

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO EM BOVINOS: DNA  
METILTRANSFERASES E GENES “IMPRINTED” EM EMBRIÕES,  
FETOS E PLACENTAS**

**Felipe Perecin**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil**

**Fevereiro de 2007**

P434e Perecin, Felipe  
Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA  
metiltransferases e genes "imprinted" em embriões, fetos e placentas /  
Felipe Perecin. -- Jaboticabal, 2007  
xx, 83 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: César Roberto Esper, Paulo Henrique  
Franceschini, Flávio Vieira Meirelles, Maria Angélica Miglino

Bibliografia

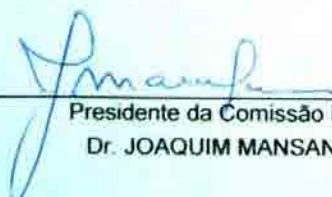
1. Clonagem. 2. Reprogramação nuclear. 3. Expressão gênica. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.64:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: fperecin@fcav.unesp.br

**unesp****UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS****CERTIFICADO DE APROVAÇÃO****TÍTULO:** EPIGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO EM BOVINOS: DNA METIL  
TRANSFERASES E GENES "IMPRINTED" EM EMBRIÕES, FETOS  
E PLACENTAS**AUTOR:** FELIPE PERECIN**ORIENTADOR:** Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIAAprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA  
VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:  
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
Dr. CESAR ROBERTO ESPER  
Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI  
Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES  
Dra. MARIA ANGÉLICA MIGLINO

Data da realização: 26 de fevereiro de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**FELIPE PERECIN** – nascido no município de Jaboticabal – SP, aos 20 dias do mês de agosto de 1980, concluiu o curso colegial no “Colégio Santo André”, na cidade de Jaboticabal – SP, em dezembro de 1997. Ingressou em fevereiro de 1998 no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP; foi bolsista do Programa Especial de Treinamento – Grupo PET/CAPES, de agosto de 1998 a junho de 2001; obteve bolsa de Iniciação Científica da FAPESP de julho de 2001 a junho de 2002, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Concluiu, em dezembro de 2002, o curso superior em Medicina Veterinária, quando obteve a primeira colocação no Exame Nacional de Cursos do MEC. Ingressou, em março de 2003, no programa de pós-graduação, ao nível de Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Doutorado Direto da FAPESP.

Dedico aos meus pais,  
**Dilermando e Regina**,  
e à minha irmã, **Tatiana**,  
incentivadores e espelhos  
da minha caminhada,  
pelo amor dedicado,  
pelos exemplos de retidão  
e ensinamentos  
de respeito ao próximo.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiro lugar.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**, pela orientação e ensinamentos, pela credibilidade em mim depositada e pelo despertar do gosto pela ciência. Mestre e cientista ousado, é a quem devo muito do conhecimento e experiência acumulados enquanto estive na pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles**, por abrir as portas do seu laboratório e compartilhar sua experiência. Grande incentivador do raciocínio científico, foi uma pessoa fundamental para o sucesso deste trabalho.

À amiga **Simone Cristina Méo Niciura**, que desde a iniciação científica vem acompanhando o meu amadurecimento científico. Teve participação crucial na avaliação dos genes “imprinted” e contribuiu muito na redação deste trabalho com suas correções, observações e sugestões sempre relevantes.

Ao amigo **Walt Yamazaki**, pessoa de caráter exemplar, que participou deste trabalho desde a produção dos embriões até as análises de expressão gênica, sempre disposto a dividir seu conhecimento e a dar o melhor de si.

À **Christina Ramires Ferreira**, dinâmica, perseverante e inteligente, me ajudou em inúmeros momentos: na execução dos experimentos, no trabalho com os animais, nos abates das receptoras, nos ensaios de biologia molecular. Foi companheira nas horas de trabalho e lazer, e soube compreender a minha ausência nos meses finais do doutorado.

Ao **Prof. Dr. César Roberto Esper**, por quem tenho grande admiração, pelos ensinamentos durante a graduação e pós-graduação, pelo exemplo de dedicação e pelos votos de confiança em mim depositados nos momentos oportunos.

À **Roberta Vantini**, amiga competente e responsável. Foi peça chave no laboratório em Jaboticabal durante a etapa de produção dos embriões.

Aos amigos **Danilas Salinet Melo** e **Erlon Gomes de Oliveira Júnior**, pela presteza sempre que os trabalhos com as doadoras e receptoras de embrião eram necessários.

Às amigas e companheiras de bancada **Naiara Zoccal Saraiva** e **Tatiane Almeida Drummond Tetzner**, por toda ajuda no laboratório e fora dele.

Aos amigos **Fernando Henrique Biase, Felipe Camargo Braga e Marcos Roberto Chiaratti** pelas discussões científicas e todo auxílio na execução e análise dos dados da PCR em tempo real.

À **Giovana Krempel Fonseca Merighe e Adriana Roberta Oliveira**, sempre muito organizadas e acessíveis. Foram pessoas importantes para que os trabalhos em Pirassununga rendessem frutos.

Aos professores **Dr. Paulo Henrique Franceschini, Dr. José Maurício Barbanti Duarte, Dra. Gisele Zoccal Mingoti e Dr. Francisco Guilherme Leite** pelas correções e sugestões que engrandeceram este trabalho.

Aos pós-graduandos ou colegas que passaram pelo DMVPRA nos últimos quatro anos: **Alexandre Wolf, Ana Paula Perini, Andréa Cristina Basso, Antônio Campanha Martinez, Cassiana Ometto de Abreu, Clara Slade, Edson Guimarães Lo Turco, Eliana Gazoto, Eric Laurentiz de Caiado Castro, Érika da Silva Carvalho Morani, Eveline dos Santos Zanetti, Gabriel Ferreira Sória, Giovana D'Andréa Pavão, Juliana Correa Borges, Karina Belotti Avelino, Kléber Luciano Anciotto, Letícia Siqueira de Sá Barretto, Lorivaldo Paz Landim Júnior, Mabel Freitas Cordeiro, Marcelo Bezerra, Marcelo Roncoletta, Maria Emília Franco Oliveira, Max Vitória Resende, Paula Ferreira da Costa, Roberta Ferreira Machado, Rúbia Bueno da Silva, Sandra Helena Gabaldi, Viviane Sgobi Dias de Caiado Castro**, pelo apoio no laboratório, pelo convívio e amizade.

Aos demais professores, **Dr. Gilson Hélio Tonniolo, Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima**, e funcionários, **Ivo Luís de Almeida Júnior, Paulo Sérgio e Isabel Aparecida Penariol Natarelli**, do Departamento de Reprodução Animal, pelos ensinamentos e apoio sempre que necessário.

Aos integrantes do LMMD, **Profa. Cláudia Lima Verde Leal, Adriana Kroef Tarouco, Alexandre Barreto de Almeida, Fabiana Fernandes Bressan, Kátia Regina Lancelotti Schwarz, Lígia Garcia Mesquita, Moysés dos Santos Miranda, Patrícia Marañon Porciúncula, Paulo Roberto Adona, Sylvia Sanches Cortezzi, Tiago Henrique Câmara de Bem, Weruska Karyna Freitas Santos**, por tornarem agradável a estada em Pirassununga.

À **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino** e sua equipe, pela participação no abate das receptoras, coleta e análise das amostras de placenta.

Ao **Edgar Scatena**, por permitir a realização de superovulações e transferências de embrião em sua propriedade.

**À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal,** instituição pela qual tenho enorme carinho. Nela vivi parte da minha infância, adolescência e juventude, a ela devo minha formação acadêmica e científica.

**À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP -**, pelo apoio financeiro.

Este projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processos nº. 02/12078-0, 03/12352-7 e 04/14884-9, no período março de 2003 a fevereiro de 2007.

O presente trabalho foi avaliado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA, protocolo nº016178-06) desta unidade de ensino, que certificou sua conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESES.....</b>	<b>2</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
3.1. Clonagem.....	3
3.1.1. Princípios.....	3
3.1.2. A evolução da clonagem por transferência de núcleo.....	3
3.1.3. Eficiência da clonagem.....	7
3.2. Epigenética.....	8
3.2.1. Metilação do DNA.....	9
3.2.2. DNA metiltransferases.....	11
3.2.3. “Imprinting” genômico.....	13
3.2.3.1. Regulação dos genes “imprinted” <i>Igf2</i> , <i>Igf2r</i> e <i>H19</i> .....	15
3.3. Reprogramação nuclear e alterações epigenéticas em clones.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Reagentes e meios.....	19
4.2. Superovulação e coleta de embriões <i>in vivo</i> .....	19
4.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	20
4.3.1. Recuperação oocitária e maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	20
4.3.2. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	20
4.3.3. Clonagem por transferência nuclear (TN) de células somáticas.....	21
4.3.3.1. Preparo das células somáticas doadoras de núcleo.....	21
4.3.3.2. Enucleação e reconstituição oocitária.....	21

4.3.3.3. Ativação dos oócitos reconstituídos.....	22
4.3.4. Obtenção de embriões partenogênicos.....	23
4.3.5. Cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....	23
4.4. Remoção da zona pelúcida e colheita dos embriões.....	23
4.5. Estabelecimento de gestações.....	24
4.6. Coleta dos fetos e anexos fetais.....	24
4.7. Sexagem dos embriões.....	25
4.8. Amplificação do RNA mensageiro dos embriões.....	26
4.9. Extração do RNA total dos fetos e anexos.....	26
4.10. Transcrição reversa.....	27
4.11. PCR em tempo real.....	27
4.12. Análise dos dados da PCR e análise estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1. Produção de embriões.....	33
5.2. Expressão das DNA metiltransferases em blastocistos bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	34
5.3. Expressão das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide de fetos bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	38
5.4. Expressão dos genes “imprinted” em membranas cório-alantóide de fetos bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	40
5.5. Expressão das DNA metiltransferases em fetos bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	43
5.6. Expressão dos genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	45
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados para quantificação relativa dos genes “imprinted” e das DNA metiltransferases, e código de acesso no GenBank..... 29
- Tabela 2.** Quantidade de oócitos utilizada, número e porcentagem de blastocistos produzidos pelas técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), ativação partenogenética (Parteno) e transferência nuclear (TN) em bovinos..... 33
- Tabela 3.** Comparação da produção de embriões clonados utilizando células doadoras de núcleo submetidas ( $G_0$ ) ou não ( $G_1$ ) à privação de soro..... 33
- Tabela 4.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão, correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em blastocistos bovinos após amplificação linear do RNA mensageiro..... 34
- Tabela 5.** Razão de expressão para o *GAPDH* entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN- $G_0$  e TN- $G_1$ . Múltiplas comparações entre os grupos..... 36
- Tabela 6.** Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN- $G_0$  e TN- $G_1$ . Múltiplas comparações entre os grupos..... 37
- Tabela 7.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão, correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide de fetos bovinos..... 38

<b>Tabela 8.</b> Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre as membranas cório-alantóide dos grupos <i>in vivo</i> , FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.....	39
<b>Tabela 9.</b> Valores de eficiência $\pm$ desvio padrão (DP), correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa dos genes “imprinted” em membranas cório-alantóide de fetos bovinos; e temperaturas de dissociação (T <sub>diss</sub> ) $\pm$ DP.....	41
<b>Tabela 10.</b> Razão de expressão normalizada dos genes “imprinted” entre membranas cório-alantóide dos grupos <i>in vivo</i> , FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.....	42
<b>Tabela 11.</b> Valores de eficiência $\pm$ desvio padrão, correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em fetos bovinos.....	43
<b>Tabela 12.</b> Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre as membranas cório-alantóide dos grupos <i>in vivo</i> , FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.....	44
<b>Tabela 13.</b> Valores de eficiência $\pm$ desvio padrão (DP), correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa dos genes “imprinted” em fetos bovinos; e temperaturas de dissociação (T <sub>diss</sub> ) $\pm$ DP.....	46
<b>Tabela 14.</b> Razão de expressão normalizada dos genes “imprinted” entre fetos bovinos dos grupos <i>in vivo</i> , FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O genoma paterno (azul) sofre desmetilação ativa, enquanto o genoma materno (vermelho) é passivamente desmetilado até o estágio de 8 células, exceto nos genes “imprinted”; em seguida a “de novo” metilação é observada (linha negra; MANN e BARTOLOMEI, 2002)..... 10
- Figura 2.** No alelo materno (M) a ligação da proteína CTCF ao ICR impede sua metilação e a interação dos estimuladores (elipses) aos promotores do *Igf2*, permitindo a expressão do *H19*. No alelo paterno (P) a metilação (círculos vermelhos) do ICR pela DNMT permite a interação dos estimuladores com os promotores do *Igf2* e sua expressão, mas impede a expressão do *H19* devido à metilação de seu promotor (DELAVAL e FEIL, 2004)..... 16
- Figura 3.** No alelo materno (M) a metilação (círculos vermelhos) do ICR intrônico impede a produção do *Air* e permite a expressão do gene *Igf2r*. No alelo paterno (P), a produção do RNA não-codificador *Air* suprime a expressão do *Igf2r* (DELAVAL e FEIL, 2004)..... 17
- Figura 4.** Exemplo de curva de regressão linear para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR. Os pontos incluídos entre os limites superior e inferior da janela de linearidade foram utilizados nos cálculos da eficiência e da correlação da curva..... 31
- Figura 5.** Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de “threshold” (definido como o ponto médio da janela de linearidade). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de “threshold” corresponde ao ciclo do “threshold” (Ct)..... 32

- Figura 6.** Distribuição dos valores de Ct para *GAPDH* em blastocistos bovinos nos grupos *in vivo*, FIV, Parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Cada ponto representa um único embrião..... 35
- Figura 7.** Razão de expressão para o *GAPDH* entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*..... 36
- Figura 8.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases em blastocistos bovinos nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*..... 38
- Figura 9.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases entre membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*..... 40
- Figura 10.** Razão de expressão dos genes “imprinted” entre membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*..... 43
- Figura 11.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases entre fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*..... 45

**Figura 12.** Razão de expressão dos genes “imprinted” entre fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*..... 48

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-DMAP .....	6-dimetilaminopurina
6-FAM .....	Fluorocromo 6-carboxi-fluoresceína
ANOVA .....	Análise de variância
aRNAm .....	RNA mensageiro anti-senso
ART.....	Técnicas de reprodução assistida
ATP .....	Trifosfato de adenosina
B12.....	Cianocobalamina
B6.....	Piridoxina
BSA.....	Albumina sérica bovina
BWS.....	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
cDNA.....	DNA complementar
cDNAa.....	DNA complementar a aRNAm
COC .....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP.....	Corpúsculo polar
CpG.....	“Cytosine-phosphate diester-guanine”
Ct .....	Ciclo do “threshold”
CTCF .....	Fator de ligação CCCTC
DEPC .....	Diethylpirocarbonato
DMD .....	“Differentially methylated domain”
DMEM .....	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMR.....	“Differentially methylated region”
DMSO .....	Dimetilsulfóxido
DNA .....	Ácido Desoxirribonucléico
<i>DNMT</i> .....	DNA metiltransferase
dNTP.....	Trifosfato de desoxinucleosídeos
DP .....	Desvio padrão
DTT .....	Ditiotreitol
EDTA .....	Ácido etilenodiaminotetracético

FIV .....	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio Folículo Estimulante
ga .....	Gauge
<i>GAPDH</i> .....	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH .....	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
HDAC .....	Histona desacetilase
HSOF .....	SOF com tampão Hepes
i.m. ....	intramuscular
IA .....	Inseminação artificial
IC .....	centro de “imprinting”
ICR.....	região de controle de “imprinting”
ICSI.....	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
<i>IGF2</i> .....	“Insulin-like growth factor II”
<i>IGF2R</i> .....	“Insulin-like growth factor II receptor”
LH .....	Hormônio Luteinizante
LOS.....	“Large offspring syndrome”
M .....	Molar
MBD .....	“Methyl binding domain”
MeCP2 .....	“Methyl CpG-binding protein 2”
mg .....	miligrama
MGBNFQ .....	“Minor groove binder non-fluorescent quencher”
MHz.....	MegaHertz
miRNA.....	micro RNA
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
mL .....	mililitro
mm .....	milímetro
mM.....	milimolar
P4.....	Progesterona
Parteno .....	Partenogenético

PBS	Solução salina com tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i>
REST	“Relative Expression Software Tool”
RIISPOA	Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
ROX	Fluorocromo carboxi-X-rodamina
SAM	S-adenosilmetionina
SAS	“Statistical Analysis System”
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
SRS	Síndrome de Silver-Russell
TALP	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TAMRA	Fluorocromo 6-carboxi-tetrametil-rodamina
TCM	“Tissue Culture Medium”
TN	Transferência nuclear
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
TN-G <sub>0</sub>	Transferência nuclear usando células em G <sub>0</sub>
TN-G <sub>1</sub>	Transferência nuclear usando células em G <sub>1</sub>

## EPIGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO EM BOVINOS: DNA METILTRANSFERASES E GENES “IMPRINTED” EM EMBRIÕES, FETOS E PLACENTAS

**RESUMO** – A clonagem por transferência de núcleo é freqüentemente associada a resultados insatisfatórios devido à reprogramação nuclear anormal da célula somática doadora de núcleo e à expressão gênica alterada. O primeiro objetivo deste trabalho foi estudar a freqüência dos RNAs mensageiros das DNA metiltransferases (*DNMT* 1, 3A e 3B, e do gene de expressão constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) em blastocistos bovinos isolados produzidos *in vivo* e *in vitro* por transferência nuclear (TN) de célula somática, ativação partenogenética e fertilização *in vitro* (FIV). O segundo objetivo foi avaliar a expressão das *DNMTs* e dos genes “imprinted” *IGF2*, *IGF2R* e *H19* em membranas cório-alantóide e fetos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* por TN, ativação partenogenética e FIV e recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação. Houve decréscimo ( $P < 0,05$ ) na freqüência do *GAPDH* nos blastocistos TN e partenogenéticos quando comparados aos embriões fertilizados, e também diferença entre blastocistos TN produzidos com diferentes protocolos de sincronização celular (células em  $G_0$  ou  $G_1$  do ciclo celular). Com relação às *DNMTs*, não foram identificados transcritos da *DNMT1* nos blastocistos do grupo TN- $G_0$ ; ocorreu diminuição na freqüência dos transcritos da *DNMT3B* nos embriões TN quando comparados aos partenotos. Não se observou diferença na freqüência relativa das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide e fetos. Com relação aos genes “imprinted”, o grupo partenogenético apresentou menor nível de expressão de *IGF2* em relação aos os demais grupos; baixos níveis de expressão de *IGF2* e *IGF2R* foram observados, respectivamente, em amostras de feto e de cório-alantóide derivadas de animais clonados por TN, quando comparadas aos grupos fertilizados *in vivo* e *in vitro*.

**Palavras-chave:** Bovino, DNA metiltransferase, embrião, expressão gênica, genes “imprinted”, transferência nuclear.

## DEVELOPMENTAL EPIGENETIC IN BOVINE: DNA METHYLTRANSFERASES AND IMPRINTED GENES IN EMBRYOS, FETUSES AND PLACENTA

**ABSTRACT** - Cloning by nuclear transfer is often associated with poor results due to abnormal nuclear reprogramming of somatic cell donor and altered gene expression. The first objective of this study was to evaluate the frequency of DNA methyltransferases (*DNMT* 1, 3A and 3B, and the housekeeping glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNAs in single bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro* by somatic cell nuclear transfer (SCNT), parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization (IVF). The second objective was to evaluate the expression of *DNMTs* and imprinted genes *IGF2*, *IGF2R* and *H19* in chorio-alantois membrane of bovine fetuses produced *in vivo* or *in vitro* by SCNT, parthenogenetic activation and IVF, and recovered between days 33 and 36 of gestation. There was strong *GAPDH* downregulation ( $P < 0.05$ ) in parthenogenetic and cloned by SCNT blastocysts when compared to fertilized ones, and also differences between cloned blastocysts produced with different cell synchronization ( $G_0$  or  $G_1$ ) protocol. Regarding *DNMTs* expression, we did not identify *DNMT1* transcripts in SCNT- $G_0$  derived blastocysts, and observed *DNMT3B* downregulation in SCNT-derived embryos when compared to parthenotes. No differences in DNA methyltransferase relative frequency were seen in chorio-alantois membrane and fetuses. Regarding imprinted genes expression, downregulation of *IGF2* in the parthenogenetic group was observed in comparison to all other groups, and also, downregulation of *IGF2* and *IGF2R* in the cloned-derived fetuses and chorio-alantois samples, respectively, were observed comparing to *in vivo* and *in vitro* fertilized groups.

**keywords:** Cattle, DNA methyltransferase, embryo, gene expression, imprinted genes, nuclear transfer.

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Desde o nascimento do primeiro mamífero viável através da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS, WILMUT et al., 1997), muitos pesquisadores têm relatado alterações placentárias e baixa eficiência da técnica em gerar crias a termo, além de desenvolvimento peri- e pós-natal anormais (CIBELLI et al., 1998; YOUNG et al., 1998; HILL et al., 1999, 2000; WELLS et al., 1999; HEYMAN et al., 2002; CHAVATTE-PALMER et al., 2002; PACE et al., 2002; WILMUT et al., 2002).

