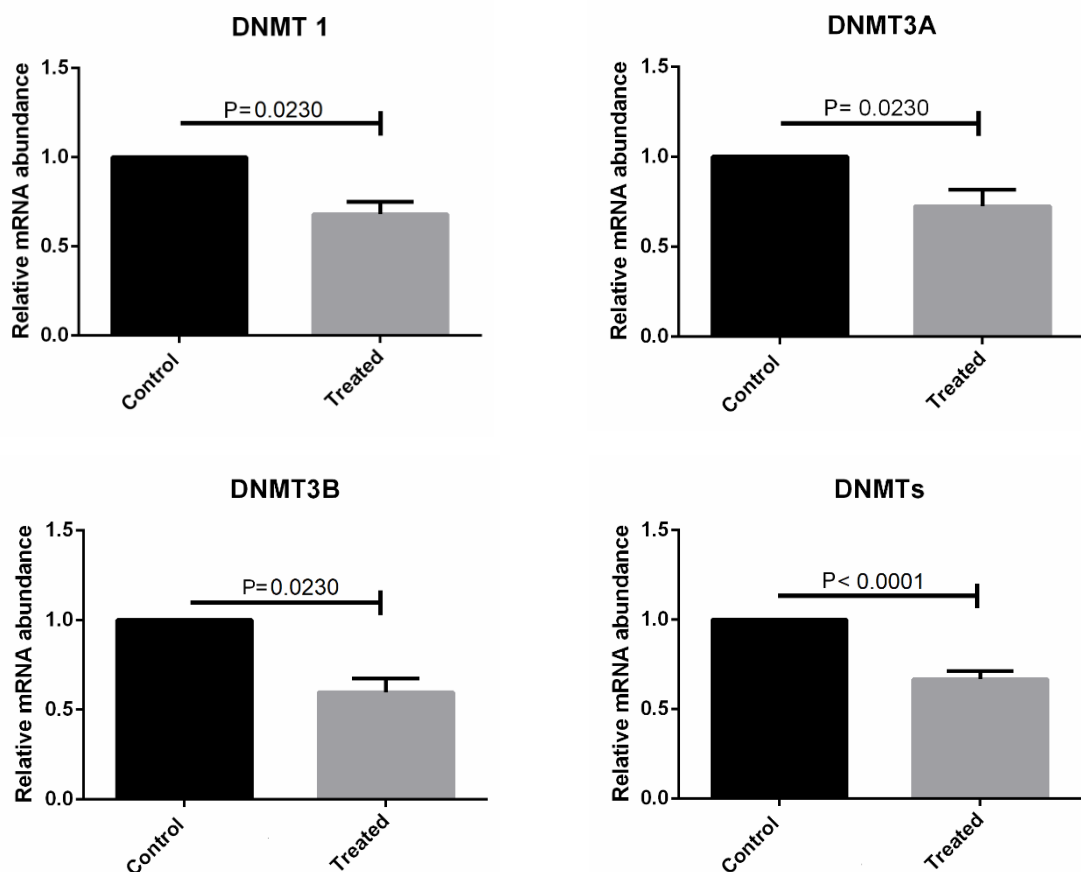
**Figura 17.** Quantidade relativa de mRNA para os genes que codificam para as enzimas DNMT (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA, procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Por outro lado, quando comparamos a expressão dos genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B individualmente, não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle (Figura 18).



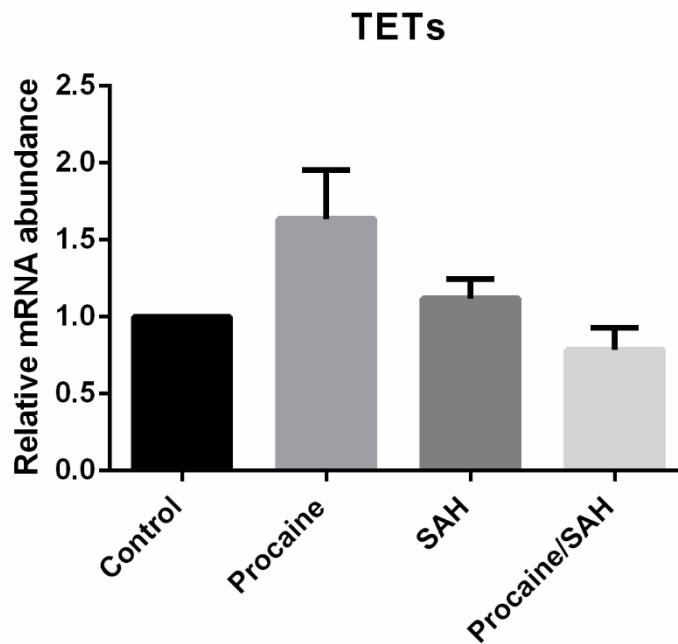
**Figura 18.** Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Além dos resultados avaliados por tratamento, também foi comparada a quantidade de transcritos entre células controle e tratadas como um único grupo. Os resultados mostraram que os níveis de transcritos foram maiores nas células controle quando comparados às células tratadas para as 3 formas de DNMT (Figura 19).



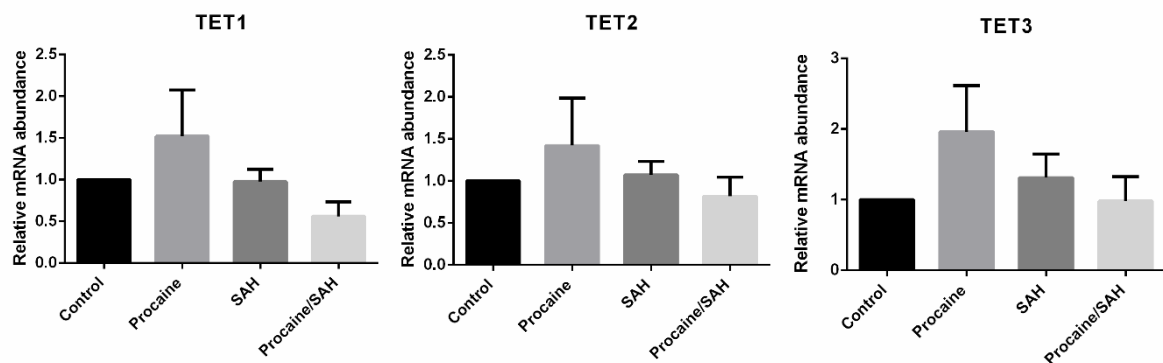
**Figura 19.** Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA, Procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Quanto aos genes que codificam para as enzimas TET, foi observado que o uso de procaína e/ou SAH no cultivo celular por 14 dias não alterou a quantidade de transcritos para esses genes (Figura 20).



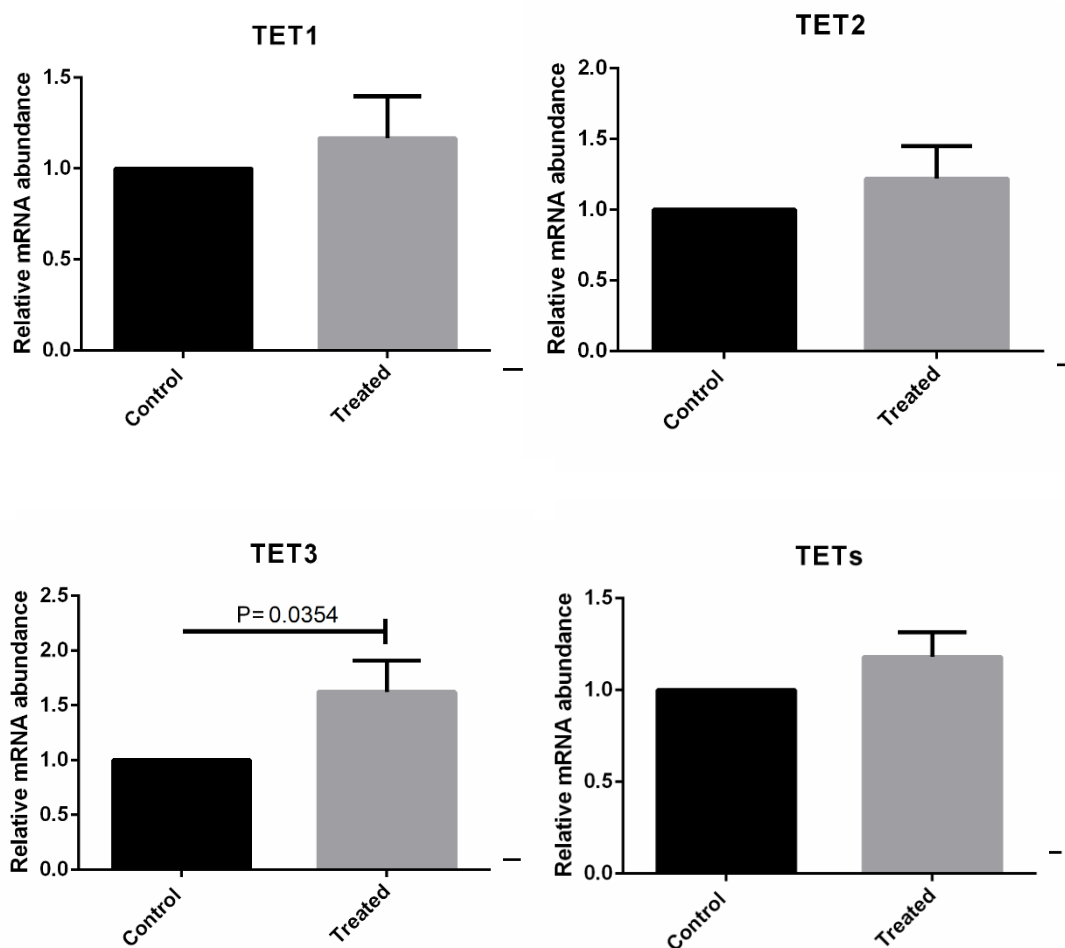
**Figura 20.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA, procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Analisando individualmente cada gene, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e os tratamentos com procaína e/ou SAH (Figura 21).



