

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**CONTROLE EPIGENÉTICO DE GENES “IMPRINTED”  
EM PLACENTAS DE GESTAÇÕES PRODUZIDAS POR  
TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA, FECUNDAÇÃO *IN*  
*VITRO* E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS**

**João Carlos Torrente Penteado**

Médico Veterinário

Araçatuba – SP

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**CONTROLE EPIGENÉTICO DE GENES “IMPRINTED”  
EM PLACENTAS DE GESTAÇÕES PRODUZIDAS POR  
TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA, FECUNDAÇÃO *IN*  
*VITRO* E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS**

**João Carlos Torrente Penteado**

**Orientador: Dra. Flavia Lombardi Lopes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba - SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P419c      Penteado, João Carlos Torrente.  
            Controle epigenético de genes “imprinted” em  
            placentas de gestações produzidas por transferência  
            embrionária, fecundação in vitro e transferência  
            nuclear em bovinos / João Carlos Torrente Penteado. -  
            Araçatuba, 2015  
            65 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

            Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
            Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de  
            Araçatuba

            Orientadora: Profa. Flavia Lombardi Lopes

            1. Bovinos 2. Biotécnicas reprodutivas 3. Modificação  
            de histonas 4. PHLDA2 5. TSSC4 6. Placenta I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba  
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



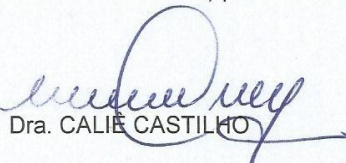
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Controle epigenético de genes "imprinted" em placentas de gestações produzidas por transferência embrionária, fecundação in vitro e transferência nuclear em bovinos

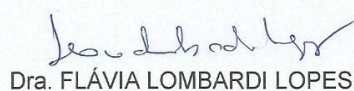
**AUTOR:** JOÃO CARLOS TORRENTE PENTEADO

**ORIENTADORA:** Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

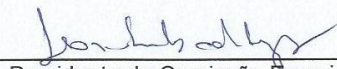
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

  
Dra. CALIE CASTILHO

  
Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTTI

  
Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 9 de dezembro de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES  
- Orientadora -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JOÃO CARLOS TORRENTE PENTEADO** – nascido em São José do Rio Preto no dia 25 de julho de 1988. Coursou o ensino fundamental na E.M.P.G. Antônio Daher e ensino médio na E.T.A.M. São Francisco de Assis em Colina – SP, concluído em 2006. No ano de 2008 ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – SP – FCAA, no curso de Medicina Veterinária onde concluiu o curso em 2012. Durante o último ano do ensino médio foi bolsista pela Fundepag na APTA Alta Mogiana em Colina – SP no período de 02/01/2006 a 24/12/2006. Na graduação, estagiou no Instituto de Terras do Estado de São Paulo – ITESP- como bolsista da Funep no período de 11/01/2010 a 11/01/2011. Em março de 2011 iniciou a bolsa de iniciação científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC- sob orientação do professor Me. José Reinaldo Bernardi. Ingressou no programa de mestrado em agosto de 2013, no curso de pós-graduação na área de Ciência Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP Araçatuba – SP, com bolsa de mestrado CAPES no período de agosto de 2013 a fevereiro de 2015, sob orientação da Dra. Flavia Lombardi Lopes.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”*

*Steve Jobs*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a meus pais que sempre me apoiaram, nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Eu amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

São meus sinceros agradecimentos...

A Deus por permitir a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus pais João Carlos e Terezinha, irmãos Clara Jaqueline e Pierre que tanto me apoiaram durante essa trajetória, incentivando e motivando todo momento.

A Dra. Flávia Lombardi Lopes que me mostrou de uma forma transparente como se desenvolve uma linha de pesquisa, mostrando como vencer dificuldades que aparecem no decorrer de um projeto. Também agradeço pelos ensinamentos, paciência e respeito que teve comigo durante todo esse período.

Ao Dr. Daniel Robert Arnold, Mariangela Maldonado, Roberta Gaspar, Rodolfo Junqueira e Laura Lorena pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos que dividem a casa comigo que sempre respeitaram meus horários de estudos e colaboraram para que eu pudesse me dedicar ao máximo neste trabalho.

Meus colegas de trabalho, sempre me apoiando e me substituindo para que eu me dedicasse 100% neste trabalho.

A família Spessotto, Paulo, Gislene, Giovana, Paulo Henrique e Gabriele, que me deram muito apoio, incentivo e motivação para sempre buscar meu melhor.

A minha namorada Gabriele (Gabi) que sempre me apoiou, me acompanhou em todos os momentos e me ajudou a concluir esse trabalho.



A Dra Tereza Cristina Cardoso Silva pela disponibilidade do laboratório e utilização de equipamentos.

A CAPES pela bolsa de mestrado servindo como um incentivo ao aluno.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação, fica aqui o meu MUITO OBRIGADO.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1	Desenvolvimento e função trofoblástica.....	21
2.2	Problemas placentários associados à técnica de transferência nuclear de células somáticas (TN) .....	22
2.2.1	Cultivo embrionário.....	23
2.3	Epigenética.....	24
2.3.1	Metilação do DNA.....	25
2.3.2	Cromatina e as modificações das histonas.....	26
2.3.3	Epigenética placentária.....	27
2.3.4	Alterações epigenéticas em embriões produzidos por TN.....	28
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos .....	31
3.2.1	Objetivo 1:.....	31
3.2.2	Objetivo 2:.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Produção dos Animais .....	32
4.2	Amostras produzidas por Transferência embrionária (TE).....	32
4.3	Animais produzidos por Fertilização <i>In Vitro</i> .....	33
4.4	Animais produzidos por Transferência Nuclear.....	34
4.5	Coleta de amostras.....	35
4.5.1	Extração de RNA.....	35
4.5.2	Produção do cDNA, Primers e PCR em tempo real .....	36
4.6	Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).....	37
4.6.1	Digestão de enzimas de restrição para análise parental de produtos ChIP.....	38
4.7	Análise estatística dos Resultados.....	39

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	40
5.1	Efeitos da reprodução assistida na expressão dos genes <i>PHLDA2</i> e <i>TSSC4</i> .....	40
5.2	Análise de CHIP na região promotora de <i>PHLDA2</i> e <i>TSSC4</i> .....	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>8</b>	<b>REFÊRENCIAS</b> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

% = Porcentagem

µg = Micrograma

µseg = microssegundos

°C = grau Celsius

ASCL2 = Achaete-scute complex homologue-like 2

CaCl<sub>2</sub> = Cloreto de cálcio

CCO = Complexo cúmulos oócito

ChIP = Cromatina Immunoprecipitation

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

CONGEA = Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNMTs = Metiltransferases

EUA = Estados Unidos da América

Fig = Figura

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH= Hormônio folículo estimulante

GAPDH = Glyceraldeyde-3-phosphate dihydrogenase

H19 = Histona 19

H2A = Histona 2 A

H2B = Histona 2 B

H3 = Histona 3

H3K4me2 = dimetilação da lisina quatro da histona três

H3K9me2 = dimetilação da lisina nove da histona três

H4 = Histona 4

H4K5 = Histona 4 lisina 5

HEPES = N- [2-hydroxyethyl] piperazine-N<sup>+</sup>- [2-ethanesulfonic acid]

IA = Inseminação Artificial

IC2 = Imprinting center 2

IFN-τ = Interferon tau

IgG = Imunoglobulina G  
ISTS = Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
kV = Quilovolt  
MCI = Massa Celular Interna  
me<sub>2</sub> = Dimetil  
mg = Miligrama  
min = Minuto  
MIV = Maturação *in vitro*  
mM = Milimol  
MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus  
mRNA = RNA mensageiro  
mSOF = Fluido sintético de oviduto modificado  
N° = Número  
O<sub>2</sub> = Oxigênio  
PAG = Pregnancy associated glycoproteins  
Pb= Pares de base  
PBS = Phosphate buffered saline  
PCR = Polymerase Chain Reaction  
PHLDA2 = Plectrin homology-like domain, family A, member 2  
PIC = Coquetel inibidor de protease  
PL = Placental lactogen  
POI = Puro de Origem Importado  
qPCR = PCR quantitativo  
RNA = ácido ribonucleico  
SAS = Statistical Analysis System  
SFB = Soro fetal bovino  
SOF = Fluido sintético de oviduto  
SP = São Paulo  
TCM-199 = Tissue culture medium 199  
TGC = Trophoblast giant cells  
TN = Transferência nuclear

TNCS = Transferência nuclear de células somáticas

TS = Trophoblast stem

TSA = Tricostatina A

TSSC4 = Tumour Suppressing Subtransferable Candidate 4

UCSC = Universidade da Califórnia, Santa Cruz

UI = Unidade internacional

## LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Sequência dos inicializadores utilizados para análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunoprecipitação da cromatina (ChIP). <i>GAPDH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. TSSC4. Tumor suppressing subtransferable candidate 4. PHLDA2. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2</i> .....	37
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Expressão relativa do gene *PHLDA2* em amostras de tecidos cotiledonares (A) e intercotiledonares (B) de placentas com 60 dias de gestação dos grupos TE, FIV e TN determinados por qPCR. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ )..... 40
- Figura 2- Expressão relativa do gene *TSSC4* em amostras de tecidos cotiledonares (A) e intercotiledonares (B) de placentas com 60 dias de gestação dos grupos TE, FIV e TN determinados por qPCR. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ )..... 41
- Figura 3- ChIP-qPCR da dimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me2) (A) e dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me2) (B) na região proximal do promotor do gene *PHLDA2* no dia 60 de gestação dos grupos TE, FIV e TN. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ )..... 42
- Figura 4- ChIP-qPCR da dimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me2) (A) e dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) (B) na região promotora proximal do gene *TSSC4* no dia 60 de gestação dos grupos TE, FIV e TN. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ )..... 43
- Figura 5- Análise alelo-específica da marcação para H3K4me2 na região promotora proximal do gene *PHLDA2*. Produtos de ChIP-qPCR para H3K4me2 de *PHLDA2*



oriundos de placenta com 60 dias de gestação, do  
cruzamento de *Bos taurus* (BT) x *Bos indicus* (BI),  
digeridos com *Acil*..... 44

## **CONTROLE EPIGENÉTICO DE GENES “IMPRINTED” EM PLACENTAS DE GESTAÇÕES PRODUZIDAS POR TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA, FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM BOVINOS**

**RESUMO** - O processo de desenvolvimento embrionário e placentário está sob controle epigenético intenso, com os diversos processos epigenéticos regulando a diferenciação de células pluripotentes em células especializadas. Um desenvolvimento placentário anormal é observado com frequência em gestações de clones, e está associado a uma alteração na reprogramação epigenética da célula doadora e do embrião formado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes “imprinted” *TSSC4* e *PHLDA2* em tecido cotiledonário e intercotiledonário, aos 60 dias de gestação, de placentas produzidas por Transferência Embrionária (TE), Fecundação *In Vitro* (FIV) e Transferência Nuclear (TN) em bovinos, e também investigar o controle epigenético desses genes na placenta bovina, avaliando o perfil epigenético dos mesmos em tecidos cotiledonários dos grupos experimentais (TE, FIV e TN). A expressão do gene *TSSC4* foi reduzida em 30% na região cotiledonária do grupo produzido por TN, no entanto a expressão do gene *PHLDA2* aumentou em aproximadamente onze vezes nos grupos TN e FIV, quando comparados ao grupo TE. Análises de ChIP para a histona H3 na região promotora proximal dos genes *TSSC4* e *PHLDA2* mostraram um aumento para a marcação permissiva H3K4me2 e uma redução para a inibitória H3K9me2 em cotilédones de placentas clonadas em relação às placentas produzidas por TE. Interessantemente, ambas as marcações de histonas para o gene *TSSC4* também estavam significativamente alteradas também em placentas produzidas por FIV, quando comparadas ao grupo TE. Esses resultados mostram que a expressão dos genes “imprinted” *TSSC4* e *PHLDA2* está alterada em placentas de gestações produzidas por transferência nuclear. Ainda, alterações na expressão do gene *PHLDA2* e das modificações de histona no gene *TSSC4*, nos cotilédones produzidos por FIV, indicam que o cultivo *in vitro* pode contribuir para as alterações observadas no grupo TN.

