

# Estudo do imprinting genómico em espermatozóides de pacientes com oligozoospermia

C.J. Marques<sup>a</sup>, S. Fernandes<sup>a</sup>, F. Carvalho<sup>a</sup>, J. Silva<sup>a,b</sup>, M. Sousa<sup>a,b,c</sup> e A. Barros<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Serviço de Genética. Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. Porto. Portugal.

<sup>b</sup>Centro de Genética da Reprodução Prof. A Barros. Porto. Portugal.

<sup>c</sup>Laboratório de Biologia Celular. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Porto. Portugal.

## RESUMO

No presente trabalho, estudou-se a metilação da DMR do gene *H19* através de diversas metodologias moleculares, incluindo a mutação dirigida do DNA pelo bissulfato de sódio, a clonagem de fragmentos de DNA em vectores bacterianos, e a sequenciação do DNA. Foram estudados 69 clones de 5 amostras de espermatozóides isolados de homens com concentração normal de espermatozóides no sêmen ( $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$ ) e 31 clones de 2 amostras de espermatozóides isolados de pacientes com oligozoospermia grave ( $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ ). Verificámos que nos espermatozóides dos pacientes com oligozoospermia grave a larga maioria dos clones apresenta metilação incompleta (26/31, 83,9%), situação contrária ao verificado nos clones dos espermatozóides oriundos das amostras com normozoospermia (33/69, 47,8%). Na oligozoospermia grave, a média de CpG não metiladas foi de 4,1, com uma variação de 1-17 CpG atingidas, enquanto que na normozoospermia a média foi de 0,7 e a variação de 1-3, sendo a diferença entre as médias significativa ( $p = 0,001$ ). A não metilação de múltiplas CG em simultâneo ocorreu em 5/33 (15,2%) dos clones com défices de metilação no grupo da normozoospermia, enquanto que na oligozoospermia grave a maioria dos casos (19/26, 73,1%) apresentou não metilação associada em simultâneo. Do mesmo modo, por cada posição CpG, a taxa de défice de metilação na normozoospermia foi sempre inferior a 10%, com excepção das CG-6 e 9 (12 e 14%), enquanto que na oligozoospermia grave a maioria dos casos apresentou valores superiores a 20% de não metilação ( $p = 0,000-0,044$ ). A não metilação completa do local de ligação da proteína CTCF (CpG 4-8) apenas foi encontrada nos casos de oligozoospermia grave (3/31, 9,7%). Em conclusão, os espermatozóides dos pacientes com oligozoospermia grave apresentam taxas elevadas de erros de imprinting genómico, pelo que existe a possibilidade de transmissão desses erros à descendência durante os tratamentos por microinjecção. Na ausência de metilação da DMR do *H19*, existe a possibilidade de ligação da CTCF ao alelo paterno e consequente transmissão de dois alelos *H19*

activos e de dois alelos *IGF2* inactivos, o que se prevê afectar negativamente o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os resultados aconselham, por isso, que antes do tratamento da infertilidade por ICSI se peça um estudo do imprinting genómico dos espermatozóides para avaliação do risco.

**Palavras chave:** Imprinting genómico. Espermatogénese. Infertilidade. Gene *H19*. Oligozoospermia.

## ABSTRACT

### Study of genomic imprinting in spermatozooids from patients with oligozoospermia

In the present study, we evaluated the methylation status of *H19* gene DMR (Differentially Methylated Region) using sodium bisulphite treatment of DNA, cloning of PCR (Polymerase Chain Reaction) products and automated DNA sequencing. We studied 69 clones from 5 sperm samples obtained from males with normal sperm counts ( $\geq 20 \times 10^6 \text{ Sz/mL}$ ) and 31 clones from 2 sperm samples isolated from patients with severe oligozoospermia ( $< 5 \times 10^6 \text{ Sz/mL}$ ). In sperm cells from severe oligozoospermic patients, we observed that the majority of clones (26/31, 83.9%) presented incomplete methylation, in contrast to clones obtained from sperm from normozoospermic males (33/69, 47.8%). In severe oligozoospermia, the average of unmethylated CpGs was of 4.1, ranging between 1 to 17 affected CpGs, while in normozoospermia the average was of 0.7, ranging from 1 to 3 affected CpGs, being statistically significant the difference between the two groups ( $p=0.001$ ). The simultaneous demethylation of multiple CpGs occurred in 5/33 (15.2%) of the clones with incomplete methylation in the normozoospermia group,

O presente trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Sapiens: 36363/99, 43462/01, 48.376/02, UMIB).

**Correspondência:** Mário Sousa.

Lab Biologia Celular. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Universidade do Porto.

Lg Prof Abel Salazar, 2. 4099-003 Porto. Portugal.

Correio electrónico: msousa@icbas.up.pt

while in severe oligozoospermia the majority of the cases (19/26, 73.1%) presented associated demethylation simultaneously. Concomitantly, for each CpG position, the level of methylation deficit in normozoospermia was always inferior than 10% with the exception of CpG 6 and 9 (12 and 14%, respectively), while in severe oligozoospermia the majority of cases presented values of demethylation superior than 20% ( $P = 0.000-0.044$ ). The complete demethylation of CTCF protein binding site (CpG 4-8) was only found in severe oligozoospermic cases (3/31, 9.7%). In conclusion, sperm from severe oligozoospermic patients present high rates of genomic imprinting errors, leading to the possibility of transmission of these errors to the offspring during ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) treatments. In the absence of methylation at H19 DMR, CTCF protein might bind to the paternal allele and, consequently, promote the transmission of two active H19 and two inactive IGF2 alleles. This situation could negatively affect the in vitro development of preimplantation embryo. Thus, these results suggest the importance of a previous study of genomic imprinting in sperm before the ICSI procedure, in order to evaluate the existence of any risk.