**Figura 21.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET1, TET2 e TET3 determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

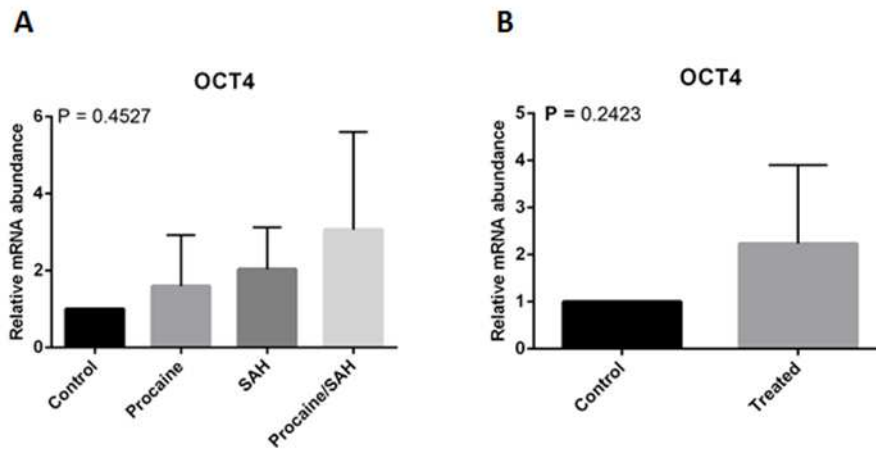
Além dos resultados avaliados por tratamento, também foi comparada a quantidade de transcritos para os genes que codificam as enzimas TET entre células controle e tratadas como um único grupo (Figura 22). A TET3 apresentou maior quantidade de transcritos no grupo tratado em relação ao grupo controle (Figura 22).



**Figura 22.** Quantidade relativa de mRNA para os genes TET1, TET2 e TET3 determinada por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina cultivados *in vitro* com as substâncias desmetilantes de DNA procaína e S-Adenosil L-homocisteína (SAH). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Para verificar o estado de pluripotência das células tratadas, analisamos a expressão do gene OCT4. Foi detectada a presença de transcritos para o gene OCT4 em todos os tratamentos, mas não houve diferença significativa nos níveis de transcritos nas células tratadas em relação ao grupo controle (Figura 23).





**Figura 23.** (A) Níveis de mRNA para o gene OCT4 determinado por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina tratados com procaína e/ou S-adenosil L-homocisteína (SAH). Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . (B) Níveis de mRNA para o OCT4 determinados por RT-qPCR em fibroblastos de pele bovina tratados com procaína e/ou S-adenosil L-homocisteína (SAH) independentemente dos tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

Estudos indicam que falhas no desenvolvimento inicial em embriões obtidos a partir da transferência nuclear de células somáticas (TNCS), um processo que depende da capacidade de um ovócito maduro e enucleado reprogramar um genoma somático diferenciado para permitir o restabelecimento da totipotência celular, estejam diretamente relacionadas à reprogramação epigenética incompleta do genoma somático do núcleo diferenciado (Morgan *et al.*, 2005). Embriões clonados carregam consigo a maquinaria epigenética do núcleo diferenciado, apresentando falhas no desenvolvimento inicial em comparação a embriões obtidos *in vitro* ou *in vivo* (Bourc'his *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001).

Em células de mamíferos, aproximadamente 2-5% dos nucleotídeos citosina do DNA são modificados pela adição covalente de um grupo metil ao carbono-5 do seu anel (Bird, 1992). Essa modificação epigenética ocorre preferencialmente nas citosinas em um contexto de dinucleotídeos CpG. Isso resulta na conversão para 5-metilcitosina e metilação de até 70% das citosinas CpG no genoma (Egger *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que os fibroblastos de pele cultivados *in vitro* sem a adição das substâncias desmetilantes de DNA apresentaram uma taxa de metilação global de aproximadamente 3% (Figura 8), corroborando com os dados da literatura (Bird, 1992). Células diferenciadas geralmente apresentam um perfil epigenético de DNA hipermetilado, determinando a função gênica específica e necessidade fisiológica desempenhada por cada tecido do organismo (Jones e Takai, 2001).

A expressão gênica, regulada por metilação do DNA, é proposta como mecanismo chave que inicia eventos essenciais na embriogênese em mamíferos, desde o estabelecimento de sinais *imprinting* em gametas até o estabelecimento do padrão de metilação embrionário (Bird, 2002). A importância da regulação do desenvolvimento, mediada por metilação do DNA, é particularmente evidente após a TNCS (Bourc'his *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001), sendo a incapacidade da desdiferenciação completa e reprogramação correta do núcleo somático doado por uma célula diferenciada determinante do desenvolvimento inicial até o nascimento de um animal saudável. Assim, neste estudo usamos drogas desmetilantes de DNA no cultivo *in vitro* de fibroblastos de pele com o

objetivo de apagar sua “memória” epigenética e se aproximar a um estado de desdiferenciação celular. Isto poderia contribuir para uma maior eficiência da clonagem por TNCS, pois fisiologicamente após a fecundação, é necessária uma onda de desmetilação global do genoma (Reik e Walter, 2001; Morgan *et al.*, 2005). Drogas análogas de nucleotídeos com alta toxicidade causam apoptose celular (Villar-Garea *et al.*, 2003), mas drogas não citotóxicas e inibidoras de DNMT como a procaína e SAH, não apresentam essa característica. SAH tem afinidade muito maior com o sítio ativo de enzimas metiltransferases do que o seu precursor (S-Adenosil-Metionina - SAM). Portanto, a maioria das metiltransferases celulares são inibidas pelo acúmulo de SAH intracelular (Castro *et al.*, 2005). Assim, a proporção de SAM e SAH celular tem sido frequentemente usada como um indicador do potencial de metilação do DNA (Yi *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2005). Nossos resultados, utilizando procaína, SAH ou a associação de ambas no cultivo *in vitro* por 14 dias, mostraram que o uso dessas substâncias não afetou o crescimento e morfologia celular (Figura 6). Também não foi detectada diferença na quantidade de células totais em relação ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 7).

Villar-Garea *et al.* (2003) trataram células MCF7 e Tada *et al.* (2007) trataram uma linhagem celular de hepatoblastoma HLE com procaína, e em ambos os estudos o volume tumoral foi reduzido sem efeitos adversos, não apresentando índices de apoptose (Villar-Garea *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2007). Além disso, Hermes *et al.* (2004) relataram que células HepG2 tratadas com SAH sofreram desmetilação global do DNA em 30% (Hermes *et al.*, 2004). Em nosso estudo, o cultivo *in vitro* de fibroblastos de pele com procaína, SAH e com a associação de ambas, reduziu significativamente os níveis globais de 5-metilcitosina quando comparado ao grupo controle, sendo uma redução de aproximadamente 47% para tratamento com procaína, 44% para tratamento com SAH e 52% para tratamento com as duas drogas em associação (Figura 8). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura (Jeon *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Parashar *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018), demonstrando que ambas as drogas apresentam eficácia na redução da metilação de DNA a nível global.

Para avaliar o comportamento dos agentes desmetilantes de DNA utilizados neste estudo, usamos a estratégia de estudar sequências repetitivas de DNA. As sequências de DNA repetitivos denominadas regiões satélite incluem

sequências em tandem e desempenham função importante no estabelecimento e regulação da heterocromatina, sendo fundamentais durante a embriogênese e progressão do desenvolvimento (Pezer *et al.*, 2012). Estudos anteriores já verificaram aumento da metilação do DNA Sat I em blastocistos produzidos *in vitro* (Ulloa *et al.*, 2015), fetos clonados abortados (Zhang *et al.*, 2014) e em anomalias placentárias (Perrin *et al.*, 2007). Neste estudo também analisamos o padrão de metilação específico da região Sat I em fibroblastos que foram cultivados com a procaína e SAH. Os resultados mostraram que as células tratadas com a associação de procaína e SAH, bem como apenas com SAH, apresentaram uma menor porcentagem de metilação do DNA quando comparadas com o grupo controle (Figura 10). Apesar de nossas avaliações terem sido feitas em células, nossos resultados corroboram os achados de Zhang *et al.* (2014), que observaram redução dos níveis de metilação em genes específicos em embriões clones tratados com a combinação de SAH e Scriptaid (Zhang *et al.*, 2014).

Vários estudos demonstraram que a procaína é capaz de reduzir o nível de metilação em ilhas CpG em alguns tipos de câncer, como o hepatoma e o câncer de mama (Villar-Garea *et al.*, 2003; Castellano *et al.*, 2008). Li *et al.* (2018) verificaram que o tratamento com procaína reduziu o nível de metilação do DNA de células de carcinoma gástrico através da inibição da ligação da DNMT1 aos genes alvo. Além disso, demonstraram que a expressão de alguns genes supressores de tumor foi significativamente aumentada com o tratamento com a procaína, diminuindo a proliferação celular e indução de apoptose (Li *et al.*, 2018). Assim como os resultados obtidos por Li *et al.* (2018), nossos resultados mostraram que a procaína, quando utilizada individualmente no cultivo celular de fibroblastos, causou redução significativa no nível de metilação global do DNA quando comparada ao grupo controle (Figura 8). Porém, a procaína não foi capaz de reduzir a metilação gene-específico, no nosso caso na região satélite I (Figura 10). Por outro lado, o uso da procaína em associação com SAH, reduziu significativamente os níveis de metilação da região satélite I (Figura 10). Em camundongos, Guibert *et al.* (2012) demonstraram que regiões de elementos de transposição, como LTR-ERV1, são resistentes à desmetilação, mantendo a citosina metilada, de forma que diferentes regiões genômicas podem apresentar maior ou menor resistência em alterar seu padrão de metilação (Guibert *et al.*, 2012).

Além da avaliação de padrões de metilação de DNA nas células em cultivo, também avaliamos os padrões de metilação para duas regiões de DNA repetitivo satélites em embriões clones produzidos por transferência nuclear. Os resultados mostraram que embriões produzidos utilizando como doadores de núcleo fibroblastos cultivados com a associação de procaína e SAH apresentaram redução na porcentagem de metilação para a região Satélite I em comparação com embriões do grupo controle, que apresentaram perfil hipermetilado (Figuras 12 e 13). Esses resultados vêm a confirmar dados de Zhang et al. (2016) que verificaram em regiões satélites blastocistos TNCS altamente metilados (Zhang *et al.*, 2016).

Considerando todos os resultados de metilação de DNA em conjunto, o maior nível de metilação global nas células do grupo controle e maior nível de metilação da região satélite I nas células e embriões dos grupos controles podem sugerir que o tratamento com a associação de procaína e SAH é eficaz em conduzir células somáticas e embrionárias a um estado menos diferenciado (Zhang *et al.*, 2014). Dessa forma, sugerimos que o uso de substâncias desmetilantes de DNA possa contribuir para a correção de padrões de metilação aberrantes sendo estabelecidos durante as ondas de reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário inicial de embriões produzidos *in vitro*, principalmente em embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas.