Palavras-chave: Bovino, biotécnicas reprodutivas, modificação de histonas,  
*PHLDA2*, *TSSC4*, placenta

**EPIGENETIC CONTROL OF "IMPRINTED" GENES IN PLACENTAS  
PRODUCED BY EMBRYO TRANSFER, *IN VITRO* FERTILIZATION AND  
NUCLEAR TRANSFER IN CATTLES**

**SUMMARY** - The process of embryonic and placental development is under high epigenetic control, with different epigenetic processes regulating the differentiation of pluripotent cells into specialized cells. An abnormal placental development is observed frequently in pregnancies produced by nuclear transfer, and is associated with incomplete epigenetic reprogramming of the donor cell and formed embryo. The objective of this study was to evaluate the expression of the imprinted genes *TSSC4* e *PHLDA2* in cotyledonary and intercotyledonary tissues, after 60 days of pregnancy, in placentas produced by Embryo Transfer (ET) *In Vitro* Fertilization (IVF) and Nuclear Transfer (NT) in cattle, and also to investigate the epigenetic control of this gene in the bovine placenta evaluating the epigenetic profile of cotyledonary tissues of the experimental groups (ET, IVF and NT). The *TSSC4* gene expression was reduced by 30% in the cotyledons in the NT group, however *PHLDA2* expression of the gene was elevated by 11-fold in NT compared to ET. ChIP analysis for histone H3 at the proximal promoter region of *TSSC4* and *PHLDA2* genes showed an increase to the permissive mark H3K4me2 and a reduction for the inhibitory mark H3K9me2 in the cotyledons of cloned placentae, in relation to placentae produced by ET, for both genes. Interestingly, the inhibitory mark H3K9me2 for *TSSC4* gene was also significantly reduced in placentae produced by IVF, compared to ET control group. These results show that expression of the "imprinted" genes *TSSC4* and *PHLDA2* is affected in placenta of pregnancies produced by nuclear transfer. Further, changes in expression of gene *PHLDA2* and histone modifications in *TSSC4* gene cotyledons produced by IVF indicate that the *in vitro* culture can contribute to the observed changes in NT group.

Keywords: Bovine, histone modification, reproduction biotechnologies,  
*PHLDA2*, *TSSC4*, placenta

## 1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de implantação e formação placentária são condições indispensáveis para a continuidade das espécies mamíferas (revisado por Hemberger (2007). Nos variados tipos de placentação, que apresentam desde uma adesão até a completa invasão do endométrio pelo embrião, uma variedade celular pode ser observada, garantindo o correto desenvolvimento e desempenho da função placentária. A diferenciação das células trofoblásticas nestes tipos celulares é coordenada através da ação de vários fatores de transcrição (ROSSANT; CROSS, 2001). No entanto, os mecanismos que controlam a expressão ou silenciamento destes fatores, orquestrando assim a diferenciação placentária, continuam pouco conhecidos.

A epigenética se refere a processos que regulam a expressão gênica sem afetar o código genético. Através do controle de sequências gênicas sem alterar a sequência nucleica em si, células geneticamente idênticas são capazes de se distinguir fenotipicamente, dependendo de sua localização e/ou função (LEVENSON; SWEATT, 2005).

Existe um controle epigenético intenso no desenvolvimento embrionário por estes mecanismos, o que permite que células produzidas no mesmo ambiente e que tem o mesmo genoma podem apresentar características diferentes. Diante disso, entende-se como células geneticamente idênticas as que possam se distinguir fenotipicamente, dependendo da sua localização ou função (BERGER et al., 2009).

O processo de desenvolvimento embrionário está sob intenso controle epigenético, já que os diversos mecanismos epigenéticos regulam a diferenciação de células pluripotentes em células especializadas (REIK, 2007).

Estudos mostraram que os mecanismos epigenéticos são sensíveis aos fatores ambientais e, durante a fase de pré-implantação, esses fatores tornam-se determinante para a regulação epigenética. (DURANTHON et al., 2008). No entanto, há uma interferência no mecanismo epigenético de acordo com o ambiente em que são colocados os gametas e embriões, podendo

influenciar diretamente no padrão de expressão de genes importantes relacionados à viabilidade genética (RIZOS et al., 2003).

Desde a produção do primeiro animal através da transferência nuclear de células somática (WILMUT et al., 1997), várias espécies foram clonadas com sucesso. Porém a produção de indivíduos capazes de sobreviver até o estágio adulto continua ineficiente, como no caso de bovinos, onde a taxa de sucesso permanece ao redor de 4% (CAMPBELL et al., 2007). Acredita-se que uma das causas principais para esta falha no desenvolvimento em animais clonados seja a incompleta reprogramação das células doadoras, resultando em falha na produção de células totipotentes e conseqüentes alterações epigenéticas persistentes durante o desenvolvimento embrionário e fetal (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; JOUNEAU; RENARD, 2003; TAMADA; KIKYO, 2004).

Pouco se sabe sobre o controle epigenético nos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento placentário. O entendimento do papel da epigenética no controle dos processos reprodutivos, bem como a capacidade de controlar os processos epigenéticos durante a produção *in vitro* de embriões e clonagem de bovinos, poderão gerar enormes avanços na ciência básica, assim como no campo das biotécnicas reprodutivas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

A placenta é o órgão que define os mamíferos euterianos (revisado por HEMBERGER, 2007), sendo também o primeiro órgão a se formar durante a embriogênese. A placenta é vital para a sobrevivência embrionária, sendo responsável pela interação materno-embrionária, necessária para a troca de gases, nutrientes e eliminação de produtos (ROSSANT; CROSS, 2001). A placenta também funciona como um órgão endócrino servindo de fonte de hormônios associados à gestação e também de fatores de crescimento. Em bovinos, a placentação é do tipo epiteliocorial-sindesmocorial, onde a adesão das membranas fetais, ou cotilédones, ocorre primariamente em áreas especializadas do endométrio, as carúnculas. As membranas fetais, que se apresentam lisas durante as primeiras quatro semanas de gestação, desenvolvem projeções vilosas próximas às carúnculas (KING et al., 1980).

Com a progressão da gestação, as carúnculas se remodelam formando criptas, que serão invadidas pelas vilosidades presentes nos cotilédones. Esta extensiva interdigitação entre os tecidos materno e fetal permite o estabelecimento de uma enorme área de contato e troca, estimada em 130m<sup>2</sup> (SCHLAFER et al., 2000). A unidade cotilédone-carúncula é conhecida por placentoma. Já o corioalantóide em contato com o endométrio entre os placentomas é chamado de região intercotiledonária. O desenvolvimento placentário normal é vital para o sucesso de gestações em mamíferos. Fatores genéticos precisam ocorrer e interagir de maneira precisa a fim de regular a formação da placenta, e um passo imprescindível neste processo é o desenvolvimento inicial da camada celular externa dos blastocistos, o trofotoderma.

### **2.1 Desenvolvimento e função trofoblástica**

Como em outras espécies de mamíferos, a mórula em bovinos dá origem à massa celular interna (MCI) e às células do trofotoderma, ou



trofoblastos (TS; do inglês “trophoblast stem”) no estágio de blastocisto (McLAREN, 1990). As células do MCI dão origem ao embrião, enquanto as células TS são as progenitoras da placenta (McLAREN, 1990). Com o avanço da gestação, as células TS em ruminantes se proliferam e em seguida se diferenciam em células mononucleadas e binucleadas/gigantes (WOODING; WATHES, 1980). Em bovinos, a população de células mononucleadas compõe a maioria das células placentárias de origem trofoblástica, e estas células estão envolvidas na produção de interferon-tau ( $IFN\tau$ ), responsável pelo reconhecimento materno da gestação (ROBERTS, 1992). Os trofoblastos binucleados/gigantes (TGC; do inglês “trophoblast giant cells”), aproximadamente 20% do trofotoderma, migram através da junção materno-fetal e se fundem com as células uterinas epiteliais (WOODING; WATHES, 1980). Tipos celulares similares estão presentes em outros mamíferos como murinos e humanos (CROSS, 2001).

A formação das TGCs ocorre através de mitose acitocinética (KLISCH, 1999). Estas células produzem „pregnancy-associated glycoproteins” (PAG), „placental lactogen” (PL), e „prolactin-related proteins”, em níveis detectáveis no soro materno com a progressão da gestação (WOODING, 1981) (KESSLER; SCHULER, 1991).

## **2.2 Problemas placentários associados à técnica de transferência nuclear de células somáticas (TN)**

A transferência nuclear tem sua maior importância na pesquisa biomédica, pesquisa transgênica, preservação das espécies entre outros (GALLI et al., 2003). Os resultados da transferência nuclear são baixos, de acordo com pesquisas, apenas 4% dos blastocistos produzidos por TN dão origem a um indivíduo normal e viável (CHAVATTE-PALMER et al., 2012) (CAMPBELL, 2007). Assim como a TN, a FIV em bovinos e humanos mostram índices baixos onde, 40% dos oócitos bovinos fecundados chegam ao estágio de blastocisto, destes 45% resultam em gestação (FARIN et al., 2006;

HANSEN et al., 2010). Essas porcentagens variam consideravelmente entre estudos (WESTHUSIN et al., 2001). Nas gestações de clones a perda gestacional entre os dias 30 e 60 variam de 60 a 80% (CIBELLI, 1998a), com vários estudos relatando anomalias placentárias nas gestações clonadas. Algumas das alterações observadas são: redução no número de cotilédones presentes, variando de 50 a 100% menos que os animais produzidos por FIV (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; HILL, 2000; MIGLINO et al., 2007), e também deficiências no estabelecimento da vascularização (HILL, 2000). Anomalias placentárias também foram encontradas em períodos mais avançados de gestações, onde além de número reduzido de placentomas, os mesmos apresentaram-se aumentados em tamanho (CIBELLI, 1998b; MAYER INIELEAU, 2000), podendo ser devido a uma fusão dos placentomas (MIGLINO et al., 2007).

### **2.2.1 Cultivo embrionário**

As condições do cultivo embrionário na produção de embriões, tanto por FIV como por TN, é fundamental para garantir que os embriões sejam viáveis. Adequação e controle dos fatores ambientais são imprescindíveis para que ocorra o correto desenvolvimento do embrião durante a fase pré-implantacional (BESENFELDER et al., 2012).

Para a obtenção de bons resultados na produção de embriões *in vitro* é necessário que o embrião se desenvolva em condições semelhantes às condições fisiológicas que ocorrem no desenvolvimento *in vivo* (HANSEN et al., 2010). Sendo assim, se faz necessário o conhecimento básico das condições ambientais no desenvolvimento embrionário *in vivo* (BESENFELDER et al., 2012), que são dinâmicos e complexos (HARVEY et al., 2007).

Os embriões são altamente vulneráveis a mudanças ligadas ao meio em que são expostos (DURANTHON et al., 2008). Inúmeros fatores influenciam diretamente no cultivo *in vitro* de embriões, tais como composição do meio, quantidade de embriões cultivados por volume de meio e atmosfera gasosa

(KHURAMA; NIEMANN, 2000), mostrando que o ambiente em que os embriões são submetidos, durante o cultivo *in vitro* influencia no desenvolvimento do embrião e no sucesso das biotécnicas.

Além do impacto no potencial de desenvolvimento e qualidade dos embriões, o cultivo embrionário pode estar diretamente ligado ao controle do perfil de expressão de genes, onde alterações na composição do meio de cultivo são capazes de modificar esse padrão (FELMER et al., 2011).