**Key words:** Genomic imprinting. Spermatogenesis. Gene *H19*. Oligozoospermia.

## INTRODUÇÃO

O imprinting genómico é um mecanismo de regulação da expressão dos genes que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Assim, e ao contrário da maioria dos genes em que a expressão é bi-alélica, os genes que estão submetidos a este mecanismo têm uma expressão mono-alélica. De um modo geral, os genes submetidos a imprinting encontram-se próximos ou associados no genoma (domínios de imprinting). Os domínios de imprinting mais estudados, situam-se nos cromossomas 11 e 15. Na região 11p15.5 encontram-se os genes *H19* e *IGF2*, cujo défice de imprinting origina o síndrome de Beckwith-Wiedemann. Na região 15q11-13 situam-se os genes *SNRPN* e *UBE3A*, cujo défice de imprinting origina o síndrome de Prader-Willi e o síndrome de Angelman. A expressão aberrante destes genes sujeitos a imprinting pode provocar defeitos no desenvolvimento embrionário e da placenta, anomalias neurológicas e cancro<sup>1</sup>.

Os síndromes de Angelman e de Beckwith-Wiedemann são muito raros, estando a sua frequência ligeiramente aumentada nas crianças nascidas por reprodução medicamente assistida, quer por fecundação in vitro (FIV) do espermatozóide, por microinjecção intracitoplasmática (ICSI). Existem 3 casos de crianças nascidas por ICSI e com Síndrome de Angelman, e 20 casos de crianças com o Síndrome de Beckwith-Wiedemann nascidas por ICSI (10 casos) e por FIV (10 casos)<sup>2</sup>. Estes dados sugerem a possibilidade de a transmissão de defeitos de imprinting estar associada às técnicas de reprodução medicamente assistida. Em todas estas crianças acima descritas, a causa do síndrome deveu-se a defeitos na metilação do alelo materno, provavelmente

por anomalias na reprogramação genética que ocorre nos embriões em cultura após a fase de 4 células. Em relação à possibilidade da transmissão de defeitos de imprinting no alelo paterno durante a microinjecção por infertilidade masculina, poucos estudos foram efectuados e nenhum se revelou conclusivo<sup>3-6</sup>.

De um modo geral, a marca de imprinting consiste na metilação das citosinas dos dinucleótidos CG, situados em ilhas CpG, que são zonas do genoma em que a frequência deste dinucleótido é, comparativamente ao resto do DNA, muito elevada. As ilhas CpG encontram-se normalmente associadas ao promotor de um gene. De um modo geral, a metilação de uma ilha CpG inactiva a expressão desse gene. Na maioria dos casos, estas alterações epigenéticas ocorrem apenas num dos alelos do gene, enquanto que o outro alelo permanece desmetilado e activo. Deste modo, o encontro dos dois alelos parentais, um metilado e outro não metilado, paterno e materno, na fertilização, permite um desenvolvimento embrionário normal<sup>7</sup>. As marcas de imprinting herdadas (oriundas dos espermatozóides e dos ovócitos) são primeiro apagadas (desmetilação global do genoma) nas células germinais primordiais durante as primeiras fases da vida fetal. De seguida, as marcas do imprinting são restabelecidas (metilação preferencial de determinados genes) durante a gametogénese consoante o sexo do feto, ainda durante a vida fetal no caso da ovogénese, e após a puberdade no caso da espermatogénese. Existem duas fases de reprogramação epigenética. A primeira fase é caracterizada por uma desmetilação global de todo o genoma nas células germinais primordiais, fenómeno secundado por uma vaga de metilação dependente do sexo embrionário (imprinting parental) que se efectua nas fases iniciais da gametogénese. A segunda fase ocorre durante o período de desenvolvimento embrionário pré-implantação, verificando-se uma desmetilação dos genomas materno e paterno, com excepção dos genes submetidos a imprinting, que se encontram protegidos deste fenómeno. A maioria dos genes submetidos a imprinting parental são genes essenciais para o desenvolvimento normal do embrião<sup>8</sup>.

Dos genes sujeitos a imprinting parental, o gene *H19* é dos melhores estudados. Nos humanos, localiza-se no cromossoma 11 (11p11.5) e encontra-se metilado no alelo paterno (silenciamento) e não-metilado no alelo materno (transcrição activa). Codifica para um hnRNA que, após processamento (splicing), se transforma num mRNA poli-adenilado com 2,5 Kb. Este mRNA é transportado para o citoplasma, não sendo traduzido em proteína<sup>9,10</sup>. O gene *H19* é essencialmente transcrito nos tecidos mesodérmicos e endodérmicos fetais, sendo inibida a sua transcrição em todos os órgãos após o nascimento, com excepção

do fígado<sup>11</sup>. A desregulação deste sistema está associada com o desenvolvimento de neoplasias fetais, pelo que o mRNA transcrito do gene *H19* parece actuar como factor oncofetal<sup>12</sup>.