Embriões clones bovinos apresentam importantes alterações do seu transcriptoma, apresentando muitos genes diferencialmente expressos quando comparados com embriões controles produzidos *in vivo* (Biase *et al.*, 2016). Estudos de expressão gênica de enzimas relacionadas à metilação de DNA em fibroblastos bovinos são escassos. Porém, o conhecimento do perfil de expressão gênica em células comumente utilizadas como doadoras de núcleo na TNCS é fundamental. O estado epigenômico de embriões de mamíferos em desenvolvimento inicial é definido e governado por um grupo de genes que codificam enzimas envolvidas no remodelamento da cromatina. Min et al., (2015) detectaram que a expressão desses genes estavam mais alterada em blastocistos produzidos utilizando fibroblastos de pele como doadores de núcleo quando comparados com embriões obtidos a partir de células do cúmulus (Min *et al.*, 2015). Essa alteração na expressão gênica talvez seja em decorrência de altos níveis de DNMTs advindas dos fibroblastos de pele, podendo indicar que são células mais

diferencias que células do cúmulo, ou que apresentam elevado nível de metilação em genes de desenvolvimento inicial em relação as células do cúmulo. Além disso, verificaram também que o trofoectoderma de embriões clones apresentou um perfil de expressão gênica de genes envolvidos no desenvolvimento inicial alterado em relação aos embriões produzidos *in vitro* (Min *et al.*, 2015). Kim *et al.* (2014), avaliando a expressão da enzima DNMT1 em suínos, encontraram menor nível de expressão nos clones em relação aos controles (Kim *et al.*, 2014), assim como Golding *et al.* (2011), que verificaram baixos níveis de transcrição de DNMT1 em embriões clones bovinos obtidos com fibroblastos sem nenhum tratamento no cultivo celular (Golding *et al.*, 2011). Por outro lado, quando realizada uma análise geral em fibroblastos de pele, verificamos redução nos níveis de mRNA em todos os tratamentos em relação ao grupo controle. Nossos dados podem indicar que o uso de substâncias que reduzem o nível de transcrição de enzimas envolvidas na metilação pode melhorar a reprogramação na fase inicial do desenvolvimento embrionário em clones, adequando corretamente o perfil de expressão gênica.

A enzima DNMT3A é altamente expressa em tecidos embrionários e desempenha importante função na metilação de genes *imprinted* (Kaneda *et al.*, 2004) e alterações no seu padrão de expressão pode prejudicar todo o período do desenvolvimento embrionário e fetal afetando até o período pós-parto (Jurkowska *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que a quantidade de mRNA para a DNMT3A não se alterou nas células tratadas em comparação às células controle (Figura 18). A enzima DNMT3B é especializada em metilar regiões específicas do genoma, como por exemplo sequências satélites (Okano *et al.*, 1999). Encontramos níveis iguais de mRNA para o gene DNMT3B em células do grupo tratado igual em relação ao controle (Figura 18). Um mecanismo regulador chave da expressão gênica é a metilação do DNA. A combinação de dados epigenéticos e de expressão gênica pode informar a relação subjacente entre esses processos (Dimas *et al.*, 2009). Para entender melhor a alteração da metilação do DNA, e seus efeitos na alteração da expressão gênica, realizamos análises a nível global em fibroblastos de pele. A análise de metilação global em embriões bovinos clones demonstrou que regiões de DNA repetitivo (Satélite I e alfa-Satélite) estão hipermetiladas nos embriões clones (Zhang *et al.*, 2016). Isto está de acordo com nossos dados de metilação global (Figura 7) e da região satélite I (Figura 10), que mostraram maior

nível de metilação nas células controle em comparação às células tratadas com procaína e SAH.

Em uma análise de *log fold change*, encontramos um perfil geral *downregulated* em células tratadas para as 3 DNMT estudadas (Figura 15). Além disso, quando comparamos os níveis de mRNA em conjunto das 3 enzimas DNMT, observamos que todos os tratamentos apresentaram uma redução geral na expressão gênica (Figuras 17 e 19). Considerando que a nível celular a concentração de enzimas envia sinais que influenciam a capacidade de um fator de transcrição de se ligar ao promotor gênico, recrutar RNA polimerase e favorecer a transcrição, o uso de agentes que agem interagindo com enzimas em sua forma ativa, impedindo sua atividade, pode acarretar em um acúmulo inicial dessas enzimas, o que num momento posterior induz a célula a reduzir a taxa de transcrição para esses genes em questão, o que poderia explicar nossos resultados, onde encontramos uma redução dos níveis de mRNA para as 3 DNMT.

Dentre as enzimas que participam do estabelecimento dos padrões epigenéticos, destacam-se também as enzimas da família *ten eleven translocation* (TET) que agem na desmetilação do DNA, sendo que a regulação da sua expressão é essencial para o desenvolvimento embrionário (Ito *et al.*, 2011; Rakoczy *et al.*, 2017). Ainda que bem discutida na literatura, a expressão de enzimas da família TET, em bovinos, é pouco relatada, especialmente sobre células que serão usadas com foco na clonagem por transferência nuclear. As enzimas TET oxidam a 5mC a 5 hidroximetilcitosina (5-hmC) e, em geral, 5-hmC é transitória no epigenoma, encontrando-se em níveis inferiores à 5 mC (Hahn *et al.*, 2014). No entanto, algumas células apresentam altos níveis de 5-hmC, como células-tronco embrionárias (Choi *et al.*, 2014) e neurônios (Kriaucionis e Heintz, 2009). Nossos resultados mostraram que os níveis de expressão de TET1, e TET2 foram semelhantes entre células tratadas e células controle (Figuras 20, 21 e 22). Por outro lado, quando analisamos de forma geral, todos os tratamentos conduzem de fato, a um aumento da quantidade de mRNA de TET3 em relação ao grupo controle (Figura 22).

Em camundongos, as células da massa celular interna do blastocisto apresentam níveis mais altos de 5-hmC em relação a tecidos adultos (Ruzov *et al.*, 2011), o que pode indicar uma atividade de controle da pluripotência e capacidade

de diferenciação. Ito et. al. (2010) fizeram *knockdown* de TET1 em embriões de camundongo e o resultado indicou maior expressão no trofoectoderma, em relação ao controle, bem como impediu a diferenciação de células embrionárias, mostrando que essa enzima pode ter um papel importante na diferenciação de células da massa celular interna (Ito *et al.*, 2010). Por outro lado, outras linhas de pesquisa sugerem que a perda de TET1 reduz os níveis de 5-hmC e não afeta a pluripotência das células-tronco e nem o desenvolvimento embrionário (Dawlaty *et al.*, 2011).

Dados aqui obtidos sobre expressão gênica para a enzima TET3 mostraram que células tratadas com procaína e SAH, apresentaram maior nível de transcrição dessa enzima em comparação com o grupo controle (Figura 22). Estudos com embriões bovinos mostraram que a enzima TET1 não participa da desmetilação no desenvolvimento inicial, sendo detectadas apenas TET2 e TET3, além da TET3 apresentar maior abundância em embriões (Page-Lariviere e Sirard, 2014) e ovócitos (Wossidlo *et al.*, 2011). Analisando nossos resultados e dados da literatura, acreditamos que a enzima TET3 desempenhe um papel importante na reprogramação do epigenoma de células diferenciadas, visto que estudos já mostraram que as enzimas TET1 e TET 2 parecem estar fortemente relacionadas ao desenvolvimento de células tronco e manutenção da pluripotência (Ito *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2011; Walter, 2011).

Nossos resultados mostraram a presença de transcritos para o gene OCT4 em todos os tratamentos, mesmo fibroblastos do grupo controle, embora não se esperasse expressão de genes relacionados à pluripotência, em consequência de seu status altamente diferenciado. Esse resultado pode ser explicado pelos dados de Pan et al. (2015) a partir de sua avaliação em fibroblastos de pele que mostrou a presença de uma população heterogênea de fibroblastos contendo células-tronco multipotentes (Pan *et al.*, 2015). Além disso, não encontramos diferenças significativas nos níveis de transcritos de OCT4 entre os tratamentos, sugerindo que as alterações moleculares induzidas pela procaína e SAH não foram suficientes para alterar a expressão deste gene. Como o controle da expressão gênica é um mecanismo que envolve muitos fatores, como metilação do DNA, modificações de histonas e microRNAs, apenas a desmetilação do DNA induzida pela procaína e SAH pode não ter sido suficiente para alterar a expressão de OCT4.



## **6. Conclusão**

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados demonstraram que o uso das substâncias desmetilantes de DNA, SAH e procaína não afetou o crescimento e morfologia celulares, porém apresentou indícios de desprogramação epigenética de células, por meio de redução da metilação global e específica do DNA. Tais dados podem ser explicados pela diminuição da transcrição dos genes das enzimas DNMTs. Analisando a quantidade relativa de mRNA para todos os tratamentos, as enzimas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B apresentaram redução em seus níveis. Além disso, quando estudamos a transcrição gênica de enzima da família TET, foi detectado que em todos os tratamentos, houve aumento nos níveis de mRNA TET3.

## **7. Considerações Finais**

Sugerimos que a estratégia aqui abordada pode ser aplicada com propósito de melhorar as taxas da clonagem, bem como para pesquisas em humanos, com foco em câncer e doenças degenerativas com base epigenética.

Em síntese, o estudo aqui desenvolvido propõe o uso de agentes desmetilantes de DNA como perspectiva para aplicações na melhoria da clonagem animal e pesquisas em células humanas, bem como tratamento de linhagens carcinogênicas visto que alterações epigenéticas estão presentes em todos os cânceres humanos e envolvem metilação do DNA, alterações pós-traducionais de histonas, remodeladores de cromatina, microRNAs e outros componentes da cromatina. Terapias epigenéticas, em que o objetivo é reverter essas mudanças, já são padrão de tratamento para distúrbio pré-leucêmico e um tipo de linfoma. A aplicação de terapias epigenéticas no tratamento de tumores sólidos também está surgindo como via terapêutica viável.

## 8. Bibliografia

ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. 4. edition. New York: Garland Science, 2002. xxxiv, 1463, 86 sider ISBN 0815332181 ((hardbound)) 0815340729 ((pbk)).