### **2.3 Epigenética**

Recentemente, as pesquisas na área da epigenética vêm adicionando uma nova dimensão aos estudos de expressão gênica. Epigenética se refere a processos que regulam a expressão gênica sem, porém, afetar o código genético, e que podem ser herdados através de divisão celular (BERGER et al., 2009). Simplificadamente, a epigenética é a conexão entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo. As diferenciações celulares que ocorrem durante o processo de desenvolvimento embrionário, incluindo a diferenciação trofoblástica, são eventos dependentes de modificações epigenéticas (PALINI et al. 2011). Através do controle de sequências gênicas sem alterar a sequência nucleica em si, células geneticamente idênticas são capazes de se distinguir fenotipicamente, dependendo de sua localização e/ou função (LEVENSON; SWEATT, 2005), a fim de garantir que a expressão gênica possa ser alterada durante a progressão do processo de diferenciação celular. Entre os processos epigenéticos conhecidos até o presente momento, destacam-se: 1) a metilação do DNA, silenciando ou estabilizando uma sequência gênica através da colocação de um grupo metil em citosinas do DNA; 2) a modificação das histonas, viabilizando ou impedindo o acesso de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação no DNA; 3) o silenciamento da expressão gênica através de non-coding RNAs.

No presente estudo focaremos nos processos de metilação do DNA e modificação das histonas, descritos a seguir com mais detalhes.

### 2.3.1 Metilação do DNA

Metilação do DNA é um importante processo epigenético presente nos genomas de vertebrados, plantas, fungos, algumas espécies de bactéria e invertebrados (GOLL; BESTOR, 2005). Este processo é responsável pela regulação da expressão gênica, inativação do cromossomo X, “imprinting” do genoma, e pelo estabelecimento da estrutura da cromatina a fim de assegurar a integridade do genoma (BESTOR, 2000). A metilação do DNA caracteriza-se pela colocação de um grupo metil na posição 5 do anel pirimídico da citosina, reação esta catalizada por uma família de 5 DNA (cytosine-5)-metiltransferases (*DNMTs*). A perda dos padrões de metilação é letal em embriões murinos (LI et al., 1992), assim como os níveis de metilação de vários genes “imprinted” são aberrantes na placenta de bezerros clonados que foram avaliados após a perda gestacional (SU et al., 2011), enfatizando o vital papel deste processo epigenético durante o desenvolvimento embrionário e placentário.

Os padrões de metilação do DNA, estabelecidos pela ação das *DNMTs*, são apagados em células germinativas primordiais (dia 10.5 a 12.5 de gestação em murinos), sendo os padrões sexo-específicos reestabelecidos nos gametas durante o processo de desenvolvimento das células germinativas masculinas e femininas (revisado por LUCIFERO et al., 2004). Após a fertilização, os genomas dos pronúcleos perdem sua metilação, o masculino de maneira ativa e o feminino de maneira passiva (MAYER; NIELEAU 2000; OSWALD et al, 2000), exceção feita à metilação de algumas sequências, como os genes “imprinted”, que é mantida durante a vida do organismo (revisado por LUCIFERO et al., 2004).

A metilação global do genoma do embrião é reestabelecida durante o período de peri-implantação (MONK et al., 1987). Como mencionado, metilação é um importante fator no estabelecimento de “imprinting”, que envolve a marcação epigenética de loci específicos no alelo de proveniência materna ou paterna para que estes genes (aproximadamente 96 caracterizados atualmente; (WOOD; OAKEY, 2006)) sejam expressos de maneira monoalélica,

apenas do alelo não metilado (REIK et al., 2001). Expressão inapropriada destes genes “imprinted” tem implicações para o crescimento, fenótipo e sobrevivência (BOURC’HIS et al., 2001; HOWELL et al., 2001). Várias síndromes incluindo Beckwith-Wiedemann, Prader Willi e Angelman, estão ligadas a expressão inadequada de genes “imprinted” (PAULSEN; FERGUSON-SMITH., 2001) e algumas técnicas de reprodução assistida em humanos provocam aumento na frequência das síndromes de Beckwith-Wiedemann e Russell-Silver (ARNAUD, FEIL., 2005).

### **2.3.2 Cromatina e as modificações das histonas**

O DNA precisa ser apropriadamente compactado na cromatina a fim de assegurar a compartimentalização nuclear do genoma. No entanto, a expressão gênica depende da acessibilidade da região reguladora dos genes aos fatores de iniciação e promoção da transcrição, indicando que os fatores que compõem a cromatina precisam ser regulados de maneira a garantir os padrões corretos de silenciamento ou expressão gênica.

A cromatina é composta pelo DNA e proteínas que se ligam ao material genético, divididos em unidades repetitivas denominadas nucleossomos. O nucleossomo consiste de 146 pares de base do DNA enrolados em torno de um grupo de histonas, composto por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (KORNBERG; LORCH, 1999). Estas histonas são altamente conservadas entre as espécies (KORNBERG; LORCH, 1999). Histonas apresentam uma região carboxi-terminal globular, que se liga ao DNA, e uma cauda amino-terminal flexível que se estende para fora do nucleossomo (LUGER et al., 1997). Dependendo da modificação adicionada a esta cauda, o nucleossomo irá conseqüentemente se abrir a fim de permitir o acesso de fatores de transcrição ao DNA (modificação permissiva ou ativa), ou permanecerá fortemente fechado, inibindo assim quaisquer interações de fatores com o DNA (modificação repressiva) (MORALES; RICHARD-FOY., 2000).

Certos aminoácidos da cauda amino-terminal podem adquirir as seguintes modificações: acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (FISCHLE et al., 2003). Cada uma das histonas está susceptível a várias modificações em seus aminoácidos e a presença de uma ou mais destas modificações levam a inibição ou indução da transcrição gênica (LUGER et al., 1997). De maneira geral, o tipo da modificação adicionada irá determinar se genes associados a esta histona serão expressos ou silenciados. É importante salientar que a adição de grupos di-metil (me<sub>2</sub>) nas lisinas 4 e 9 da histona H3 (H3K4 e H3K9) apresentam efeitos opostos na atividade dos genes a elas associados, onde H3K4me<sub>2</sub> resulta em ativação da expressão e H3K9me<sub>2</sub> está associada a genes com transcrição silenciada (FISCHLE et al., 2003).

### 2.3.3 Epigenética placentária

Estudos são de suma importância para podermos compreender melhor o papel de um gene no desenvolvimento embrionário, placentário e no crescimento neonatal. Estudos mostram que ao bloquear um gene, sua função é comprometida e resulta em progeneratura anormal ou letalidade do útero (BRESSAN et al., 2009; LEFEBVRE et al., 1998; ONO et al., 2006).

A utilização de modelos transgênicos em camundongos demonstram que animais com defeitos na aquisição e/ou manutenção da metilação do DNA apresentam defeitos importantes na formação placentária, e que são incompatíveis com a manutenção da gestação (ARIMA et al., 2006; LI et al., 1992), mostrando que a metilação tem também um papel importante no desenvolvimento da placenta.

Além do papel da metilação do DNA no desenvolvimento placentário, as modificações das histonas são também essenciais para o correto desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários. A manutenção do “imprinting” em vários genes envolvidos no desenvolvimento da placenta em murinos é dependente da modificação das histonas. Lewis et al. colaboradores (2004) demonstraram que o “imprinting” center 2” (IC2) no cromossomo 7 em

camundongos recruta as marcas de metilação das histonas H3K9me2 e H3K27me3 a fim de reprimir os alelos paternos de genes placentários específicos localizados nesta região, bem como *TSSC4*, *PLHDA2*. Em bovinos, pouco é conhecido a respeito destes outros genes placentários, com exceção de *TSSC4*, que parece ser também um gene “imprinted” (DEAN et al., 2001).

O gene *TSSC4* (*Tumour Suppressing Subtransferable Candidate 4*) é um dos vários genes de supressão de tumores localizados no domínio de genes “imprinted”. Este gene está localizado entre vários genes “imprinted” e sua importante expressão placentária é regulada por “imprinting” também em murinos, interessantemente apenas neste tecido (LEWIS et al., 2004), e bovinos (ZAITOUN; KHATIB., 2008), com expressão bialélica nos outros tecidos investigados em bovinos como: coração, fígado, baço, pulmão, rim, músculos e gordura (WANG et al., 2015). Em humanos este gene não apresenta “imprinting” (LEE et al., 1999; MONK et al., 2015), sendo portanto um gene onde o processo de “imprinting” é espécie-específico.

O gene *PHLDA2* (“*pleckstrin homology-like domain, family A, member 2*”), assim como o *TSSC4*, está localizado neste conjunto de genes “imprinted” no cromossomo 11p15.5 em humanos (PAULSEN et al., 2000a). Este gene é um gene “imprinted”, com expressão preferencial no alelo materno na placenta e no fígado, também sendo observado em bovinos (SIKORA et al., 2012). Uma relação inversa foi observada entre a expressão de *PHLDA2* no cordão umbilical em bebês humanos e o peso ao nascimento (LIM et al., 2012). Os níveis de expressão de *PHLDA2* em placentas humanas também estão negativamente correlacionados ao peso ao nascer (APOSTOLIDOU et al., 2007).

#### **2.3.4 Alterações epigenéticas em embriões produzidos por TN**

A importância dos estudos epigenéticos é evidenciada no emprego das técnicas reprodutivas, onde oócitos e/ou embriões são cultivados durante períodos críticos da aquisição dos padrões epigenéticos, fato especialmente relevante para a técnica de clonagem, onde o padrão epigenético somático da célula doadora tem que ser reprogramado. O processo de produção de um indivíduo a partir de uma célula diferenciada demonstra que os programas genéticos e epigenéticos podem de fato ser manipulados a fim de restaurar a pluripotência celular (SHI et al., 2003). Porém a baixa eficiência na produção de clones viáveis aponta para um incompleto processo de reprogramação epigenética do núcleo doador (SHI et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, uma perda global da metilação ocorre em zigotos de camundongos, bovinos e suínos, seguida por uma re aquisição da metilação em estádios mais avançados do desenvolvimento embrionário (DEAN et al., 2001). Porém embriões clonados, apesar de demonstrarem a perda da metilação ativa inicial normal, não procedem com o processo de perda passiva adequadamente, como observado em embriões não-clonados (DEAN et al., 2001). No mais, uma grande proporção de embriões clonados apresentam uma metilação *de novo* precoce e que se assemelha ao padrão da célula doadora (DEAN et al., 2001). Mann et al (2003) demonstrou também defeitos na manutenção da expressão monoalélica de genes “imprinted” em blastocistos murinos produzidos por TN. Santos et al. (2003) demonstraram que embriões bovinos produzidos por TN apresentaram uma hipermetilação global do DNA associada a uma hipermetilação da H3K9. Outro estudo demonstrou que um baixo nível de acetilação da lisina 5 na histone H4 (H4K5ac) em embriões bovinos produzidos por TN (WEE et al., 2006). Quando comparados a embriões produzidos por FIV, os embriões bovinos de TN apresentam elevada metilação nas histonas nas regiões heterocromáticas (H3K9me2) bem como elevados níveis de acetilação na lisina 9 da histona H3 nas células do trofotoderma (SANTOS et al., 2003).

Uma plausível consequência de tais diferenças epigenéticas nos embriões produzidos por TN seria a alteração na expressão de genes vitais



para o desenvolvimento embrionário e/ou fetal e placentário. De fato existe uma correlação entre a porcentagem de embriões capazes de atingir o estágio de blastocisto e a proporção de embriões apresentando um epigenótipo normal. Análise em bovinos do gene “imprinted” H19 demonstrou que animais clonados que morreram logo após o nascimento apresentavam expressão bialélica deste gene (ZHANG et al., 2004). O papel da reprogramação epigenética na produção de embriões clonados é também evidenciado em experimentos onde o tratamento de células doadoras com tricostatina A (TSA), um inibidor da desacetilação das histonas, resultou em um aumento no desenvolvimento de embriões clonados (ENRIGHT et al., 2003). Em outro experimento, o tratamento de embriões clonados com TSA resultou em níveis de acetilação da H4K5, taxas de desenvolvimento embrionário e número total de células embrionárias, similares aos embriões controle produzidos por FIV (IAGER et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a expressão de genes “imprinted” importantes para o desenvolvimento placentário e investigar o controle epigenético nesses genes.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### **3.2.1 Objetivo 1:**

Avaliar a expressão dos genes “imprinted” *TSSC4* e *PHLDA2*, importantes para o desenvolvimento placentário, em tecido cotiledonário e intercotiledonário de placentas produzidas por Transferência Embrionária (TE), Fecundação *In Vitro* (FIV) e Transferência Nuclear (TN), em bovino.