Como acontece com a maioria dos genes sujeitos a imprinting, o gene *H19* possui uma região diferencialmente metilada (DMR), que se localiza de (-2,0) a (-3,4) Kb do local de iniciação da transcrição. Esta DMR possui todos os critérios para se considerar que está sujeita a imprinting: *a*) apresenta metilação paterna específica nas células somáticas; *b*) está metilada nos espermatozóides, e *c*) a metilação permanece estável durante o desenvolvimento embrionário pré-implantação<sup>13</sup>. A DMR do *H19* é constituída por 3,5 repetições directas de uma sequência com 400 bp. A sequência com 400 bp possui seis sequências conservadas (hcs 1-6), cada uma com 39 bp. Destas, as hcs 4-6 apresentam homologia com os ratinhos e os ratos<sup>5</sup>. Dentro de cada hcs existe um número variável de CpGs, das quais um grupo restrito de 4-5 CpGs constitui um núcleo altamente conservado. O núcleo altamente conservado da hcs6, com 5 CpGs, representa um local de ligação (local CTCF6) da proteína CTCF, a qual tem uma função reguladora e limita a actividade dos activadores de transcrição do gene<sup>14</sup>.

O gene *IGF2* localiza-se a (-90) Kb do gene *H19* e codifica para o factor de crescimento tipo II da insulina (*IGF2*). Nos ratinhos, verificou-se que a proteína *IGF2* tem uma acção mitogénica, funcionando como factor de proliferação e diferenciação celulares, promovendo assim o crescimento embrionário e fetal<sup>15</sup>. Nos humanos, a expressão da proteína *IGF2* é contínua, embora diminua após o nascimento<sup>16,17</sup>. Os genes *H19* e *IGF2* apresentam um imprinting oposto, ou seja, o gene *IGF2* não sofre metilação diferencial nos gâmetas, sendo a sua expressão monoparental regulada indirectamente pelo imprinting do gene *H19*. Este mecanismo é explicado pelo facto dos dois genes partilharem a mesma sequência cis-reguladora (região 3' do gene *H19*) que contém activadores génicos comuns. No caso do alelo paterno, em que a DMR do gene *H19* está metilada, a proteína CTCF não consegue ligar-se às CpGs metiladas, pelo que o gene *IGF2* é transcrito (por activação do seu promotor pelos activadores endodérmicos comuns aos dois genes), enquanto que a expressão do gene *H19* é inibida. A situação oposta ocorre no alelo materno. Neste caso, a

CTCF liga-se à DMR do gene *H19* porque as CpG não estão metiladas, sendo o gene *H19* transcrito e a expressão do *IGF2* silenciada (a ligação da CTCF impede o acesso dos activadores ao promotor do gene *IGF2*)<sup>14,18-20</sup>. Ou seja, na linha germinal masculina há silenciamento do *H19* e transcrição do *IGF2*, enquanto que na linha germinal feminina há expressão do *H19* e silenciamento do *IGF2*.

Recentemente<sup>21</sup>, verificamos existir um défice global da metilação do gene *H19* nos espermatozóides dos pacientes com oligozoospermia, em 30% dos casos com oligozoospermia grave ( $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ ) e em 17,4% dos casos com oligozoospermia moderada ( $\geq 5 < 20 \times 10^6/\text{ml}$ ), mas não nos espermatozóides dos homens com concentração normal de espermatozóides no ejaculado ( $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$ ). No presente estudo, apresentamos uma análise mais detalhada do padrão de metilação do gene *H19*. Para isso, em vez de estudar a metilação por amostra total de espermatozóides, efectuamos uma análise por espermatozóide através da técnica da clonagem molecular, comparando a normozoospermia com a oligozoospermia grave.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento de espermatozóides do ejaculado

Sob consentimento informado, estudaram-se 5 ejaculados de homens com parâmetros seminais normais<sup>22</sup> e 2 ejaculados de pacientes com oligozoospermia grave ( $1.180 \times 10^6/\text{ml}$  e  $1,6 \times 10^6/\text{ml}$ ). Após liquefacção do sémen, os espermatozóides morfologicamente normais e com motilidade progressiva rápida foram purificados por centrifugação de gradientes (Ixaprep; Medicult, Copenhagen, Denmark) seguido de swim-up.

### Extracção do DNA dos espermatozóides

A extracção do DNA dos espermatozóides foi efectuada utilizando o método de lise alcalina, com KOH e DTT<sup>23</sup>.

### Mutação dirigida do DNA pelo bissulfito de sódio

O tratamento com bissulfito de sódio permite o estudo da metilação das citosinas do DNA, pois converte

TABELA 1. Alterações no DNA genómico provocadas pelo bissulfito de sódio

DNA original	Mutação pelo bisulfito Na	1ª amplificação	2ª amplificação	Leitura na sequenciação
C-CH <sub>3</sub>	C	G	C	CG metilada
C	U	A	T	CG não-metilada



as citosinas não metiladas em uracilo, deixando as citosinas metiladas como citosinas. Deste modo, após amplificação da região e sequenciação do DNA, podemos avaliar o estado de metilação de cada citosina individualmente (tabela 1).