ALTUNDAG, O.; ALTUNDAG, K.; GUNDUZ, M. DNA methylation inhibitor, procainamide, may decrease the tamoxifen resistance by inducing overexpression of the estrogen receptor beta in breast cancer patients. *Med Hypotheses*, v. 63, n. 4, p. 684-7, 2004. ISSN 0306-9877 (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.017>

0306-9877 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325017> >.

AZEVEDO, J. M. Impactos do uso da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos. p.102 p. 2012. (Dissertação de Mestrado)

BEEBE, L. F.; MCILFATRICK, S. J.; NOTTLE, M. B. Cytochalasin B and trichostatin a treatment postactivation improves in vitro development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cloning Stem Cells*, v. 11, n. 4, p. 477-82, Dec 2009. ISSN 1557-7457 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1089/clo.2009.0029>

1536-2302 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780698> >.

BELTRAN, A. S. et al. Reprogramming epigenetic silencing: artificial transcription factors synergize with chromatin remodeling drugs to reactivate the tumor suppressor mammary serine protease inhibitor. *Mol Cancer Ther*, v. 7, n. 5, p. 1080-90, May 2008. ISSN 1535-7163 (Print)  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0526>

1535-7163 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483297> >.

BIASE, F. H. et al. Massive dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned cattle conceptus and maternal endometrium. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 113, n. 51, p. 14492-14501, Dec 20 2016. ISSN 1091-6490 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1520945114>

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940919> >.

BIRD, A. The essentials of DNA methylation. Cell, v. 70, n. 1, p. 5-8, Jul 10 1992. ISSN 0092-8674 (Print)  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90526-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90526-I)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1377983> >.

DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 1 2002. ISSN 0890-9369 (Print)  
<https://doi.org/10.1101/gad.947102>

0890-9369 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782440> >.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. Molecular reproduction and development, v. 49, n. 1, p. 29-36, Jan 1998. ISSN 1040-452X (Print)  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199801\)49:1<29::AID-MRD4>3.3.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<29::AID-MRD4>3.3.CO;2-T)

1040-452X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406193> >.

BOURC'HIS, D. et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, v. 11, n. 19, p. 1542-6, Oct 2 2001. ISSN 0960-9822 (Print)  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00480-8)

0960-9822 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591324> >.

BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*, v. 134, n. 19, p. 3401-11, Oct 2007. ISSN 0950-1991 (Print)  
<https://doi.org/10.1242/dev.001107>

0950-1991 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715177> >.

BRUNMEIR, R.; LAGGER, S.; SEISER, C. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. *The International journal of developmental biology*, v. 53, n. 2-3, p. 275-89, 2009. ISSN 1696-3547 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082649rb>

0214-6282 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412887> >.

BUCZINSKI, S. et al. Ultrasonographic fetal well-being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: a preliminary study on 10 fetuses and calves. *Can Vet J*, v. 50, n. 3, p. 261-9, Mar 2009. ISSN 0008-5286 (Print)

0008-5286 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436477> >.

CAMPBELL, K. H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. Cloning, v. 1, n. 1, p. 3-15, 1999. ISSN 1520-4553 (Print)  
<https://doi.org/10.1089/15204559950020058>

1520-4553 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16218826> >.

CAMPBELL, K. H. et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. Theriogenology, v. 68 Suppl 1, p. S214-31, Sep 1 2007. ISSN 0093-691X (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.059>

0093-691X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610946> >.

CAMPBELL, K. H. et al. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Reviews of reproduction, v. 1, n. 1, p. 40-6, Jan 1996. ISSN 1359-6004 (Print)  
<https://doi.org/10.1530/revreprod/1.1.40>

1359-6004 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414437> >.

CANTONI, G. L. THE NATURE OF THE ACTIVE METHYL DONOR FORMED ENZYMATICALLY FROM L-METHIONINE AND ADENOSINETRIPHOSPHATE<sup>1,2</sup>. J. Am. Chem. Soc, n. 11, p. 2942-2943, 1952  
1952.  
<https://doi.org/10.1021/ja01131a519>

CASTELLANO, S. et al. Constrained analogues of procaine as novel small molecule inhibitors of DNA methyltransferase-1. *J Med Chem*, v. 51, n. 7, p. 2321-5, Apr 10 2008. ISSN 0022-2623 (Print)  
<https://doi.org/10.1021/jm7015705>

0022-2623 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345608> >.

CASTRO, R. et al. Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med (Berl)*, v. 83, n. 10, p. 831-6, Oct 2005. ISSN 0946-2716 (Print)  
<https://doi.org/10.1007/s00109-005-0679-8>

0946-2716 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976919> >.

CASTRO, R. et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem*, v. 49, n. 8, p. 1292-6, Aug 2003. ISSN 0009-9147 (Print)  
<https://doi.org/10.1373/49.8.1292>

0009-9147 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881445> >.

CHENG, X. et al. Functional analysis of bovine Nramp1 and production of transgenic cloned embryos in vitro. *Zygote*, v. 23, n. 1, p. 83-92, Feb 2015. ISSN 1469-8730 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1017/S096719941300021X>

0967-1994 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683995> >.

CHESNE, P. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, v. 20, n. 4, p. 366-9, Apr 2002. ISSN 1087-0156 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/nbt0402-366>

1087-0156 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923842> >.

CHOI, I. et al. 5-hydroxymethylcytosine represses the activity of enhancers in embryonic stem cells: a new epigenetic signature for gene regulation. *BMC Genomics*, v. 15, p. 670, Aug 9 2014. ISSN 1471-2164 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-670>

1471-2164 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106691> >.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, v. 21, n. 35, p. 5483-95, Aug 12 2002. ISSN 0950-9232 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699>

0950-9232 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154409> >.

CIBELLI, J. B. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, v. 280, n. 5367, p. 1256-8, May 22 1998. ISSN 0036-8075 (Print)  
<https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1256>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596577> >.



CORNACCHIA, E. et al. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol*, v. 140, n. 7, p. 2197-200, Apr 1988. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258330> >.

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*, v. 84, n. 4, p. 463-76, Aug 2006. ISSN 0829-8211 (Print)  
<https://doi.org/10.1139/o06-090>

0829-8211 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936820> >.

DAWLATY, M. M. et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell*, v. 9, n. 2, p. 166-75, Aug 5 2011. ISSN 1875-9777 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.010>

1875-9777 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816367> >.

DEAN, W. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 24, p. 13734-8, Nov 20 2001. ISSN 0027-8424 (Print)  
<https://doi.org/10.1073/pnas.241522698>

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717434> >.

DEL ARCO, A.; IZQUIERDO, M. De novo methylation causes a tissue-specific polymorphic EcoRI pattern at the human epidermal growth factor receptor gene. *Biochem J*, v. 292 ( Pt 2), p. 591-5, Jun 1 1993. ISSN 0264-6021 (Print)  
<https://doi.org/10.1042/bj2920591>

0264-6021 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099283> >.

DI CERA, E. Modifications of nuclear DNA and its regulatory proteins. Preface. *Prog Mol Biol Transl Sci*, v. 99, p. xi-xii, 2011. ISSN 1878-0814 (Electronic)

1877-1173 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238932> >.

DIMAS, A. S. et al. Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. *Science*, v. 325, n. 5945, p. 1246-50, Sep 4 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1126/science.1174148>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644074> >.

DOZORTSEV, D. et al. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod*, v. 10, n. 2, p. 403-7, Feb 1995. ISSN 0268-1161 (Print)  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135952>

0268-1161 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7769071> >.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, v. 429, n. 6990, p. 457-63, May 27 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

<https://doi.org/10.1038/nature02625>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164071> >.

EILERTSEN, K. J. et al. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, v. 98, n. 1-2, p. 129-46, Mar 2007. ISSN 0378-4320 (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.019>

0378-4320 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17166676> >.

FAGUNDES, N. S. et al. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Mol Hum Reprod*, v. 17, n. 2, p. 85-91, Feb 2011. ISSN 1460-2407 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaq075>

1360-9947 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833870> >.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 178-91, Jan 7 2006. ISSN 0093-691X (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.022>

0093-691X (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266745> >.

FEINBERG, A. P. Methylation meets genomics. *Nat Genet*, v. 27, n. 1, p. 9-10, Jan 2001. ISSN 1061-4036 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/83825>

1061-4036 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137987> >.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, v. 4, n. 2, p. 143-53, Feb 2004. ISSN 1474-175X (Print)  
<https://doi.org/10.1038/nrc1279>

1474-175X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732866> >.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherit Metab Dis*, v. 20, n. 2, p. 270-85, Jun 1997. ISSN 0141-8955 (Print)

0141-8955 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211199> >.

FULKA, J., JR. et al. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends in biotechnology*, v. 22, n. 6, p. 279-83, Jun 2004. ISSN 0167-7799 (Print)  
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(04\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(04)00107-6)

0167-7799 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158056> >.

GALLI, C. et al. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 138-51, Jan 1 2014. ISSN 1879-3231 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.008>

0093-691X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24274418> >.

GAO, Z. et al. Procaine and procainamide inhibit the Wnt canonical pathway by promoter demethylation of WIF-1 in lung cancer cells. *Oncol Rep*, v. 22, n. 6, p. 1479-84, Dec 2009. ISSN 1791-2431 (Electronic)  
[https://doi.org/10.3892/or\\_00000590](https://doi.org/10.3892/or_00000590)

1021-335X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885602> >.

GARCIA-PEREZ, J. L.; WIDMANN, T. J.; ADAMS, I. R. The impact of transposable elements on mammalian development. *Development*, v. 143, n. 22, p. 4101-4114, Nov 15 2016. ISSN 1477-9129 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1242/dev.132639>

0950-1991 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875251> >.

GOLDING, M. C. et al. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev*, v. 78, n. 5, p. 306-17, May 2011. ISSN 1098-2795 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/mrd.21306>

1040-452X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480430> >.

GOMEZ, M. C. et al. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and stem cells*, v. 6, n. 3, p. 247-58, 2004. ISSN 1536-2302 (Print)  
<https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.247>

1536-2302 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671671> >.

GREEN, A. L.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. *Biology of reproduction*, v. 77, n. 3, p. 395-406, Sep 2007. ISSN 0006-3363 (Print)

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058164>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522076> >.

GUIBERT, S.; FORNE, T.; WEBER, M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*, v. 22, n. 4, p. 633-41, Apr 2012. ISSN 1549-5469 (Electronic)

<https://doi.org/10.1101/gr.130997.111>

1088-9051 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357612> >.