O sucesso limitado da TNCS é comumente associado à reprogramação incorreta das células doadoras de núcleo. Os padrões de metilação são regulados por, ao menos, três DNA metiltransferases (*DNMT*) cataliticamente ativas: *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* (BIRD e WOLFFE, 1999); e o seu estabelecimento após a clonagem é tardio, incompleto e, provavelmente, ineficaz na promoção do controle gênico necessário para o desenvolvimento embrionário e fetal (De SOUSA et al., 1999; BOURC'HIS et al., 2001a; WRENZYCKI et al., 2001; MANN e BARTOLOMEI, 2002; SANTOS et al., 2003; WRENZYCKI e NIEMANN, 2003).

A metilação do DNA está relacionada a uma série de eventos celulares, como o fenômeno do "imprinting" genômico (LI et al., 1993; HOLMES e SOLOWAY, 2006); uma característica crucial no desenvolvimento fetal e placentário durante a ontogênese dos mamíferos (BARTOLOMEI e TILGHMAN, 1997; KIERSZENBAUM, 2002). Alguns distúrbios associados ao emprego de biotécnicas reprodutivas são presumidamente causados por alterações em genes "imprinted", mas apesar do freqüente emprego destas biotécnicas nos bovinos, o estudo desses genes ainda é pouco desenvolvido nesta espécie.

Diversas hipóteses que buscam explicar o sucesso restrito da clonagem em mamíferos utilizando células somáticas baseiam-se na expressão anômala de genes fundamentais ao desenvolvimento do embrião, feto e placenta. Desta forma, este estudo tem por objetivos avaliar a freqüência dos RNAs mensageiros das DNA metiltransferases 1, 3A e 3B em embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in*

*vitro* por ativação partenogenética, fertilização *in vitro* e transferência nuclear de célula somática utilizando células doadoras de núcleo sincronizadas pelo cultivo até confluência ou privação de soro; e estimar a frequência dos transcritos das *DNMTs* e dos genes “imprinted” *IGF2* (transcrito paterno), *IGF2R* e *H19* (transcritos maternos) em membranas cório-alantóide e fetos obtidos por fertilização *in vitro*, clonagem, partenogênese ou produção *in vivo*.

## 2. HIPÓTESES

1) O protocolo de sincronização do ciclo celular entre célula doadora de núcleo e citoplasto receptor afeta a eficiência da clonagem e a expressão de genes importantes ao desenvolvimento;

2) Embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* por diferentes técnicas (fertilização *in vitro*, partenogênese e clonagem a partir de dois protocolos de sincronização celular) apresentam diferentes padrões de expressão das DNA metiltransferases;

3) A expressão dos genes “imprinted” e das *DNMTs* nos fetos e membranas fetais varia em razão do método de produção embrionário (*in vivo*, FIV, partenogênese e clonagem);

4) Alterações na expressão das DNA metiltransferases no desenvolvimento embrionário inicial e intrauterino estão relacionadas a alterações na expressão dos genes “imprinted”.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Clonagem**

##### **3.1.1. Princípios**

Os princípios cardeais sobre os quais a clonagem por transferência nuclear está fundamentada são: a equivalência nuclear (que pode ser entendida como a conservação do genoma durante a diferenciação celular) e a plasticidade celular (propriedade que permite que uma célula seja reprogramada e tenha a diferenciação celular redirecionada). Sem essas duas premissas a clonagem não seria possível. Foram as tentativas de demonstrar e entender esses princípios que levaram, em meados do século XX, alguns pesquisadores a propor e executar os experimentos que formariam o arcabouço daquela que, muitos anos depois, transformar-se-ia na técnica de clonagem como conhecemos hoje.

##### **3.1.2. A evolução da clonagem por transferência de núcleo**

Há mais de meio século Robert BRIGGS e Thomas KING (1952), trabalhando em experimentos que visavam investigar a totipotência nuclear, relataram o desenvolvimento de girinos após a injeção de núcleos embrionários em ovos enucleados de *Rana pipiens*. Esse experimento, além de confirmar as proposições de equivalência nuclear feitas por SPEMANN (1938), tornou-se o precursor da técnica de transferência nuclear (TN) utilizada atualmente em mamíferos.

Os trabalhos voltados para a clonagem de mamíferos, baseados inicialmente no transplante nuclear de células embrionárias, tiveram início no final da década de 1960 e primeiros anos da década de 1970 (BARANSKA e KOPROWSKI, 1970). O primeiro relato de desenvolvimento embrionário após transferência nuclear em mamíferos remonta ao ano de 1975, quando BROMHALL através de microinjeção de células provenientes de mórulas leporinas em oócitos enucleados de coelho, seguido de fusão induzida por vírus Sendai, obteve desenvolvimento até o estágio de mórula. O primeiro relato de

nascimento de clones mamíferos ocorreu em 1981, ano em que ILLMENSEE e HOPPE anunciaram o nascimento de três camundongos clonados a partir de células embrionárias.

Diversos laboratórios ao redor do mundo tentaram, sem sucesso, repetir o feito (McGRATH e SOLTER, 1984a; McLAREN, 1984), levantando suspeitas sobre a veracidade das informações divulgadas pela dupla de pesquisadores. Esse descrédito levou McGRATH e SOLTER (1984a), após insucessos em seus trabalhos de transferência nuclear a partir de células embrionárias murinas, a afirmarem que “os resultados sugeriam que a clonagem de mamíferos por transferência nuclear era biologicamente impossível”. Entretanto, o que era considerado biologicamente impossível tornou-se realidade incontestável com os anúncios do nascimento de ovelhas (WILLADSEN, 1986), bovinos (PRATHER et al., 1987; SIMS e FIRST, 1994), coelhos (STICE e ROBL, 1988), suínos (PRATHER et al., 1989), camundongos (CHEONG et al., 1993) e macacos (MENG et al., 1997) clonados a partir de células embrionárias.

A partir desses resultados, um novo questionamento surgia entre os pesquisadores da área: seria possível produzir um indivíduo clonado a partir de células somáticas? O avanço das técnicas de cultivo celular, a melhor compreensão sobre o ciclo celular e os métodos para sincronizar o ciclo de células doadoras de núcleo com oócitos receptores permitiram o nascimento de ovelhas clonadas a partir de células embrionárias cultivadas *in vitro* e induzidas até um estágio de quiescência (CAMPBELL et al., 1996). Utilizando a mesma técnica, experimentos conduzidos no Instituto Roslin – Escócia – culminaram com o anúncio do nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro mamífero clonado a partir de células adultas (WILMUT et al., 1997), que não somente respondeu a esse questionamento, como lançou novo ânimo nas pesquisas em torno da transferência nuclear de células somáticas, gerando enormes avanços nos anos subseqüentes.

Desde então, a clonagem de animais adultos já foi relatada em diversas espécies: bovinos (KATO et al., 1998), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998),

caprinos (BAGUISI et al., 1999), suínos (POLEJAVA et al., 2000), gatos (SHIN et al., 2002), coelhos (CHESNE et al., 2002); ratos (ZHOU et al., 2003), eqüinos (GALLI et al., 2003), cervídeos (BURKE, 2005), cães (LEE et al., 2005) e ferrets (LI et al., 2006).

Recentemente, também se demonstrou que células terminantemente diferenciadas, como linfócitos B e T (HOCHEDLINGER e JAENISCH, 2002; INOUE et al., 2005) são capazes de gerar indivíduos adultos, e que mesmo células cancerígenas (HOCHEDLINGER et al., 2005) podem sustentar o desenvolvimento embrionário inicial após reprogramação.

Desde a criação da ovelha “Dolly” (WILMUT et al., 1997), as principais etapas da técnica de TN não sofreram alterações. Trata-se de um procedimento em que cada uma das fases pode afetar o desenvolvimento subsequente. Os passos fundamentais podem ser sumarizados em: cultivo e seleção de células doadoras de núcleo, produção de ooplasto receptor, reconstituição oocitária, ativação e cultivo embrionário.

As alterações recentes na metodologia básica da clonagem têm sido dirigidas por duas necessidades principais: melhorar as taxas de desenvolvimento e a eficiência da técnica como um todo; e simplificar e modernizar o procedimento. Recentes esforços na tentativa de modernizar e simplificar a clonagem sugerem, por exemplo, o uso de oócitos sem zona pelúcida (BOOTH et al., 2001; OBACK et al., 2003), a clonagem sem o uso de micromanipuladores (VAJTA et al., 2001) ou a abolição da eletrofusão por injeção direta da célula no interior do citoplasto (LEE et al., 2003), sem que, no entanto, grandes melhorias tenham sido obtidas como resultado. Na tentativa de melhorar a eficiência da técnica, alguns estudos têm buscado alterar o estado epigenético da célula doadora de núcleo antes da reconstituição, seja por tratamentos químicos (ENRIGHT et al., 2003) ou pela transferência de cromatina remodelada *in vitro* (SULLIVAN et al., 2004), mas estes trabalhos também não geraram grandes avanços.

As razões para o estudo da clonagem também evoluíram ao longo de mais de 50 anos de pesquisas. Os trabalhos iniciais tinham como objetivo demonstrar e desvendar os mecanismos ligados à equivalência nuclear e à totipotência celular. Anos mais tarde, no início da década de 1970, com o desenvolvimento das tecnologias de DNA recombinante surgiram os primeiros relatos da produção de animais transgênicos (JAENISCH et al., 1975). Porém, as técnicas utilizadas na transgenia eram laboriosas e extremamente ineficientes. O domínio das técnicas de cultivo celular e o nascimento da ovelha “Dolly” revolucionaram a transgênese, permitindo a manipulação genética das células doadoras de núcleo antes da reconstituição. A associação da transgenia à clonagem gerou avanços significativos em diversos campos, como a produção de biofármacos, a melhoria de características zootécnicas nos animais de produção, a geração de modelos animais para estudo de doenças humanas e os xenotransplantes (SCHNIEKE et al., 1997, CIBELLE et al., 1998, McCREATH et al., 2000; DENNING et al., 2001a,b; DAI et al., 2002; LAI et al., 2002, KEEFER, 2004, KUES e NIEMANN, 2004; SALAMONE et al., 2006).

Além de alavancar a transgênese, a clonagem abriu novas perspectivas com a possibilidade de produção de cópias genéticas de animais com características produtivas desejáveis (PATERSON et al., 2003; FABER et al., 2004) ou de animais com resposta imunológica única (FOSBERG, 2005) e a preservação de espécies em risco de extinção ou extintas (WELLS et al., 1998; CORLEY-SMITH e BRANDHORST, 1999; WHITE et al., 1999; LOI et al., 2001). No campo da medicina, a clonagem passou a ser instrumento poderoso na tentativa de aliviar o sofrimento humano com o crescente domínio das técnicas de obtenção, cultivo e diferenciação de células-tronco embrionárias (KIND e COLMAN, 1999; HALL et al., 2006). Este procedimento, conhecido como clonagem terapêutica, tem provocado grandes debates científicos, éticos e religiosos, por envolver a produção e a destruição de embriões. Recentemente, grupos de pesquisadores deram novos alentos àqueles que depositam esperanças nesta técnica, descrevendo uma metodologia que permite a produção

de células-tronco embrionárias sem a necessidade de destruição do embrião (KLIMANSKAYA et al., 2006) e relatando a obtenção de células-tronco com potencial terapêutico a partir do líquido amniótico (De COPPI et al., 2007).

Atualmente, pouco mais de 10 anos após o nascimento da ovelha “Dolly”, a técnica de clonagem foi aplicada com sucesso em diversas espécies animais a partir de uma miríade de tipos celulares doadores de núcleo. Milhares de animais clonados já nasceram ao redor do mundo, muitos deles após manipulação genética das células doadoras, resultando em animais transgênicos com ganho ou perda de função, ou biorreatores. Apesar deste sucesso aparente, a técnica ainda apresenta uma capacidade muito limitada de gerar animais a termo e as anormalidades ao longo do processo são extremamente freqüentes.

### **3.1.3. Eficiência da clonagem**

O principal fator limitante da clonagem de animais adultos por TN é a ineficiência da técnica. Em bovinos, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos, ainda durante o período de cultivo *in vitro*, têm-se mostrado bastante variáveis, desde inferiores a 5% até superiores a 65% (WESTHUSIN et al., 2001), e os resultados de obtenção de gestações a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, menores que 5% (CIBELLI et al., 1998; WELLS et al., 1999). As falhas no desenvolvimento da placenta estão entre as causas mais comuns de perdas durante a gestação de clones (HILL et al., 2000). Perdas iniciais são atribuídas à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantóide, em razão da baixa vascularização do mesmo (De SOUSA et al., 2001); à rejeição imune (HILL et al., 2002), e às alterações placentárias (placentomegalia e reduzido número de placentônios; HILL et al., 1999). Perdas decorrentes de alterações placentárias também são freqüentes na segunda metade da gestação, especialmente em decorrência de hidroalantóide (HEYMAN et al., 2002; PACE et al., 2002; CONSTANT et al., 2006). Até mesmo naqueles animais que se desenvolvem a termo, anormalidades placentárias são observadas (LOI et al., 2006).

A viabilidade pós-natal dos animais oriundos de transferência nuclear é igualmente reduzida, e a necessidade de cuidados veterinários, quase uma regra. As disfunções observadas nos clones após o nascimento incluem: problemas músculo-esqueléticos (WELLS et al., 2004), problemas cardíacos (CHAVATTE-PALMER et al., 2002), disfunções imunes (RENARD et al., 1999), distúrbios renais (CHAVATTE-PALMER et al., 2004), alterações hepáticas (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002), alterações respiratórias (HILL et al., 1999), síndrome da cria gigante (LOS; WILSON et al., 1995; YOUNG e FAIRBURN, 2000; HEYMAN et al., 2002), entre diversas outras.

Felizmente, as anormalidades observadas nos animais clonados não são herdáveis, ou seja, não são transmitidas para as progênes (TAMASHIRO et al., 2002; WELLS et al., 2004; WELLS, 2005). Fica claro, portanto, que a causa dessas deficiências não residem em alterações cromossômicas ou mutações do DNA, mas sim em falhas de reprogramação das características epigenéticas das células somáticas, causando alterações na expressão gênica global e nos genes “imprinted”.

### **3.2. Epigenética**

Os estudos genéticos em animais têm deixado cada vez mais claro que, além da seqüência primária da fita de DNA, um outro tipo de informação capaz de influenciar o fenótipo da progênie, conhecida como epigenética, é transmitida através das gerações. Já se conhecem alguns tipos de marcações epigenéticas que regulam a expressão do genoma ao longo da vida animal, como as modificações nas histonas (proteínas que “empacotam” o DNA na formação dos cromossomos), conhecido como “código das histonas”; e as alterações na molécula de DNA propriamente dita, especificamente, a metilação do DNA. A metilação do DNA constitui uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas e é a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (NG e GURDON, 2005; TCHURIKOV, 2005).

### 3.2.1. Metilação do DNA

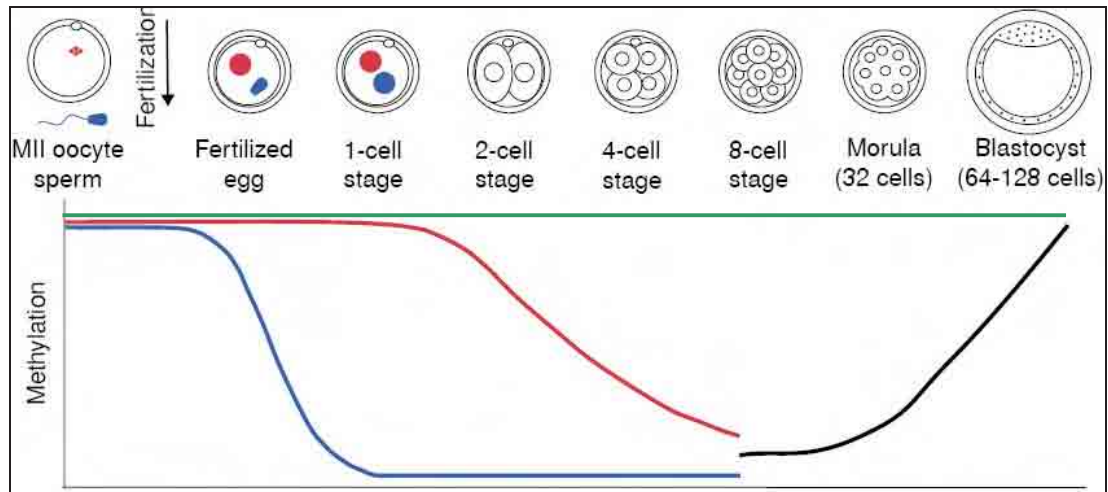
A metilação do DNA é a principal modificação epigenética do genoma e desempenha função crucial na regulação de uma ampla gama de processos biológicos em animais vertebrados, plantas e fungos (COLOT e ROSSIGNOL, 1999). Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal e tem importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no “imprinting” genômico e na modificação da cromatina (SURANI, 1998; NG e BIRD, 1999; REIK et al., 2001; SIMONSSON e GURDON, 2004).

Os padrões de metilação do genoma nas células somáticas diferenciadas são geralmente estáveis e hereditários. Entretanto, nos mamíferos há, pelo menos, dois períodos do desenvolvimento – na formação das células germinativas e nos embriões durante o período inicial de desenvolvimento – em que os padrões de metilação são reprogramados, gerando células com amplos e distintos potenciais de desenvolvimento (totipotência; REIK et al., 2001).

O primeiro ciclo de reprogramação nuclear ocorre durante a gametogênese, e neste momento ocorre o estabelecimento do “imprinting” genômico (CHAILLET et al., 1991; STÖGER et al., 1993; TREMBLAY et al., 1995). O segundo ciclo de reprogramação nuclear ocorre após a fertilização. O oócito fertilizado passa, inicialmente, por uma onda de desmetilação durante o desenvolvimento inicial, a qual “apaga” quase todo o padrão de metilação herdado dos pais (exceto dos genes “imprinted”); seguida de uma “de novo” metilação<sup>1</sup> durante o desenvolvimento embrionário inicial, determinando os padrões de metilação do embrião (KAFRI et al., 1992; MANN e BARTOLOMEI, 2002; Figura 1).

---

<sup>1</sup> “**de novo**” metilação: adição de grupamento metil em fita de DNA sem que a fita oposta contenha citosinas metiladas.



**Figura 1.** O genoma paterno (azul) sofre desmetilação ativa, enquanto o genoma materno (vermelho) é passivamente desmetilado até o estágio de 8 células, exceto nos genes “imprinted” (linha verde); em seguida a “de novo” metilação é observada (linha negra; adaptado de MANN e BARTOLOMEI, 2002).

Os genomas do espermatozóide e do oócito são transcricionalmente inativos e altamente metilados durante a fase pronuclear. Após 4 horas de fertilização, o genoma do espermatozóide é ativamente desmetilado, enquanto que o genoma proveniente do gameta feminino é passivamente desmetilado após o estágio de duas células até o estágio de 8-16 células. As regiões relacionadas aos genes “imprinted” permanecem altamente metiladas apesar da hipometilação global do genoma. A “de novo” metilação inicia-se após a implantação, na massa celular interna, mas não no trofoblasto de blastocistos de camundongos; já nos bovinos, a “de novo” metilação ocorre a partir do estágio de 8 a 16 células. (MONK et al., 1987; SANFORD et al., 1987; HOWLETT e REIK, 1991; KAFRI et al., 1992, REIK et al., 2001; FAIRBURN et al., 2002; KIERSZENBAUM, 2002; YOUNG e BEAUJEAN, 2004 – Figura 1).

A metilação do DNA está associada, na maioria dos casos, à inibição da transcrição e ao silenciamento gênico. A repressão da transcrição é baseada em dois mecanismos. O primeiro consiste na inibição direta da ação dos fatores de transcrição em seqüências específicas do DNA. A maioria dos fatores de

transcrição dos mamíferos têm nas regiões do DNA ricas em CpGs seus sítios de reconhecimento e ligação e a maquinaria transcricional requer contato com a citosina para que ocorra sua ligação com a dupla hélice. A ligação de muitos desses fatores é impedida ou abolida pela metilação das CpGs (IGUCHI-ARIGA e SCHAFFNER, 1989; ROBERTSON et al., 2000, 2004).

O segundo mecanismo de repressão da transcrição resulta do recrutamento e da ligação de proteínas ligadoras de metil (MBD) ao DNA metilado, as MBD1, MBD2, MBD3 e MeCP2 (proteína ligadoras de metil CpG 2) estão envolvidas na repressão transcricional (NG et al., 1999). A MBD1 e a MeCP2 contêm domínios de repressão transcricional que agem via histona desacetilases (HDAC). As HDACs causam desacetilação local das cadeias laterais de aminoácidos que formam as histonas, resultando em remodelação da cromatina para uma estrutura mais condensada e refratária à transcrição (TAUTON et al., 1996; BIRD e WOLFFE, 1999). As MBD2 e MBD3 fazem parte de uma grande estrutura protéica, a MeCP1. O complexo MeCP1 se liga ao DNA metilado com menos afinidade que o complexo MeCP2, o que sugere que repressões transcricionais permanentes são mantidas pela MeCP2, e silenciamentos transcricionais transitórios são determinados pela ligação do complexo MeCP1 (NG et al, 1999).

### **3.2.2. DNA metiltransferases**

A metilação do DNA se altera de forma orquestrada durante o desenvolvimento embrionário por meio da desmetilação de genes específicos e da “de novo” metilação. A metilação ocorre na posição 5 do anel pirimídico que forma a molécula de citosina, transformando-a numa 5-metil-citosina. Esse processo ocorre em dinucleotídeos CpG, constituídos por uma citosina 5' seguida de uma guanosina, e requer a atividade enzimática da DNA metiltransferase (*DNMT*; ROBERTSON et al., 2000; MEEHAN, 2003).