##### **3.2.2 Objetivo 2:**

Investigar o controle epigenético dos genes *TSSC4* e *PHLDA2* na placenta bovina avaliando o perfil epigenético desses genes, nos tecidos cotiledonários dos grupos experimentais (TE, FIV e TN).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Produção dos Animais**

Para realização desse experimento, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. LOUIS, MO, EUA) todos os produtos químicos. Os protocolos de tratamentos que tiveram animais envolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, em conformidade com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizadas amostras de tecidos cotiledonários e intercotiledonários, obtidas aos 60 dias de gestação de fêmeas *Bos indicus* (Seis Nelores POI) adquiridas na Fazenda Brumado (BARRETOS, SP, BRASIL) inseminadas com sêmen *Bos taurus* (Hereford POI) comprado na CRV Lagoa (SERTÃOZINHO, SP, BRASIL). Aos 7 dias após as inseminações destas fêmeas, os embriões foram coletados por lavagem uterina e transferidos para receptoras mestiças, devidamente sincronizadas (n=4). Para os experimentos com FIV (n=18), o mesmo genótipo foi utilizado (mesmas fêmeas e mesmo lote de sêmen). Células fibroblásticas de 7 fetos obtidos por FIV, após 60 dias de gestação, foram utilizadas como doadoras para a produção dos animais por transferência nuclear (n=36), eliminando assim a variabilidade genotípica.

### **4.2 Amostras produzidas por Transferência embrionária (TE)**

Para a produção de amostras de TE, foi feita o tratamento de superovulação nas doadoras como descrito a seguir. No dia 0 foi aspirado o folículo dominante e colocado o implante de progesterona (INTERVET VETERINÁRIA DO BRASIL, CRUZEIRO, BRASIL) permanecendo dos dias 0-7. Dos dias 4-7 foi injetado Follitropin-V (BIONICHE ANIMAL HEALTH CANADÁ, BELLEVILLE, CANADÁ) com intervalo de 12 horas, com doses

diárias decrescentes (50, 40, 40, 30, 30, 20 mg, total de 210 mg). No dia 6, foi injetado 500 µg de cloprostenol (OUROFINO, SAÚDE ANIMAL, CRAVINHOS, SP, BRASIL). No dia 9 foi feita injeção de Buserelina e os animais foram inseminados, 12 e 24 horas após a injeção, com sêmen do touro Hereford. Após sete dias da IA, foi feita a lavagem uterina nas doadoras nelore superovuladas. Blastocistos grau 1 e 2 (qualidade alta), de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS), foram selecionados e transferidos imediatamente nas receptoras cruzadas anteriormente sincronizadas (estro sete dias antes do dia da transferência) para ter um controle nos efeitos em relação aos outros grupos quando utilizado a transferência, e também diminuindo o risco de morte das novilhas nelores.

### **4.3 Animais produzidos por Fertilização *In Vitro***

A FIV foi realizada a partir de oócitos de fêmeas *Bos indicus* (as mesmas fêmeas utilizadas como doadoras de embriões no grupo TE descrito acima) e sêmen *Bos taurus* (o mesmo touro e lote utilizado para os animais produzidos para o grupo TE). Nos dias 4-6 foram administradas doses decrescentes de FSH (50, 40, 40, 30UI (LABORATÓRIO CALIER, BARCELONA, ESPANHA), total de 160UI de FSH por animal. No sétimo dia oócito foram coletados.

Os Complexos cúmulus-oócitos foram coletados e o fluido folicular aspirado, em seguida lavado com tampão HEPES TCM-199 (LIFES TECHNOLOGIES, GRAND ISLAND, NY, EUA). Após a lavagem, foi feita a suplementação com 10% de soro fetal bovino (SFB, CRIPION, ANDRADINA, BRASIL). Grupos de 25 CCOs foram colocados em meio de cultivo MIV (TCM-199 suplementado com 10% soro fetal bovino, 1.0 µg/mL de FSH (BIONICHE, ANIMAL HEALTH, CANADÁ), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (MERCK SERONO, SÃO PAULO, BRASIL), 1.0 µg/mL de estradiol, 16µg/mL piruvato de sódio e 83.4µg/mL de amicacina) com 5% de CO<sub>2</sub> em umidade saturada. Após 24 horas em MIV, os oócitos foram fertilizados por 24 horas

como descrito em Oliveira et al. (2013). Foi usado sêmen de touro Hereford como descrito acima, processado em gradiente de Percoll (45%/90%) numa concentração de  $5 \times 10^3$  espermatozóides por oócito.

Após fertilizados, os zigotos foram desnudados e cultivados em fluido sintético de oviduto (SOF) e aminoácidos (1.4 mM Glicina, 1mM Glutamina, 0.4mM Alanina, 2% aminoácidos essenciais e 1% de aminoácidos não essenciais (GARDNER et al 1994)) suplementados com 5 $\mu$ g/mL de albumina de soro fetal bovino e 2.5% SFB, em umidade atmosférica a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> por 7 dias.

#### **4.4 Animais produzidos por Transferência Nuclear**

As células doadoras para TN são de fetos de FIV (n=3), onde foram realizadas culturas primárias de fibroblastos oriundos dos fetos FIV coletados aos 60 dias de gestação de *Bos taurus* x *Bos indicus*. As células com 60 dias de gestação foram coletadas, cultivadas em meio Dulbecco's Eagle's suplementados com 10% de SFB e 50 unidades por mL de penicilina-estreptomicina (LIFE TECHNOLOGIES, GRAND ISLAND, NY, EUA) em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 39°C. Entre a passagem 2 e 5, as células doadoras foram deixadas para crescimento e confluência, e mantidas 2 dias antes do uso para obter células no estágio G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> do ciclo celular.

Para remoção das células do cumulus foi utilizado hialuronidase 0,2% e a seleção dos oócitos se baseou na presença do primeiro corpúsculo polar como descrito em Bordignon et al. (2003). A micromanipulação dos oócitos foi conduzida em PBS contendo 7.5  $\mu$ g/ml de citocalasina B (SIGMA), onde o primeiro corpúsculo polar foi removido junto com aproximadamente 30% do citoplasma oocitário. Um único fibroblasto fetal foi introduzido no espaço perivitelínico oocitário. Os fibroblastos utilizados foram derivados dos fetos produzidos por FIV obtidos ao dia 60 de gestação, utilizados no experimento. Os oócitos com os fibroblastos foram colocados em 0.3 M de manitol contendo 0.1 mM de MgSO<sub>4</sub> e 0.05 mM de CaCl<sub>2</sub> e então aplicou-se um pulso elétrico de

1.5-kV por 70  $\mu$ seg. Os óocitos reconstruídos foram depositados em gotas de 50 $\mu$ l de fluido sintético de oviduto modificado (mSOF). Após 1-2 h em cultura, os embriões foram examinados para determinar a fusão, e então expostos a 5 mM ionomicina (SIGMA) por 4 minutos a fim de induzir ativação partenogenética. Os embriões foram cultivados em mSOF a 39°C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub> por 7 dias. Após este cultivo os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas, e a coleta realizada aos 60 dias de gestação.

#### **4.5 Coleta de amostras**

Semelhante ao grupo TE, os embriões de 7-8 dias dos grupos FIV e TN foram transferidos por técnica não cirúrgica em receptoras já sincronizadas. No dia 59 foi realizado o diagnóstico de gestação feito por ultrassonografia retal em todos os grupos (TE, FIV e TN) e no dia 60 de gestação os animais foram abatidos. A taxa de gestação para TE foi de 75% (3/4), para FIV foi de 33,3% (6/18) e para TN foi de 19,4% (7/36). O transporte dos úteros do abatedouro até o laboratório foi feito em gelo para serem processados. O comprimento dos fetos foi medido (“crown-rump length” (CRL)), quatro a cinco placentomas foram fixados em formalina 10% tamponada. Foram contados os cotilédones, tecidos cotiledonários e intercotiledonários foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a análise.

##### **4.5.1 Extração de RNA**

O RNA foi extraído a partir das amostras de tecidos cotiledonários e intercotiledonários com o kit RNeasy mini kit (QIAGEN, MISSISSAUGA, CANADÁ), seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, pedaços de aproximadamente 30 mg de tecido foram cortados e colocados em tubos de 1,5 ml adicionado 600  $\mu$ l do tampão RLT e 6  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi homogeneizado em homogeneizador de

tecidos e a extração seguiu o protocolo do kit, com eluição do RNA ao final em 30µl de água livre de RNase. A concentração do RNA foi medida no aparelho NanoDrop® 2000 (THERMO SCIENTIFIC, OTTAWA, CANADÁ) para posteriormente realizar a produção do DNA complementar (cDNA), descrita a seguir.

#### **4.5.2 Produção do cDNA, Primers e PCR em tempo real**

Para a produção do cDNA foi utilizada a enzima transcriptase reversa Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV, INVITROGEN, CALIFORNIA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Utilizou-se o primer universal oligodT. Para cada amostra, 1.500 ng de RNA total foram utilizados na reação de transcrição reversa.

Os primers foram construídos a partir das sequências dos genes e seus RNAm, adquiridos através do genoma bovino disponível na Universidade da Califórnia, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser [<http://genome.ucsc.edu/>]. O programa utilizado para construção dos primers a partir destas sequências foi o Primer3 (ROZEN; SKALETSKY., 2000).

A reação de PCR em tempo real, para avaliar a expressão dos genes *TSSC4* e *PHLDA2*, foi realizada com uso do termociclador MxPRO3005 PCR (AGILENT, SANTA CLARA, CA, EUA) e o kit da enzima QuantiTect SYBR Green (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. Cada reação de PCR foi realizada em triplicata para cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação relativa do gene selecionado em relação à sua curva padrão, ajustado pelo gene de controle endógeno *GAPDH*. A sequência dos primers está disponível na Tabela 1.

**Tabela 1-** Sequência dos inicializadores utilizados para análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunoprecipitação da cromatina (ChIP). *GAPDH*. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *TSSC4*. *Tumor suppressing subtransferable candidate 4*. *PHLDA2*. *Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2*

Gene	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>GAPDH</i>	AAGGCCATCACCATCTTCCA	CCACTACATACTCAGCACCAGCAT
<i>TSSC4</i>	AAGATGTGTCCCAAGGTTGC	AGACCGGAATTGACTCAGGA
<i>TSSC4</i> - ChIP	AAGATGTGTGTCCCAAGGTTGC	GGATTGAACCCAGGTCTCCT
<i>PHLDA2</i>	CCAGGTGTGGAAGAAGAAGC	GACGCGTTCCAGTAGCTCTC
<i>PHLDA2</i> : ChIP	GGCAGGAGCTAGCAATCACT	GAGCCTAGGGAGTGGGAAAG

#### 4.6 Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

A técnica de ChIP permite verificar se proteínas específicas estão ligadas a uma sequência gênica de interesse. Esta técnica foi utilizada para estudar a presença de modificações das histonas (permissivas: H3K4me2 e inibitórias: H3K9me2) à região promotora proximal dos dois genes “imprinted” nas placentas dos três grupos experimentais. Foi usado o kit. Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, DANVERS, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 50 mg de tecidos cotiledonários foram picados e incubados com 1,5% de formaldeído em PBS associado à coquetel inibidor de protease (PIC) durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Após a ligação cruzada, os tecidos foram lavados em PBS associado à PIC e desagregados com um homogeneizador Dounce (SIGMA). Após foi feita lavagem com PBS, digerido, seguindo as recomendações do fabricante e realizado sonicação (oito pulsos de 10



segundos com 50% de amplitude com 1 minuto de intervalo entre os pulsos), com o uso de sonicador Vibracell (SONICS AND MATERIALS NEWTOWN, CT, EUA). Foi recolhido a cromatina digerida e adicionado anti-dimetil H3K9 (diluição a 1:25, MERCK, TEMECULA, CA, EUA) anti-dimetil H3K4 (diluição a 1:25, CELL SIGNALING TECHNOLOGY) ou IgG de coelho não imune (utilizado como controle negativo), as amostras foram imunoprecipitadas a 4°C de um dia para o outro. Foi recolhido o precipitado com esferas de proteína G-agarose, o DNA recuperado foi purificado em colunas fornecidas pelo kit de purificação. Os iniciadores para PCR em tempo real estão na Tabela 1.