GURDON, J. B.; COLMAN, A. The future of cloning. *Nature*, v. 402, n. 6763, p. 743-6, Dec 16 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

<https://doi.org/10.1038/45429>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617195> >.

HAHN, M. A.; SZABO, P. E.; PFEIFER, G. P. 5-Hydroxymethylcytosine: a stable or transient DNA modification? *Genomics*, v. 104, n. 5, p. 314-23, Nov 2014. ISSN 1089-8646 (Electronic)

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.015>

0888-7543 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25181633> >.

HASHIMOTO, H. et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*, v. 40, n. 11, p. 4841-9, Jun 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks155>

0305-1048 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362737> >.

HE, Y. F. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, v. 333, n. 6047, p. 1303-7, Sep 2 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1126/science.1210944>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21817016> >.

HERMES, M. et al. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp Cell Res*, v. 294, n. 2, p. 325-34, Apr 1 2004. ISSN 0014-4827 (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.001>

0014-4827 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023523> >.

HEYMAN, Y. et al. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning and stem cells*, v. 6, n. 2, p. 111-20, 2004. ISSN 1536-2302 (Print)  
<https://doi.org/10.1089/1536230041372364>

1536-2302 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15268784> >.

HILL, J. R. et al. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Animal reproduction science*, v. 67, n. 1-2, p. 17-26, Jul 3 2001. ISSN 0378-4320 (Print)

[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00106-3)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408110> >.

HOSSEINI, S. M. et al. Chemically assisted somatic cell nuclear transfer without micromanipulator in the goat: effects of demecolcine, cytochalasin-B, and MG-132 on the efficiency of a manual method of oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette. *Animal reproduction science*, v. 158, p. 11-8, Jul 2015. ISSN 1873-2232 (Electronic)

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.002>

0378-4320 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956201> >.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, v. 466, n. 7310, p. 1129-33, Aug 26 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)

<https://doi.org/10.1038/nature09303>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639862> >.

ITO, S. et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, v. 333, n. 6047, p. 1300-3, Sep 2 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)

<https://doi.org/10.1126/science.1210597>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778364> >.



JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, v. 33 Suppl, p. 245-54, Mar 2003. ISSN 1061-4036 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/ng1089>

1061-4036 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610534> >.

JAFARI, N. et al. Genomic integrity of ground-state pluripotency. *J Cell Biochem*, v. 119, n. 12, p. 9781-9789, Dec 2018. ISSN 1097-4644 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/jcb.27296>

0730-2312 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30171711> >.

JANSSEN, A.; COLMENARES, S. U.; KARPEN, G. H. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 34, p. 265-288, Oct 6 2018. ISSN 1530-8995 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>

1081-0706 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30044650> >.

JEON, B. G. et al. S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, v. 135, n. 6, p. 815-28, Jun 2008. ISSN 1741-7899 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1530/REP-07-0442>

1470-1626 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304987> >.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1068-70, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075 (Print)  
<https://doi.org/10.1126/science.1063852>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498573> >.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, v. 12, n. 2, p. 206-22, Jan 24 2011. ISSN 1439-7633 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201000195>

1439-7633 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243710> >.

KANEDA, M. et al. Role of de novo DNA methyltransferases in initiation of genomic imprinting and X-chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 69, p. 125-9, 2004. ISSN 0091-7451 (Print)  
<https://doi.org/10.1101/sqb.2004.69.125>

0091-7451 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16117641> >.

KANG, Y. K. et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature genetics*, v. 28, n. 2, p. 173-7, Jun 2001. ISSN 1061-4036 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/88903>

1061-4036 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381267> >.

KANO, F. et al. MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic *Xenopus* extracts. *J Cell Biol*, v. 149, n. 2, p. 357-68, Apr 17 2000. ISSN 0021-9525 (Print)

<https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.357>

0021-9525 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769028> >.

KATO, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v. 282, n. 5396, p. 2095-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075 (Print)  
<https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2095>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851933> >.

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 29, p. 8874-8, Jul 21 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1501718112>

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195770> >.

KEEFER, C. L. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of reproduction*, v. 66, n. 1, p. 199-203, Jan 2002. ISSN 0006-3363 (Print)  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.199>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751283> >.

KIKYO, N.; WOLFFE, A. P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *Journal of cell science*, v. 113 ( Pt 1), p. 11-20, Jan 2000. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591621> >.

KIM, S. Y. et al. Siberian Sturgeon Oocyte Extract Induces Epigenetic Modifications of Porcine Somatic Cells and Improves Developmental Competence of SCNT Embryos. *Asian-Australas J Anim Sci*, v. 27, n. 2, p. 266-77, Feb 2014. ISSN 1011-2367 (Print)  
<https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13699>

1011-2367 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049951> >.

KO, M. et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, v. 468, n. 7325, p. 839-43, Dec 9 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/nature09586>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057493> >.

KOH, K. P. et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, v. 8, n. 2, p. 200-13, Feb 4 2011. ISSN 1875-9777 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.008>

1875-9777 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295276> >.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, v. 324, n. 5929, p. 929-30, May 15 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1126/science.1169786>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372393> >.

KUBOTA, C. et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 3, p. 990-5, Feb 1 2000. ISSN 0027-8424 (Print)  
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.990>

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655472> >.

LACERDA, V. A. M. Impactos do uso da procaína como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília., p. 105 p., 2010 2010.

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, v. 11, n. 3, p. 191-203, Mar 2010. ISSN 1471-0064 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/nrg2732>

1471-0056 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20125086> >.

LEE, B. C. et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v. 436, n. 7051, p. 641, Aug 4 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/436641a>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079832> >.

LEE, J. et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, v. 129, n. 8, p. 1807-17, Apr 2002. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934847> >.

LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol*, v. 157, n. 4, p. 603-13, May 13 2002. ISSN 0021-9525 (Print)  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200202052>

0021-9525 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011110> >.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, v. 18, n. 11, p. 1427-31, Nov 2002. ISSN 1367-4803 (Print)  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>

1367-4803 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112> >.

LI, Y. C. et al. Procaine is a specific DNA methylation inhibitor with anti-tumor effect for human gastric cancer. *J Cell Biochem*, v. 119, n. 2, p. 2440-2449, Feb 2018. ISSN 1097-4644 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/jcb.26407>

0730-2312 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28926119> >.

LIANG, S. et al. Scriptaid Treatment Decreases DNA Methyltransferase 1 Expression by Induction of MicroRNA-152 Expression in Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0134567, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134567>

1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261994> >.

LIEBER, C. S.; PACKER, L. S-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects--an introduction. *Am J Clin Nutr*, v. 76, n. 5, p. 1148S-50S, Nov 2002. ISSN 0002-9165 (Print)  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.1148S>

0002-9165 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12418492> >.

LIU, Z. et al. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, v. 172, n. 4, p. 881-887 e7, Feb 8 2018. ISSN 1097-4172 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>

0092-8674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29395327> >.

LOENARZ, C.; SCHOFIELD, C. J. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol*, v. 4, n. 3, p. 152-6, Mar 2008. ISSN 1552-4469 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/nchembio0308-152>

1552-4450 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18277970> >.

LUND, A. H.; VAN LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev*, v. 18, n. 19, p. 2315-35, Oct 1 2004. ISSN 0890-9369 (Print)  
<https://doi.org/10.1101/gad.1232504>

0890-9369 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466484> >.

LUO, B. et al. Effects of histone acetylation status on the early development of in vitro porcine transgenic cloned embryos. *Cell Reprogram*, v. 17, n. 1, p. 41-8, Feb 2015. ISSN 2152-4998 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1089/cell.2014.0041>

2152-4971 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393500> >.

MAALOUF, W. E.; ALBERIO, R.; CAMPBELL, K. H. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics*, v. 3, n. 4, p. 199-209, Jul-Aug 2008. ISSN 1559-2308 (Electronic)  
<https://doi.org/10.4161/epi.3.4.6497>

1559-2294 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698155> >.

MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev*, v. 81, n. 2, p. 126-40, Feb 2014. ISSN 1098-2795 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/mrd.22220>

1040-452X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23893518> >.

MANN, M. R. et al. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, v. 69, n. 3, p. 902-14, Sep 2003. ISSN 0006-3363 (Print)  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017293>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748125> >.



MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*, v. 11, n. 4, p. 285-96, Apr 2010. ISSN 1471-0064 (Electronic)

<https://doi.org/10.1038/nrg2752>

1471-0064 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300089> >.

MAYER, W. et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, v. 403, n. 6769, p. 501-2, Feb 3 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

<https://doi.org/10.1038/35000656>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676950> >.

MCNULTY, S. M.; SULLIVAN, B. A. Alpha satellite DNA biology: finding function in the recesses of the genome. *Chromosome Res*, v. 26, n. 3, p. 115-138, Sep 2018. ISSN 1573-6849 (Electronic)

<https://doi.org/10.1007/s10577-018-9582-3>

0967-3849 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29974361> >.

MEIRELLES, F. V. et al. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reprod Fertil Dev*, v. 22, n. 1, p. 88-97, 2010. ISSN 1031-3613 (Print)

<https://doi.org/10.1071/RD09229>

1031-3613 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003849> >.

MELLO, M. R. et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de*

pesquisas medicas e biologicas, v. 36, n. 11, p. 1485-9, Nov 2003. ISSN 0100-879X (Print)

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003001100006>

0100-879X (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576903> >.

MENDONCA ADOS, S. et al. Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. PLoS One, v. 10, n. 10, p. e0142072, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142072>

1932-6203 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517264> >.

MIN, B. et al. Transcriptomic Features of Bovine Blastocysts Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. G3 (Bethesda), v. 5, n. 12, p. 2527-38, Sep 3 2015. ISSN 2160-1836 (Electronic)

<https://doi.org/10.1534/g3.115.020016>

2160-1836 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342001> >.

MIYAZAKI, S. et al. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. Developmental biology, v. 158, n. 1, p. 62-78, Jul 1993. ISSN 0012-1606 (Print)

<https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1168>

0012-1606 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392472> >.

MOLYNEAUX, K. A. et al. Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Gene Expr Patterns*, v. 4, n. 2, p. 167-81, Mar 2004. ISSN 1567-133X (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.modgep.2003.09.002>

1567-133X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161097> >.

MORGAN, H. D. et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, v. 14 Spec No 1, p. R47-58, Apr 15 2005. ISSN 0964-6906 (Print)  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>

0964-6906 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809273> >.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 47 Suppl 5, p. 2-10, Aug 2012a. ISSN 1439-0531 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x>

0936-6768 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913555> >.