RIGS (1975) e HOLLIDAY e PUGH (1975) foram os primeiros a sugerir que a metilação do DNA faz parte do mecanismo de regulação da expressão gênica

durante desenvolvimento, e que a existência de metiltransferases mantém os padrões de metilação do DNA. A existência das metiltransferases foi subsequente demonstrada por experimentos que evidenciaram a herança dos padrões de metilação em células de mamíferos (WIGLER et al., 1981; STEIN et al., 1982) e pela clonagem da primeira *DNMT* mamífera, atualmente conhecida como *DNMT1* (BESTOR et al., 1988). A proteína DNMT1 foi identificada no sítio de replicação do DNA, sugerindo que a manutenção da metilação está atrelada à replicação do DNA (LEONHARDT et al., 1992). Além disso, a inativação do gene *Dnmt1* em camundongos causou extensa desmetilação de todas as seqüências examinadas (LI et al., 1992; LEI et al., 1996). Estes achados comprovam que a DNMT1 funciona como a principal metiltransferase de manutenção, assegurando a replicação dos padrões de metilação do DNA após cada ciclo de divisão celular, metilando o DNA hemi-metilado.

A “de novo” metilação é detectada durante a gametogênese e em embriões no início do desenvolvimento (JÄHNER et al., 1982). Embora a DNMT1 seja capaz de metilar DNA desmetilado *in vitro* (BESTOR, 1992) evidências do seu envolvimento na “de novo” metilação durante o desenvolvimento permanecem incertas. A procura por “de novo” metiltransferases em mamíferos levou à identificação de diversas metiltransferases novas, incluindo membros das famílias *DNMT2* e *DNMT3*.

É pouco provável que a DNMT2 seja a enzima responsável pela “de novo” metilação uma vez que a inativação da *Dnmt2* em células tronco-embriônicas de camundongos não perturbou a “de novo” metilação ou a manutenção da metilação (OKANO et al., 1998a). Recentemente, alguns grupos identificaram que esta enzima pode metilar seqüências extremamente específicas do DNA, explicando o baixo nível de atividade anteriormente detectada (HERMANN et al., 2003; LIU et al., 2003; TANG et al., 2003).

A família das *DNMT3s* é composta por, ao menos, três genes: *DNMT3A*, *DNMT3B* e *DNMT3L*. Foi demonstrado por experimentos de inativação gênica em camundongos e células-tronco embrionárias que tanto a *Dnmt3a* como a *Dnmt3b*

são necessárias para a “de novo” metilação do genoma durante a embriogênese e essenciais no desenvolvimento dos mamíferos (OKANO et al., 1998b; 1999; HERMANN et al., 2004). A inativação da *DNMT3A* e da *DNMT3B* desorganiza a “de novo” metilação durante o desenvolvimento embrionário inicial causando morte embrionária nesse período, mas não provoca efeito perceptível na manutenção dos padrões de metilação preexistentes (OKANO et al., 1999). Embora não apresente atividade catalítica, a DNMT3L desempenha importante papel na regulação do estabelecimento dos “imprintings”. Camundongos “knockouts” para a *Dnmt3L* não apresentam metilações nas regiões de “imprinting”, levando à expressão bialélica destes genes (BOURC’HIS et al., 2001b; HATA et al., 2002; KANEDA et al., 2004).

### 3.2.3. “Imprinting” genômico

O “imprinting” genômico em mamíferos foi descoberto no início da década de 1980 como resultado de dois experimentos sobre o desenvolvimento de embriões uniparentais ou com dissomia uniparental em camundongos (McGRATH e SOLTER, 1984b; SURANI et al., 1984). Nos dois casos, foi possível demonstrar a não-equivalência funcional dos genomas paterno e materno. O “imprinting” genômico consiste na expressão diferencial de genes de acordo com a sua origem parental, resultando na expressão de apenas uma, entre as duas cópias herdadas de um gene. Os genes “imprinted” paternos têm o alelo paterno epigeneticamente modificado, prevenindo a transcrição e assegurando a expressão monoalélica do alelo materno. O mesmo raciocínio é válido para os genes “imprinted” maternos, nos quais apenas o alelo paterno é expresso.

A metilação do DNA é o principal mecanismo regulador do estabelecimento e da manutenção do “imprinting” genômico; uma vez que sua presença resulta em uma estrutura de cromatina mais condensada e resistente à transcrição (REIK et al., 1987).

A explicação mais aceita para a existência do “imprinting” genômico é a teoria do “conflito genético” ou “investimento parental” (HAIG e GRAHAM, 1991;

MOORE e HAIG, 1991), proposta a partir de observações sobre a participação dos genes “imprinted” no desenvolvimento e crescimento do feto ou da placenta; e dos efeitos contrários em suas ações. Por exemplo: genes expressos paternos como *IGF2* e *PEG3* promovem crescimento fetal, enquanto que genes expressos maternos, como *IGF2R* e *GNAS* tendem a frear o crescimento fetal (REIK e DEAN, 2001; TYCKO e MORISON, 2002). As fêmeas, restringindo o crescimento fetal são capazes de ter vida reprodutiva mais longa, assegurando o sucesso reprodutivo em longo prazo. Em contraste, aos machos interessa que sua progênie seja maior e mais forte, mesmo que em detrimento da fêmea. Outra teoria sugere que a presença dos genes “imprinted” seja função de um modelo evolutivo (BEAUDET e JIANG, 2002). Segundo esta teoria, as espécies que desenvolveram o “imprinting” são mais hábeis para responder a pressões ambientais simplesmente alterando qual dos dois alelos é silenciado e qual é expresso. Há ainda a teoria da “bomba-relógio ovariana” (VARMUZA e MANN, 1994), segundo a qual o “imprinting” ocorre para evitar o desenvolvimento partenogenético de embriões dentro do ovário, preservando a fêmea.

Os genes “imprinted” geralmente ficam agrupados dentro do genoma (CATTANACH e KIRK, 1985), e a maioria destes agrupamentos está sob controle de elementos do DNA chamados de centro de “imprinting” (IC). Os genes dentro dos agrupamentos compartilham os elementos regulatórios, e alguns dos mecanismos através dos quais os ICs controlam os genes ou outras regiões regulatórias dentro dos agrupamentos já são conhecidos. Um deles envolve o isolamento de genes de um lado do IC e os promotores gênicos de outro, através de interações orquestradas da proteína isolatória CTCF e da cromatina (DREWEL et al., 2000; SCHOENHERR et al., 2003; KURUKUTI et al., 2006). Outro mecanismo envolve RNAs não-codificadores que se originam dos ICs e atuam na cromatina, remodelando-a (MALLORY e VAUCHERET, 2004; DU e ZAMORE, 2005).

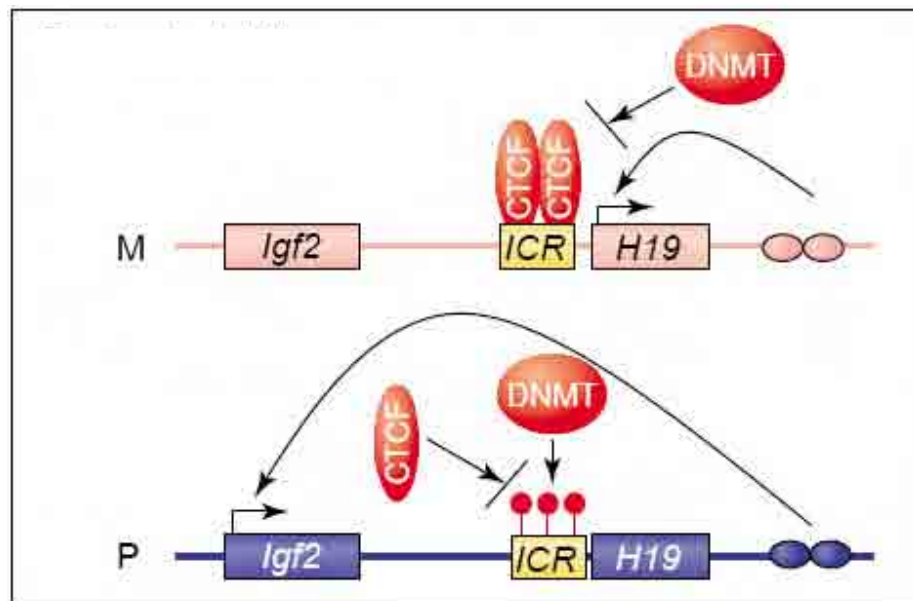
Um dos componentes de todos os ICs são as regiões de metilação diferencial (DMR). As DMRs são estabelecidas na linhagem germinativa,

resultando, nos “imprintings” paternos, em altos níveis de metilação do DNA no espermatozóide e na ausência de metilação no oócito; ou em padrões contrários nos “imprintings” maternos. Essa metilação parental-específica é mantida ao longo do desenvolvimento, sem sofrer efeito da “de novo” reprogramação que ocorre após a fertilização (TREMBLAY et al., 1995).

Além das diferenças na metilação do DNA, os ICs também apresentam diferenças alélicas na estrutura da cromatina. Modificações nas histonas que reprimem a transcrição, como a metilação da lisina 9 e lisina 27 da histona H3 (H3-K9 e H3-K27, respectivamente) são encontradas nos ICs e DMRs dos alelos metilados, enquanto que as histonas transcricionalmente ativas, apresentando acetilação das histonas H3 e H4, estão associadas aos alelos não metilados (LEWIS e REIK, 2006).

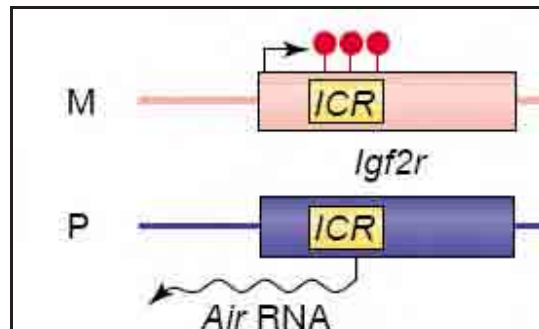
### **3.2.3.1. Regulação dos genes “imprinted” *Igf2*, *Igf2r* e *H19***

O primeiro IC a ser geneticamente caracterizado em estudos utilizando murinos foi a região de metilação diferencial (DMR) ascendente ao *H19* (também chamada de DMD ou ICR), a qual controla a expressão dos genes *H19* e *Igf2* (THORVALDSEN et al., 1998). A ICR do locus *Igf2-H19* possui como um dos seus elementos de controle uma proteína “zinc-finger” (proteína que contém o metal zinco no sítio de reconhecimento do DNA) conhecida como CTCF (ou fator de ligação CCCTC). A proteína CTCF liga-se ao ICR do alelo materno não-metilado impedindo a ação das DNMTs e prevenindo a metilação. A ligação da CTCF ao alelo materno impede a interação entre o gene *Igf2* e os estimuladores situados em posição descendente ao *H19*, mas permite a ação do promotor do *H19* e sua expressão. No alelo paterno, a metilação do ICR e não ligação da CTCF permite a interação dos estimuladores com os promotores do *Igf2*, mas suprimem a expressão do *H19* devido à metilação próxima ao seu promotor (SCHOENHERR et al., 2003; DELAVAL e FEIL, 2004). Em resumo, a metilação diferencial do locus *Igf2-H19* assegura a expressão exclusiva do *Igf2* pelo alelo paterno e do *H19* pelo materno (Figura 2).



**Figura 2.** No alelo materno (M) a ligação da proteína CTCF ao ICR impede sua metilação e a interação dos estimuladores (elipses) aos promotores do *Igf2*, permitindo a expressão do *H19*. No alelo paterno (P) a metilação (círculos vermelhos) do ICR pela DNMT permite a interação dos estimuladores com os promotores do *Igf2* e sua expressão, mas impede a expressão do *H19* devido a metilação de seu promotor (DELAVAL e FEIL, 2004).

Assim como no locus do *Igf2-H19*, a regulação do “imprinting” no locus do *Igf2r* murino é regulada por elementos sensíveis à metilação da cromatina; entretanto, diferentemente do primeiro, o alelo metilado é expresso. O ICR intrônico do gene *Igf2r*, metilado no alelo materno, determina a inibição da expressão do *Igf2r* no alelo paterno. O ICR do *Igf2r* origina, a partir do alelo paterno não metilado, um RNA não-codificador denominado *Air*, responsável por impedir a expressão do *Igf2r* a partir do alelo paterno (SLEUTELS et al., 2002; DELAVAL e FEIL, 2004 – Figura 3).



**Figura 3.** No alelo materno (M) a metilação (círculos vermelhos) do ICR intrínico impede a produção do *Air* e permite a expressão do gene *Igf2r*. No alelo paterno (P), a produção do RNA não-codificador *Air* suprime a expressão do *Igf2r* (DELAVAL e FEIL, 2004).

### 3.3. Reprogramação nuclear e alterações epigenéticas em clones

Diversos estudos buscam investigar as razões pelas quais a clonagem apresenta resultados insatisfatórios, e muitos têm destacado o papel dos eventos epigenéticos nas falhas de desenvolvimento dos animais clonados. As alterações observadas nos clones não são transmitidas para a prole, corroborando a origem epigenética das falhas observadas (ZHANG et al., 2004).

Para o desenvolvimento normal após a TNCS, as marcações epigenéticas da célula doadora de núcleo devem ser reprogramadas para um padrão comparável a um zigoto. Essa condição asseguraria um perfil de expressão de genes compatível com o desenvolvimento embrionário e fetal. No entanto, nos embriões clonados, a reprogramação deve ocorrer em um intervalo de tempo mais curto e num contexto celular radicalmente diferente quando comparados ao desenvolvimento normal, aumentando consideravelmente as chances de erros (JOUNEAU e RENARD, 2003).

De fato, em embriões bovinos clonados foram observados níveis aumentados de metilação das células embrionárias, nos estágios de quatro e oito células. Embora ocorra uma desmetilação inicial no genoma da célula doadora de núcleo, a desmetilação passiva não é observada nos mesmos níveis dos embriões normais. Além da redução no grau de desmetilação, também se observa uma “de novo” metilação anormal nos embriões clonados, com início

precoce se comparada a embriões normais (BOURC'HIS et al, 2001a; DEAN et al., 2001).

Utilizando técnicas de biologia molecular, diversos trabalhos documentaram as várias alterações de cunho epigenético observadas em animais clonados, como por exemplo:

- alterações na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário e fetal (De SOUSA et al., 1999; DANIELS et al., 2000, 2001; WRENZYCKI et al., 2001, 2002; NIEMANN et al., 2002; SEBASTIANO et al., 2004; LONG et al., 2006; BEYHAN et al., 2007);
- falhas relacionadas aos genes “imprinted” (RIDEOUT III et al., 2001; HUMPHERYS et al., 2002; NIEMANN et al., 2002);
- alterações de metilação do DNA (BOURC'HIS et al, 2001a; DEAN et al., 2001; KANG et al., 2001; CEZAR et al., 2003; CHUNG et al., 2003);
- alterações na remodelação da cromatina (SANTOS et al., 2003);
- falhas de inativação do X (XUE et al., 2002).

A transferência de embriões reconstituídos morfologicamente normais, mas apresentando incompleta reprogramação nuclear é, certamente, uma das principais causas dos altos índices de perdas gestacionais e anomalias observadas nos animais clonados (JOUNEAU e RENARD, 2003; LATHAM, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e meios

Exceto quando mencionado, reagentes e meios foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

### 4.2. Superovulação e coleta de embriões *in vivo*

Embriões produzidos *in vivo* foram obtidos após superovulação e inseminação artificial (IA) de fêmeas bovinas cruzadas *Bos indicus/B. taurus* apresentando ciclicidade ovariana. As ondas foliculares foram sincronizadas pela aspiração do folículo dominante e inserção de dispositivo de liberação de progesterona (P4) (Crestar, Intervet Internation GmbH, Unterschleissheim, Alemanha). A quantidade total de 200mg de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canadá) foi administrada i.m. em oito doses decrescentes, duas vezes ao dia, por quatro dias consecutivos (40mg x 2, 30mg x 2, 20mg x 2, 10mg x 2, respectivamente), com início 3 a 4 dias após a aspiração folicular. Para indução de luteólise, concomitante à quinta dose de FSH, 150µg de um análogo de prostaglandina F<sub>2α</sub> (D-cloprostenol, Preloban, Intervet International GmbH) foi administrado i.m. A remoção do dispositivo de liberação de P4 foi realizada concomitantemente à sexta aplicação de FSH. Finalmente, 0,1mg de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, Fertagyl, Intervet Internation GmbH) foi administrado i.m. concomitantemente à oitava aplicação de FSH para induzir pico de LH. As vacas foram inseminadas 12 e 24 horas após a aplicação de GnRH com sêmen de um touro Nelore (*B. indicus*). No sétimo dia do desenvolvimento (IA=dia 0), os embriões foram recuperados não-cirurgicamente por lavagem uterina com solução salina com tampão fosfato (PBS).

### **4.3. Produção *in vitro* de embriões**

#### **4.3.1. Recuperação oocitária e maturação *in vitro* (MIV)**

Ovários provenientes de abatedouro foram transportados para o laboratório em solução salina 0,9% a 28-32°C. Folículos entre 2 e 8mm foram aspirados utilizando agulha de 18 ga acoplada a seringa de 20mL. Oócitos com, no mínimo, 4 camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram selecionados para MIV. Grupos de 20 a 25 COCs foram maturados sob óleo mineral (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA) em gotas de 100µL de meio de cultivo de tecidos (TCM 199, GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA) com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cripion, Andradina, SP, Brasil), 1,0µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canadá), 50µg/mL hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0µg/mL estradiol, 0,20mM piruvato de sódio e 83,4µg/mL amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Os COCs foram mantidos em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e temperatura de 38,5°C por 24 horas.

#### **4.3.2. Fertilização *in vitro* (FIV)**

Após 24 horas de MIV, COCs expandidos foram transferidos para gotas de 100µL de meio TALP-FIV suplementado com 6mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 30µg/mL de heparina, 18µM penicilamina, 10µM hipotaurina, 1,8µM epinefrina, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. Foi utilizado sêmen congelado de touro Nelore (*B. indicus*) e os espermatozóides móveis foram separados por gradiente de densidade em Percoll 45% e 90%. A concentração final de espermatozóides vivos foi de  $1 \times 10^5$  por gota. Oócitos e espermatozóides foram co-incubados por 22 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e temperatura de 38,5°C com umidade máxima. Ao final do período de co-incubação, os prováveis zigotos foram lavados em TALP-FIV e transferidos para meio de cultivo de embriões.

### **4.3.3. Clonagem por transferência nuclear (TN) de células somáticas**

#### **4.3.3.1. Preparo das células somáticas doadoras de núcleo**

Linhagens celulares de fibroblastos somáticos, derivadas de biópsia de pele de uma vaca Nelore (*B. indicus*) de 19 anos de idade foram utilizadas como fonte doadora de núcleos. O fragmento de pele resultante da biópsia foi dividido em pedaços menores (aproximadamente 3 mm) e os explantes foram cultivados em garrafas de 25mm<sup>2</sup> contendo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 50% (v/v) de SFB e 83,4µg/mL de amicacina a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima. Este meio foi utilizado durante os três primeiros dias de cultivo para o estabelecimento da linhagem primária. Após isso, o cultivo celular foi mantido utilizando DMEM acrescido de 10% (v/v) de SFB e 83,4µg/mL amicacina. Quando a linhagem celular primária atingiu confluência, as células foram tratadas com 0,05% (m/v) de tripsina acrescida de 1% (v/v) de soro de galinha. Todas as passagens celulares foram cultivadas até a confluência. Células das passagens iniciais foram congeladas em DMEM suplementado com 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, EUA) e armazenadas em nitrogênio líquido. Linhagens celulares cultivadas por três ou quatro passagens, submetidas (presumível G<sub>0</sub>) ou não (presumível G<sub>1</sub>) à privação de soro, foram utilizadas nos experimentos de transferência nuclear. Para o grupo TN-G<sub>0</sub> a privação de soro (DMEM + 0,5% de SFB) foi realizada por 3 a 5 dias antes da reconstituição oocitária (WILMUT et al., 1997; KATO et al., 1998). Para o grupo TN-G<sub>1</sub>, as células não sofreram privação de soro.