#### **4.6.1 Digestão de enzimas de restrição para análise parental de produtos ChIP**

O produto do ChIP-PCR dos genes de *PHLDA2* e *TSSC4* em TE (n = 3), FIV (n = 4) e NT (n = 5) foram digeridos com as enzimas de restrição *Acil* para *PHLDA2* e *PstI* para *TSSC4* (NEW ENGLAND BIOLABS - PICKERING, ON, CANADÁ) que reconhecem e digerem, no alelo materno, uma sequência específica, separando-o visualmente do alelo paterno, baseado nos polimorfismos de nucleotídeo único presentes nos F1 obtidos do cruzamento *Bos taurus* (Hereford - macho) x *Bos indicus* (Nelore – fêmea). Os produtos de PCR foram digeridos a 37 ° C durante 1 h seguido de inativação a 65 ° C durante 20 minutos para a enzima *Acil* (*PHLDA2*) e para a enzima *PstI* (*TSSC4*) foram 37°C durante 1 hora, seguindo de inativação a 80°C durante 20 minutos. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e as bandas foram visualizadas com a utilização do brometo de etídio em luz ultravioleta. Para analisar a intensidade da banda, foi usado o Software ImageJ (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, BETHESDA, MD, EUA).

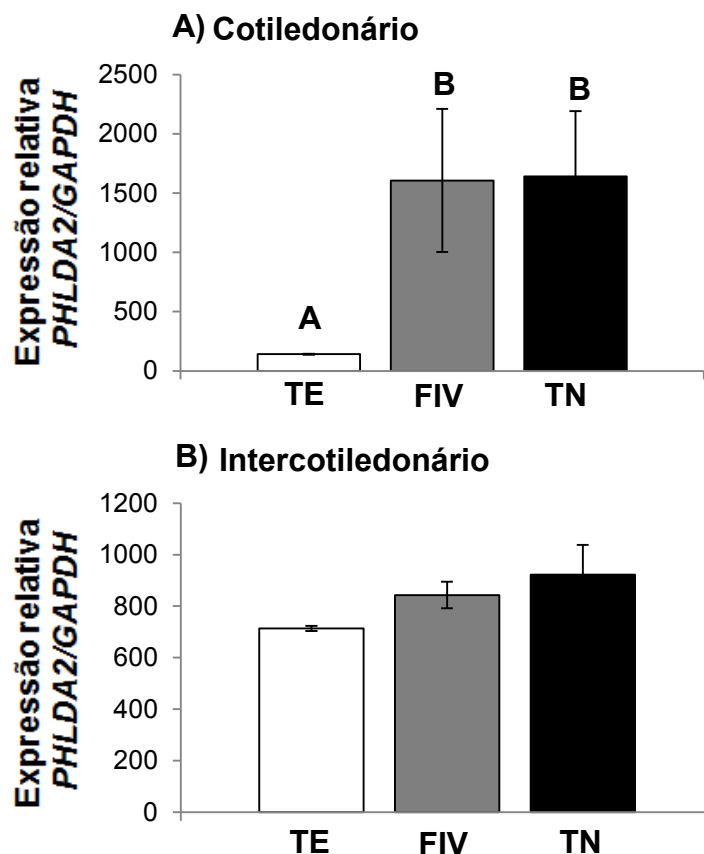
#### **4.7 Análise estatística dos Resultados**

O tamanho dos fetos, dos cotilédones, contagem de células gigantes, expressão gênica, CHIP e digestão foram analisados com análise de variância ANOVA, pelo General Linear Model Procedures do SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA). A comparação das médias foi feita com o Duncan's Multiple Range Test. A significância foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

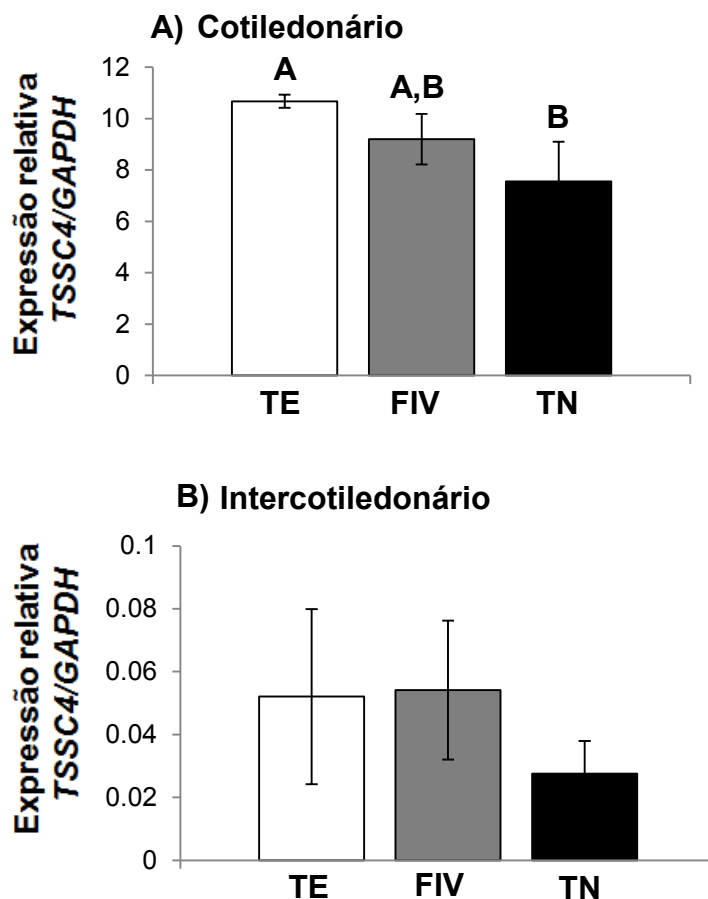
### 5.1 Efeitos da reprodução assistida na expressão dos genes *PHLDA2* e *TSSC4*

Quando comparada a expressão do gene *PHLDA2* em tecidos cotiledonários, houve um aumento de 11 vezes no Grupo TN em relação ao grupo TE. Inesperadamente, foi observado um aumento nesta mesma magnitude na expressão do *PHLDA2* no Grupo FIV, quando comparado ao grupo TE (Figura.1A). Quando analisamos os tecidos intercotiledonários tivemos as mesmas tendências no perfil de expressão entre os grupos, porém sem diferença significativa (Figura. 1B)



**Figura 1-** Expressão relativa do gene *PHLDA2* em amostras de tecidos cotiledonares (A) e intercotiledonares (B) de placentas com 60 dias de gestação dos grupos TE, FIV e TN determinados por qPCR. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ ).

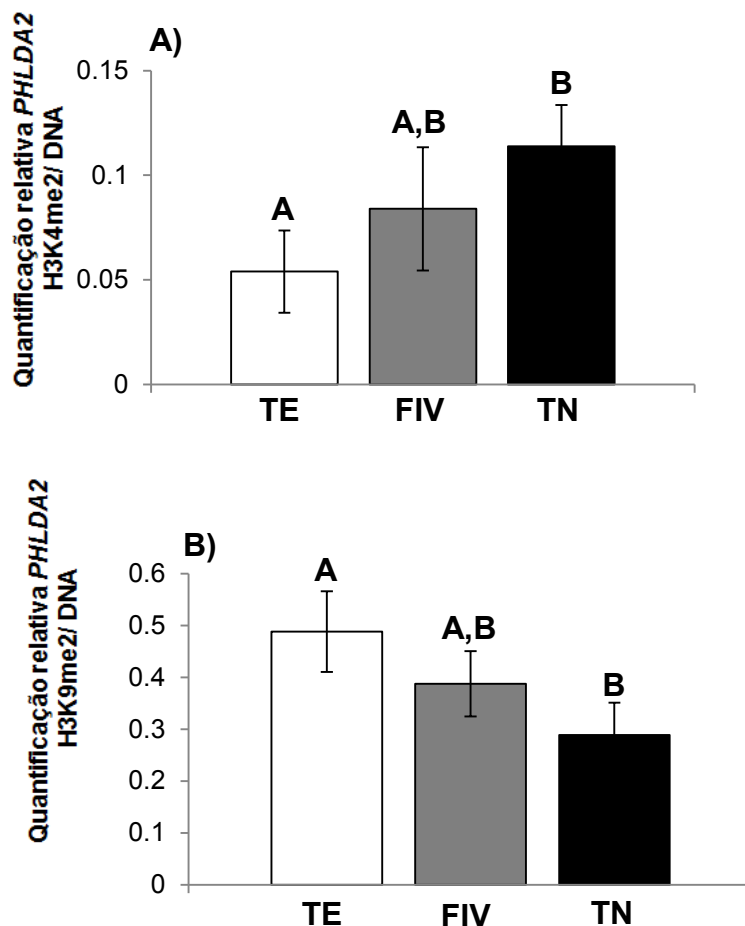
A expressão do gene *TSSC4* foi menor na região cotiledonária em placentas produzidas por TN aos 60 dias de gestação, quando comparada às amostras controle, produzidos por TE. Um decréscimo em torno de 30% na expressão gênica do *TSSC4* foi observado nos cotilédones produzidos por TN ( $p < 0.05$ ). As amostras produzidas por FIV apresentaram valores intermediários aos grupos controle e TN, porém sem diferença significativa em relação aos dois outros grupos (Figura 2A). Avaliamos também o nível de expressão de *TSSC4* em tecidos intercotiledonários dos três grupos, mas não encontramos diferença significativa entre eles (Figura 2B).



**Figura 2-** Expressão relativa do gene *TSSC4* em amostras de tecidos cotiledonares (A) e intercotiledonares (B) de placentas com 60 dias de gestação dos grupos TE, FIV e TN determinados por qPCR. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ ).

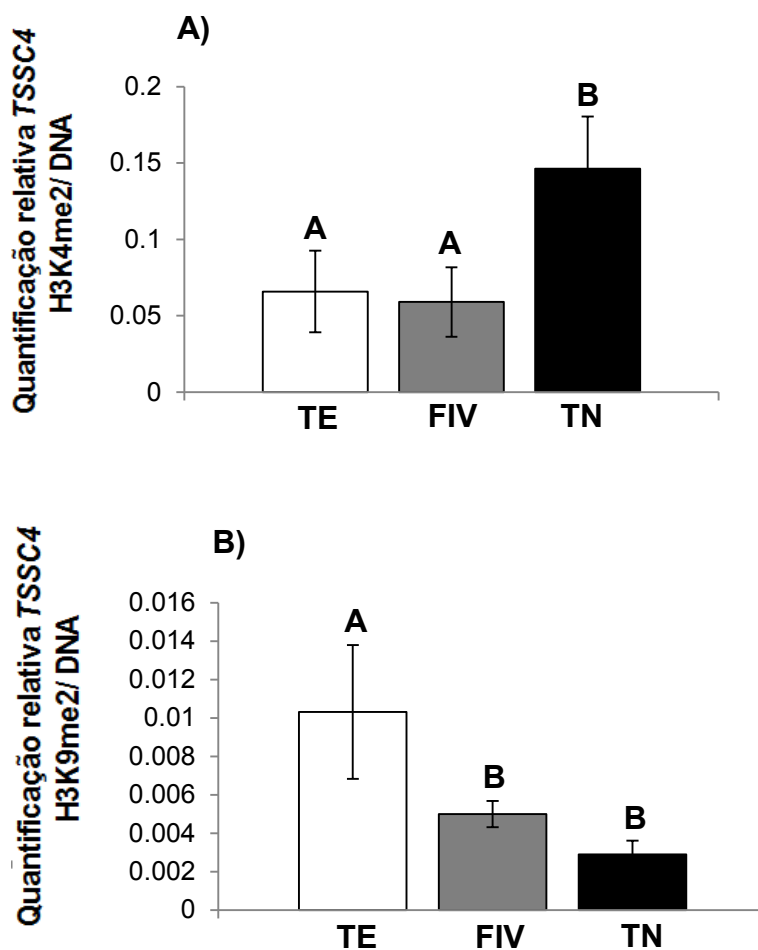
## 5.2 Análise de CHIP na região promotora de *PHLDA2* e *TSSC4*

Para o promotor proximal do gene *PHLDA2*, houve um aumento na histona permissiva H3K4me2 para as amostras produzidas por TN quando comparadas com as amostras TE ( $p < 0,05$ , Figura 3A). Com relação à modificação inibitória H3K9me2, observamos uma redução nas amostras produzidas por TN quando comparadas ao grupo TE ( $p < 0,05$ , Figura 3B). Para ambas as modificações, a marcação nas amostras produzidas por FIV não diferiu dos outros dois grupos.