\_\_\_\_\_. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim*, v. 47 Suppl 5, p. 2-10, Aug 2012b. ISSN 1439-0531 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x>

0936-6768 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913555> >.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, v. 99, n. 3, p. 247-57, Oct 29 1999. ISSN 0092-8674 (Print)

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141> >.

PAGE-LARIVIERE, F.; SIRARD, M. A. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. *Cell Reprogram*, v. 16, n. 1, p. 40-53, Feb 2014. ISSN 2152-4998 (Electronic)

<https://doi.org/10.1089/cell.2013.0055>

2152-4971 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459992> >.

PAN, S. et al. Application of a novel population of multipotent stem cells derived from skin fibroblasts as donor cells in bovine SCNT. *PLoS One*, v. 10, n. 1, p. e0114423, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114423>

1932-6203 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25602959> >.

PANAYIOTIDIS, M. I. et al. Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutat Res*, v. 674, n. 1-2, p. 23-30, Mar 31 2009. ISSN 0027-5107 (Print)

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.006>

0027-5107 (Linking). Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010443> >.

PAPIN, C. et al. Combinatorial DNA methylation codes at repetitive elements. *Genome Res*, v. 27, n. 6, p. 934-946, Jun 2017. ISSN 1549-5469 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1101/gr.213983.116>

1088-9051 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348165> >.

PARASHAR, S. et al. S-adenosylmethionine blocks osteosarcoma cells proliferation and invasion in vitro and tumor metastasis in vivo: therapeutic and diagnostic clinical applications. *Cancer Med*, v. 4, n. 5, p. 732-44, May 2015. ISSN 2045-7634 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/cam4.386>

2045-7634 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619880> >.

PATRA, S. K.; BETTUZZI, S. Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation. *Biochemistry (Mosc)*, v. 74, n. 6, p. 613-9, Jun 2009. ISSN 1608-3040 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1134/S0006297909060042>

0006-2979 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19645665> >.

PERRIN, D. et al. Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta. *Oncogene*, v. 26, n. 17, p. 2518-24, Apr 12 2007. ISSN 0950-9232 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210039>

0950-9232 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043645> >.

PEZER, Z. et al. Satellite DNA-mediated effects on genome regulation. *Genome Dyn*, v. 7, p. 153-69, 2012. ISSN 1660-9263 (Print)  
<https://doi.org/10.1159/000337116>

1660-9263 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22759818> >.

POLEJAEVA, I. A. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v. 407, n. 6800, p. 86-90, Sep 7 2000. ISSN 0028-0836 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/35024082>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993078> >.

PRATHER, R. S. et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of reproduction*, v. 37, n. 4, p. 859-66, Nov 1987. ISSN 0006-3363 (Print)  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod37.4.859>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3689854> >.

RAKOCZY, J. et al. Dynamic expression of TET1, TET2, and TET3 dioxygenases in mouse and human placentas throughout gestation. *Placenta*, v. 59, p. 46-56, Nov 2017. ISSN 1532-3102 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.09.008>

0143-4004 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29108636> >.

RAZIN, A.; CEDAR, H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, n. 7, p. 2725-8, Jul 1977. ISSN 0027-8424 (Print)

<https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2725>

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/268622> >.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1089-93, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075 (Print)

<https://doi.org/10.1126/science.1063443>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498579> >.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature reviews. Genetics*, v. 2, n. 1, p. 21-32, Jan 2001. ISSN 1471-0056 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/35047554>

1471-0056 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11253064> >.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, v. 174, n. 3, p. 341-8, Jan 31 2006. ISSN 1488-2329 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1503/cmaj.050774>

0820-3946 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446478> >.

RUZOV, A. et al. Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res*, v. 21, n. 9, p. 1332-42, Sep 2011. ISSN 1748-7838 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.113>

1001-0602 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747414> >.

SABIT, H. et al. Procaine Induces Epigenetic Changes in HCT116 Colon Cancer Cells. *Genet Res Int*, v. 2016, p. 8348450, 2016. ISSN 2090-3154 (Print)  
<https://doi.org/10.1155/2016/8348450>

2090-3162 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27843649> >.

SAINI, M. et al. Treatment of Donor Cells and Reconstructed Embryos with a Combination of Trichostatin-A and 5-aza-2'-Deoxycytidine Improves the Developmental Competence and Quality of Buffalo Embryos Produced by Handmade Cloning and Alters Their Epigenetic Status and Gene Expression. *Cell Reprogram*, v. 19, n. 3, p. 208-215, Jun 2017. ISSN 2152-4998 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1089/cell.2016.0061>

2152-4971 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28463020> >.

SEGURA-PACHECO, B. et al. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 5, p. 1596-603, May 2003. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738711> >.

SHEMER, R. et al. Tissue-specific methylation patterns and expression of the human apolipoprotein AI gene. *J Biol Chem*, v. 265, n. 2, p. 1010-5, Jan 15 1990. ISSN 0021-9258 (Print)



0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688547> >.

SHI, D. et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, v. 77, n. 2, p. 285-91, Aug 2007a. ISSN 0006-3363 (Print)  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475931> >.

\_\_\_\_\_. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology of reproduction*, v. 77, n. 2, p. 285-91, Aug 2007b. ISSN 0006-3363 (Print)  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>

0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475931> >.

SHIH, C. C. et al. Procainamide Inhibits DNA Methylation and Alleviates Multiple Organ Dysfunction in Rats with Endotoxic Shock. *PLoS One*, v. 11, n. 9, p. e0163690, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163690>

1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27661616> >.

SHIN, T. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v. 415, n. 6874, p. 859, Feb 21 2002. ISSN 0028-0836 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/nature723>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859353> >.

SIGALOTTI, L. et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol*, v. 212, n. 2, p. 330-44, Aug 2007. ISSN 0021-9541 (Print)  
<https://doi.org/10.1002/jcp.21066>

0021-9541 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17458893> >.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. *Blood*, v. 93, n. 12, p. 4059-70, Jun 15 1999. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361102> >.

SMITH, L. C. et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod Domest Anim*, v. 47 Suppl 4, p. 107-14, Aug 2012. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827358> >.

SU, J. et al. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Pineal Res*, v. 59, n. 4, p. 455-68, Nov 2015. ISSN 1600-079X (Electronic)  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12275>

0742-3098 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331949> >.

SUSKO-PARRISH, J. L. et al. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Developmental biology*, v. 166, n. 2, p. 729-39, Dec 1994. ISSN 0012-1606 (Print)

<https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1351>

0012-1606 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813790> >.

TADA, M. et al. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatology international*, v. 1, n. 3, p. 355-64, Sep 2007. ISSN 1936-0533 (Print)

<https://doi.org/10.1007/s12072-007-9014-5>

1936-0533 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669330> >.

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, v. 324, n. 5929, p. 930-5, May 15 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)

<https://doi.org/10.1126/science.1170116>

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372391> >.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 30 2007. ISSN 0092-8674 (Print)

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

0092-8674 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408> >.

TROUNSON, A.; PERA, M. Potential benefits of cell cloning for human medicine. *Reproduction, fertility, and development*, v. 10, n. 1, p. 121-5, 1998. ISSN 1031-3613 (Print)

<https://doi.org/10.1071/R98042>

1031-3613 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727602> >.

ULLOA, S. M. et al. Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. *Zygote*, v. 23, n. 3, p. 367-77, Jun 2015. ISSN 1469-8730 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1017/S0967199413000658>

0967-1994 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423448> >.

UNGERER, M.; KNEZOVICH, J.; RAMSAY, M. In utero alcohol exposure, epigenetic changes, and their consequences. *Alcohol Res*, v. 35, n. 1, p. 37-46, 2013. ISSN 2168-3492 (Print)

2168-3492 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313163> >.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Animal reproduction science*, v. 92, n. 3-4, p. 211-30, May 2006. ISSN 0378-4320 (Print)  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.12.001>

0378-4320 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406426> >.

VALINLUCK, V.; SOWERS, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, v. 67, n. 3, p. 946-50, Feb 1 2007. ISSN 0008-5472 (Print)  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>

0008-5472 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283125> >.

VERMA, G. et al. Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls.  
Journal of animal science and biotechnology, v. 6, p. 43, 2015. ISSN 1674-9782  
(Print)  
<https://doi.org/10.1186/s40104-015-0043-y>

1674-9782 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473031> >.

VILLAR-GAREA, A. et al. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-  
inhibitory effects in human cancer cells. Cancer research, v. 63, n. 16, p. 4984-9,  
Aug 15 2003. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941824> >.

WAKAYAMA, T. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes  
injected with cumulus cell nuclei. Nature, v. 394, n. 6691, p. 369-74, Jul 23 1998.  
ISSN 0028-0836 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/28615>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690471> >.

WALTER, J. An epigenetic Tet a Tet with pluripotency. Cell Stem Cell, v. 8, n. 2, p.  
121-2, Feb 4 2011. ISSN 1875-9777 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.009>

1875-9777 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295264> >.

WANG, D. et al. Faithful expression of imprinted genes in donor cells of SCNT cloned pigs. *FEBS Lett*, v. 589, n. 16, p. 2066-72, Jul 22 2015. ISSN 1873-3468 (Electronic)

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.016>

0014-5793 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119041> >.

WATANABE, D. et al. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*, v. 118, n. 1-2, p. 187-90, Oct 2002. ISSN 0925-4773 (Print)

[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00242-3)

0925-4773 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351185> >.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v. 320, n. 6057, p. 63-5, Mar 6-12 1986. ISSN 0028-0836 (Print)

<https://doi.org/10.1038/320063a0>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3951549> >.

WILMUT, I. Cloning for medicine. *Scientific American*, v. 279, n. 6, p. 58-63, Dec 1998. ISSN 0036-8733 (Print)

<https://doi.org/10.1038/scientificamerican1298-58>

0036-8733 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9828465> >.

WILMUT, I.; BAI, Y.; TAYLOR, J. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 370, n. 1680, p. 20140366, Oct 19 2015. ISSN 1471-2970 (Electronic)

<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0366>

0962-8436 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416677> >.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, v. 385, n. 6619, p. 810-3, Feb 27 1997. ISSN 0028-0836 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/385810a0>

0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039911> >.

WOSSIDLO, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. Nat Commun, v. 2, p. 241, 2011. ISSN 2041-1723 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/ncomms1240>

2041-1723 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407207> >.