O tratamento pelo bissulfito de sódio foi efectuado por dois métodos alternativos, o de Manning et al<sup>6</sup> e pelo reagente comercial CpGenome DNA Modification Kit (Intergen).

### Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi efectuada por hemi-nested PCR, obtendo-se um produto de 231 bp do gene *H19* com 18 CpGs da DMR e que inclui a região hcs6 onde a CFCT se liga (GenBank accession n.º AF125183; nucleótidos 6005-6326)<sup>4</sup>. Os produtos de PCR foram separados por electroforese num gel a 2,5% de agarose, e visualizados por fluorescência após coloração do DNA com brometo de etídio.

### Clonagem dos produtos de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados com transformação de bactérias, sendo que cada colónia transformada apenas possui o DNA referente a um só espermatozóide. Para este efeito foi utilizado o TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) com a estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. A extracção do DNA plasmídico foi efectuada com recurso ao Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). A amplificação do DNA foi efectuada por PCR como acima descrito.

### Sequenciação do DNA

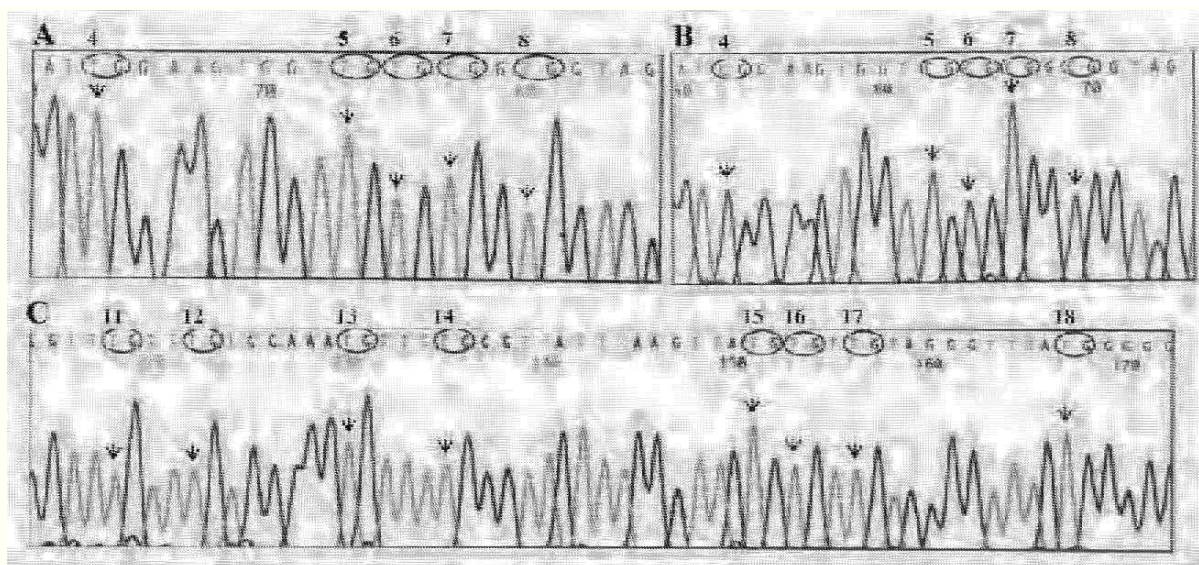
Os produtos de PCR foram purificados com o *kit* GFX PCR-DNA and Gel Band Purification *Kit* (Amersham Pharmacia). Após a purificação, os fragmentos de DNA foram sequenciados automaticamente (fig. 1) utilizando o *kit* BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) num ABI PRISM 310 Genetic Analyzer com *software* adequado (DNA Sequencing Analysis®, Applied Biosystems).