#### **4.3.3.2. Enucleação e reconstituição oocitária**

Às 18 horas de MIV, COCs expandidos foram incubados em solução de hialuronidase 0,2% (m/v) por 5 minutos e submetidos a pipetagens para remoção das células do *cumulus*. Oócitos apresentando o primeiro corpúsculo polar foram selecionados e incubados por 15 minutos em fluido sintético de oviduto modificado (SOF; VAJTA et al., 1999) com 10µg/mL de bizbenzimidaz (Hoechst

33342) e 7,5µg/mL de citocalasina B a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima. Os procedimentos de micromanipulação foram realizados em SOF tamponado com HEPES (HSOF; WELLS et al., 1999) suplementado com 10% de SFB e 7,5µg/mL de citocalasina B. Para a enucleação, uma pipeta de borossilicato de vidro de 25µm de diâmetro externo foi utilizada para a remoção do primeiro corpúsculo polar e citoplasma adjacente. A enucleação foi confirmada pela visualização do carioplasto aspirado dentro da pipeta exposta à luz ultravioleta. Após a enucleação, os citoplastos retornavam ao meio de maturação onde eram mantidos até os procedimentos de reconstituição. Fibroblastos isolados foram transferidos para o espaço perivitelínico de cada citoplasto receptor e os complexos citoplasto-célula foram eletrofundidos em solução de manitol 0,28M contendo 0,05mM de cálcio, 0,1mM de magnésio e 0,3mg/mL de BSA. A eletrofusão foi induzida por dois pulsos diretos de 2,0kV/cm com duração de 20µs cada, utilizando equipamento BTX Eletrocell Manipulator 2001 (BTX, San Diego, CA, EUA). As taxas de fusão foram determinadas 30 a 60 minutos após a eletrofusão, e oócitos reconstituídos com sucesso foram incubados em HSOF + 10% de SFB a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### **4.3.3.3. Ativação dos oócitos reconstituídos**

Oócitos reconstituídos foram quimicamente ativados 30 horas após o início da MIV, utilizando 5µM de ionomicina por 5 minutos em TCM 199 tamponado com HEPES e suplementado com 10% de SFB, seguido de incubação em SOF suplementado com 20mM de cloreto de estrôncio (SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Mallinckrodt, Hazelwood, MO, EUA) e 10µg/mL de citocalasina B por 6 horas a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar (MÉO et al., 2005).

#### **4.3.4. Obtenção de embriões partenogênicos**

Para a obtenção de embriões partenogênicos (parteno), oócitos maturados por 24 horas foram desnudados, selecionados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar e mantidos em meio de maturação até a ativação partenogênica. Após 30 horas de MIV, os oócitos foram ativados com ionomicina seguido por incubação em SOF + estrôncio + citocalasina B, conforme descrito anteriormente para a ativação dos oócitos reconstituídos.

Alguns dos embriões partenogênicos destinados à transferência de embriões foram ativados com ionomicina seguido por incubação em 2mM 6-DMAP, em SOF, por 4 horas, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera.

#### **4.3.5. Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo embrionário foi realizado em microgotas de 100 $\mu$ L de SOF contendo 5mg/mL de BSA livre de ácidos graxos (fração V) e 2,5% de SFB, em sistema de co-cultivo com células da granulosa, cobertas por óleo mineral. A cada 48 horas, o “feeding” era realizado pela substituição de 50% do volume da microgota por meio recém-preparado. Grupos de 10-20 embriões foram cultivados em cada microgota a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar durante 7 dias, até o estágio de blastocisto.

#### **4.4. Remoção da zona pelúcida e colheita dos embriões**

Blastocistos produzidos *in vivo* ou *in vitro* (FIV, TN-G<sub>0</sub>, TN-G<sub>1</sub>, parteno) foram lavados duas vezes em PBS contendo 0,1% (m/v) de álcool polivinílico (PVA) e brevemente incubados em solução PBS-ácida (PBS-HCl pH 2,0) para remoção da zona pelúcida (ZP). Embriões livres de ZP foram individualmente lavados em PBS suplementando com 0,1% de PVA e 1U/ $\mu$ L de inibidor de RNase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e transferidos em um volume de

1 $\mu$ L desta solução para microtubos de 0,2mL. As amostras foram individualmente congeladas por imersão direta em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

#### **4.5. Estabelecimento de gestações**

Para o estabelecimento de gestações a partir de embriões produzidos *in vivo*, fêmeas bovinas cruzadas *B. indicus/B. taurus* apresentando ciclicidade ovariana foram superovuladas conforme descrito no item 4.2. e posteriormente submetidas à monta natural.

Para gestações a partir de embriões produzidos *in vitro* (FIV, TN ou parteno), fêmeas bovinas cruzadas *B. indicus/B. taurus* apresentando ciclicidade ovariana foram sincronizadas com 150 $\mu$ g de um análogo de prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (D-cloprostenol, Preloban, Intervet), observadas quanto à manifestação de cio (dia 0) e inovuladas no dia 7 com blastocistos oriundos de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de célula somática ou partenogênese. No trigésimo dia de gestação, o diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultra-sonográfico por via retal com aparelho Aloka SSD-900 (Aloka Co., Tóquio, Japão) equipado com transdutor linear de 5MHz. Receptoras com diagnóstico positivo foram abatidas entre o 33º e 36º dia de gestação.

#### **4.6. Coleta dos fetos e anexos fetais**

As fêmeas bovinas foram abatidas de acordo com as normas do RIISPOA. Imediatamente após o abate, o trato reprodutivo foi removido, acondicionado em gelo e transportado ao laboratório. Os cornos uterinos foram dissecados com um corte longitudinal na curvatura maior, expondo o feto e anexos fetais. Fragmentos do feto e da membrana cório-alantóide foram coletados, congelados por imersão em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

#### 4.7. Sexagem dos embriões

Blastocistos obtidos por fertilização *in vivo* e *in vitro* tiveram o sexo determinado pela reação em cadeia da polimerase (PCR; WRENZYCKI et al., 2002) utilizando 1/3 do lisado embrionário. A PCR foi realizada em volume final de 25µL contendo tampão de PCR 1X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5µM de oligonucleotídeos iniciadores cromossomo Y específicos (5'-CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT-3' e 5'-TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG-3'), 0,1µM de oligonucleotídeos iniciadores bovino específicos (5'-AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA-3' e 5'-AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT-3'), e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As condições de termociclagem incluíam um passo inicial de 97°C por 2 minutos, seguido de 32 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão. Após o último ciclo, um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C foi realizado. Cada reação de PCR continha um controle feminino, um masculino e um controle livre de amostra (branco). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE (90mM de Tris, 90mM de ácido bórico e 2mM de EDTA, pH8,3) contendo 0,5mg/mL de brometo de etídeo. Após a eletroforese, os géis foram escaneados (Fuji FLA3000 Fluorescence Scanner, Fuji Photo Film Co., Tóquio, Japão) e os fragmentos visualizados utilizando os programas Image Reader FLA-3000 Series (v.1.11) e Image Gauge (v.3.12; Fuji Photo Film Co.). Os embriões machos ou fêmeas eram distinguidos pelo padrão de bandeamento em gel: os primeiros apresentavam duas bandas de tamanho 300bp e 210bp contrapondo-se a uma banda única de 300bp nos segundos. Uma vez que as células doadoras de núcleo utilizadas nos procedimentos de TN e que os embriões partenogênicos eram do sexo feminino, somente blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* do sexo feminino foram utilizados nas análises posteriores.

#### 4.8. Amplificação do RNA mensageiro dos embriões

Quarenta blastocistos livres de zona pelúcida (8 de cada grupo: *in vivo*, FIV, NT-G<sub>0</sub>, NT-G<sub>1</sub> e Parteno) foram individualmente submetidos a um ciclo de amplificação linear do RNA mensageiro utilizando o “Superscript™ RNA amplification system” (L-1016, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o procedimento de amplificação descrito por VAN GELDER et al. (1990). De maneira simplificada, o procedimento envolveu: a) transcrição reversa do RNA mensageiro com uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores, cada um deles formados por um promotor T7 polimerase seguido de uma seqüência de ácidos desoxitimidílicos (dT); b) síntese de dupla-fita de cDNA e purificação; c) amplificação linear do cDNA através de transcrição *in vitro* usando a RNA polimerase T7; d) purificação do RNAm anti-senso (aRNAm) e armazenamento a -80°C.

#### 4.9. Extração do RNA total dos tecidos e anexos fetais

Os fetos e membranas cório-alantóide dos grupos *in vivo*, FIV, TN e parteno foram descongelados e submetidos à extração de RNA com TRIzol (Gibco BRL), segundo protocolo do fabricante. Isoladamente, em um cadinho, a amostra foi imersa em nitrogênio líquido, pulverizada com pistilo e os fragmentos resultantes foram homogeneizados com 1mL de TRIzol, centrifugados a 12000xg por 10 minutos a 4°C, acrescida de 0,2mL de clorofórmio (Merck & Co.) e centrifugado novamente. O RNA foi removido da fase aquosa, precipitado com 0,5mL de álcool isopropílico (Mallinckrodt), lavado com etanol (Merck & Co.) 75% (v/v) e dissolvido em 50µL de água tratada com DEPC e quantificados utilizando biofotômetro (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Como não houve sucesso no estabelecimento gestações a partir de embriões do grupo TN-G<sub>0</sub>, as análises de expressão gênica em fetos e membranas cório-alantóide do grupo TN correspondem a gestações derivadas de embriões do grupo TN-G<sub>1</sub>.

#### 4.10. Transcrição reversa

O aRNAm foi incubado 5 minutos a 70°C com 6,75µM de hexâmeros randômicos (pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e imediatamente resfriado a 4°C para adição de 50U de enzima transcriptase reversa (ImProm-II™ Reverse Transcriptase, Promega, Madison, WI, EUA) e reagentes: tampão – 250mM de Tris, 375mM de KCl, 50mM de DTT – 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM de cada dNTP e 2U/µL de inibidor de RNase em um volume de 20µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 8 minutos, aquecidas a 42°C por 1 hora, incubadas a 70°C por 15 minutos e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

A transcrição reversa dos tecidos e anexos fetais foi realizada com 1µg de RNA total, os hexâmeros randômicos foram substituídos por oligonucleotídeos formados por ácido desoxitimidílico (pd(T)<sub>12-18</sub>; Amersham Biosciences) na mesma concentração, e o passo de incubação a 25°C foi suprimido.

#### 4.11. PCR em tempo real

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Em todas as reações de PCR em tempo real foi utilizado o corante ROX como referência passiva.

Nas reações para quantificação das *DNMTs*, foi utilizado TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,9µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,25µM da sonda TaqMan® em reação de 20µL. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 55 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 45 segundos. As quantificações relativas dos transcritos dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*; AB098979), DNA metiltransferase 1 (*DNMT1*; AY244709), 3a (*DNMT3A*; AY271298) e 3b (*DNMT3B*; AY244710) foram realizadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores e sondas TaqMan® sintetizadas pela Applied Biosystems. Os oligonucleotídeos

iniciadores e sondas utilizados para mensurar a frequência dos transcritos de gene de expressão constitutiva (*GAPDH*) e das DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) estão apresentados nas Tabela 1.

Volumes correspondentes a 1/200, 1/50, 1/100 e 1/50 da solução de cDNA total de cada embrião foram utilizados para as amplificações por PCR do *GAPDH*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*, respectivamente. Cada amostra foi avaliada em quadruplicata para cada gene. Toda reação de PCR continha um controle livre de amostra (branco).

Para a análise dos genes “imprinted” foi utilizado Power SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,06µM, 0,20µM, 0,50µM e 0,25µM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores para o *GAPDH*, *IGF2*, *IGF2R* e *H19*, respectivamente, em reação de 20µL. As condições de termociclagem incluíram um passo inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi iniciada em 60°C com +0,1°C de incremento até atingir 95°C. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação dos genes “imprinted” *IGF2*, *IGF2R* e *H19* e controle endógeno (*GAPDH*), sintetizados pela Invitrogen, estão descritos na Tabela 1. As reações para quantificação relativa dos transcritos dos genes “imprinted” continham 40ng de cDNA e foram realizadas em quadruplicata.

**Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados para quantificação relativa dos genes “imprinted” e das DNA metiltransferases, e códigos de acesso no GenBank.

<b>Gene</b>	<b>Seqüência (5'→3')</b>	<b>GenBank</b>
<b>DNA metiltransferases</b>		
<i>GAPDH</i>	AAGGCCATCACCATCTTCCA CCACTACATACTCAGCACCAGCAT VIC-AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG-TAMRA	AB098979
<i>DNMT1</i>	GCAGTACCAGCCCATCCT GCGGGCAGCCACCAA 6FAM-ATGTCCTTGCAAATATG-MGBNFQ	AY244709
<i>DNMT3A</i>	GCTCATGTGTGGGAACAACAATT CACCAAGAGATCCACACATTCCA 6FAM-CTGCAGGTGCTTTTG-MGBNFQ	AY271298
<i>DNMT3B</i>	GTCCTTCCACCCTCTCTTTGAG GTCGTCGTGTACATGTAGAAGA 6FAM-CATGCCGGGACCGCT-MGBNFQ	AY244710
<b>Genes “Imprinted”</b>		
<i>GAPDH</i>	GCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT	AB098979
<i>IGF2</i>	CTTCAGCCGACCATCCAGCCGCATAAAC TCAGCGGACGGTGA CTCTTGGCCTCTCT	X53553
<i>IGF2R</i>	CGCCTACAGCGAGAAGGGGTTAGTC AGAAAAGCGTGACGTGCGCTTGTC	JO3527
<i>H19</i>	GACACCCAGAACCCTCAAGA CCTTCCAGAGCTCATTCTG	AY849926

#### 4.12. Análise dos dados da PCR e análise estatística

Os dados referentes à produção de embriões foram submetidos à ANOVA utilizando o SAS v.8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando um nível de significância de 5%.

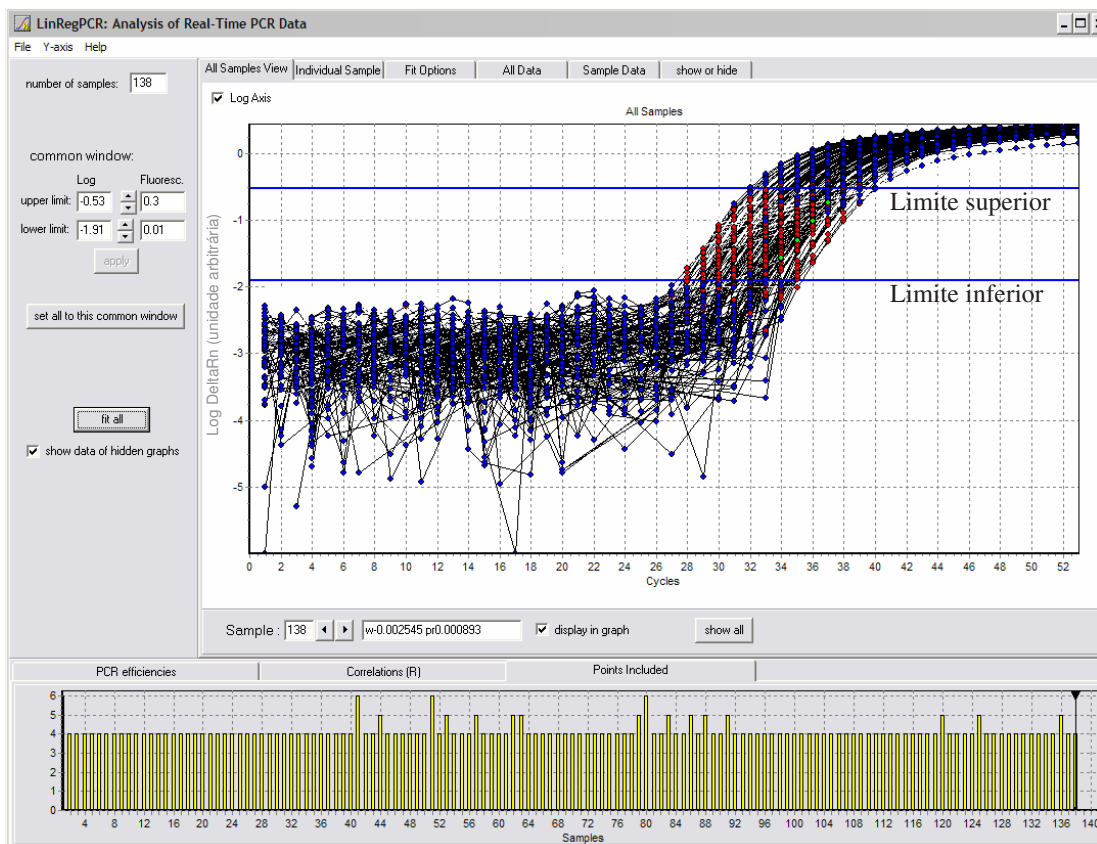
A eficiência média das amplificações por PCR foi estimada para cada par de oligonucleotídeos iniciadores em cada amostra utilizando uma regressão linear do logaritmo da fluorescência a cada ciclo (RAMAKERS et al., 2003), através do software LinRegPCR. Cada curva de regressão foi ajustada para conter no mínimo 4 e no máximo 6 pontos, e máximo coeficiente de regressão linear. Para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, a linha de “threshold” foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, que corresponde à fase em que as amostras estão sofrendo amplificação exponencial. A janela de linearidade foi determinada pelos valores mínimos (limite inferior) e máximos (limite superior) de fluorescência utilizados para estimar a eficiência da PCR (Figuras 4 e 5).

As diferenças nas frequências dos transcritos dos genes foram calculadas pela equação: razão de expressão =  $[1 + (\text{eficiência média da PCR})]^{C_t \text{ médio do grupo testado} - C_t \text{ médio do grupo referência}}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

As razões de expressão foram normalizadas pela razão de expressão do controle endógeno (*GAPDH*) de acordo com a fórmula:

$$\text{Razão de expressão}_{(\text{normalizada})} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta C_t_{\text{alvo}}(\text{testado-referência})}}{E_{\text{endo}}^{\Delta C_t_{\text{endo}}(\text{testado-referência})}},$$

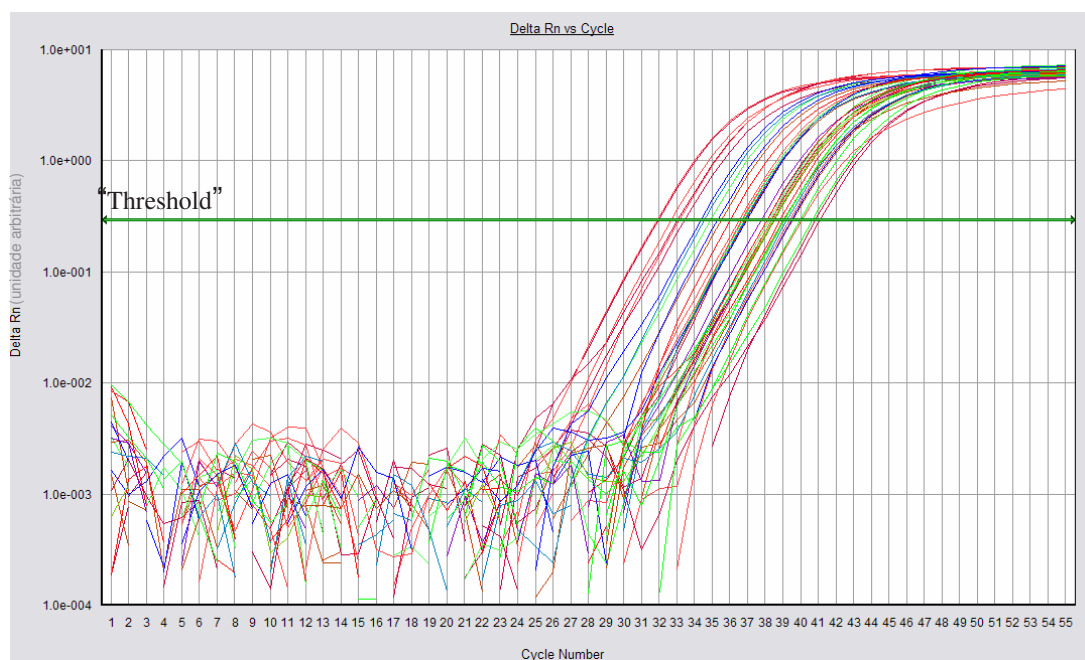
onde: E = eficiência média da PCR para cada par de oligonucleotídeos;  $C_t$  = ciclo em que cada curva de amplificação passa pelo “threshold”;  $\Delta C_t$  = diferença entre  $C_t$  do grupo testado e  $C_t$  do grupo referência.



**Figura 4.** Exemplo de curva de regressão linear para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR. Os pontos incluídos entre os limites superior e inferior da janela de linearidade foram utilizados nos cálculos da eficiência e da correlação da curva.

Para mensurar as diferenças significativas foi utilizado o teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (“Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test”) utilizando o “Relative Expression Software Tool” (REST; PFAFFL et al., 2002). A hipótese nula ( $H_0$ ) foi a de ausência de diferenças entre os grupos, enquanto que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas caso a probabilidade da hipótese alternativa [ $P(H_1)$ ] fosse inferior a 0,05.

Os resultados estão apresentados em razões de expressão não normalizados para o *GAPDH* nos blastocistos. Para os demais genes estão apresentadas as razões de expressão normalizadas em todos os tecidos.



**Figura 5.** Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de “threshold” (definido como o ponto médio da janela de linearidade). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de “threshold” corresponde ao ciclo do “threshold” (Ct).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção de embriões

Para padronização da produção de embriões pelas diferentes técnicas foram realizadas 34 sessões de micromanipulação e diversas rotinas de fertilização *in vitro* e ativação partenogenética. Os resultados da produção de embriões estão descritos abaixo, nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Quantidade de oócitos utilizada, número e porcentagem de blastocistos produzidos pelas técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), ativação partenogenética (Parteno) e transferência nuclear (TN) em bovinos.

Grupo	Número oócitos	Número blast.	% Blast.± DP
FIV	464*	116	25,00 ± 7,67
Parteno	938**	370	39,45 ± 4,76
TN-G <sub>0</sub>	549***	113	20,58 ± 13,84
TN-G <sub>1</sub>	696***	242	34,77 ± 10,47

Blast = blastocisto; DP = desvio padrão; \* número de COCs; \*\* oócitos maduros (após seleção do 1.CP); \*\*\* oócitos reconstituídos (enucleados, eletrofundidos e ativados).