WU, F. et al. Procaine stimulates aquaporin5 expression in human salivary gland ductal cells via the suppression of DNA methyltransferase1. Mol Med Rep, v. 17, n. 6, p. 7996-8002, Jun 2018. ISSN 1791-3004 (Electronic)  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8821>

1791-2997 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29620185> >.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. Nat Rev Genet, May 30 2017. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28555658> >.

XIE, Z. et al. MET Inhibition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer*, v. 7, n. 10, p. 1205-14, 2016. ISSN 1837-9664 (Print)  
<https://doi.org/10.7150/jca.14604>

1837-9664 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390595> >.

YANG, X. et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature genetics*, v. 39, n. 3, p. 295-302, Mar 2007. ISSN 1061-4036 (Print)  
<https://doi.org/10.1038/ng1973>

1061-4036 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325680> >.

YI, P. et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*, v. 275, n. 38, p. 29318-23, Sep 22 2000. ISSN 0021-9258 (Print)  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002725200>

0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884384> >.

YU, B. et al. Genome-wide, Single-Cell DNA Methylation Reveals Increased Non-CpG Methylation during Human Oocyte Maturation. *Stem Cell Reports*, v. 9, n. 1, p. 397-407, Jul 11 2017. ISSN 2213-6711 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.026>

2213-6711 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648898> >.



ZACHARIAS, W.; KOOPMAN, W. J. Lupus-inducing drugs alter the structure of supercoiled circular DNA domains. *Arthritis and rheumatism*, v. 33, n. 3, p. 366-74, Mar 1990. ISSN 0004-3591 (Print)  
<https://doi.org/10.1002/art.1780330309>

0004-3591 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690542> >.

ZHANG, H. et al. Combination of S-adenosylhomocysteine and scriptaid, a non-toxic epigenetic modifying reagent, modulates the reprogramming of bovine somatic-cell nuclear transfer embryos. *Molecular reproduction and development*, v. 81, n. 1, p. 87-97, Jan 2014. ISSN 1098-2795 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1002/mrd.22287>

1040-452X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347442> >.

ZHANG, S. et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. *Sci Rep*, v. 6, p. 30345, Jul 26 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)  
<https://doi.org/10.1038/srep30345>

2045-2322 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27456302> >.

## 9. Anexos

### Anexo 1

#### Extração de DNA - DNeasy Blood & Tissue Kit

Notas antes de iniciar protocolo:

- Realizar todos os passos de centrifugação à temperatura ambiente (15-25° C).
- Redissolver qualquer precipitado nos tampões AL e ATL.
- Adicionar etanol aos tampões AW1 e AW2 concentrados.
- Deixar o *pellet* de células à temperatura ambiente.
- Pré-aqueça banho maria a 56° C.

1. Centrifugar o máximo de  $5 \times 10^6$  das células por 5 min a 300 g
2. Ressuspender em 200  $\mu$ L de PBS e adicionar 20  $\mu$ L de proteinase K.
3. Adicionar 200  $\mu$ L de tampão AL. Misturar bem por vortex. Incubar amostras a 56° C durante 10 min.
4. Adicionar 200  $\mu$ L de etanol (96-100%). Misturar bem por vortex.
5. Pipetar a mistura para uma coluna de centrifugação DNeasy mini acoplada em tubo de coleta. Centrifugar a 6000 g durante 1 min. Descartar tubo coleta.
6. Colocar a coluna de centrifugação em novo tubo de coleta. Adicionar 500  $\mu$ L tampão AW1. Centrifugar durante 1 min 6000 g. Descartar tubo de coleta.
7. Colocar a coluna de centrifugação em novo tubo de coleta, adicione 500  $\mu$ L de tampão AW2 e centrifugar durante 3 min a 20.000 g. Descartar tubo de coleta.
8. Transferir a coluna de centrifugação para um novo tubo de 1,5 mL ou 2mL (tubo final identificado).
9. Eluir o DNA em 200  $\mu$ L de tampão AE, adicionado bem ao centro da membrana. Incubar durante 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 min a 6000 g.

## Anexo 2

### Extração de DNA de Embrião - Lise Celular

1. Retirar as amostras do freezer e descongelar em gelo.
2. *Spin* nos tubos para decantar material.
3. Colocar todos os embriões em tubo do tipo eppendorf 0,2 mL com pipeta P10 (*pools* de 4 embriões).
4. *Spin* (6000 g por 15 min) no *pool* e retirar o excesso de PBS (deixar 10 µL de PBS).
5. Lavar com 10 µL de pronase (20mg/mL) homogeneizar por pipetagem (volume final = 20 µL e [ ] final pronase = 10mg /mL).
6. Acrescentar uma gota de óleo mineral a cada amostra.
7. Incubar no termocilador a 37° C por 30 min.
8. Incubar no termocilador a 85° C por 15 min para inativar enzima.
9. Choque térmico: congelar em nitrogênio líquido e levar ao termociclador a 95° C por 1 min.
10. Repetir passo 9 por 5 vezes.
11. Retirar óleo mineral com pipeta e armazenar a -20° C.

### Anexo 3

#### Metilação Global – 5mC DNA ELISA Kit

1. Adicionar 100 ng de DNA a um tubo e levar o volume final a 100 µL com 5-mC Coating Buffer.
2. Desnaturar o DNA a 98° C durante 5 min em termociclador. Após desnaturação, transferir imediatamente para gelo por 10 min.
3. Adicionar volume inteiro (100 µL) do DNA desnaturado ao poço da placa, cobrir com papel alumínio e incubar a 37° C durante 1 hora.
4. Descartar o conteúdo dos poços.
5. Lavar cada poço 3 vezes com 200 µL de tampão ELISA 5-mC. Descartar o tampão após cada lavagem.
6. Adicionar 200 µL de Tampão ELISA 5-mC a cada poço. Cobrir a placa com papel alumínio e incubar a 37° C durante 30 min.

Adição de anticorpos:

1. Preparar mix dos anticorpos de acordo com a seguinte tabela:

	Diluição	Volume (µL)	Exemplo (18 poços)
5-mC ELISA Tampão	N/A	(# poços + 2) 100	2.000 uL
Anti-5- Methylcytosine	1:2.000	Tampão vol. / 2.000	1 uL
Anticorpo secundário	1:1.000	Tampão vol. / 1.000	2 uL

2. Descartar tampão dos poços e adicionar 100 µL do mix de anticorpos a cada poço. Cobrir a placa com papel alumínio e incubar a 37° C durante 1 hora.
3. Descartar o mix de anticorpos dos poços.
4. Lavar cada poço 3 vezes com 200 µL de tampão ELISA 5 mC.
5. Adicionar 100 µL de HRP Developer a cada poço. Incubar por 10-60 min a temperatura ambiente.
- 4- Medir a absorvância a 405-450 nm utilizando um leitor de placas ELISA.

## Anexo 4

### Tratamento com Bissulfito de Sódio - EZ DNA Methylation-Lightning Kit – Zymo

1. Adicionar 130  $\mu\text{L}$  de Lightning Conversion Reagent em 20  $\mu\text{L}$  de DNA (500ng de células e aproximadamente 3,6ng de embriões) ao tubo de 0,5 mL.
2. Dar um *spin* em centrífuga.
3. Levar ao termociclador seguindo a seguinte condição:
  - 98° C por 8 min
  - 54° C por 60 min
  - 4° C por 20 horas (opcional)
4. Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de M-Binding Buffer na Zymo Spin IC Column e colocar a coluna dentro do tubo de coleta.
5. Colocar a amostra na coluna, fechar e inverter delicadamente (10 vezes).
6. Centrifugar a 30 s a 10.000 g. Descartar o Filtrado.
7. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de M-wash Buffer na coluna e centrifugar por 30 s a 10.000 g, descartar o filtrado.
8. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de L-Desulphonation Buffer na coluna e aguardar 15-20 min à temperatura ambiente. Centrifugar por 30 s a 10.000 g, descartar o filtrado.
9. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de M-wash Buffer na coluna e centrifugar por 30 s, descartar o filtrado
10. Repetir o passo 9.
11. Colocar a coluna dentro de um tubo de 1,5 mL identificado e adicionar 10  $\mu\text{L}$  de M-Elution Buffer no centro da coluna. Centrifugar 30-60 s a 10.000 g para eluir o DNA e armazenar a amostra a -80° C.

## **Anexo 5**

### **Purificação de DNA de gel de agarose - Wizard SV Gel and PCR Clean up System**

1. Adicionar Membrane Binding Solution no tubo com bandas recortadas.  
Usar 10 mL/10 mg de gel.
2. Vortexar e incubar 50-60° C em banho-maria até dissolver completamente as bandas.
3. Inserir a mini coluna no tubo coletor.
4. Transferir o gel dissolvido para a coluna e esperar 1 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 16000 g por 1 min, descartar filtrado e colocar no tubo novamente.
6. Adicionar 700 µL de Membrane Wash Solution e centrifugar a 16000 g por 1 min, descartar filtrado.
7. Adicionar 500 µL de Membrane Wash Solution e centrifugar 16000 g por 5 min. Esvaziar o tubo e centrifugar a 16000 por 1min com a tampa da centrifuga aberta.
8. Transferir para novo tubo identificado (1,5 mL) e adicionar 20-30 µL de Nuclease Free Water no centro da coluna por 1 min em temperatura ambiente.
9. Centrifugar 16000 g por 2 min (confirmar o processo de eluição).
10. Quantificar e armazenar DNA -20° C.

## Anexo 6

### TOPO TA Cloning vector - pCRII-TOPO® vector system, Invitrogen)

Cálculo da ligação do inserto ao vetor:

A eficiência da ligação depende da razão molar entre inserto e o vetor. O ideal é 3:1

Realizar o cálculo através do site:

[http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)

Ligação:

1. Usar tubo de 0,2 mL

1° Água - 3 µL

2° Solução Salina (1.2M NaCl, 0,06M MgCl<sub>2</sub>) - 1µL

3° DNA (diluído de acordo com calculado no site) - 1 µL

4° Vetor - 1µL (por reação)

2. Colocar à T.A. por 3 horas, depois armazenar a -20° C.

## Anexo 7

### Transformação Bacteriana

1. Descongelar *E.coli* competente (DH5 $\alpha$ ™ - T1R) sobre gelo.
2. Com cuidado, para evitar choque térmico, adicionar a 1 $\mu$ L de células, 3  $\mu$ L de reação de ligação a parede do tubo e com delicadeza homogenizar, não misturar com a pipeta.
3. Incubar no gelo por 30 min.
4. Realizar choque térmico 30 s a 42°C.
5. Imediatamente levar ao gelo por 2 min.
6. No fluxo, adicionar 150  $\mu$ L de meio S.O.C. (composição: 2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM e Glicose 20 mM) (Invitrogen) a temperatura ambiente. Não misturar com a pipeta, colocar na parede do tubo.
7. Agitar tubo a 200 rpm a 37° C por 1 hora no shaker.