### Análise estatística

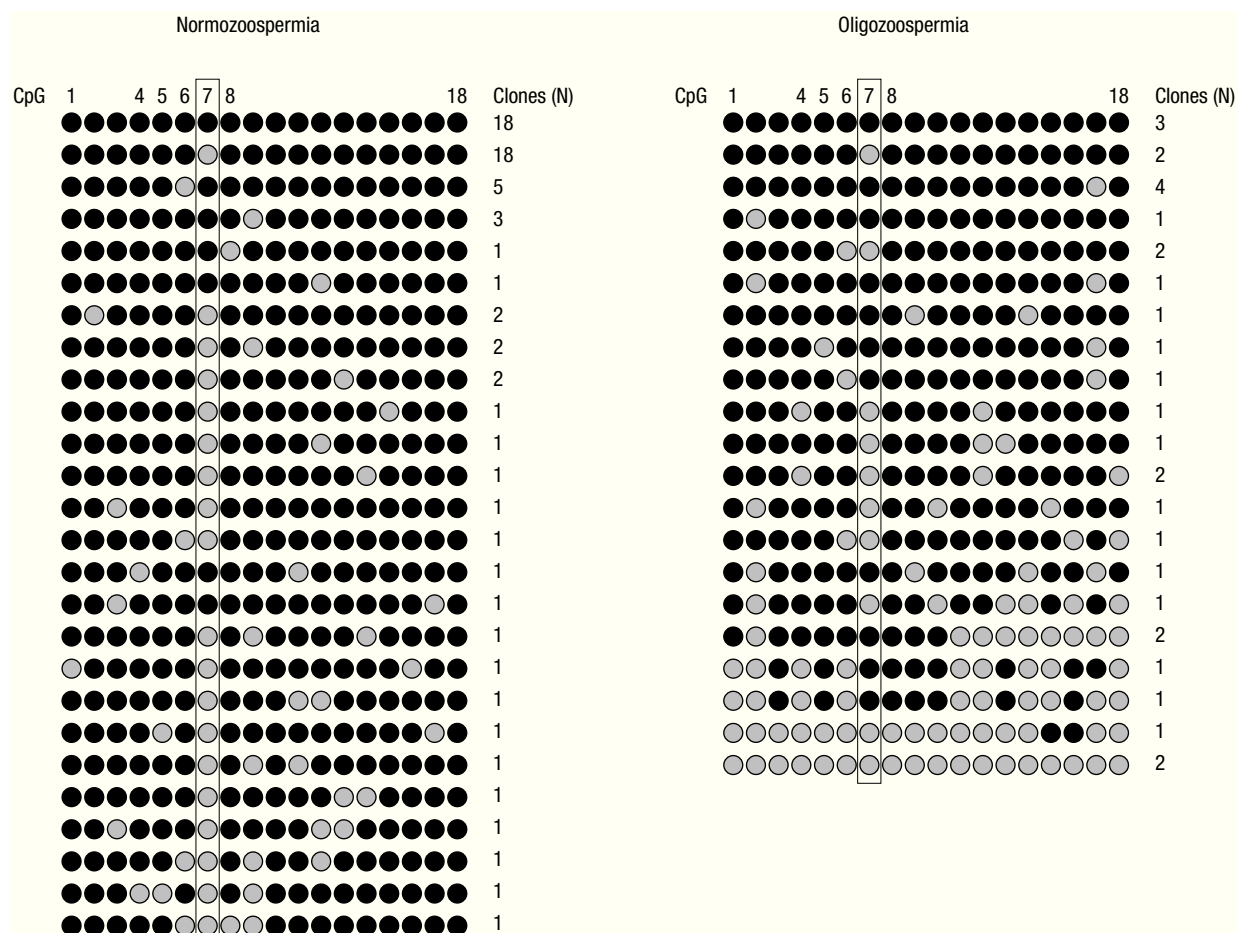
As médias entre grupos foram comparadas recorrendo ao teste T de student (2-tailed). A comparação entre grupos relativo às frequências percentuais foi efectuada pelo teste do qui quadrado (2-tailed). Para a análise estatística utilizou-se o programa SPSS 9.0 Windows. O intervalo de confiança foi de 95%, considerando-se o p significativo quando inferior a 0,05.

## RESULTADOS

Foram estudados 69 clones obtidos de 5 amostras de sémen de homens com concentração normal de espermatozóides no ejaculado, e 31 clones obtidos de 2 amostras de sémen de pacientes com oligozoospermia grave.



**Figura 1.** Análise da metilação após tratamento com o bissulfito de sódio seguido de sequenciação do DNA. A. Exemplo de clone com as CpG 4-8 não metiladas (região de ligação da CTCF). B. Exemplo de clone com as CpG 4-8 metiladas. C. Exemplo de clone com as CpG 11-18 não metiladas.



**Figura 2.** Diagrama com o padrão de metilação das 18 CpGs do gene *H19* nos clones analisados. A CpG-7 (dentro de rectângulo) é um local polimórfico, pelo que a sua não metilação não corresponde a um défice. O local de ligação da proteína CTCF corresponde às CpG 4-8. Citosina metilada (preto) e citosina não metilada (cinzento).