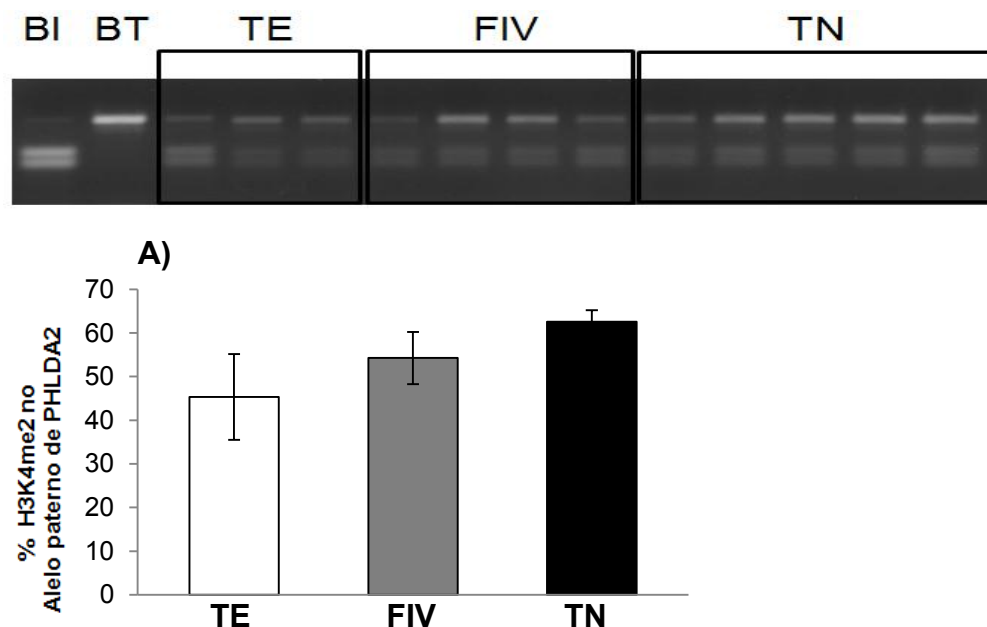
**Figura 3-** CHIP-qPCR da dimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me2) (A) e dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me2) (B) na região proximal do promotor do gene *PHLDA2* no dia 60 de gestação dos grupos TE, FIV e TN. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ ).

A dimetilação de lisinas na histona H3 associada ao promotor proximal do gene *TSSC4* foi alterada devido ao uso das biotécnicas FIV e TN. Na análise de CHIP para a modificação de histona permissiva (H3K4me2), os valores foram maiores em clones que em amostras TE e FIV. Por outro lado, a marcação da histona inibitória (H3K9me2) foi significativamente menor em clones, e também em amostras produzidas por FIV, que em amostras do grupo TE. (Figura 4).



**Figura 4-** CHIP-qPCR da dimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me2) (A) e dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) (B) na região promotora proximal do gene *TSSC4* no dia 60 de gestação dos grupos TE, FIV e TN. Letras diferentes sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0.05$ )

A utilização de *Bos taurus* (paterno) x *Bos indicus* (materno) para cruzamento nos permitiu identificar os alelos parentais baseados em SNPs entre Hereford e Nelore, para *PHLDA2* e *TSSC4*, das placentas F1 com 60 dias de gestação, dos três grupos. Bandas distintas a partir da digestão com a enzima *Acil* para *PHLDA2* quantificou a porcentagem de H3K4me2 para cada alelo de placentas F1. As placentas de clones tinham em média 20% mais dimetilação na marca permissiva (H3K4) sobre o alelo paterno, que é normalmente silenciado pelo processo de “imprinting”, quando comparadas com placentas de TE. Em placentas do grupo FIV o aumento da dimetilação em H3K4 foi de 10% comparado a TE (Figura 5A). Na avaliação feita para o gene *TSSC4* não houve diferença na distribuição alélica das marcações de histonas H3K4me2 e H3K9me2 entre os grupos. Estes resultados para o gene *TSSC4* indicam que, apesar do aumento significativo na dimetilação de H3K4 no grupo TN, e na diminuição da dimetilação de H3K9 nos grupos TN e FIV, estas diferenças não foram alelo-específicas.



**Figura 5-** Análise alelo-específica da marcação para H3K4me2 na região promotora proximal do gene *PHLDA2*. Produtos de ChIP-qPCR para H3K4me2 de *PHLDA2* oriundos de placenta com 60 dias de gestação, do cruzamento de *Bos taurus* (BT) x *Bos indicus* (BI), digeridos com *Acil*.

## 6 DISCUSSÃO

A técnica de reprodução assistida de TN para clonagem, mesmo com quase três décadas de aprimoramento, ainda tem uma baixa eficiência, em torno de 4% de sucesso no nascimento (CAMPBELL et al., 2007). Os riscos de perda gestacional são altos em qualquer fase da gestação devido, em grande parte, a uma má formação placentária. Neste estudo, buscamos investigar a expressão dos genes *TSSC4* e *PHLDA2*, que apresentam “imprinting” placentário (MONK, 2015), e o seu controle epigenético na placenta.

Para este estudo delinearíamos um modelo altamente controlado, onde utilizamos as mesmas fêmeas (*Bos indicus*) e o mesmo macho (*Bos taurus*) para a formação dos três grupos estudados (TE, FIV e TN) com o intuito de eliminar a variabilidade genotípica. Ainda, foram usadas células de fibroblastos de fetos coletados do grupo de FIV a partir do dia 60 de gestação para a realização da TN. Este modelo controlou, da melhor maneira possível, as variações genéticas entre os grupos, permitindo que o papel da epigenética no controle dos genes *PHLDA2* e *TSSC4*, pudessem ser avaliados de maneira bastante individualizada.

Análises morfológicas das amostras fetais e placentárias, utilizando este modelo, foram previamente relatadas pelo nosso grupo (ARNOLD et al., 2015) onde demonstramos que apesar de serem numericamente maiores, os fetos produzidos por FIV e TN, que tiveram um comprimento de  $8.0 \pm 0.3$  e  $8.3 \pm 0.2$  centímetros respectivamente, não diferiram significativamente em tamanho dos fetos produzidos no grupo controle produzido por TE ( $7.8 \pm 0.3$  centímetros). Os cotilédones visivelmente identificáveis de todos os grupos foram contados, não havendo diferença significativa entre os grupos TE ( $60.0 \pm 5.2$ ), FIV ( $69.0 \pm 8.0$ ) e NT ( $54.4 \pm 6.6$ ). Também foram analisados os números de células mono e binucleadas em cortes histológicos dos três grupos. Curiosamente a porcentagem de células binucleadas por animal variou significativamente entre os três grupos, sendo o grupo TN o que demonstrou o nível mais baixo, com  $13.0 \pm 0.4\%$  de célula binucleadas, seguido da FIV com o nível médio de



17.4±4.2%, e o grupo TE com o valor mais elevado de 20.8±0.9%, indicando um comprometimento no processo de formação dos tipos celulares na placenta destes animais produzidos por técnicas reprodutivas.

Nos genes expressos na placenta, muitos apresentam o processo de “imprinting” (UMLAUF et al., 2004), sendo portanto expressos monoalelicamente dependendo da origem materna ou paterna (MORISON et al., 1998), e os genes *PHLDA2* e *TSSC4* fazem parte deste grupo de genes sob o controle epigenético de sua expressão alélica na placenta (MONK, 2015). Tanto *PHLDA2* como *TSSC4*, são genes expressos pelo alelo materno em camundongos (MONK et al., 2006, TUNSTER et al., 2010). Como foi visto no presente estudo, a expressão destes genes está alterada nos cotilédones de animais produzidos por FIV e TN (*PHLDA2*), ou só TN (*TSSC4*). Alterações na expressão gênica podem afetar diretamente o desenvolvimento da placenta, e resultar posteriormente em perda gestacional, como relatado em outros estudos feitos em camundongos, onde o desenvolvimento placentário foi de 10 a 20% menor nos dias 16,5 e 18,5 de gestação em animais geneticamente modificados para expressar maiores quantidades de *PHLDA2* na placenta (SALAS et al., 2004; TUNSTER et al., 2010; TUNSTER et al., 2014), quando e 10% menor no dia 16,5 de gestação em camundongos transgênicos comparados a camundongos normais (SALAS et al., 2004). Ainda em camundongos, a supressão do gene *PHLDA2* resulta no aumento do tamanho placentário (FRANK et al., 2002). A redução da expressão desse gene na gestação bovina está diretamente ligada a um supercrescimento da placenta no terço final da gestação (GUILLOMOT et al., 2010). Interessantemente, em nosso estudo observamos um aumento significativo de mais de 10 vezes na expressão do gene *PHLDA2* em clones quando comparado ao grupo controle TE, levando em consideração que não houve diferença entre o tamanho dos fetos e a quantidade de cotilédones entre os grupos. A diferença entre os estudos pode estar no tipo de célula doadora, amostras analisadas ou protocolos experimentais. Neste trabalho utilizamos células de fibroblastos fetais como doadoras para o grupo TN diferentemente do estudo realizado por

Guillomot et al. (2010), que utilizou células de fibroblastos adultos. Outra diferença entre os dois estudos está no meio utilizado para a cultura dos embriões, sendo que neste estudo foi utilizado meio SOFaa e no estudo feito por Guillomot et al. (2010) os embriões foram cultivados em meio B2. Em nosso estudo as amostras são derivadas de gestações de TE, FIV e TN viáveis. No estudo de Guillomot et al. (2010) as gestações comparadas foram IA e TN viáveis e não viáveis. Outro fator importante foi que, em nosso trabalho foi avaliada a expressão de *PHLDA2* aos 60 dias de gestação, e não temos dados de expressão em fases mais adiantadas da gestação, tal como mostrado por Guillomot et al. (2010), onde as placentas foram avaliadas aos 200 dias de gestação, ou em camundongos, aos 10 dias (revisado por JENSEN et al., 2014).

Também foi observado um aumento na expressão do gene *PHLDA2* em amostras de FIV semelhante ao encontrado em TN, podendo estar relacionado ao efeito de cultivo, uma vez que ambos os grupos foram expostos a condições idênticas de cultivo *in vitro*. Um estudo recente demonstra a importância do controle na expressão do gene *PHLDA2* no desenvolvimento pré-implantacional em embriões bovinos produzidos por FIV (DRIVER et al., 2013). Neste estudo, Driver et al (2013) relata que houve maior expressão deste gene em embriões degenerados comparados com embriões que atingiram o estágio de blastocisto. Os autores ainda reduziram artificialmente a concentração de RNAm de *PHLDA2* por microinjeção de oligonucleotídeos de RNA de interferência, e isto resultou em aumento na porcentagem de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto (DRIVER et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo juntamente com os resultados relatados por Driver et al. (2013), sugerem que a regulação correta do gene *PHLDA2* é fundamental para o desenvolvimento placentário e embrionário.