**Tabela 3.** Comparação da produção de embriões clonados utilizando células doadoras de núcleo submetidas (G<sub>0</sub>) ou não (G<sub>1</sub>) à privação de soro.

G	SM	OT	ER	EE	%E (DP)	Blt	%Blt (DP)	B/SM	P/TE (%P)
G <sub>0</sub>	20	2615	1631	549	33,66 <sup>a</sup> (13,70)	113	20,58 <sup>a</sup> (13,84)	5,65	0/25 (0%)
G <sub>1</sub>	19	2715	1737	696	40,07 <sup>b</sup> (11,95)	242	34,77 <sup>b</sup> (10,47)	12,74	4/11 (36,4%)

<sup>a,b</sup> médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (P<0,05). G=grupo; SM=sessões de micromanipulação; OT=número total de oócitos utilizado (após seleção do 1.CP); ER=estruturas reconstituídas (submetidas à eletrofusão); EE=estruturas eletrofundidas; %E=taxa de eletrofusão; DP=desvio padrão; Blt=número de blastocistos; %Blt=taxa de produção de blastocistos;

B/SM=média de blastocistos produzidos por sessão de micromanipulação; P/TE=prenheses de 30 dias/número de transferências; %P=taxa de prenhez.

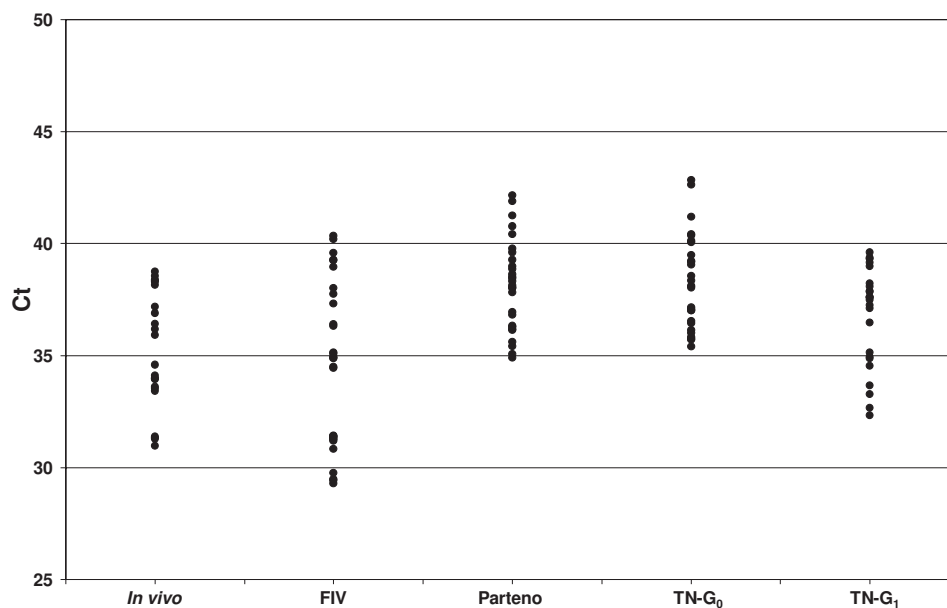
## 5.2. Expressão das DNA metiltransferases em blastocistos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*

As eficiências médias e os desvios padrões calculados, a correlação ( $R^2$ ) média e os valores do “threshold” apresentados na Tabela 4 foram considerados para realização dos cálculos no REST.

**Tabela 4.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão, correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em blastocistos bovinos após amplificação linear do RNA mensageiro.

Gene	Eficiência $\pm$ DP	Correlação ( $R^2$ )	“Threshold”
<i>GAPDH</i>	1,97 $\pm$ 0,07	0,994	0,210
<i>DNMT1</i>	1,93 $\pm$ 0,07	0,999	0,175
<i>DNMT3A</i>	1,93 $\pm$ 0,04	1,000	0,295
<i>DNMT3B</i>	1,77 $\pm$ 0,05	0,999	0,125

Os valores médios dos ciclos do “threshold” (Ct) para o *GAPDH* nos grupos foram 35,18 $\pm$ 2,61 para o grupo *in vivo*; 34,51 $\pm$ 3,63 para o grupo FIV; 38,16 $\pm$ 2,03 para o grupo parteno; 38,29 $\pm$ 2,12 para o grupo TN-G<sub>0</sub> e 36,71 $\pm$ 2,23 para o grupo TN-G<sub>1</sub>. A distribuição das amostras dentro dos grupos está apresentada na Figura 6.



**Figura 6.** Distribuição dos valores de Ct para *GAPDH* em blastocistos bovinos nos grupos *in vivo*, FIV, Parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Cada ponto representa um único embrião.

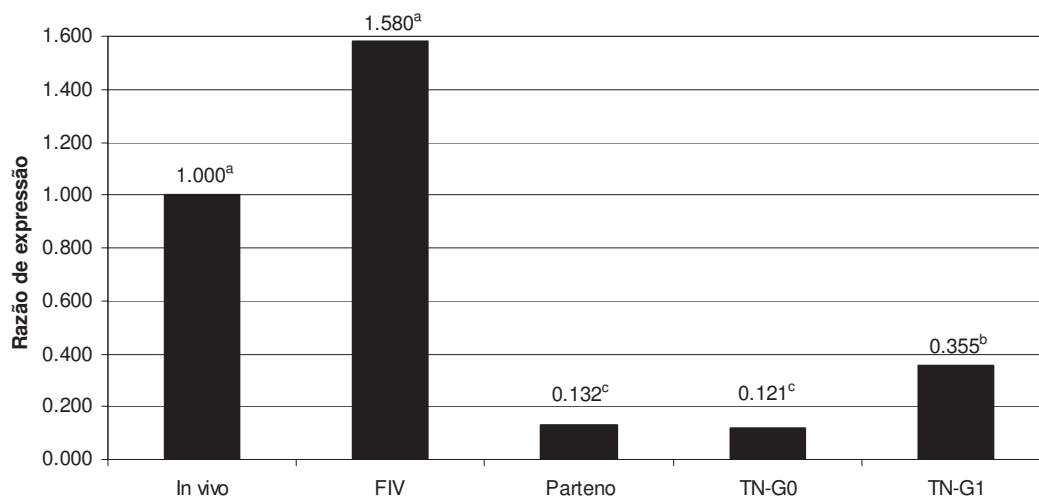
As razões de expressão calculadas para o *GAPDH* revelaram decréscimo na freqüência dos transcritos deste gene nos grupos parteno ( $P < 0,001$ ), TN-G<sub>0</sub> ( $P < 0,001$ ) e TN-G<sub>1</sub> ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos grupos *in vivo* (0,132, 0,121 e 0,355, respectivamente) e FIV (0,084, 0,077 e 0,224, respectivamente); e também aumento desta freqüência ( $P < 0,05$ ) no grupo TN-G<sub>1</sub> em comparação aos grupos parteno (2,686) e TN-G<sub>0</sub> (2,924), como apresentado na Tabela 5 e Figura 7.

Com relação às razões de expressão das DNA metiltransferases, não foi possível detectar transcritos de *DNMT1* no grupo TN-G<sub>0</sub>. Foi observado decréscimo na freqüência relativa ( $P < 0,05$ ) da *DNMT3B* nos grupos TN-G<sub>0</sub> (0,303) e TN-G<sub>1</sub> (0,142) quando comparados ao grupo partenogenético (Tabela 6 e Figura 8).

**Tabela 5.** Razão de expressão para o *GAPDH* entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Múltiplas comparações entre os grupos.

Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)			
	<i>In vivo</i>	FIV	Parteno	TN-G <sub>0</sub>
FIV	1,580 (0,07-37,31)			
Parteno	0,132** (0,1-1,26)	0,084** (0,01-1,86)		
TN-G <sub>0</sub>	0,121** (0,01-1,32)	0,077** (0,01-1,66)	0,919 (0,11-6,41)	
TN-G <sub>1</sub>	0,355* (0,02-3,06)	0,224* (0,01-4,39)	2,686* (0,34-21,78)	2,924* (0,32-25,56)

\* P<0,05; \*\*P<0,001

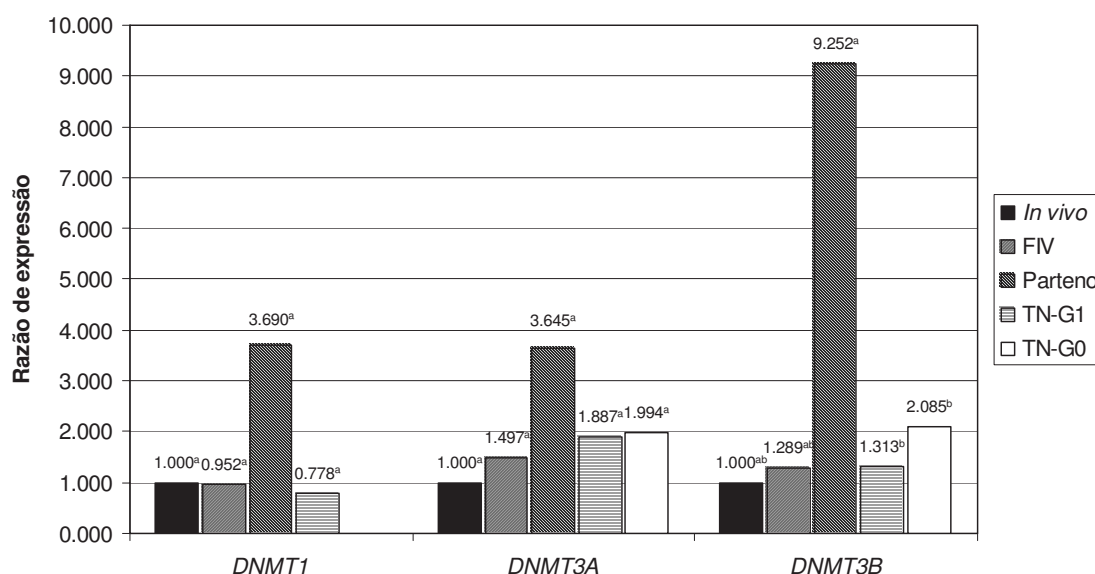


**Figura 7.** Razão de expressão para o *GAPDH* entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si (P<0,05). Grupo referência=*In vivo*.

**Tabela 6.** Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre blastocistos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno, TN-G<sub>0</sub> e TN-G<sub>1</sub>. Múltiplas comparações entre os grupos.

	Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)			
		<i>In vivo</i>	FIV	Parteno	TN-G <sub>0</sub>
DNMT1	FIV	0,952 (0,11-8,18)			
	Parteno	3,690 (0,72-21,18)	3,878 (0,94-21,74)		
	TN-G <sub>1</sub>	0,778 (0,12-4,06)	0,818 (0,18-3,87)	0,211 (0,08-0,43)	
DNMT3A	FIV	1,497 (0,11-27,25)			
	Parteno	3,645 (0,56-19,43)	2,435 (0,23-23,90)		
	TN-G <sub>0</sub>	1,994 (0,34-9,62)	1,332 (0,13-11,78)	0,547 (0,21-1,41)	
	TN-G <sub>1</sub>	1,887 (0,22-15,13)	1,260 (0,08-14,20)	0,518 (0,13-2,18)	0,946 (0,26-3,79)
DNMT3B	FIV	1,289 (0,12-14,85)			
	Parteno	9,252 (1,58-86,54)	7,179 (1,26-41,59)		
	TN-G <sub>0</sub>	2,085 (0,69-32,90)	2,176 (0,41-8,97)	0,303* (0,17-0,64)	
	TN-G <sub>1</sub>	1,313 (0,19-12,51)	1,019 (0,14-7,16)	0,142* (0,04-0,41)	0,468 (0,21-1,23)

\* P<0,05



**Figura 8.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases em blastocistos bovinos nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*.

### 5.3. Expressão das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide de fetos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*

As eficiências médias e os desvios padrões calculados, a correlação ( $R^2$ ) média e os valores do “threshold” apresentados na Tabela 7 foram considerados para realização dos cálculos no REST.

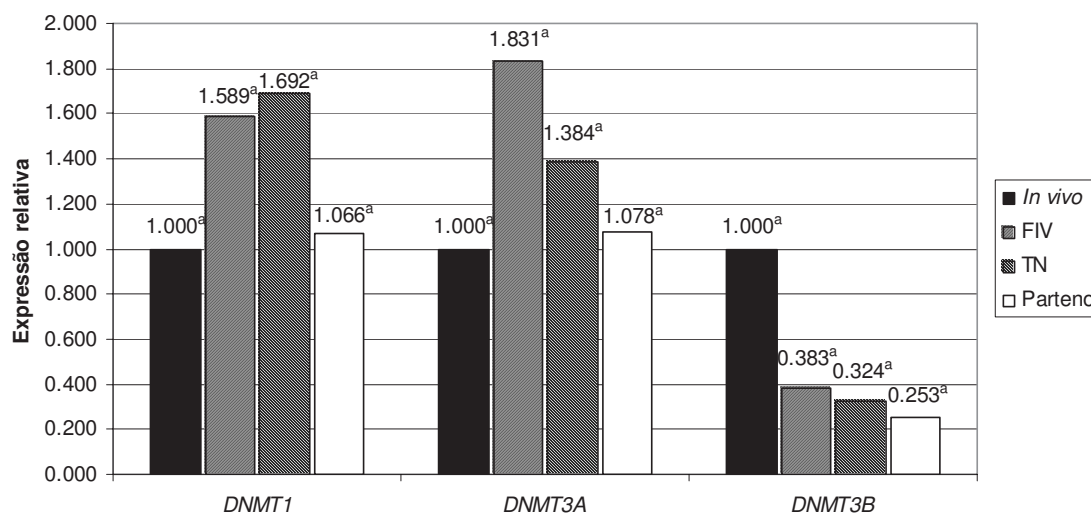
**Tabela 7.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão, correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide de fetos bovinos.

Gene	Eficiência $\pm$ DP	Correlação ( $R^2$ )	“Threshold”
<i>GAPDH</i>	1,94 $\pm$ 0,07	0,996	0,210
<i>DNMT1</i>	2,00 $\pm$ 0,09	0,997	0,155
<i>DNMT3A</i>	2,00 $\pm$ 0,05	0,999	0,170
<i>DNMT3B</i>	1,87 $\pm$ 0,06	0,999	0,105

Não foram observadas diferenças proporcionais na expressão das DNA metiltransferases em membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre o 33º e 36º dia de gestação, entre os grupos produzidos *in vivo*, fertilizados *in vitro*, partenogênicos ou clonados por transferência nuclear de célula somática (Tabela 8 e Figura 9).

**Tabela 8.** Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre as membranas cório-alantóide dos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.

	Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)		
		<i>In vivo</i>	FIV	TN
DNMT1	FIV	1,589 (0,29-4,83)		
	TN	1,692 (0,30-5,02)	1,065 (0,72-1,70)	
	Parteno	1,066 (0,17-4,04)	0,671 (0,37-1,05)	0,630 (0,36-1,19)
DNMT3A	FIV	1,831 (0,60-6,58)		
	TN	1,384 (0,37-3,41)	0,756 (0,30-2,34)	
	Parteno	1,078 (0,23-4,85)	0,588 (0,18-1,51)	0,779 (0,29-2,40)
DNMT3B	FIV	0,383 (0,08-2,24)		
	TN	0,324 (0,02-4,22)	0,847 (0,09-10,18)	
	Parteno	0,253 (0,01-2,65)	0,661 (0,15-1,78)	0,781 (0,07-13,75)



**Figura 9.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases entre membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*.

#### 5.4. Expressão dos genes “imprinted” em membranas cório-alantóide de fetos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*

As eficiências médias e os desvios padrões calculados, a correlação ( $R^2$ ) média e os valores do “threshold” apresentados na Tabela 9 foram considerados para realização dos cálculos no REST. Todas as amostras apresentaram temperaturas de dissociação muito próximas, confirmando a especificidade do ensaio (Tabela 9).

**Tabela 9.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão (DP), correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa dos genes “imprinted” em membranas cório-alantóide de fetos bovinos; e temperaturas de dissociação (T<sub>diss</sub>)  $\pm$  DP.

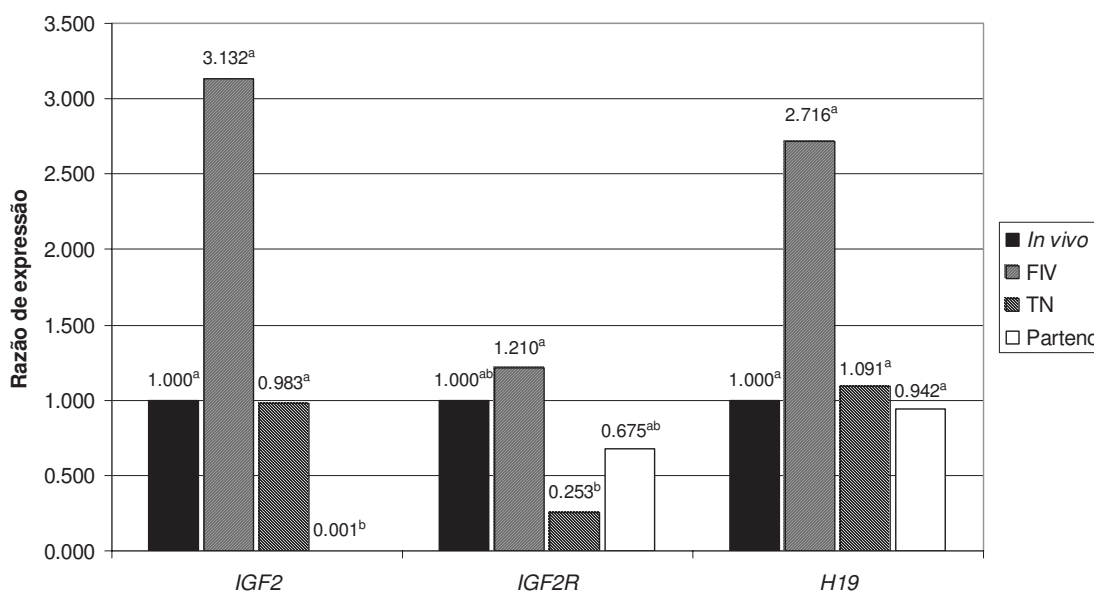
<b>Gene</b>	<b>Eficiência <math>\pm</math> DP</b>	<b>Correlação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>“Threshold”</b>	<b>T<sub>diss</sub> <math>\pm</math> DP (°C)</b>
<i>GAPDH</i>	1,84 $\pm$ 0,05	0,999	0,185	81,55 $\pm$ 0,19
<i>IGF2</i>	1,85 $\pm$ 0,05	0,999	0,160	87,47 $\pm$ 0,21
<i>IGF2R</i>	1,69 $\pm$ 0,04	0,999	0,135	87,05 $\pm$ 0,24
<i>H19</i>	1,98 $\pm$ 0,09	0,999	0,125	79,68 $\pm$ 0,27

As análises das diferenças proporcionais dos transcritos dos genes “imprinted” em membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre o 33<sup>o</sup> e 36<sup>o</sup> dia de gestação, entre os grupos produzidos *in vivo*, FIV, parteno ou TN revelou decréscimo ( $P < 0,001$ ) na frequência do *IGF2* nas amostras partenogenéticas quando comparadas aos grupos *in vivo* FIV ou TN (0,001; 0,001 e 0,001, respectivamente). Também permitiu observar decréscimo ( $P < 0,001$ ) na frequência dos transcritos de *IGF2R* nas amostras TN (0,253) quando comparadas ao grupo *in vivo* (Tabela 10 e Figura 10).

**Tabela 10.** Razão de expressão normalizada dos genes “imprinted” entre membranas cório-alantóide dos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.

	Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)		
		<i>In vivo</i>	FIV	TN
IGF2	FIV	3,132 (0,92-10,17)		
	TN	0,983 (0,27-3,15)	0,314 (0,06-1,40)	
	Parteno	0,001* (0,001-0,004)	0,001* (0,00-0,001)	0,001* (0,00-0,006)
IGF2R	FIV	1,210 (0,24-6,18)		
	TN	0,253* (0,07-0,76)	0,209 (0,05-0,87)	
	Parteno	0,675 (0,16-3,10)	0,558 (0,10-2,20)	2,665 (0,86-8,71)
H19	FIV	2,716 (0,67-9,66)		
	TN	1,091 (0,18-5,31)	0,402 (0,06-1,97)	
	Parteno	0,942 (0,20-4,57)	0,347 (0,07-1,42)	0,863 (0,14-4,27)

\*P<0,05



**Figura 10.** Razão de expressão dos genes "imprinted" entre membranas cório-alantóide de fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*.

### 5.5. Expressão das DNA metiltransferases em fetos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*

Eficiências médias e desvios padrões calculados, correlação ( $R^2$ ) média e valores do "threshold" apresentados na Tabela 11 foram considerados para realização dos cálculos no REST.

**Tabela 11.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão, correlação e "threshold" utilizados na quantificação relativa das DNA metiltransferases em fetos bovinos.