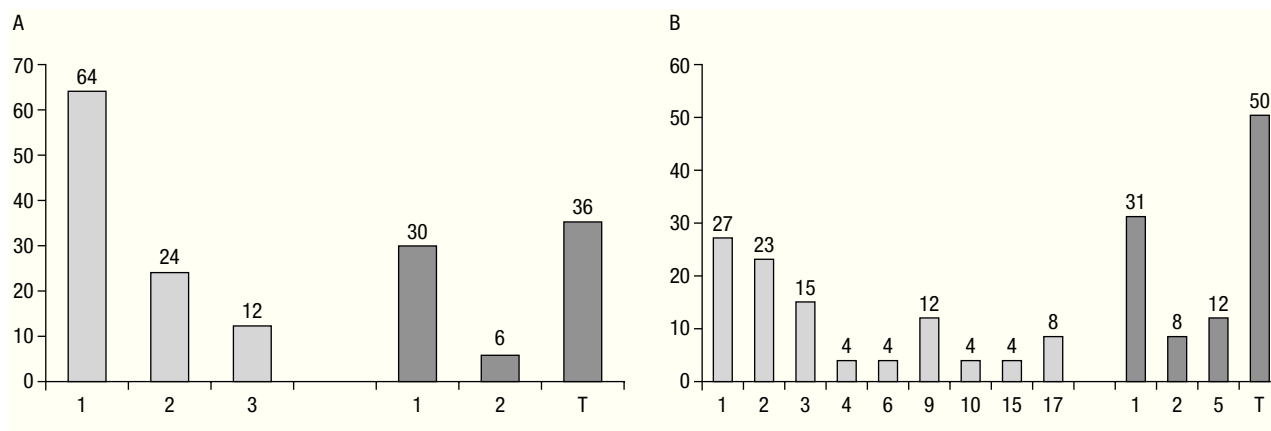
### Normozoospermia

Nos clones derivados das amostras normozoospermicas (fig. 2), 36/69 (52,2%) dos clones apresentaram um padrão normal de metilação, enquanto que 33/69 (47,8%) dos clones apresentaram metilação incompleta. A CpG na posição 7 representa um local polimórfico (polimorfismo C/T; GenBank accession number AF125183, posição 7966), querendo isto dizer que na população coexistem as formas metilada e não metilada sem qualquer significado patológico: em 39/69 (56,5%) dos clones no total das amostras, em 18/36 (50%) dos clones no grupo restrito da amostra sem défices de metilação noutra local, e em 21/33 (63,6%) dos clones no grupo restrito da amostra com défices de metilação noutra local, o que confirma o carácter polimórfico da CpG-7. Nos 33 clones com alteração da metilação, 21 clones atingiram uma só CG, 8 clones apresentaram não metilação em simultâ-

neo em duas CG, e 4 clones estavam não metilados em três CG em simultâneo (fig. 3A). Nos 33 clones com défice de metilação, o local de ligação da CTCF (CpG 4-8), apenas foi encontrado não metilado parcialmente em 12 clones, 10 clones numa CG e 2 clones em duas CG (fig. 3A). No total dos clones, a média de défices de metilação foi de 0,71 (variação: 0-3; SD: 0,893; SEM: 0,108), e de 1,485 (variação: 1-3; SD: 0,712; SEM: 0,124) considerando apenas os clones com défices de metilação.

### Oligozoospermia severa

Nos clones derivados das amostras com oligozoospermia severa (fig. 2), 5/31 (16,1%) dos clones apresentaram um padrão normal de metilação, enquanto que 26/31 (83,9%) dos clones apresentaram metilação incompleta. Nos 26 clones com alteração da metilação, 7 clones apresentaram apenas uma CG não metilada,



**Figura 3.** Frequências percentuais (eixo dos Y) de clones com déficit de metilação na (A) normozoospermia ( $n = 33$ ) e na (B) oligozoospermia severa ( $n = 26$ ), com o número de CG não metiladas em simultâneo encontrando-se indicado no eixo das abcissas. À esquerda analisa-se a % de clones com 1 ou mais CG não metiladas no total de clones com déficit de metilação, e à direita a % de clones com 1 ou mais CG não metiladas na região de ligação da CTCF (CpG4-8).

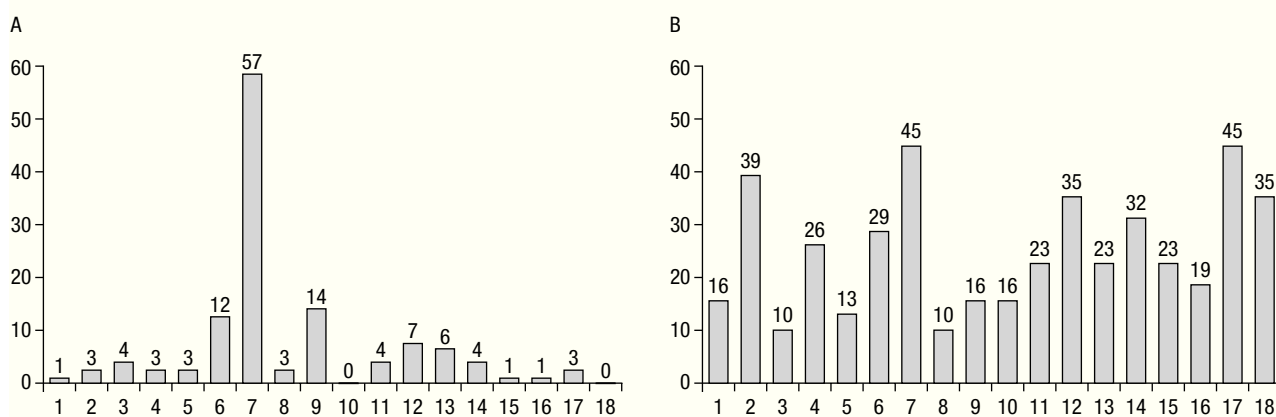
enquanto que os restantes apresentaram várias CG não metiladas em simultâneo: em duas CG (6 clones), três CG (4 clones), quatro CG (1 clone), seis CG (1 clone), nove CG (3 clones), dez CG (1 clone), quinze CG (1 clone) e em dezassete CG (2 clones) em simultaneidade (fig. 3B). De salientar ter-se encontrado um clone com quinze CG não metiladas e dois clones com todas as CG não metiladas. O local de ligação da CTCF (CpG 4-8) foi encontrado não metilado em 13 clones: 8 clones numa só CG, 2 clones em duas CG em simultâneo, e não metilado na sua totalidade em 3 clones. A não metilação polimórfica da CpG-7 foi encontrada em 14/31 (45,2%) dos clones no total das amostras, em 2/5 (40%) dos clones no grupo restrito da amostra sem défices de metilação noutra local, e em 12/26 (46,2%) dos clones no grupo restrito da

amostra com défices de metilação noutra local. No total dos clones, a média de défices de metilação foi de 4.097 (variação: 0-17; SD: 4.982; SEM: 0,895), e de 4.885 (variação: 1-17; SD: 5.078; SEM: 0,996) considerando apenas os clones com défices de metilação.