A maioria das alterações encontradas nesse estudo e nos outros, provavelmente está relacionada com a reprogramação incompleta no período de cultivo *in vitro* sofrido pelos embriões de TN, podendo afetar o padrão correto de expressão gênica e também o desenvolvimento. E, de fato,

observamos diferença significativa entre os grupos FIV e TE quando comparamos a expressão do gene *PHLDA2*. Salilew-Wondim et al. (2013) mostraram, em experimento com microarranjo, a expressão de genes no dia 50 de gestação de bovinos produzidos *in vitro* e TN, onde foram encontradas diferenças em vários genes. Este estudo demonstrou que a expressão gênica geral para a FIV parece ser intermediária entre animais produzidos por IA e TN (SALILEW-WONDIM et al., 2013), confirmando assim que, as condições de cultivo *in vitro* podem afetar significativamente a expressão gênica e, provavelmente, no período de pré-implantação do embrião, o seu potencial de desenvolvimento.

No presente estudo vimos que a expressão de *TSSC4* foi maior em placentas de TE comparado com as placentas de gestações produzidas por TN. Em estudo anteriores, o gene *TSSC4* apresentou um aumento de expressão em embriões degenerados quando comparados a blastocistos normais, em um sistema de produção *in vitro* de embriões (DRIVER et al., 2013), o que pode sugerir que o controle no nível de expressão deste gene, exercido pelo processo de “imprinting”, onde metade dos alelos é silenciada na placenta, é necessário para garantir o correto desenvolvimento. O que observamos em nossos estudos foi uma redução no grupo TN de aproximadamente 30% do valor do grupo controle, o que deve ser interpretado como uma redução de um gene já fisiologicamente expresso a 50% do nível de genes de expressão bialélica. Simplificadamente, o risco de possíveis problemas funcionais, como consequência da alteração de níveis de expressão, é muito maior em genes monoalélicos, onde uma redução de expressão se traduz por uma significativa redução na quantidade residual total de transcritos.

Alterações observadas nos diversos estudos mostrados anteriormente, mostram que a regulação da expressão dos genes é fundamental para se obter um correto desenvolvimento embrionário. Desta forma, através dos dados mostrados na literatura e dos resultados mostrados aqui, fica claro que as condições de cultivo *in vitro* exercem importante influência na produção de

embriões oriundos das biotécnicas reprodutivas, podendo talvez, ser uma explicação para as baixas taxas de desenvolvimentos da produção *in vitro*.

Desta forma podemos considerar que durante o processo de clonagem, um dos pontos cruciais para o estabelecimento do padrão correto da expressão gênica, levando a um desenvolvimento normal e o conseqüente sucesso da gestação, é o período de cultivo destes embriões produzidos por TN. Observamos no presente estudo que os cotilédones produzidos por FIV também apresentaram uma modesta, ainda que não significativa, redução nos níveis de *TSSC4*, e uma redução significativa nos níveis de dimetilação da lisina 9 da histona 3, redução essa comparável à observada para o grupo TN. De fato, outros estudos realizados demonstraram alterações importantes em modificações de histonas em resposta a diferentes condições de cultivo usadas na FIV (CORREA et al., 2013; GASPAR et al., 2015) ou em relação a gestações produzidos por IA (ARNOLD et al., 2015). Portanto, suspeitamos que as diferenças observadas nas placentas do grupo TN possam ser, em partes, explicadas pelo uso do cultivo *in vitro*, parte fundamental do processo de produção de embriões por clonagem.

Os genes em torno do *Kcnq1ot1*, que tem um papel na repressão dos genes vizinhos, parece não ter sua marca estritamente regulada por metilação do DNA, em células placentárias, têm demonstrado ser necessário as modificações de histonas repressivas para manter a expressão (LEWIS et al., 2004; KOROSTOWSKI et al., 2012). Um dos gene que estudamos, o *PHLDA2*, parece estar nesta categoria. Este gene maternalmente expresso parece ser regulador do crescimento placentário (revisado por JENSEN et al., 2014) e apresenta marcações de histonas alelo-específicas, que controlam o estabelecimento e/ou manutenção do imprinting (LEWIS et al., 2004). Em nosso estudo, feito com o gene *PHLDA2*, foi mostrado que as amostras de TN apresentaram 20% mais H3K4me2 (permissiva) no alelo paterno, silenciado normalmente, comparado com placentas de transferência de embriões. Também vimos que as placentas de FIV tiveram um aumento de 10% na H3K4me2 no alelo paterno, em relação às placentas produzidas por TE,

indicando que o enriquecimento da marca da histona permissiva pode ser responsável pelo aumento da expressão observada nestes grupos para o gene *PHLDA2*.

O correto remodelamento de histonas é fundamental para que haja a transcrição favorecendo no desenvolvimento normal do feto (FU et al., 2012). Embriões produzidos por transferência nuclear apresentam, alterações significativas no remodelamento das histonas (MORGAN et al., 2005; SANTOS et al., 2003; WEE et al., 2006; WU et al., 2011). No estudo feito com o gene *TSSC4*, as amostras de TN mostraram uma porcentagem maior de dimetilação da H3K4 (permissiva) e menor dimetilação da H3K9 (inibitória), o que não explica a expressão diferenciada neste grupo, uma vez que a expressão foi reduzida no Grupo TN. Como mencionado anteriormente, o processo de “imprinting” pode ser estabelecido (mantido) por qualquer um dos três processos epigenéticos, ou por uma combinação deles (revisado por BESTOR et al., 2000), portanto estudos futuros são necessários para estabelecer se algum dos demais processos epigenéticos estão alterados no Grupo TN, e poderiam, portanto explicar a diminuição nos níveis de expressão de *TSSC4*.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados mostram que as expressões dos genes “imprinted” *TSSC4* e *PHLDA2* são afetadas em placentas de gestações produzidas por TN, assim como as modificações de histonas H3K4me2 e H3K9me2.

Alteração na marcação das histonas como a diminuição dos níveis de dimetilação da H3K9 em *TSSC4* nas placentas produzidas por FIV e TN, indicam que o cultivo pode corroborar com alterações no Grupo TN.

## 8 REFÊRENCIAS

APOSTOLIDOU, S.; ABU-AMERO, S.; O'DONOGHUE, K.; FROST, J.; OLAFSDOTTIR, O.; CHAVELE, K.M.; WHITTAKER, J.C.; LOUGHNA, P.; STANIER, P.; MOORE, G.E. Elevated placental expression of the imprinted *PHLDA2* gene is associated with low birth weight. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 85, n.4, p. 379-387, 2007.

ARIMA, T.; HATA, K.; TANAKA, S.; KUSUMI, M.; LI, E.; KATO, K.; SHIOTA, K.; SASAKI, H.; WAKE, N. Loss of the maternal imprint in *Dnmt3Lmat*<sup>-/-</sup> mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue. **Dev. Biol.** v. 297, n.2, p. 361–373, 2006.

ARNOLD, D.R.; LEFEBVRE, R.; SMITH, L.C. Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaetescute-like homologue 2 (*Mash 2*) gene. **Placenta**, v. 27, p. 1124-1131, 2006.

ARNOLD, D.R.; GASPAR, R.C.; ROCHA, C.V.; SANGALLI, J.R.; BEM, T.H.C.; CORRÊA, C.A.P., PENTEADO, J.C.T.; MEIRELLES, F.V.; LOPES, F.L. Nuclear transfer alters placental gene expression and associated histone modifications of the placental-specific imprinted gene pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (*PHLDA2*) in cattle Reproduction, **Fertil. Devel.**, p. 1-10. 2015

ARNAUD, P.; FEIL, R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. **Birth Defects Res. C Embryo Today**, v. 75, n.2, p. 81-97, 2005.

BERGER, S. L. KOUZARIDES, T. SHIEKHATTAR, R. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev.** n. 23, n.7 p. 781-783, 2009.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, n.16, p. 2395-2402, 2000.

BESSENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; BREM, G. Role of the oviduct in early embryo development. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47, n. 4, p.156-63, 2012.

BORDIGNON, V., KEYSTON, R., LAZARIS, A., BILODEAU, A. S., PONTES, J. H., ARNOLD, D., FECTEAU, G., KEEFER, C., AND SMITH, L. C.. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells. *Biol. Reprod.* **68**, 2013–2023. 2003.

BOURCHIS, D.; XU, G.L.; LIN, C.S. Dnmt3l and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, n.5551, p. 2536-2539, 2001.

BRESSAN, F.F.; DE BEM, T.H.C.; PERECIN, F.; LOPES, F.L.; AMBROSIO, C.E.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A. Unearthing the Roles of Imprinted Genes in the Placenta. **Placenta**, v. 30, p. 823-834, 2009.

CAMPBELL, K.H.S.; FISCHER, P.; CHEN, W.C.; CHOI I.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, suppl.1, p. 5214-5231, 2007.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEÓN, F.A.; ROBL, J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, n.5367, p. 1256-1258, 1998a.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEÓN, F.A.; ROBL, J.M. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 16, n.7, p. 642-646, 1998b.

CHAVATTE-PALMER P., CAMOUS S., JAMMES H., LE CLEAC'H N; GUILLOMOT M.; LEE R. Review: placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v.33 p. 99–104. 2012.



CORREA, C.A.P.; ARNOLD, D.R.; GASPAR, R.C.; ROCHA JUNIOR, C.V.; COLLADO, M.; & LOPES, F.L. Characterization of the histone H3R26me2 modification during *in vitro* development of bovine embryos. In „Proceedings of the 27th ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), 27, 2013. Praia do Forte, BA, Brazil”, SBTE, p. 560, 2013.

CROSS, J.C. Genes regulating embryonic and fetal survival. **Theriogenology**, v. 55, n.1, p. 193-207, 2001.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Current Issue**, v. 98, p. 13734–13738, 2001.

DRIVER, A.M.; HUANG, W.; KROPP, J.; PEÑAGARICANO, F., KHATIB, H. Knockdown of CDKN1C (p57<sup>kip2</sup>) and PHLDA2 Results in Developmental Changes in Bovine Pre-implantation Embryos. **Plos One**. v. 8, n. 7, p. 69490 2013.

DURANTHON, V.; WATSON, J. A.; LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 141-50, 2008.

ENRIGHT, B.P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X.C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2<sup>′</sup>-deoxycytidine. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 896-901, 2003.

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, p. 178–191, 2006.

FELMER, R. N., ARIAS, M. E., MUÑOZ, G. A. E Rio, J. H.. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Mol. Reprod.Devel.**, v. 78, n. 6, p. 403-414, 2011.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditiselegans*. **Nature**, v. 391, n.6669, p. 806-811, 1998.

FISCHLE, W.; WANG, Y. , ALLISY, C.D. Histone and chromatin cross-talk. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 172–183, 2003.

FRANK, D.; FORTINO, W.; CLARK, L.; MUSALO, R.; WANG, W.; SAXENA, A.; LI, C. M.; REIK, W.; LUDWIG, T.; TYCKO, B. Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene *Ipl*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, 7490–7495. 2002.

FU, L., ZHANG, J., YAN, F.X., GUAN, H., HOU, J. Abnormal histone H3K9 dimethylation but normal dimethyltransferase EHMT2 expression in cloned sheep embryos. **Theriogenology**, v. 78, p. 1929-1938. 2012

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, p. 425:680, 2003.

GARDNER, D. K., LANE, M., SPITZER, A., BATT, P. A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biol. Reprod.** v. 50, p. 390–400. 1994.

GASPAR, R. C.; ARNOLD, D. R.; CORRÊA, C. A.; da ROCHA, C. V.; PENTEADO, J. C.; DEL COLLADO, M.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M.; LOPES, F. L. Oxygen tension affects histone remodeling of *in vitro*-produced embryos in a bovine model. **Theriogenology** v. 83, p. 1408–1415. 2015.

GONSALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, Varela, 2002.

GUILLOMOT, M.; TAGHOUTI, G.; CONSTANT, F.; DEGRELLE, S.; HUE, I., CHAVATTE-PALMER, P.; JAMMES, H. Abnormal expression of the imprinted gene *Phlda2* in cloned bovine placenta. **Placenta** v. 31, p. 482–490. 2010.