## Anexo 8

### Mini-preparação de Plasmídeo - Pure Yield™ Plasmid Miniprep System

1. Colocar no tubo eppendorf de 1,5 mL aproximadamente 1,5 mL de meio LB com bactérias.
2. Centrifugar por 1 min em rotação máxima.
3. Descartar o meio e manter o *pellet*. Vortexar por 30 seg.
4. Adicionar 100 µL de Cell Lysis Buffer (Blue), inverter 6 vezes durante 2 min.
5. Adicionar 350 µL de Neutralization Buffer (frio), inverter 10 vezes, até não estar mais azul.
6. Centrifugar por 10 min em rotação máxima.
7. Transferir o sobrenadante para coluna e centrifugar por 30 seg em máxima rotação, descartar o filtrado.
8. Adicionar 200 µL de Endotoxin Removal Wash à coluna e centrifugar em máxima rotação por 30 seg.
9. Adicionar 400 µL de Column Wash Solutions (CWS) à coluna e centrifugar em máxima rotação por 30 seg.
10. Transferir a coluna para novo tubo identificado (1,5 mL).
11. Adicionar 30 µL de Elution Buffer no centro da coluna. Deixar 1 min a temperatura ambiente e centrifugar em máxima rotação por 1 min.
12. Armazenar -20°C.

## Anexo 9

### Mini-preparação de plasmídeo

Soluções:

- I - 99  $\mu$ L de TE (Tris HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0) + 1  $\mu$ L RNase 1 mg/mL
- II – NaOH 0,2 M + 1% SDS
- III – Acetato de potássio 3M + Ácido acético 5M

1. Dividir meio LB com bactérias em 2 tubos de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 13400 rpm por 1 min.
3. Verter tubo para descartar sobrenadante e adicionar 1 mL de PBS para lavar.
4. Vortexar para ressuspender o *pellet* e centrifugar 13400 rpm por 1 min.
5. Verter tubo para descartar sobrenadante,
6. Vortexar amostra para ressuspender.
7. Adicionar 100  $\mu$ L da solução I. Adicionar 200  $\mu$ L da Solução II.
8. Homogeneizar gentilmente por inversão dos tubos. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
9. Adicionar 150  $\mu$ L da solução III gelada e homogeneizar no vortex.
10. Incubar no gelo por 5 min. Centrifugar a 10000 g por 6 min.
11. Transferir o sobrenadante para outro tubo (usar pipeta P1000).
- 12 . Adicionar 400  $\mu$ L de isopropanol gelado.
- 13 . Inverter tubo 10 vezes e incubar a -20° C por pelo menos 2 horas ou *overnight*.
14. Centrifugar 16000 g por 15 min e verter tubo para descartar sobrenadante.
15. Adicionar 150  $\mu$ L de TE + 60  $\mu$ L Cloreto de lítio (LiCl 10M).
- 16 . Ressuspender o pellet gentilmente. Incubar no gelo por 10 min.
17. Centrifugar 13000 rpm por 20 min. Transferir sobrenadante para novo tubo.
18. Adicionar 600  $\mu$ L de etanol 100% gelado. Homogeneizar invertendo tubo com cuidado.
19. Deixar a temperatura ambiente por 10 min. Centrifugar 13000 rpm por 20 min.
20. Verter tubo e descartar sobrenadante (cuidado com *pellet*).
21. Centrifugar 5 min 10000 rpm após lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 70% gelado.

22. Retirar sobrenadante com pipeta (P200).
23. Secar o *pellet* 10-15 min em temperatura ambiente
24. Ressuspender *pellet* com 20  $\mu$ L de água Mili-Q e deixar a temperatura ambiente por 20 min.
25. Levar ao banho maria a 55° C por 10 min.
26. Quantificar e guardar a -20° C (longo prazo) ou 4° C (uso imediato).

## Anexo 10

### Digestão com ECO RI (Invitrogen)

1. Colocar em tubo de 0,2 mL:

5U da Enzima	0,1 µL
1x tampão H10x	1,0 µL
H2O Mili-Q	6,9 µL
DNA miniprep	2,0 µL
Vol. Final	10,0 µL

2. Levar ao banho-maria por 8-16 horas a 37° C.

3. Aplicar em gel de agarose a 1,8% para visualização.

## Anexo 11

### Extração de RNA total - PureLink RNA Mini Kit

1. Adicionar no Lysis Buffer (1mL) -10  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol
2. Para  $1 \times 10^6$  –  $5 \times 10^6$  células, usar 600  $\mu$ L de Lysis Buffer.
3. Vortexar e homogeneizar com a pipeta.
4. Adicionar volume igual de etanol 70% gelado e misturar no vortex. Inverter o tubo para evitar qualquer precipitado.
5. Transferir 600  $\mu$ L da amostra para a coluna acoplada ao tubo de coleta.
6. Centrifugar 12000 g por 15 seg.
7. Descartar o eluído e recolocar tubo coletor.
8. Adicionar 300  $\mu$ L de Wash Buffer I na coluna com RNA ligado.
9. Descartar tubo de coleta e colocar coluna e novo tubo.
10. Adicionar 80  $\mu$ L do mix DNase (DNase, tampão e água DEPC) na membrana e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
11. Adicionar 350  $\mu$ L de Wash Buffer I e centrifugar 12000 g por 15 seg.
12. Descartar tubo coletor.
13. Adicionar 500  $\mu$ L de Wash Buffer II e centrifugar 12000g por 15 seg.
14. Descartar eluído e reinserir no mesmo tubo e repetir passo 13.
15. Centrifugar com tampa aberta a 12000 g por 1 min para secar membrana.
16. Descartar tubo coletor e colocar coluna novo tubo de 1,5 mL identificado.
17. Adicionar 20  $\mu$ l de água RNase free ao centro da coluna e incubar por 1 min a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 12000 g por 2 min. Descartar coluna e estocar RNA a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Anexo 12

### Layout das placas para RT-qPCR

PLACA 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1
B	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1
C	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1
D	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
E	PROC1	PROC1	PROC1									
F	SAH1	SAH1	SAH1									
G	P/S1	P/S1	P/S1									
H	C1	C1	C1					C-	C-	C-	C-	C-

DNMT1  
 DNMT3A  
 DNMT3B  
 GAPDH  
 B-ACTINA

PLACA 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1	PROC1
B	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1	SAH1
C	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1	P/S1
D	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
E	PROC1	PROC1	PROC1									
F	SAH1	SAH1	SAH1									
G	P/S1	P/S1	P/S1									
H	C1	C1	C1					C-	C-	C-	C-	C-

TET1  
 TET2  
 TET3  
 GAPDH  
 B-ACTINA

PLACA 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2
B	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2
C	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2
D	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
E	PROC2	PROC2	PROC2									
F	SAH2	SAH2	SAH2									
G	P/S2	P/S2	P/S2									
H	C2	C2	C2					C-	C-	C-	C-	C-

DNMT1  
 DNMT3A  
 DNMT3B  
 GAPDH  
 B-ACTINA

PLACA 4												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2	PROC2
B	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2	SAH2
C	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2	P/S2
D	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
E	PROC2	PROC2	PROC2									
F	SAH2	SAH2	SAH2									
G	P/S2	P/S2	P/S2									
H	C2	C2	C2					C-	C-	C-	C-	C-

TET1  
 TET2  
 TET3  
 GAPDH  
 B-ACTINA

PLACA 5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3
B	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3
C	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3
D	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
E	PROC3	PROC3	PROC3									
F	SAH3	SAH3	SAH3									
G	P/S3	P/S3	P/S3									
H	C3	C3	C3					C-	C-	C-	C-	C-

DNMT1  
DNMT3A  
DNMT3B  
GAPDH  
B-ACTINA

PLACA 6												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3	PROC3
B	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3	SAH3
C	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3	P/S3
D	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
E	PROC3	PROC3	PROC3									
F	SAH3	SAH3	SAH3									
G	P/S3	P/S3	P/S3									
H	C3	C3	C3					C-	C-	C-	C-	C-

TET1  
TET2  
TET3  
GAPDH  
B-ACTINA

PLACA 7												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4
B	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4
C	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4
D	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4
E	PROC4	PROC4	PROC4									
F	SAH4	SAH4	SAH4									
G	P/S4	P/S4	P/S4									
H	C4	C4	C4					C-	C-	C-	C-	C-

DNMT1  
DNMT3A  
DNMT3B  
GAPDH  
B-ACTINA

PLACA 8												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4	PROC4
B	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4	SAH4
C	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4	P/S4
D	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4
E	PROC4	PROC4	PROC4									
F	SAH4	SAH4	SAH4									
G	P/S4	P/S4	P/S4									
H	C4	C4	C4					C-	C-	C-	C-	C-

TET1  
TET2  
TET3  
GAPDH  
B-ACTINA

## Resultado RT-qPCR

	Procaína							
	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	TET1	TET2	TET3	Bactina	GAPDH
Média Ct	23,73	24,01	28,87	24,57	25,05	25,76	18,96	19,69
TM (°C)	80,42	83,6	85,52	83,51	81,09	80,94	84,08	85,83
	SAH							
	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	TET1	TET2	TET3	Bactina	GAPDH
Média Ct	25,34	25,00	31,43	25,83	25,26	26,60	19,85	20,92
TM (°C)	80,74	83,92	85,83	83,76	81,09	81,09	84,24	85,57
	Procaína/SAH							
	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	TET1	TET2	TET3	Bactina	GAPDH
Média Ct	24,66	25,26	29,56	26,30	25,74	25,74	19,18	20,01
TM (°C)	80,74	83,92	85,83	84,23	81,25	81,25	84,4	85,52
	Controle							
	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	TET1	TET2	TET3	Bactina	GAPDH
Média Ct	25,35	25,22	29,75	25,92	25,72	27,35	19,92	21,53
TM (°C)	80,74	83,92	85,83	83,92	81,25	81,25	84,4	85,36