### Estudo comparativo

A comparação estatística entre as médias de clones com défices de metilação revelou diferenças significativas entre a normozoospermia e a oligozoospermia grave, quer em relação ao total dos clones ( $p = 0,001$ ), quer em relação aos clones com défices de metilação ( $p = 0,002$ ).

Em relação à análise comparativa das frequências percentuais de não metilação por cada CpG, verifica-



**Figura 4.** Frequências percentuais (eixo dos Y) de clones com déficit de metilação na (A) normozoospermia ( $n = 69$ ) e na (B) oligozoospermia severa ( $n = 31$ ) por cada CpG (eixo das abcissas). O local da CpG-7 é polimórfico.

ram-se diferenças significativas ( $p = 0,000-0,044$ ) entre a normozoospermia e a oligozoospermia grave em todos os casos, com excepção dos locais CpG-3, 5, 7, 8 e 9. Em relação à normozoospermia, a percentagem de não metilação foi sempre inferior a 10%, sendo as citosinas com maior percentagem de desmetilação as CpG-6 e 9 (fig. 4A). Pelo contrário, na oligozoospermia severa, a percentagem de não metilação foi praticamente sempre superior a 10%, encontrando-se as maiores percentagens de não metilação ( $> 30\%$  dos clones) nas CpG-2, 12, 14, 17 e 18 (fig. 4B). Em duas CpGs de amostras com normozoospermia, as CG-10 e CG-18, todos clones se encontraram totalmente metilados, enquanto que nos clones da oligozoospermia severa estas CG apresentaram uma percentagem de não metilação de 16% e 35%, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelam que os pacientes com oligozoospermia grave apresentam defeitos na metilação do gene *H19*, traduzidos pelo elevado número de citosinas que se apresentavam não metiladas neste gene (83,9%) e pela elevada frequência de múltiplas CpG não metiladas em simultâneo, quer fora quer dentro da região de ligação da CTCF. O facto de nestes pacientes se terem encontrado dois clones totalmente não metilados sugere um risco acrescido de transmissão de defeitos de imprinting, uma vez que o alelo paterno deste gene é metilado nos espermatozóides. Adicionalmente, em 3 dos clones de oligozoospermia grave verificou-se uma ausência total de metilação em todas as cinco CG que constituem o local de ligação da proteína reguladora CTCF6 (CpG 4-8). Este tipo de erro de imprinting nos espermatozóides poderá conduzir a um desenvolvimento anormal do embrião, uma vez que o défice da metilação activa o gene *H19* (pelo que dois genes *H19* activos estarão presentes no embrião) e inibe o gene *IGF2* (pelo que dois genes *IGF2* inactivos estarão presentes no embrião)<sup>24-26</sup>.

Os espermatozóides de homens normozoospermicos apresentaram também uma metilação incompleta das citosinas, embora em muito menor número. Este facto sugere que será mais importante na transmissão de um imprinting correcto o grau de metilação global do gene e não a metilação de algumas citosinas em particular. No entanto, verificou-se uma diferença significativa na ocorrência de não metilação na maioria das CpGs, sugerindo que estas CpGs podem estar mais susceptíveis à desmetilação nos espermatozóides de oligozoospermicos graves.

A ausência de metilação nas CpG do gene *H19* pode ser devida a dois factores, ou por défices do processo de desmetilação fetal, ou por défice de metilação diferencial pelas DNA-metiltransferases, enzimas que estabelecem a metilação dos genes imprintados durante a gametogénese. Os nossos resultados prévios da análise do gene *MEST*<sup>21</sup> sugerem que a não metilação não se deve a défices do processo de desmetilação global. De facto, o gene *MEST*, um gene que se mantém desmetilado na espermatogénese, encontrou-se sempre não metilado nas amostras de oligozoospermia grave. Estes resultados sugerem, assim, que na oligozoospermia grave existe uma actividade anómala das DNA-metiltransferases, o que as implica pela primeira vez nos defeitos na espermatogénese.

Dois estudos prévios haviam também estudado em espermatozóides a região hcs-6 da DMR do gene *H19*. Num desses trabalhos, os autores verificaram uma metilação completa das CG, tendo analisado 30 clones a partir de três ejaculados com concentração normal de espermatozóides<sup>4</sup>. Pelo contrário, os nossos resultados demonstram um défice de metilação de 47,8% nas amostras oriundas de ejaculados com concentração normal de espermatozóides, sendo esta diferença explicável pelo maior número de amostras que estudamos. No outro estudo, efectuado em 16 clones oriundos de espermatozóides de um ejaculado com concentração normal de espermatozóides, os autores verificaram que podem existir 1-3 CpGs não metiladas, tendo sido a CG-14 a que apresentava maior percentagem de não metilação (9/16, 56%)<sup>3</sup>. Estes resultados são parecidos com os do nosso estudo, pois também encontramos 1-3 CG não metiladas na normozoospermia, mas diferem totalmente nas frequências, pois verificamos que os níveis de não metilação raramente ultrapassam os 10% por cada CpG, com excepção da CG-6 (12%) e da CG-9 (14%).