GOLL, M.G.; BESTOR, T.H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu Rev Biochem.**, v. 74, p. 481-514, 2005.

HANSEN, P. J.; BLOCK, J.; LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; HENDRICKS, K. E. M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Rep. Fert. Dev.**, v. 22, p. 59–66, 2010.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p.113-28, 2007.

HEMBERGER, M. Epigenetic landscape required for placental development. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 64, n.18, p. 2422-2436, 2007.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.** 63, 1787–1794. 2000.

HOWELL, C.Y.; BESTOR, T.H.; DING, F. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. **Cell**, v. 104, n.6, p. 829-838, 2001.

IAGER, A.E.; RAGINA, N.P.; ROSS, P.J.; BEYHAN, Z.; CUNNIFF, K.; RODRIGUEZ, R.M.; CIBELLII, J.B. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. **Cloning Stem Cells**, v. 10, n. 3, p. 371-379, 2008.

JENSEN, A. B.; TUNSTER, S. J.; JOHN, R. M. The significance of elevated placental PHLDA2 in human growth restricted pregnancies. **Placenta**. v. 35, p. 528–532, 2014.

JOUNEAU, A.; RENARD, J.P. Reprogramming in nuclear transfer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 13, n. 5, p. 486-491, 2003.

KESSLER, M.A.; SCHULER, L.A. Structure of the bovine placental lactogen gene and alternative splicing of transcripts. **DNA Cell Biol.**, v. 10, n. 2, p. 93-104, 1991.

KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 59, n. 1, p. 95-100, 1980.

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. **Anat. Embryol**, v. 200, p. 229–237, 1999.

KORNBERG, R.D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell**, v. 98, p. 285–294, 1999.

KOROSTOWSKI, L.; SEDLAK, N.; ENGEL, N. . The *Kcnq1ot1* long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of *Kcnq1*, but does not regulate its imprinting in the developing heart. **PLoS Genet**. v. 8, 2012.

KOPECNY, V.; FLECHON, J. E.; CAMOUS, S.; FULKA, J. JR. Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. **Mol. Rep. Devel.**, v. 1, p. 79–90, 1989.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula

blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741-766, 2000.

LEE, M.P.; BRANDENBURG, S.; LANDES G.M.; ADAMS M.; MILLER G, FEINBERG, A.P. Two novel genes in the center of the 11p15 imprinted domain escape genomic imprinting. **Hum. Mol. Genet.** v.8. n.4. 683-690. 1999

LEFEBVRE, L.; VIVILLE, S.; BARTON, S.C.; ISHINO, F.; KEVERNE, E.B.; ISHINO, F.; SURANI, M.A. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. **Nat. Genet**, v. 20, p. 163–169, 1998.

LEVENSON, J.M.; SWEATT, J.D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nat. Rev.Neurosci.**, v. 6, n.2, p. 108-118, 2005.

LEWIS, A.; MITSUYA, K.; UMLAUF, D.; SMITH, P.; DEAN, W.; WALTER, J.; HIGGINS, M.; FEIL, R.; REIK, W. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. **Nat. Genet.**, v.36, 1291–1295. 2004

LI, E.; BESTOR, T.H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, n.6, p. 915-926, 1992.

LIM, A.L.; NG, S.; LEOW, S.C.; CHOO, R.; ITO, M.; CHAN, Y.H.; GOH, S.K.; TNG, E.; KWEK, K.; CHONG, Y.S.; GLUCKMAN, P.D.; FERGUSON-SMITH, A.C. Epigenetic state and expression of imprinted genes in umbilical cord correlates with growth parameters in human pregnancy. **J. Med. Genet.**, v. 49, n.11, p. 689-697, 2012.

LUCIFERO, D.; MANN, M.R.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-Specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Hum. Mol. Gen.**, v. 13, n. 8, p. 839-849, 2004.

LUGER, K.; MADER, A.W.; RICHMOND, R.K.; SARGENT, D.F.; RICHMOND, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-260, 1997.

MANN, M.R.; CHUNG, Y.G.; NOLEN, L.D. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. **Biol.Reprod.**, v. 69, p. 902-914, 2003.

MAYER, W. & NIELEAU, A. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, n.6769, p. 501-502, 2000.

MCLAREN, A.; BUEHR, M. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. **Cell Differ Dev.** 1990 Sep;31(3):185-95

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F.T.V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; CARTER, A.M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum. Mol. Gen.**, v. 14, n. 1, p. R47–R58, 2005.

MONK D., ARNAUD P., APOSTOLIDOU S., HILLS F. A., KELSEY G., STANIER P. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.103, p.6623–6628. 2006.

MONK, D. Genomic imprinting in the human placenta. **Amer. Jour. Obstet. Gynecol.** v.213. n.4. p.152-162. 2015.

MONK, M.; BOUBELIK, M. & LEHNERT, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryodevelopment. **Development**, v. 99, p. 371-382, 1987.

MORALES, V.; RICHARD-FOY, H. Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n.19, p. 7230-7237, 2000.

- MORISON, I.M. AND REEVE, A.E. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. **Hum. Mol. Genet.**; v. 7: 1599–1609. 1998
- OLIVEIRA, C. S., SARAIVA, N. Z., CRUZ, M. H., MAZETI, B., OLIVEIRA, L. Z., LOPES, F. L., GARCIA, J. M. HDAC inhibition decreases XIST expression on female IVP bovine blastocysts. **Reproduction** v.145, p. 9–17. 2013.
- ONO, R.; NAKAMURA, K.; INOUE, K.; NARUSE, M.; USAMI, T.; WAKISAKA-SAITO, N.; HINO, T.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; KOHDA, T.; OGURA, A.; YOKOYAMA, M.; KANEKO-ISHINO, T.; ISHINO, F. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. **Nat.Genet.**, v. 38, p. 101–106, 2006.
- OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Curr. Biol**, v. 10, n. 8, p. 475-478, 2000.
- PALINI, S.; STEFANI, S.; SCALA, V.; DUSI, L.; BULLETTI, C. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation embryo development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1221, p. 54–60, 2011.
- PAULSEN J.E, LÜTZOW-HOLM C. In vivo growth inhibition of human colon carcinoma cells (HT-29) by all-trans-retinoic acid, difluoromethylornithine, and colon mitosis inhibitor, individually and in combination. **Anticancer Res.** v.20. 3485-9. 2000b.
- PAULSEN, M.; EL-MAARRI, O.; ENGEMANN, S.; STRODICKE, O.; DAVIE, K.; REINHARDT, R.; REIK, W.; WALTER, J. Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith–Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse. **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, n. 12, p. 1829-1841, 2000a.
- PAULSEN, M.; FERGUSON-SMITH, A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **J. Pathol**, v. 195, n. 1, p. 97-110, 2001.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-432, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LAFUENTE, J.; BOLAND M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and Messenger RNA expression. **Biol. Rep.** , v. 68, p. 236-243, 2003.

ROBERTS, R.M. Interferons as hormones of pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 3, n. 13, p. 432-452, 1992.

ROSSANT, J.; CROSS, J.C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 7, p. 538-548, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.** v.132, 365–386. 2000

SALAS, M.; JOHN, R.; SAXENA, A.; BARTON, S.; FRANK, D.; FITZPATRICK, G.; HIGGINS, M. J.; AND TYCKO, B. Placental growth retardation due to loss of imprinting of Phlda2. **Mech. Dev.** v.121, 1199–1210. 2004.

SALILEW-WONDIM, D.; TESFAYE, D.; HOSSAIN, M.; HELD, E.; RINGS, F.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; CINAR, U.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Aberrant placenta gene expression pattern in bovine pregnancies established after transfer of cloned or *in vitro* produced embryos. **Physiol. Genomics** v.45, p.28–46, 2013

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos. **Curr. Biol.**, v. 13, n. 13, p. 1116–1121, 2003.



SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Anim. Reprod. Sci**, p. 145-160, 2000.

SHI, W.; ZAKHARTCHEKA, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, v. 71, p. 91-113, 2003.

SIKORA, K.M.; MAGEE, D.A.; BERKOWICZ, E.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.; CARTER, F.; COMTE, A.; WATERS, S.M.; MACHUGH, D.E.; SPILLANE, C. PHLDA2 is an imprinted gene in cattle. **Anim. Genet.**, v. 43, n. 5, p. 587-590. 2012.

SU, J.M.; YANG, B.; WANG, Y.S.; LI, Y.Y.; XIONG, X.R.; WANG, L.J.; GUO, Z.K.; ZHANG, Y. Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. **Theriogenology**, v. 75, p. 1346–1359, 2011.

TAMADA, H.; KIKYO, N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. **Cytogenet Genome Res**, v. 105, n.2, p. 285–291, 2004.

TUNSTER, S. J.; TYCKO, B.; ; JOHN, R. M. The imprinted Phlda2 gene regulates extraembryonic energy stores. **Mol. Cell. Biol.** v.30, p. 295–306. 2010.

TUNSTER, S. J., VAN DE PETTE, M., AND JOHN, R. M. Isolating the role of elevated Phlda2 in asymmetric late fetal growth restriction in mice. **Dis. Model. Mech.**, v.7, 1185–1191. 2014.

UMLAUF, D.; GOTO, Y.; CAO, R.; CERQUEIRA, F.; WAGSCHAL, A.; ZHANG, Y.; FEIL, R. Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. **Nat. Genet.** v. 36, p. 1296–1300. 2004.

- WANG M.; LI D.; ZHANG M.; YANG W.; WU G.; CUI Y LI S. Biallelic expression of Tssc4, Nap114, Phlda2 and Osbpl5 in adult cattle. **J. Genet.**, v. 94 n.3 p. 391-395. 2015.
- WEE, G.; KOO, D.B.; SONG, B.S.; KIM, J.S.; KANG, M.J.; MOON, S.J.; KANG, Y.K.; LEE, K.K.; HAN, Y.M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatins in cloned embryos. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 9, p. 6048-57, 2006.
- WESTHUSIN, M.E.; LONG, C.R.; SHIN, T.; HILL, J.R.; LOONEY, C.R.; PRYOR, J.H.; PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v. 55, p. 35-49, 2001.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**. v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.
- WOOD, A.J.; OAKLEY, R.J. Genomic Imprinting in Mammals: Emerging Themes and Established Theories. **PLoS Genet**, v. 2, n.11, p. 147, 2006.
- WOODING, F.B. Localization of ovine placental lactogen in sheep placentomes by electronmicroscope immunocytochemistry. **J. Reprod. Fertil**, v. 62, n. 1, p. 15-19, 1981.
- WOODING, F.B.P.; WATHER, D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **J. Rep. Fert.**, v. 59, p. 425-430. 1980.
- WU, F.R.; LIU, Y.; SHANG, M.B.; YANG, X.X.; DING, B.; GAO, J.G.; WANG, R.; LI, W.Y. Differences in H3K4 trimethylation *in vivo* and *in vitro* fertilization mouse preimplantation embryos. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, 1099-1108, 2012.
- YATSUKI, H.; JOH, K.; HIGASHIMOTO, K.; SOEJIMA, H.; ARAI, Y.; WANG, Y.; HATADA, I.; OBATA, Y.; MORISAKI, H.; ZHANG, Z. Domain regulation of imprinting cluster in Kip2/Lit1 subdomain on mouse chromosome 7F4/F5: large-

scale DNA methylation analysis reveals that DMR-Lit1 is a putative imprinting control region. **Genome Res.**, v. 12, p. 1860-1870, 2002.

ZAITOU, I.; KHATIB, H. Imprinting e da expressão análise genômica comparativa de seis gado genes. **J. Anim. Sci.**, v. 86, n.1, p. 25-32, 2008.

ZAITOUN, I.; KHATIB, H. Comparative genomic imprinting and expression analysis of six cattle genes. **J. Anim Sci**, v. 86, n.1, p. 25-32, 2008.

ZHANG, S.; KUBOTA, C.; YANG, L.; ZHANG, Y.; PAGE, R.; O'NEILL, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. **Biol. Reprod.**, v. 71, n. 5, p. 1540-1544. 2004.