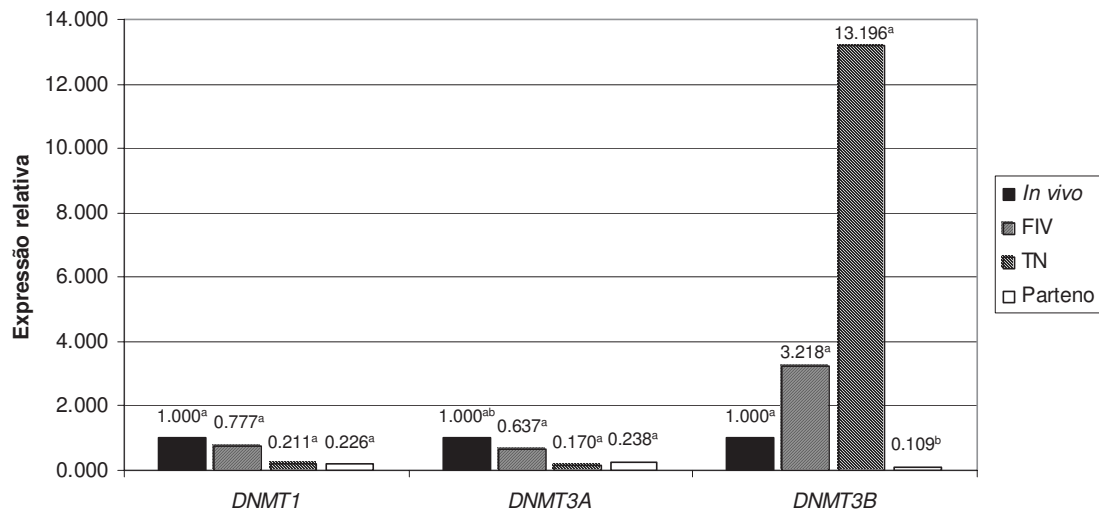
Gene	Eficiência $\pm$ DP	Correlação ( $R^2$ )	"Threshold"
<i>GAPDH</i>	2,00 $\pm$ 0,11	0,996	0,160
<i>DNMT1</i>	2,00 $\pm$ 0,10	0,999	0,090
<i>DNMT3A</i>	2,00 $\pm$ 0,08	0,998	0,110
<i>DNMT3B</i>	1,85 $\pm$ 0,05	0,999	0,105

Foram observadas diferenças proporcionais ( $P < 0,05$ ) na expressão da DNA metiltransferase 3B em fetos bovinos recuperados entre o 33º e 36º dia de gestação, entre o grupo partenogênético (0,034 e 0,008) e os grupos fertilizado *in vitro* e clonado por transferência nuclear de célula somática, respectivamente (Tabela 12 e Figura 11).

**Tabela 12.** Razão de expressão normalizada das DNA metiltransferases entre as membranas cório-alantóide dos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN.

Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)			
	<i>In vivo</i>	FIV	TN	
DNMT1	FIV	0,777 (0,05-16,50)		
	TN	0,211 (0,002-20,43)	0,272 (0,002-33,60)	
	Parteno	0,226 (0,02-0,94)	0,291 (0,02-1,84)	1,071 (0,03-31,20)
DNMT3A	FIV	0,637 (0,06-16,82)		
	TN	0,170 (0,001-23,70)	0,267 (0,001-157,20)	
	Parteno	0,238 (0,06-0,67)	0,373 (0,01-4,80)	1,401 (0,02-83,24)
DNMT3B	FIV	3,218 (0,26-38,90)		
	TN	13,196 (2,61-55,10)	4,101 (0,80-20,24)	
	Parteno	0,109 (0,02-0,42)	0,034* (0,007-0,18)	0,008* (0,006-0,01)

\* $P < 0,05$



**Figura 11.** Razão de expressão para as DNA metiltransferases entre fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*.

### 5.6. Expressão dos genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*

As eficiências médias e desvios padrões calculados, correlação ( $R^2$ ) média e valores do “threshold” apresentados na Tabela 13 foram considerados para realização dos cálculos no REST. Todas as amostras apresentaram temperaturas de dissociação muito próximas, confirmando a especificidade do ensaio (Tabela 13).

**Tabela 13.** Valores de eficiência  $\pm$  desvio padrão (DP), correlação e “threshold” utilizados na quantificação relativa dos genes “imprinted” em fetos bovinos; e temperaturas de dissociação (T<sub>diss</sub>)  $\pm$  DP.

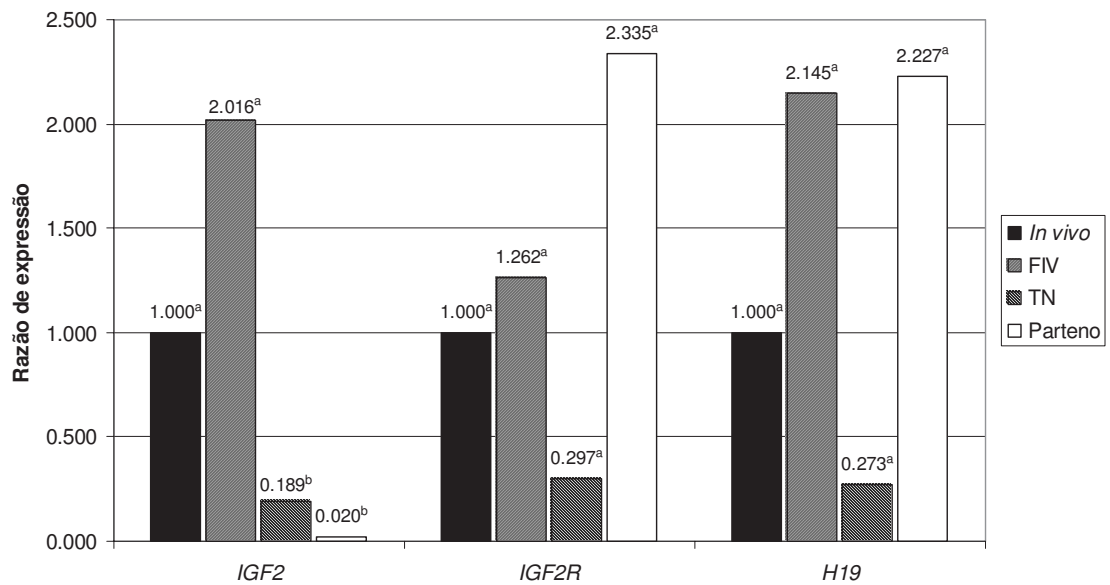
<b>Gene</b>	<b>Eficiência <math>\pm</math> DP</b>	<b>Correlação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>“Threshold”</b>	<b>T<sub>diss</sub> <math>\pm</math> DP (°C)</b>
<i>GAPDH</i>	1,90 $\pm$ 0,08	0,998	0,105	81,86 $\pm$ 0,31
<i>IGF2</i>	1,88 $\pm$ 0,07	0,998	0,079	87,66 $\pm$ 0,33
<i>IGF2R</i>	1,69 $\pm$ 0,08	0,999	0,090	87,58 $\pm$ 0,42
<i>H19</i>	1,96 $\pm$ 0,08	0,999	0,198	80,01 $\pm$ 0,30

As análises das diferenças proporcionais dos transcritos dos genes “imprinted” em fetos bovinos recuperados entre o 33<sup>o</sup> e 36<sup>o</sup> dia de gestação, mostraram diferenças para o gene *IGF2*. Houve decréscimo ( $P < 0,05$ ) de seus transcritos nos grupos TN e Parteno em comparação ao grupo *in vivo* (0,189 e 0,020, respectivamente) e FIV (0,094 e 0,010, respectivamente; Tabela 14 e Figura 12).

**Tabela 14.** Razão de expressão normalizada dos genes “imprinted” entre fetos bovinos dos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Múltiplas comparações entre os grupos.

	Grupos testados	Grupos referência (Erro padrão min – Erro padrão max)		
		<i>In vivo</i>	FIV	TN
IGF2	FIV	2,016 (0,34-12,07)		
	TN	0,189 (0,003-14,04)	0,094* (0,001-7,31)	
	Parteno	0,020 (0,00-1,52)	0,010* (0,00-0,75)	0,108 (0,00-97,79)
IGF2R	FIV	1,262 (0,07-20,30)		
	TN	0,297 (0,003-23,56)	0,235 (0,001-42,53)	
	Parteno	2,335 (0,08-70,28)	1,850 (0,02-145,91)	7,869 (0,02-2667,23)
H19	FIV	2,145 (0,40-15,97)		
	TN	0,273 (0,003-23,53)	0,127 (0,001-9,94)	
	Parteno	2,227 (0,03-157,36)	1,038 (0,01-62,39)	8,169 (0,009-6284,54)

\*P<0,05



**Figura 12.** Razão de expressão dos genes “imprinted” entre fetos bovinos recuperados entre os dias 33 e 36 de gestação, nos grupos *in vivo*, FIV, parteno e TN. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ). Grupo referência=*In vivo*.

## 6. DISCUSSÃO

Embriões, fetos, placentas e animais clonados possuem alterações morfológicas e padrões errôneos de expressão de genes importantes para o desenvolvimento. Acredita-se que uma das possíveis razões para a baixa eficiência da clonagem por transferência nuclear reside na incompleta ou deficiente na reprogramação epigenética da célula doadora de núcleo.

Os primeiros estudos (WRENZYCKI et al., 2001; WRENZYCKI e NIEMANN, 2003) acerca das DNA metiltransferases no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos relataram menor frequência de transcritos da *DNMT1* em blastocistos produzidos por TN quando comparados àqueles oriundos de fertilização *in vitro*. A comparação entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* também revelou diferenças, com maior frequência da *DNMT1* nos últimos. Estes mesmos autores descreveram maior frequência da *DNMT3A* em embriões clonados relativamente aos produzidos *in vivo*, fertilizados *in vitro* ou partenogenéticos, sem observar, no entanto, diferença alguma quanto à *DNMT3B*.

Um estudo mais recente (BEYHAN et al., 2007) encontrou resultados contrastantes, observando decréscimo na expressão relativa da *DNMT3A* em embriões produzidos por TNCS relativamente a controles produzidos por FIV. Além disso, foram encontrados diferentes níveis de expressão da *DNMT3A* entre blastocistos clonados produzidos a partir de diferentes células doadoras de núcleo.

SAGIRKAYA et al. (2006) demonstraram variações nos níveis de expressão relativa da *DNMT3A* em função do meio de cultivo empregado na PIV de embriões. Utilizando amplificação global de cDNA e técnicas de hibridização, LONG et al. (2006) observaram maior frequência de transcritos de *DNMT3A* em embriões bovinos produzidos por FIV em comparação àqueles produzidos *in vivo* ou por TNCS, bem como elevada expressão relativa de *DNMT3B* em blastocistos

FIV comparativamente às testemunhas produzidas *in vivo*; e nenhuma diferenças quanto aos níveis da *DNMT1*.

Nos nossos resultados não observamos diferenças significativas nas comparações entre embriões clonados e fertilizados quanto à expressão das DNA metiltransferases. Diferenças significativas foram observadas apenas entre embriões clonados e partenogênicos quanto à expressão da *DNMT3B*, maior no último grupo. Maior expressão relativa das DNA metiltransferases 3a e 1 (estatisticamente não significativa) também foi observada nos embriões partenogênicos quando comparados aos demais grupos. Comparando-se os grupos *in vivo* x FIV e TN-G<sub>1</sub> x TN-G<sub>0</sub> padrões muito semelhantes de expressão foram observados, exceto pela ausência de transcritos da *DNMT1* no grupo G<sub>0</sub>. Ademais, as razões de expressão do *GAPDH* apresentaram marcantes diferenças entre os grupos, especialmente para as comparações envolvendo os grupos fertilizados (*in vivo* e *in vitro*) versus os ativados (partenogênicos ou clones), com intensa supressão nos últimos. Uma vez que os genes de expressão constitutiva correlacionam-se à quantidade total de poli(A) RNAm, isso sugere que embora as quantidades relativas assemelhem-se, ocorrem diferenças nas quantidades totais dos transcritos destes genes.

Alguns dos efeitos resultantes das alterações na expressão das metiltransferases são conhecidos. A perda de metilação do DNA não afeta a proliferação e a viabilidade de células tronco-embrionárias em cultivo (TSUMURA et al., 2006), e os efeitos decorrentes das alterações nos padrões de metilação só se tornam aparentes durante ou após a gastrulação quando estas células começam a se diferenciar (LEI et al., 1996). Em concordância com esses resultados, células-tronco deficientes em *DNMT1* morrem após indução da diferenciação e aquelas com deficiência de *DNMT3A* e *3B* são incapazes de diferenciar-se (CHEN et al., 2003; JACKSON et al., 2004) A superexpressão de *DNMT3A* e *DNMT3B* causa metilação “de novo” em células de mamíferos (CHEN et al., 2003); enquanto que falhas ou ausência de expressão da DNA metiltransferases da família 3 resultam em mortalidade embrionária, com múltiplas

alterações de desenvolvimento (CHEN e LI, 2004). A DNMT3A aparenta ser uma metiltransferase de ação global, enquanto que a DNMT3B é especializada na metilação de partes específicas do genoma: seqüências repetitivas pericentroméricas e ilhas CpG no cromossomo X inativo (SIEDLECKI e ZIELENKIEWICZ, 2006). A inativação da DNMT3B causa desmetilação apenas em regiões específicas do cromossomo X inativado, instabilidade cromossômica e imortalização espontânea (BESTOR, 2000; DODGE et al., 2005).

A inativação da *Dnmt1* em células murinas resulta em severa desmetilação e morte celular. EDEN et al. (2003) demonstraram que a hipometilação do genoma em camundongos “knockout” para *Dnmt1* aumenta a instabilidade cromossomal e predispõe à ocorrência de rearranjos cromossômicos. Tais resultados sugerem que a metilação do DNA, além de ser fundamental para garantir o funcionamento e a integridade da célula diferenciada normal, é crítica na diferenciação celular.

Apesar das diferenças nas técnicas utilizadas para avaliação da expressão gênica, nas condições de cultivo embrionário, nas fontes de células doadoras de núcleo ou nos protocolos utilizados para produção de embriões por TN, níveis alterados de transcritos das *DNMTs* têm sido sistematicamente encontrados. Entretanto, não se observa um padrão constante na expressão das metiltransferases entre os grupos e entre os diversos ensaios para quantificação, tampouco são esclarecidos os mecanismos que controlam a expressão das *DNMTs*.

Destarte, os resultados encontrados nos permitem algumas suposições: a ausência de expressão da *DNMT1* nos grupos clonados, notoriamente naquele derivado de células submetidas à privação de soro, nos leva a acreditar que embriões clonados obtidos a partir deste protocolo são menos viáveis do que aqueles oriundos de células em G<sub>1</sub>. A ausência de *DNMT1* compromete a metilação do DNA a cada ciclo celular e torna os embriões inaptos a manterem as marcações epigenéticas após cada mitose. Embora o sucesso da clonagem a partir de células sincronizadas pela privação de soro tenha sido relatado por

alguns grupos de pesquisa, como aqueles que geraram a ovelha “Dolly” (WILMUT et al., 1997) ou a bezerra “Penta” (YAMAZAKI et al., 2005), existe uma tendência entre os pesquisadores que trabalham na área de clonagem a abolir o uso de da privação do soro no cultivo celular (CIBELLI et al., 1998; WELLS et al., 1999). Nossos resultados de produção de embriões clonados e estabelecimento de gestações a partir de células doadoras de núcleo submetidas à privação de soro foram claramente inferiores àqueles obtido com células cultivadas na presença do soro, com menores taxas de eletrofusão, desenvolvimento até o estágio de blastocisto e estabelecimento de prenhez.

A privação de soro é comumente utilizada como método de sincronização do ciclo celular, no entanto, o cultivo na ausência de soro reduz a viabilidade celular e aumenta a ocorrência de fragmentação de DNA (GIBBONS et al., 2002). Além disso, já se demonstrou que tanto o cultivo até a confluência como a privação de soro por 1 a 5 dias são igualmente eficazes na sincronização do ciclo celular em fibroblastos bovinos (HAYES et al., 2005).

É bastante provável que as diferenças observadas nas freqüências das DNA metiltransferases em fases iniciais de desenvolvimento reflitam-se mais adiante, no desenvolvimento intrauterino, afetando a diferenciação celular e a expressão de genes importantes, como os “imprinted”. Isto pode explicar a dificuldade encontrada para o estabelecimento de gestações a partir de embriões clonados utilizando células doadoras de núcleo cultivadas sob privação de soro fetal.

Cerca de 112 genes ou componetes funcionais (RNAs não-codificadores) são conhecidamente “imprinted” em humanos e camundongos, alguns dos quais são conservados nas espécies ruminantes (REIK e WALTER, 2001; YOUNG et al., 2003; MORISON et al., 2005). Dezenas deles estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento fetal, e além disso, demonstram ser particularmente importantes no desenvolvimento placentário e no transporte de nutrientes, especialmente aminoácidos e glicose, entre placenta e feto (TILGHMAN, 1999; CONSTÂNCIA et al., 2002; MORISON et al., 2005).

O conhecimento dos mecanismos através dos quais a metilação do DNA regula o “imprinting” genômico vem crescendo nos últimos anos. Sabidamente a manutenção dos padrões diferenciais de metilação nas células é crucial para a expressão monoalélica dos genes “imprinted”. A metilação da DMR nos loci “imprinted” pode causar o silenciamento direto de determinados genes, como no caso do *H19*; e, indiretamente, ativar outros genes por meio de mecanismos secundários, como o bloqueio da ligação do fator CCCTC aos isoladores, no caso do *IGF2*; ou reprimindo a produção de transcritos antisensos (RNAs não-codificadores), no caso do *IGF2R* (BELL e FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000; DELAVAL e FEIL, 2004).

Dessa forma, a perda da metilação do DNA, como ocorre em embriões deficientes em *DNMT1*, faz com que o *IGF2* e *IGF2R*, normalmente expressos a partir dos alelos paterno e materno, respectivamente, tornem-se silenciosos; enquanto que o gene *H19*, normalmente expresso pelo alelo materno passe a ter expressão bialélica (LI et al., 1993).

Além da metilação do DNA, outros eventos epigenéticos como a acetilação e a metilação das proteínas histonas, e diversos fatores capazes de interagir com a cromatina desempenham papéis na manutenção do “imprinting” (LI, 2002).

O gene *IGF2*, expresso apenas a partir do alelo paterno, codifica um fator de crescimento envolvido no crescimento fetal e placentário. Em humanos, o gene *IGF2* está envolvido na síndrome Russell-Silver (SRS), caracterizada pela perda de metilação na ICR do *IGF2-H19*, decréscimo na expressão do *IGF2* e expressão bialélica de *H19*, com resultante retardo no crescimento intrauterino e pós-natal (BLIEK et al., 2006). De maneira contrária, a superexpressão do *IGF2* em humanos, causa uma síndrome conhecida como síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), caracterizada pela metilação bialélica da ICR *IGF2-H19*, perda da expressão do *H19* e expressão bialélica do *IGF2*. Os indivíduos acometidos pela SBW apresentam, entre outros sintomas, crescimento exagerado pré e pós-natal, organomegalia e hipoglicemia neonatal (DELAVAL et al., 2006). De modo análogo, em murinos, níveis aumentados na expressão do *Igf2* foram

relatados como causa de crescimento fetal exacerbado (EGGENSCHWILLER et al., 1997), enquanto decréscimos na sua expressão foram associados a déficit de crescimento (DeCHIARA et al., 1990). De maneira interessante, a freqüência da SBW é claramente superior nos indivíduos do sexo feminino (WEKSBERG et al., 2002); e células-tronco embrionárias de sexo feminino (com dois cromossomos X ativos) apresentam perda de metilação na ICR *IGF2-H19* e em outras regiões cromossômicas (ZVETKOVA et al., 2005), sugerindo que falhas epigenéticas nas ICRs podem estar ligadas à presença de dois cromossomos X ou à sua inativação.

Nas síndromes de Beckwith-Wiedemann e Russell-Silver, há manutenção inapropriada dos padrões de metilação nas ICRs. Similarmente, falhas na manutenção dos padrões de metilação das regiões de controle dos genes “imprinted” ocorrem quando células embrionárias indiferenciadas ou embriões são submetidos a condições de cultivo *in vitro* e/ou micromanipulados (KHOSLA et al., 2001). Embora os mecanismos que levam à essas alterações ainda sejam desconhecidos, as técnicas de reprodução assistida, em especial a ICSI em humanos, provocam aumento na freqüência da SBW e SRS (ARNAUD e FEIL, 2005). De modo análogo, nos animais, o emprego da FIV e da clonagem tem gerado sistematicamente animais com fenótipos e sintomas que se assemelham à SBW ou à SRS, como a síndrome da cria gigante ou o retardo no desenvolvimento comumente observado nos animais oriundos das biotécnicas reprodutivas (DeBAUN et al., 2003; MANN et al., 2003; YOUNG et al., 2003). Além disso, há relatos de diferenças sexo-específicas nos resultados das biotécnicas reprodutivas como FIV e clonagem em bovinos, em que o número de nascimentos é superior nos machos, dando suporte à hipótese que possíveis falhas na metilação e na inativação do cromossomo X figurem entre as prováveis causas da baixa eficiência dessas biotécnicas nas fêmeas.