Um outro trabalho prévio estudou o nível de metilação do gene *H19* em espermatozóides de homens normozoospermicos, mas em regiões distintas da hcs6, e que incluíram as regiões hcs-1, hcs-3 e hcs-5. A região hcs-1 apresentou desmetilação parcial, a região hcs-3 encontrou-se completamente desmetilada em todos os clones, e a região hcs-5 estava totalmente metilada em quase todos os clones, o que sugere a importância das regiões hcs-1 e hcs-5, mas não da hcs-3, no estabelecimento da marca de imprinting do gene *H19*<sup>5</sup>.

Os estudos efectuados na DMR do gene *H19* em espermatozóides de rato<sup>27-29</sup>, confirmam os estudos prévios em espermatozóides humanos, uma vez que, e apesar do reduzido número de clones avaliado, a maioria dos casos se encontrava totalmente metilada, enquanto que nas com metilação incompleta esta ape-



nas variava entre 1-3 CpGs não metiladas. No entanto, os dados do nosso estudo mais alargado demonstram uma diferença significativa entre as duas espécies.

Em conclusão, efectuamos um estudo alargado da metilação da região hcs-6 da DMR do gene *H19* em espermatozóides oriundos quer de ejaculados com concentração normal de espermatozóides (69 clones), que de amostras com oligozoospermia grave (31 clones). Este estudo é o primeiro a ser efectuado numa amostra tão ampla de clones nos casos com concentração normal de espermatozóides, e a primeira a ser efectuada em casos de oligozoospermia grave. Os resultados demonstram que, na normozoospermia, podem haver CG não metiladas, mas que a sua frequência raramente atinge os 10% e não ultrapassa 3 CG não metiladas em simultâneo (5/33, 15,2%). Pelo contrário, na oligozoospermia grave, a maioria dos espermatozóides apresenta défices de metilação (83,9%), a maioria das CpG é atingida com frequências superiores a 20% (11/26, 42,3%), na maior parte dos casos ocorrem défices de metilação em várias CG em simultâneo (19/26, 73,1%), e ocorrem casos com não metilação de toda a região (2/31, 6,5%), bem como casos com não metilação de todas as CG envolvidas na ligação da CTCF (3/31, 9,7%). Por ficar assim demonstrado um aumento significativo de risco de transmissão de defeitos do imprinting genómico paterno na oligozoospermia, sugere-se que antes do tratamento da infertilidade por ICSI se peça um estudo do imprinting genómico dos espermatozóides para avaliação do risco.

## AGRADECIMENTOS

Agradece-se o apoio laboratorial nos espermogramas do Dr. Paulo Viana (Centro de Genética da Reprodução A. Barros).

## Referências bibliográficas

- Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14:101-10.
- Gosden R, Trasler J, Lucifero D, et al. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet.* 2003;361:1975-77.
- Frevel M, Sowerby S, Petersen G, et al. Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms tumor. *J Biol Chem.* 1999;274:29331-40.
- Kerjean A, Dupont J, Vasseur C, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2183-7.
- Hamatani T, Sasaki H, Ishihara K, et al. Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm. *Biochem Biophys Acta.* 2001;1518:137-44.
- Manning M, Lissens W, Bonduelle M, et al. Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:1049-53.
- Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Genet Rev.* 2001;2:21-32.
- Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14:93-100.
- Brannan C, Dees E, Ingram R. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* 1990;10:28-36.
- Zhang Y, Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet.* 1992;1:40-4.
- Poirier F, Chan CT, Timmons PM, et al. The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Development.* 1991;113:1105-14.
- Ariel I, Ayeshe S, Perlman E, et al. The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA. *Mol Pathol.* 1997;50:34-44.
- Jinno Y, Sengoku K, Nakao M, et al. Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum Mol Genet.* 1996;5:1155-61.
- Takai D, Gonzales F, Tsai Y, et al. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2619-26.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;345:78-80.
- Gray A, Tam AW, Dull TJ, et al. Tissue specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene. *DNA.* 1987;6:283-95.
- Giannoukakis N, Deal C, Paquette J. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet.* 1993;4:98-101.
- Lee JE, Pintar J, Efstratiadis A. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development.* 1990;110:151-9.
- Leighton P, Saam J, Ingram R, et al. An enhancer deletion affects both H19 and IGF2 expression. *Genes Dev.* 1995;9:2079-89.
- Runge S, Nielsen F, Nielsen J, et al. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem.* 2000;275:29562-9.
- Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, et al. Altered genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet.* 2004;363:1700-2.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- Manning M, Lissens W, Weidner W, et al. DNA methylation analysis in immature testicular sperm cells at different developmental stages. *Urol Int.* 2001;67:151-5.
- Szabo P, Mann JR. Expression and methylation of imprinted genes during in vitro differentiation of mouse parthenogenetic and androgenetic embryonic stem cell lines. *Development.* 1994;120:1651-60.
- Khosla S, Dean W, Brown D, et al. Culture of preimplantation mouse embryos affects development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod.* 2001;64:918-26.
- Arney KL. H19 and Igf2 – enhancing the confusion? *Trends Genet.* 2003;19:17-23.
- Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997;17:275-6.
- Davis T, Trasler J, Moss S, et al. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics.* 1999;58:18-28.
- Lucifero D, Mertineit C, Clarke H, et al. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics.* 2002;79:530-8.