

EXPRESSÃO DE DNA METILTRANSFERASES EM BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Perecin, F.¹; Yamazaki, W.¹; Ferreira, C.R.²; Méo, S.C.³; Biase, F.H.²; Merighe, G.K.F.²; Saraiva, N.Z.¹; Tetzner, T.A.D.¹; Meirelles, F.V.²; Garcia, J.M.¹

¹DMVPRA-FCAV/UNESP-Jaboticabal; ²ZAB-FZEA/USP-Pirassununga; ³CPPSE-EMBRAPA-São Carlos.
fperecin@fcav.unesp.br

Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial na regulação da expressão gênica e na diferenciação celular. Uma proporção elevada de embriões produzidos por transferência nuclear (TN) é incapaz de estabelecer e sustentar a gestação a termo. Há grande consenso que alterações epigenéticas, primariamente causadas por alterações nos padrões de metilação do DNA, resultam em expressão gênica anormal em embriões e fetos clonados, tornando os índices de sucesso da clonagem frustrantes. Este trabalho objetivou analisar os padrões de expressão das DNA metiltransferases (DNMT) 1, 3A e 3B em blastocistos bovinos produzidos *in vivo* (grupo IV) ou *in vitro* por FIV (grupo FIV) e transferência nuclear a partir de fibroblastos submetidos à privação de soro fetal bovino (SFB) durante o cultivo (grupo TN-S), ou cultivados até a confluência (grupo TN-C). Uma vez que a linhagem celular doadora de núcleo era proveniente de uma fêmea, os blastocistos dos grupos IV e FIV foram sexados por PCR e somente aqueles do sexo feminino foram utilizados nas etapas posteriores. Após remoção da zona pelúcida em PBS pH 2,5, os blastocistos foram individualmente submetidos a um ciclo de amplificação linear do RNA mensageiro utilizando o "Superscript RNA amplification system" (L-1016, Invitrogen). A transcrição reversa de volume correspondente a 1/10 do RNA de um embrião foi realizada com 6,75µM de hexâmeros randômicos e transcriptase reversa (Improm-II Reverse Transcriptase, Promega) seguindo instruções do fabricante. Os ensaios de quantificação relativa dos transcritos dos genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B foram realizados por PCR em tempo real com sistema de detecção TaqMan[®] (Applied Biosystems); utilizando o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno. Foram utilizados oito embriões por grupo, amplificados em quadruplicata. A eficiência média das amplificações por PCR foi estimada para cada gene utilizando-se uma regressão linear do logaritmo da fluorescência a cada ciclo (Ramakers et al., *Neurosci. Lett.*, 339:62, 2003); e as razões de expressão calculadas de acordo com metodologia descrita por Livak e Schmittgen (*Methods*, 25:402, 2001). Para verificar as diferenças significativas foi utilizado o "Pair wise fixed reallocation randomization test" (Pfaffl et al., *Nucleic Acids Res.*, 30:e36, 2002). Todas as razões de expressão foram normalizadas pelo GAPDH e calibradas em função do grupo IV. Não foram detectados transcritos da DNMT1 nos blastocistos do grupo TN-S, em contrapartida, não se verificaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre as razões de expressão dos grupos FIV (0,95) e TN-C (0,77), comparados ao grupo IV. Os grupos de transferência nuclear (TN-C e TN-S) apresentaram razões de expressão numericamente superiores para a DNMT3A (1,89 e 1,99; respectivamente) e para a DNMT3B (1,31 e 2,08; respectivamente) quando comparados aos grupos fertilizados (IV e FIV: 1,00 e 1,50 para DNMT3A; e 1,00 e 1,29 para DNMT3B; respectivamente), no entanto, sem diferenças significativas ($P > 0,05$). A ausência de expressão da DNMT1 no grupo TN com fibroblastos submetidos à privação de SFB nos leva a sugerir que embriões clonados a partir deste protocolo sejam menos viáveis do que aqueles oriundos de fibroblastos cultivados até confluência. A falta de DNMT1 compromete a metilação do DNA a cada ciclo celular e torna os embriões inaptos a manterem as marcações epigenéticas após cada mitose e sustentar o desenvolvimento fetal. Suporte financeiro: FAPESP 03/12352-7 e 04/14884-9.

EXPRESSION OF DNA METHYLTRANSFERASES IN *IN VIVO*- AND *IN VITRO*-PRODUCED BOVINE BLASTOCYSTS

In mammals, DNA methylation is essential for gene expression regulation and cell differentiation. A high proportion of embryos produced by nuclear transfer (NT) is unable to establish and sustain a full term pregnancy. There is great consensus that epigenetic alterations, primarily due to abnormalities in DNA methylation patterns, cause abnormal gene expression in cloned embryos and fetuses, frustrating the success of cloning. This work aimed to analyze the patterns of DNA methyltransferases (DNMT) 1, 3A and 3B expression in bovine blastocysts *in vivo*- (group IV) or *in vitro*-produced by IVF (group IVF) and nuclear transfer from fibroblasts submitted to fetal calf serum (FCS) starvation (group NT-S) or cultivated until confluence (group NT-C). Since nuclear donor cell lineage was of female gender, blastocysts from IV and IVF groups were sexed by PCR and only female embryos were used in further steps. After removal of zona pellucida in pH2.5-PBS, individual blastocysts were submitted to one round of linear amplification of messenger RNA using Superscript RNA amplification system (L-1016, Invitrogen). Reverse transcription from RNA equivalent to 1/10 of the whole embryo was carried out with 6.75µM of random hexamers and Improm-II Reverse Transcriptase (Promega) according manufacturer instructions. Assays for relative quantification of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene transcripts were performed in real-time PCR with TaqMan probes (Applied Biosystems); using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as endogenous control. Eight samples per group were amplified in quadruplicate reactions. The average efficiency of PCR amplifications was estimated for each gene using a linear regression on the logarithm of fluorescence per cycle (Ramakers et al., *Neurosci. Lett.*, 339:62, 2003); and the expression ratios were calculated according to the method described previously by Livak and Schmittgen (*Methods*, 25:402, 2001). To verify statistical differences the Pair wise fixed reallocation randomization test (Pfaffl et al., *Nucleic Acids Res.*, 30:e36, 2002) was used. All expression ratios were normalized by GAPDH and calibrated by IV group. In one hand, transcripts of DNMT1 were not detected in the embryos from NT-S group, on the other hand, no statistical differences ($P > 0,05$) were found between the expression ratios in the groups IVF (0.95) and NT-C (0.77) compared with IV embryos. The nuclear transfer groups (NT-C and NT-S) presented expression ratios numerically higher for DNMT3A (1.89 and 1.99; respectively) and for DNMT3B (1.31 and 2.08; respectively) than the groups fertilized (IV and IVF: 1.00 and 1.50 for DNMT3A; and 1.00 and 1.29 for DNMT3B; respectively), however, without statistical differences. The absence of DNMT1 expression in the NT group produced with serum-starved fibroblasts suggests that cloned embryos obtained using this protocol are less viable than those produced with fibroblasts cultivated until confluence. The lack of DNMT1 compromises DNA methylation after each cell cycle and cause the embryos to become unable to keep the epigenetic marks after mitosis and to sustain fetal development.