Em nosso estudo observamos, nas membranas cório-alantóide, padrões similares de expressão de IGF2 entre os grupos produzidos *in vivo* e TN, e maior expressão no grupo fertilizado *in vitro* (não significativo). Nos tecidos fetais, foi

encontrada elevada expressão de *IGF2* no grupo fertilizado *in vitro* e decréscimo significativo na frequência destes transcritos no grupo TN. Como esperado, ausência quase completa de expressão do *IGF2* foi encontrada tanto nas membranas cório-alantóide como nos fetos derivados do tratamento de ativação partenogenética, corroborando sua condição de “imprinted” materno.

Expressão anormal de *IGF2* foi relatada anteriormente em animais clonados acometidos de morte neonatal, com elevada expressão em tecido cardíaco e hepático de bezerros (LI et al., 2007) ou em tecidos renais de camundongos (HUMPHERYS et al., 2002). Expressão anormal de *Igf2* também foi observada em fetos e placenta de camundongos clonados (OGAWA et al., 2003) ou em placentas de bezerros clonados a termo (YAMAZAKI, 2006), com decréscimo nos dois casos.

O gene *H19*, situado na região flanqueadora do ICR e expresso pelo alelo materno, origina um RNA não-codificador de função pouco conhecida. No entanto, a conservação do gene *H19* entre humanos, murinos e ruminantes, e a sua expressão na placenta e em tecidos embrionários (GOSHEN et al., 1993, SASAKI et al., 1995; LEE et al., 2002; ZHANG et al., 2004) indicam que o RNA não-codificador do *H19* é funcional (HURST e SMITH, 1999). Embora pareça não exercer um papel crítico no desenvolvimento (JONES et al., 1998), alguns estudos indicam que o *H19* atua regulando a tradução e a função de outros genes, incluindo o *IGF2* (LI et al., 1998; RUNGE et al., 2000), e que sua superexpressão afeta a viabilidade pré-natal (BRUNKOW e TILGHMAN, 1991). Um importante passo na descoberta das funções exatas do *H19* foi dado por CAI e CULLEN (2007), que descobriram que o transcrito não-codificador do *H19* atua como um miRNA primário, capaz de originar um microRNA maduro conhecido como miR-675. Isto sugere que o papel biológico do *H19* inclui a formação de um miRNA que modula a tradução de RNAs específicos, ou que o miR-675 constitui um mecanismo para atenuação da função do *H19*.

Em nossos resultados, os transcritos do gene *H19* foram encontrados em níveis muito similares nas membranas cório-alantóide dos grupos *in vivo*, TN e

partenogenético; enquanto que no grupo FIV houve maior expressão deste gene (não significativo). No tecido fetal, houve elevada freqüência dos transcritos deste gene nos grupos FIV e parteno; contrapondo-se a um decréscimo no grupo TN (não significativo).

Na literatura, os resultados dos estudos acerca do *H19* apresentam grande variabilidade e são controversos. Elevada freqüência dos seus transcritos foram descritos em órgãos de clones bovinos com morte perinatal (YANG et al., 2005; LI et al., 2007), enquanto redução foi relatada em fetos, placentas (OGAWA et al., 2003) e fígados (HUMPHERYYS et al., 2001) de clones murinos. Ovinos clonados e desenvolvidos a termo não apresentam diferenças quanto à expressão de *H19* (YOUNG et al., 2003), enquanto que expressão bialélica deste foi relatada em bovinos clonados (ZHANG et al., 2004). Na placenta de clones há relatos desde ausência de anormalidades (INOUE et al., 2002) até ausência de expressão (HUMPHERYYS et al., 2001) em murinos; e de expressão diferencial entre clones e animais normais em bovinos (YAMAZAKI, 2006).

Em murinos, a expressão de *Igf2* e *H19* é negativamente correlacionada. (DELAVAL e FEIL, 2004). Em nossos resultados, bem como nos resultados de YAMAZAKI (2006), alta correlação positiva entre *IGF2* e *H19* foi observada em fetos e placentas. Esses resultados indicam fortemente que existem diferenças interespecíficas na regulação do “imprinting” genômico no locus *IGF2-H19*.

O gene *IGF2R*, “imprinted” paterno e expresso pelo alelo materno, também desempenha papel importante como um regulador negativo do crescimento fetal através do seqüestro para o interior de lisossomos e subsequente degradação de *IGF2* (LAU et al., 1994; LUDWIG et al., 1996; MURPHY e JIRTLE, 2003). Em ovelhas, embriões partenogenéticos expressam baixos níveis de *IGF2* e altos níveis de *IGF2R* e *H19*, e possuem crescimento retardado quando comparados aos controles (FEIL et al., 1998; HAGEMANN et al., 1998; YOUNG et al., 2003). De modo inverso, ausência na expressão do *IGF2R* em embriões ovinos submetidos a condições de cultivo *in vitro* está associada ao exacerbado crescimento fetal ou LOS (YOUNG et al., 2001). Assim, as condições de cultivo *in*

*vitro* e/ou micromanipulação parecem afetar severamente o “imprinting” do gene *IGF2R*.

LONG e CAI (2007), examinando fetos bovinos clonados e acometidos de morte perinatal encontraram padrões aberrantes de metilação na ICR do *IGF2R*, assim como YOUNG e colaboradores (2003) observaram perda de metilação na DMR do *IGF2R* em ovelhas clonadas. Relatos semelhantes em fetos murinos foram realizados por OGAWA et al. (2003). Expressão reduzida de *IGF2R* foi relatada em quantificações de tecido cardíaco, hepático e renal de bezerros clonados com morte perinatal (LI et al., 2007), contrastando com resultados descritos por YANG et al. (2005), em que não foram observadas alterações nos padrões de expressão do *IGF2R* em neonatos bovinos clonados. No entanto, embora hipometilação na DMR do *IGF2R* tenham sido freqüentemente relatadas, alterações na expressão de *IGF2R* na placenta de animais clonados com desenvolvimento a termo jamais foram encontradas (YAMAZAKI, 2006).

Os nossos resultados para o gene *IGF2R* revelaram decréscimo dos transcritos deste no grupo TN tanto em tecidos placentários quanto fetais (não significativo nos fetos); bem como níveis similares entre os grupos fertilizados *in vivo* e *in vitro* em ambos tecidos. No grupo partenogenético houve pequeno decréscimo na expressão placentária de *IGF2R* e elevada expressão relativa deste no tecido fetal (não significativo).

Uma vez que após a fertilização, as distintas marcações epigenéticas entre os alelos são mantidas ao longo do desenvolvimento, surge o questionamento sobre quando ocorrem as alterações epigenéticas relacionadas aos genes “imprinted”. Embora não se possa descartar uma possível origem nos gametas, diversas observações apontam que essas falhas freqüentemente ocorrem após a fertilização, como por exemplo, a presença de mosaicismo nos padrões de metilação de DNA ou o relato de gêmeos monozigóticos em que apenas um indivíduo apresenta falhas de “imprinting” (BAILEY et al., 1995).

A maioria das ICRs contém seqüências ricas em dinucleotídeos CpG, e as metilações diferenciais estabelecidas na linhagem germinativa são mantidas após

a fertilização e ao longo do desenvolvimento nas células somáticas. O mecanismo que garante a manutenção do “imprinting” genômico não é completamente entendido embora se saiba que a metilação do DNA e a conformação das proteínas histonas associadas desempenham papéis fundamentais (FUKS, 2005).

A DNMT3A é essencial no estabelecimento da metilação nas ICRs (KANEDA et al., 2004) nas células germinativas, assim como a expressão constitutiva da metiltransferase de manutenção (*DNMT1*) é crítica para a manutenção do “imprinting” genômico ao longo do desenvolvimento (JAENISCH e BIRD, 2003). Os níveis de expressão da *DNMT1* são também críticos, e sua superexpressão pode acarretar na metilação de ICRs de alelos normalmente desmetilados (BINISZKIEWICZ et al., 2002). Ainda, a associação das proteínas MBDs aos alelos metilados garante o recrutamento de complexos enzimáticos responsáveis pelas modificações das proteínas histonas ligadas aos diferentes padrões de metilação e atividade transcricional (FOURNIER et al., 2002).

Não resta dúvidas que a atividade das DNA metiltransferases, especialmente da DNMT1 e 3A, constitui um ponto crítico na manutenção das metilações e no controle dos genes “imprinted”. Em nossos resultados as alterações significativas observadas nos fetos e nas placentas oriundos de embriões produzidos por TN, como o decréscimo na expressão de *IGF2* fetal e *IGF2R* placentário, são indicativos de perda de metilação do DNA.

Entretanto, a frequência dos transcritos das DNA metiltransferases, e especialmente da *DNMT1*, não apresentaram alterações significativas entre os grupos, levantando a suspeita que, talvez não o nível de expressão das DNA metiltransferases, mas a sua atividade possa variar entre os grupos.

Há evidências crescentes de que algumas substâncias atuam como importantes cofatores enzimáticos na atividade catalítica das DNA metiltransferases ou em outros processos epigenéticos, e são capazes de alterar o “status” epigenético celular. A metilação do DNA catalizada pelas DNMTs utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como doador do grupamento metil. A SAM é sintetizada a partir da L-metionina pela metionina adenosiltransferase, em uma

reação dependente de ATP, colina e vitaminas do complexo B, como ácido fólico, B6 e B12 (WATERLAND e JIRTLE, 2004, WU et al., 2004). Dietas deficientes em ácido fólico e colina, não apenas resultam em hipometilação do DNA (DUTHIE et al. 2004), como alteram os níveis de expressão (de RNAm e proteínas) de diversos componentes da maquinaria de metilação de DNA, como as DNA metiltransferases e as proteínas MBDs (GHOSHAL et al., 2006). Assim como a metilação do DNA, as modificações covalentes nas proteínas histonas (ou “código das histonas”) também são dependentes de micronutrientes, como a biotina (HASSAM e ZEMPLINI, 2006).

Dessa forma, a metilação do DNA, as modificações das proteínas histonas, e, conseqüentemente, a estrutura da cromatina, os padrões de metilação do DNA e de expressão gênica podem ser afetados pela disponibilidade de aminoácidos e micronutrientes. No meio de cultivo utilizado na produção *in vitro* de embriões deste trabalho não houve adição de micronutrientes como vitaminas. É bastante provável que o SFB forneça alguns, ou todos estes micronutrientes, porém em quantidades desconhecidas e certamente variáveis em razão da variada origem dos lotes e dos métodos de processamento. Associado ao fato de que os níveis de alguns micronutrientes alteram a expressão dos componentes celulares envolvidos na metilação do DNA e podem causar alterações nas metilações do DNA, as diferenças relatadas entre os grupos de pesquisa acerca da expressão das DNA metiltransferases e as alterações de metilação do genoma observadas em animais produzidos por ARTs podem ter origem, em parte, na composição do meio de cultivo. Evidentemente, esta hipótese ainda necessita de comprovação experimental. As pesquisas que visam o estabelecimento de meios de cultivo definidos para a produção de embriões podem trazer novas perspectivas no entendimento destes processos.

Os resultados encontrados na quantificação relativa dos genes “imprinted”, indicativos de perda de metilação genômica, não foram acompanhados de alterações significativa nos transcritos das DNA metiltransferases. As possíveis razões desse fato incluem desde alterações na atividade catalítica das DNMTs

por fenômenos pós-traducionais, ou mecanismos envolvidos com proteínas associadas, como a DNMT3L ou as MBDs; até mesmo o envolvimento de outros mecanismos epigenéticos, em especial as modificações das proteínas histonas.

O entendimento pleno e a capacidade de controlar os processos epigenéticos envolvidos na produção *in vitro* de embriões e clonagem de bovinos tem o potencial de gerar enormes avanços no campo das biotécnicas reprodutivas, abrindo uma vasta área de estudos a ser explorada.

## 7. CONCLUSÕES

1) No processo de clonagem, o uso de células doadoras de núcleo submetidas ao cultivo com privação de soro fetal resulta em menores taxas de eletrofusão, produção de blastocisto e estabelecimento de prenhez.

2) Os ensaios para quantificação relativa da freqüência dos transcritos das DNA metiltransferases nos blastocistos não revelaram diferenças significativas entre os grupos, exceto pela ausência de transcritos da *DNMT1* nos blastocistos clonados a partir de fibroblastos bovinos submetidos ao cultivo na privação de soro fetal. As implicações desse achado incluem provável dificuldade em manter os padrões somáticos de metilação do genoma, alteração de expressão nos genes “imprinted” e alterações nos mecanismos de diferenciação celular. Isso explica, em parte, as menores taxas de gestação obtidas a partir destes embriões.

3) Alterações significativas nas freqüências relativas dos transcritos dos genes “imprinted” foram observadas em fetos e membranas cório-alantóide derivadas de transferência nuclear, dando suporte à hipótese que as falhas de expressão, especialmente aquelas ligadas aos genes “imprinted”, estão entre as causas da baixa eficiência da clonagem.

4) Embora ocorram variações nos dados, importantes e significativas alterações na freqüência dos transcritos das DNA metiltransferases não foram encontradas; no entanto, os resultados das quantificações relativas dos genes “imprinted” apresentam alterações sugestivas de perda de metilação, indicando provável alteração na atividade catalítica das DNA metiltransferases, nas suas proteínas associadas ou nas proteínas histonas.

## 8. REFERÊNCIAS

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

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTRÖM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.17, p.456-461, 1999.

BAILEY, W.; POPOVICH, B.; JONES, K. L. Monozygotic twins discordant for Russell-Silver syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, Hoboken, v.58, p.101-105, 1995.

BARANSKA, W.; KOPROWSKI, H. Fusion of unfertilized mouse eggs with somatic cells. **J. Exp. Zool.**, New York, v.174, p.1-14, 1970.

BARTOLOMEI, M. S.; TILGHMAN, S. M. Genomic imprint in mammals. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.31, p.493-525, 1997.

BEAUDET, A. L.; JIANG, Y. H. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprinting-dependent evolution. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.70, p.1389-1397, 2002.

BELL, A. C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**, London, v.405, p.482-485, 2000.

BESTOR, T. H. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. **EMBO J.**, Oxford, v.11, p.2611-2617, 1992.

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

BESTOR, T. H.; LAUDANO, A.; MATTALIANO, R.; INGRAM, V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domains of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **J. Mol. Biol.**, London, v.203, p.971-983, 1988.

BEYHAN, Z.; FORSBERG, E. J.; EILERTSEN, K. J.; KENT-FIRST, M.; FIRST, N. L. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.74; p.18-27, 2007.

BINISZKIEWICZ, D.; GRIBNAU, J.; RAMSAHOYE, B.; GAUDET, F.; EGGAN, K.; HUMPHERYS, D.; MASTRANGELO, M. A.; JUN, Z.; WALTER, J.; JAENISCH, R. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.22, p.2124-2135, 2002.

BIRD, A. P.; WOLFFE, A. P. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. **Cell**, Cambridge, v.99, p.451-454, 1999.

BLIEK, J.; TERHAL, P.; van DEN BOGAARD, M-J.; MAAS, S.; HAMEL, B.; SALIEB-BEUGELAAR, G.; SIMON, M.; LETTEBOER, T.; van DER SMAGT, J.; KROES, H.; MANNENS, M. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome, but also isolated asymmetry or a SRS-like phenotype. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.76, p.604-614, 2006.

BOOTH, P.J.; TAN, S.J.; REIPURTH, R.; R., HOLM, P.; CALLESEN, H. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.3, p.139-150, 2001.

BOURC'HIS, D.; LeBOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Curr. Biol.**, Cambridge, v.11, p.1542-1546, 2001a.

BOURC'HIS, D.; XU, G-L.; LIN, C-S.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T. H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, Washington, v.294, p.2536-2539, 2001b.

BRIGGS, R.; KING, T.J. The transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.38, p.455-463, 1952.

BROMHALL, J. D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, London, v.258, p.719–722, 1975.

BRUNKOW, M. E.; TILGHMAN, S. M. Ectopic expression of the H19 gene in mice causes prenatal lethality. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.5, p.1092-1101, 1991.

BURKE, J. Texas A&M University - CVM Researchers first to clone White-tailed Deer. Disponível em: <[http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer\\_clone.shtml](http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer_clone.shtml)>, 2003. Acesso em: 01.09.2006.

CAI, X.; CULLEN, B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. **RNA**, New York, v.13, p.313-316, 2007.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, London, v.380, p.64–66, 1996.

CATTANACH, B. M.; KIRK, M. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. **Nature**, London, v.315, p.496-498, 1985.

CEZAR, G. G.; BARTOLOMEI, M. S.; FORSBERG, E. J.; FIRST, N. L.; BISHOP, M. D.; EILERTSEN, K. J. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.**, New York, v.68, p.1009-1014, 2003.

CHAILLET, J. R.; VOGT, T. F.; BEIER, D. R.; LEDER, P. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. **Cell**, Cambridge, v.66, p.77-83, 1991.

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

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

CHEN, T.; UEDA, Y.; DODGE, J. E.; WANG, Z.; LI, E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a e Dnmt3b. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.23, p.5594-5605, 2003.

CHEN, T.; LI, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. **Curr. Top. Dev. Biol.**, Orlando, v.60, p.55-89, 2004.

CHEONG, H. T.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. **Biol. Reprod.**, New York, v.48, p.958–963, 1993.

CHESNE, P.; ADENOT, P. G.; VIGLIETTA, C.; BARATTE, M.; BOULANGER, L.; RENARD, J. P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.20, p.366- 369, 2002.

CHUNG, Y. G.; RATNAM, S.; CHAILLET, J.R.; LATHAM, K. E. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v.69, p.146–153, 2003.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves

produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v.280, p.1256-1258, 1998.

COLOT, V.; ROSSINOL, J. L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **BioEssays**, Cambridge, v.21, p.402-411, 1999.

CONSTÂNCIA, M.; HEMBERGER, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; STEWART, F.; KELSEY, G.; FOWDEN, A.; SIBLEY, C.; REIK, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, London, v.417, p.945-948, 2002.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biol. Reprod.**, New York, v.75, p.122-130, 2006.

CORLEY-SMITH, G. E.; BRANDHORST, B. P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.53, p.363-367, 1999.

DAI, Y.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; CHEN, S. H.; PHELPS, C. J.; BALL, S.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; McCREATH, K. J.; LAMBORN, A. E.; COWELL-LUCERO, J. L.; WELLS, K. D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I. A.; AYARES, D. L. Targeted disruption of the alpha1,3- galactosyltransferase gene in cloned pigs. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.20, p.251-255, 2002.

DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biol. Reprod.**, New York, v.63, p.1034-1040, 2000.

DANIELS, R.; HALL, V. J.; FRENCH, A. J.; KORFIATIS, N. A.; TROUNSON, A. O. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.60, n.3, p.281-288, 2001.

De COPPI, P.; BARTSCH, G. Jr.; SIDDIQUI, M. M.; XU, T.; SANTOS, C. C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A. C.; SNYDER, E. Y.; YOO, J. J.; FURTH, M. E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.25, p.100-106, 2007.

De SOUSA, P. A.; WINGER, Q.; HILL, J. R.; JONES, K.; WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E. Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. **Cloning**, Larchmont, v.1, p.63-69, 1999.

De SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biol. Reprod.**, New York, v.65, p.23-30, 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. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.98, p.13734-13738, 2001.

DeBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 e H19. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.72, p.156-160, 2003.

DeCHIARA, T. M.; EFSTRATIADIS, A.; ROBERTSON, E. J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II disrupted by targeting. **Nature**, London, v.345, p.78-80, 1990.

DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v.14, p.188-195, 2004.

DELAVAL, K.; WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Epigenetic deregulation of imprinted in congenital diseases of aberrant growth. **BioEssays**, Cambridge, v.28, p.453-458, 2006.

DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W. A.; ROLLO, M.; De SOUSA, P.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A.J. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.19, p.559-562, 2001a.

DENNING, C.; DICKINSON, P.; BURL, S.; WYLIE, D.; FLETCHER, J.; CLARK, A. J. Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.3, p.221-231, 2001b.

DODGE, J. E.; OKANO, M.; DICK, F.; TSUJIMOTO, N.; CHEN, T.; WANG, S.; UEDA, Y.; DYSON, N.; LI, E. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.280, p.17986-17991, 2005.

DREWELL, R. A.; BRENTON, J. D.; AINSCOUGH, J. F.; BARTON, S. C.; HILTON, K. J.; ARNEY, K. L.; DANDOLO, L.; SURANI, M. A. Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch. **Development**, Cambridge, v.127, p.3419-3428, 2000.

DU, T.; ZAMORE, P. D. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. **Development**, Cambridge, v.132, p.4645-4652, 2005.

DUTHIE, S. J.; NARAYANAN, S.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BASTEN, G.; POWERS, H. Folate, DNA stability and colo-rectal neoplasia. **Proc. Nutr. Soc.**, London, v.63, p.571-578, 2004.

EDEN, A.; GAUDET, F.; WAGHMARE, A.; JAENISCH, R. Chromosomal instability and tumor promoted by DNA hypomethylation. **Science**, Washington, v.300, p.455, 2003.

EGGENSCHWILER, J.; LUDWIG, T.; FISHER, P.; LEIGHTON, P. A.; TILGHMAN, S. M.; EFSTRATIADIS, A. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.11, p.3128-3142, 1997.

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 $\beta$ -deoxycytidine. **Biol. Reprod.**, New York, v.69, p.896-901, 2003.

FABER, D. C.; FERRE, L. B.; METZGER, J.; ROBL, J. M.; KASINATHAN, P. Agro-economic impact of cattle cloning. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.6, p.198-207, 2004.

FAIRBURN, H. R.; YOUNG, L. E.; HENDRICH, B. D. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? **Curr. Biol.**, Cambridge, v.12, p.68-70, 2002.

FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep. **Mamm. Genome**, New York, v.9, p.831-834, 1998.

FOSBERG, E. J. Commercial application of nuclear transfer clones: three examples. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.17, p.59-68, 2005.

FOURNIER, C.; GOTO, Y.; BALLESTAR, E.; DELAVAL, K.; HEVER, A. M.; ESTELLER, M.; FEIL, R. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. **EMBO J.**, Oxford, v.23, p.6560-6570, 2002.

FUKS, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v.15, p.490-495, 2005.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, London, v.424, p.635, 2003.

GHOSHAL, K.; LI, X.; DATTA, J.; BAI, S.; POGRIBNY, I.; POGRIBNY, M.; HUANG, Y.; YOUNG, D.; JACOB, S. T. A folate- and methyl-deficient diet alter the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic silencing in livers of F344 rats. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.136, p.1522-1527, 2006.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTEBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biol. Reprod.**, New York, v.66, p.895-900, 2002.

GOSHEN, R.; RACHMILEWITZ, J.; SCHNEIDER, T.; DE GROOT, N.; ARIEL, I.; PALT, Z.; HOCHBERG, A. A. The expression of the H19 and IGF2 genes during human embryogenesis and placental development. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.34, p.374-379, 1993.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, A. J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S.; TERVIT, H. R. *In vitro* and early *in vivo* development of sheep gynogenones and putative androgenones. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.50, p.154-162, 1998.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. **Cell**, Cambridge, v.64, p.1045-1046, 1991.

HALL, V. J.; STOJKOVIC, P.; STOJKOVIC, M. Using therapeutic cloning to fight human disease: A conundrum or reality? **Stem Cells**, Dayton, v.24, p.1628-1637, 2006.

HARK, A. T.; SCHOENHERR, C. J.; KATZ, D. J.; INGRAM, R. S.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. **Nature**, London, v.405, p.486-489, 2000.

HASSAM, Y. I.; ZEMPLINI, J. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.136, p.1763-1765, 2006.

HATA, K.; OKANO, M.; LEI, H.; LI, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. **Development**, Cambridge, v.129, p.1983-1993, 2002.

HAYES, O.; RAMOS, B.; RODRÍGUEZ, L. L.; AGUILAR, A.; BADÍA, T.; CASTRO, F. O. Cell confluency is as efficient as serum starvation for induced arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.87, p.181-192, 2005.

HERMANN, A.; SCHMITT, S.; JELTSCH, A. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.278, p.31717-31721, 2003.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v.61, p.2571-2587, 2004.

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

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

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

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

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, London, v.415, p.1035-1038, 2002.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C.; YAMADA, Y.; KIM, M.; CHIN, L.; JAENISCH, R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.18, p.1875-1885, 2005.

HOLLIDAY, R., PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, Washington, v.187, p.226-232. 1975.

HOLMES, R.; SOLOWAY, P. D. Regulation of imprinted DNA methylation. **Cytogenet. Genome Res.**, Basel, v.113, p.122-129, 2006.

HOWLETT, S. K.; REIK, W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. **Development**, Cambridge, v.113, p.119-127, 1991.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M. 3<sup>rd</sup>; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic

instability in ES cells and cloned mice. **Science**, Washington, v.293, p.95-97, 2001.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; FRIEDMAN, A.; HOECHEDLINGER, K.; YANAGIMACHI, R.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R.; JAENISCH, R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.99, p.12889-12894, 2002.

HURST, L. D.; SMITH, N. G. Molecular evolutionary evidence that H19 mRNA is functional. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.15, p.134-135, 1999.

IGUCHI-ARIGA, S. M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.3, p.612-619, 1989.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, Cambridge, v.23, p.9-18, 1981.

INOUE, K.; KOHDA, T.; LEE, J.; OGONUKI, N.; MOCHIDA, K.; NOGUCHI, Y.; TANEMURA, K.; KANEKO-ISHINO, T.; ISHINO, F.; OGURA, A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. **Science**, Washington, v.295, p.297, 2002.

INOUE, K.; WAKAO, H.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; SEINO, K.; NAMBU-WAKAO, R.; NODA, S.; MIYOSHI, H.; KOSEKI, H.; TANIGUCHI, M.; OGURA, A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. **Curr. Biol.**, Cambridge, v.15, p.1114-1118, 2005.

JACKSON, M.; KRASSOWSKA, A.; GILBERT, N.; CHEVASSUT, T.; FORRESTER, L.; ANSELL, J.; RAMSAHOYE, B. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.24, p.8862-8871, 2004.

JAENISCH, R.; FAN, H.; CROKER, B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.72, p.4008-4012, 1975.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, New York, v.33, p.245-254, 2003.

JÄHNER, D.; STUHLMANN, H.; STEWART, C. L.; HARBERS, K.; LOHLER, J.; SIMON, I.; JAENISCH, R. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. **Nature**, London, v.298, p.623-628, 1982.

JONES, B. K.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. Igf2 imprinting does not require its own DNA methylation or H19 RNA. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.12, p.2200-2207, 1998.

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

KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; McCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.6, p.705-714, 1992.

KANEDA, M.; OKANO, M.; HATA, K.; SADO, T.; TSUJIMOTO, N.; LI, E.; SASAKI, H. Essential role for the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. **Nature**, London, v.429, p.900-903, 2004.

KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, A. S.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nat. Genet.**, New York, v.28, p.173-177, 2001.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, Washington, v.282, p.2095-2098, 1998.

KEEFER, C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.82,-83, p.5-12, 2004.

KHOSLA, S.; DEAN, W.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of pre-implantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.7, p.419-427, 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.63, p.269-272, 2002.

KIND, A.; COLMAN, A. Therapeutic cloning: needs and prospects. **Sem. Cell Dev. Biol.**, London, v.10, p.279-286, 1999.

KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. **Nature**, London, v.444, p.481-485, 2006.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotech.**, Oxford, v.22, p.286-294, 2004.

KURUKUTI, S.; TIWARI, V. K.; TAVOOSIDANA, G.; PUGACHEVA, E.; MURELL, A.; ZHAO, Z.; LOBANENKOV, V.; REIK, W.; OHLSSON, R. CTCF binding at H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to IGF2. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.103, p.10684-10689, 2006.

LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K-W.; CHEONG, H-T.; GREENSTEIN, J. L.; IM, G-S.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B. N.; MURPHY, C. N.; CARTER, D. B.; HAWLEY, R. J.; PRATHER, R. S. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science**, Washington, v.295, p.1089-1092, 2002.

LATHAM, K. E. Cloning: questions answered and unsolved. **Differentiation**, London, v.72, p.11-22, 2004.

LAU, M. M.; STEWART, C. E.; LIU, Z.; BHATT, H.; ROTWEIN, P.; STEWART, C. L. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.8, p.2953-2963, 1994.

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; SHAMIM, M. H.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, London, v.426, p.641, 2005.

LEE, J. W.; WU, S. C.; TIAN, X. C.; BARBER, M.; HOAGLAND, T.; RIESEN, J.; LEE, K. H.; TU, C. F.; CHENG, W. T. K.; YANG, X. Production of cloned pig by whole-cell intracytoplasmic microinjection. **Biol. Reprod.**, New York, v.69, p.995-1001, 2003.

LEE, R. S.; DEPREE, K. M.; DAVEY, H. W. The sheep (*Ovis aries*) H19 gene: genomic structure and expression patterns, from the preimplantation embryo to adulthood. **Gene**, Amsterdam, v.301, p.67-77, 2002.

LEI, H.; OH, S. P.; OKANO, M.; JUTTERMANN, R.; GOSS, K. A.; JAENISCH, R.; LI, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **Development**, Cambridge, v.122, p.3195-3205, 1996.

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

LEWIS, A.; REIK, W. How imprinting centres work. **Cytogenet. Genome Res.**, Basel, v.113, p.81-89, 2006.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat. Rev. Genet.**, London, v.3, p.662-673, 2002.

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

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

LI, S.; LI, Y.; YU, S.; DU, W.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LIU, Y.; LI, N. Expression of insulin-like growth factors system in cloned cattle dead within hours after birth. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.74, p.397-402, 2007.

LI, Y. M.; FRANKLIN, G.; CUI, H. M.; SVENSSON, K.; HE, X. B.; ADAM, G.; OHLSSON, R.; PFEIFER, S. The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.28247-28252, 1998.

LI, Z.; SUN, X.; CHEN, J.; LIU, X.; WISELY, S. M.; ZHOU, Q.; RENARD, J. P.; LENO, G. H.; ENGELHARDT, J. F. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. **Dev. Biol.**, New York, v.293, p.439-448, 2006.

LIU, K.; WANG, Y. F.; CANTEMIR, C.; MULLER, M. T. Endogenous assays of DNA methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells *in vivo*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.23, p.2709-2719, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using relative quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. **Methods**, San Diego, v.25, p.402-408, 2001.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA Jr, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.19, p.962-964, 2001.

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FULKA Jr, J.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; SALDA, L. D.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, p.1110-1121, 2006.

LONG, J. E.; CAI, X.; HE, L. Q. Gene profiling of cattle blastocysts derived from nuclear transfer, *in vitro* fertilization and *in vivo* development based on cDNA library. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, (Epub ahead of print, DOI 10.1016/j.anireprosci.2006.07.006), 2006.

LONG, J-R.; CAI, X. Igf2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, Amsterdam, v.388, p.125-134, 2007.

LUDWIG, T.; EGGENSCHWILER, J.; FISHER, P.; D'ERCOLE, A. J.; DAVENPORT, M. L.; EFSTRATIADIS, A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. **Dev. Biol.**, New York, v.177, p.517-535, 1996.

MALLORY, A. C.; VAUCHERET H. MicroRNAs: something important between the genes. **Curr. Opin. Plant Biol.**, London, v.7; p.120-125, 2004.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biol.**, London, v.3, p.1-4, 2002.

MANN, M. R. W.; CHUNG, Y. G.; NOLEN, L. D.; VERONA, R. I.; LATHAM, K. E.; BARTOLOMEI, M. S. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v.69, p.902-914, 2003.

McCREATH, K. J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K. H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, London, v.405, p.1066-1069, 2000.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. **Science**, Washington, v.226, p.1317-1319, 1984a.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, Cambridge, v.37, p.179-183, 1984b.

McLAREN, A. Mammalian development: methods and success of nuclear transplantation in mammals. **Nature**, London, v.309, p.671-672, 1984.

MEEHAN, R. R. DNA methylation in animal development. **Sem. Cell Dev. Biol.**, London, v.14, p.53-65, 2003.

MENG, L.; ELY, J. J.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, New York, v.57, p.454-459, 1997.

MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; LEAL, C. L. V.; OLIVEIRA, J. A.; GARCIA, J. M. Use of strontium for bovine oocyte activation. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.63, p.2089-2102, 2005.

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

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.7, p.45-49, 1991.

MORISON, I. M.; RAMSAY, J. P.; SPENCER, H. G. A census of mammalian imprinting. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.21, p.457-465, 2005.

MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. **BioEssays**, Cambridge, v.25, p.577-588, 2003.

NG, H. H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v.9, p.158-163, 1999.

NG, H. H.; ZHANG, Y.; HENDRICH, B.; JOHNSON, C. A.; TURNER, B. M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; REINBERG, D.; BIRD, A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. **Nat. Genet.**, New York, v.23, p. 58-61, 1999.

NG, R. K.; GURDON, J. B. Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. **Cell Cycle**, Georgetown, v.4, p.760-763, 2005.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.4, p.29-38, 2002.

OBACK, B.; WIERSEMA, A. T.; GAYNOR, P.; LAIBLE, G.; TUCKER, F. C.; OLIVER, J. E.; MILLER, A. L.; TROSKIE, H. E.; WILSON, K. L.; FORSYTH, J. T.; BERG, M. C.; COCKREM, K.; McMILLAN, V.; TERVIT, H. R.; WELLS, D. N. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v.5, p.3-12, 2003.

OGAWA, H.; ONO, Y.; SHIMOZAWA, N.; SOTOMARU, Y.; KATSUZAWA, Y.; HIURA, H.; ITO, M.; KONO, T. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. **Reproduction**, Cambridge, v.126, p.549-557, 2003.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.26, p.2536-2540, 1998a.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nat. Genet.**, New York, v.19, p.219-220, 1998b.

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

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M.; FORSBERG, E. J.; GOLUEKE, P. J.; GRABER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPANG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, P. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biol. Reprod.**, New York, v.67, p.334-339, 2002.

PATERSON, L.; De SOUSA, P.; RITCHIE, W.; KING, T.; WILMUT, I. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials applications of reproductive cloning. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.79, p.137-143, 2003.

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.30, p.e36, 2002.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S-H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, London, v.407, p.505-509, 2000.

PRATHER, R.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M.; ROBL, J. M.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol. Reprod.**, New York, v.37, p.859-866, 1987.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v.41, p.414-418, 1989.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPPEZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v.339, p.62-66, 2003.

REIK, W.; COLLICK, A.; NORRIS, M. L.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. **Nature**, London, v.328, p.248-251, 1987.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v.22, p.2838-2843, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nat. Rev. Genet.**, London, v.2, p.21-32, 2001.

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

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

RIDEOUT III, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, Washington, v.293, p.1093-1098, 2001.

RIGGS, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v.14, p 9-25, 1975.

ROBERTSON, K. D.; KEYOMARSI, K.; GONZALES, F. A.; VELICESCU, M.; JONES, P. A. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a e 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.28, p.2108-2113, 2000.

ROBERTSON, A. K.; GEIMAN, T. M.; SANKPAL, U. T.; HAGER, G. L.; ROBERTSON, K. D. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, San Diego, v.322, p.110-118, 2004.

RUNGE, S.; NIELSEN, F. C.; NIELSEN, J.; LYKKE-ANDERSEN, J.; WEWER, U.; CHRISTIANSEN, J. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.275, p.29562-29569, 2000.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, Cambridge, v.131, p.895-904, 2006.

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

SANFORD, J. P.; CLARK, H. J.; CHAPMAN, V. M.; ROSSANT, J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.1, p.1039-1046, 1987.

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.**, Cambridge, v.13, p.1116-1121, 2003.

SASAKI, H.; FERGUSON-SMITH, A. C.; SHUM, A. S. W.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Temporal and spatial regulation of H19 imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development**, Cambridge, v.21, p.4195-4202, 1995.

SCHINIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor XI transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v.278, p.2130-2133, 1997.

SCHOENHERR, C. J.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. **Nat. Genet.**, New York, v.33, p.66-69, 2003.

SEBASTIANO, V.; GENTILE, L.; GARAGNA, S.; REDI, A. C.; ZUCCOTTI, M. Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.70, p.146-154, 2004.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, London, v.415, p.859, 2002.

SIEDLECKI, P.; ZIELENKIEWICZ, P. Mammalian DNA methyltransferases. **Acta Biochem. Pol.**, Warszawa, v.53, p.245-256, 2006.

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nat. Cell. Biol.**, London, v.6, p.984-990, 2004.

SIMS, M.; FIRST, N. L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.91, p.6143-6147, 1994.

SLEUTELS, F.; ZWART, R.; BARLOW, D. P. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. **Nature**, London, v.415, p.810-813, 2002.

SPEMANN H. **Embryonic development and induction**. Yale University Press, New Haven, Connecticut, 1938. p.211.

STEIN, R.; GRUENBAUM, Y.; POLLACK, Y.; RAZIN, A.; CEDAR, H. Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.79, p.61-65, 1982.

STICE, S. L.; ROBL, J. M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v.39, p.657-664, 1988.

STÖGER, R.; KUBICKA, P.; LIU, C. G.; KAFRI, T.; RAZIN, A.; CEDAR, H.; BARLOW, D. P. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. **Cell**, Cambridge, v.73, p.61-71, 1993.

SULLIVAN, E. J.; KASINATHAN, S.; KASINATHAN, P.; ROBL, J. M.; COLLAS, P. Cloned calves from chromatin remodeled *in vitro*. **Biol. Reprod.**, New York, v.70, p.146-153, 2004.

SURANI, M. A. H.; BARTON, S. C.; NORRIS, M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, London, v.308, p.548-550, 1984.

SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germline. **Cell**, Cambridge, v.93, p.309-312, 1998.

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

TANG, L. Y.; REDDY, M. N.; RASHEVA, V.; LEE, T. L.; LIN, M. J.; HUNG, M. S.; SHEN, C. K. The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.278, p.33613-33616, 2003.

TAUNTON, J.; HASSIG, C. A.; SCHREIBER, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. **Science**, Washington, v.272, p.408-411, 1996.

TCHURIKOV, N. A. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry (Moscow)**, New York, v.70, p.406-423, 2005.

TILGHMAN, S. M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. **Cell**, Cambridge, v.96, p.185-193, 1999.

THORVALDSEN, J. L.; DURAN, K. L.; BARTOLOMEI, M. S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.12, p.3693-3702, 1998.

TREMBLAY, K. D.; SAAM, J. R.; INGRAM, R. S.; TILGHMAN, S. M.; BARTOLOMEI, M. S. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. **Nat. Genet.**, New York, v.9, p.407-413, 1995.

TSUMURA, A.; HAYAKAWA, T.; KUMAKI, Y.; TAKEBAYASHI, S.; SAKAUE, M.; MATSUOKA, C.; SHIMOTOHNO, K.; ISHIKAWA, F.; LI, E.; UEDA, H. R.; NAKAYAMA, J.; OKANO, M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.11, p.805-815, 2006.

TYCKO, B.; MORISON, I. M. Physiological functions of imprinted genes. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v,192, p.245-258, 2002.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open-pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v.52, p.939-948, 1999.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; HYTTEL, P.; THOUAS, G. A.; TROUNSON, A. O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, Larchmont, v.3, p.89-95, 2001.

VAN GELDER, R. N.; VON ZASTROW, M. E.; YOOL, A.; DEMENT, W. C.; BARCHAS, J. D.; EBERWINE, J. H. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.87, p.1663-1667, 1990.

VARMUZA, S.; MANN, M. Genomic imprinting – defusing the ovarian time bomb. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.10, p.118-123, 1994.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, London, v.394, p.369-374, 1998.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, Burbank, v.20, p.63-68, 2004.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; CALUSERIU, O.; SMITH, A. C.; FEI, Y. L.; NISHIKAWA, J.; STOCKLEY, T. L.; BEST, L.; CHITAYAT, D.; OLNEY A.; IVES, E.; SCHNEIDER, A.; BESTOR, T. H.; LI, M.; SADOWSKI, P.; SQUIRE, J. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.11, p.1317-1325, 2002.

WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Rev. Sci. Tech.**, Paris, v.24, p.251-256, 2005.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod. Fert. Dev.**, East Melbourne, v.10, p.369-378, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol. Reprod.**, New York, v.60, p.996-1005, 1999.

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

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

WHITE, K. L.; BUNCH, T. D.; MITALIPOV, S.; REED, W. A. Establishment of pregnancy after transfer of nuclear transfer embryos produced from fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. **Cloning**, Larchmont, v.1, p.47-54, 1999.

WIGLER, M.; LEVY, D.; PERUCHO, M. The somatic replication of DNA methylation. **Cell**, Cambridge, v.24, p.33-40, 1981.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, London, v.320, p.63-65, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v.385, p.810-813, 1997.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; De SOUSA, P. A.; DINNYES, A.; KING, T. J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D. N.; YOUNG, L. E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, London, v.419, p.583-586, 2002.

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

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biol. Reprod.**, New York, v.65, p.309-317, 2001.

WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; KORSawe, K.; NIEMANN, H. *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biol. Reprod.**, New York, v.66, p.127-134, 2002.

WRENZYCKI, C., NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of *in vitro* production and somatic nuclear transfer. **Reprod. Biomed. Online**, Cambridge, v.7, p.649-656, 2003.

WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A.; MEININGER, C. J.; SPENCER, T. E. Maternal nutrition and fetal development. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.134, p.2169-2172, 2004.

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nat. Genet.**, New York, v.31, p.216-220, 2002.

YAMAZAKI, W. **Estudo do “genomic imprinting” na placenta de clones bovinos.** 2006. 104f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, Cambridge, v.13, p.295-302, 2005.

YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.71, p.431- 438, 2005.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, Colchester, v.3, p.155-163, 1998.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Los Altos, v.53, p.627-648, 2000.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; McEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nat. Genet.**, New York, v.27, p.153-154, 2001.

YOUNG, L. E.; SCHNIEKE, A. E.; McCREATH, K. J.; WIECKOWSKI, S.; KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A. J.; WILMUT, I.; PASQUALINO, L.; FEIL R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2r imprinting in the sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mech. Dev.**, Shannon, v.120, p.1433-1442, 2003.

YOUNG, L. E.; BEAUJEAN, N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of mouse and sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.82-83, p.61-78, 2004.

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.**, New York, v.71, p.1540-1544, 2004.

ZHOU, Q.; RENARD, J. P.; Le FRIEC, G.; BROCHARD, V.; BEAUJEAN, N.; CHERIFI, Y.; FRAICHARD, A.; COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, Washington, v.302, p.1179, 2003.

ZVETKOVA, I.; APEDAILE, A.; RAMSAHOYE, B.; MERMOUD, J.; CROMPTON, L.; JOHN, R.; FEIL, R.; BROCKDORFF, N. Global hypomethylation of the genome in XX ES cells. **Nat. Genet.**, New York, v.37, p.1274-1279, 2005.