



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS COM A
REPROGRAMAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA EM PLACENTA DE BOVINOS
CLONES**

Luna Nascimento Vargas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

UBERLÂNDIA – MG
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS COM A
REPROGRAMAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA EM PLACENTA DE BOVINOS
CLONES**

Luna Nascimento Vargas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
genética)

UBERLÂNDIA – MG
2018

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

V297p
2018 Vargas, Luna Nascimento, 1994
 Perfil transcricional de genes relacionados com a reprogramação da
 metilação do DNA em placenta de bovinos clones [recurso eletrônico] /
 Luna Nascimento Vargas. - 2018.

Orientador: Maurício Machaim Franco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.815>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS COM A
REPROGRAMAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA EM PLACENTA DE BOVINOS
CLONES**

Aluna: Luna Nascimento Vargas

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinadores: Márcio José Poças Fonseca

Vivian Alonso Goulart

Data da defesa: 26/07/18

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

Maurício Machaim Franco

UBERLÂNDIA – MG
2018

“Não há um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho. ”

Dr. Wayne W. Dyer

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valéria e Wytergon, pelo apoio fundamental durante essa jornada e por não medirem esforços para realização dos meus sonhos. Obrigada por toda base e por entenderem minha distância.

À toda minha família, pelo incentivo, força e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Maurício, pela confiança, paciência e oportunidade de realização desse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos e por contribuir de forma admirável para meu crescimento profissional.

Ao meu namorado, Leo, pelo suporte e carinho durante todo tempo de realização desse trabalho.

Aos meus amigos de longa data e aqueles que fiz em Brasília, obrigada pelos bons momentos vividos, amizade e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

A toda equipe do LRA, pela contribuição para minha formação e, sobretudo para a realização desse trabalho.

Obrigada à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por toda a estrutura e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Obrigada à Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pela oportunidade de realização do Mestrado.

Obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de alguma forma para minha caminhada, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Clonagem.....	1
1.2 Epigenética	2
1.3 Metilação do DNA	3
1.4 Maquinaria enzimática para metilação do DNA	4
1.5 Maquinaria enzimática para desmetilação do DNA.....	8
1.6 Imprinting genômico.....	11
1.7 Reprogramação epigenética no desenvolvimento inicial	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Amostra biológica.....	17
3.2 Extração de RNA total.....	19
3.3 Tratamento com DNase	19
3.4 Síntese de cDNA.....	19
3.5 PCR em tempo real.....	19
3.6 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	49

RESUMO

A clonagem por meio da transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é uma biotecnologia da reprodução com várias aplicações e já em uso comercial. No entanto, ainda é uma técnica com baixa eficiência devido a alta frequência de anormalidades fetais e placentárias. Para que o embrião se desenvolva normalmente, o perfil epigenético do genoma somático da célula doadora de núcleo deve ser reprogramado corretamente após a transferência nuclear. No entanto, nos embriões clones essa reprogramação não ocorre de forma eficiente, o que leva a alterações no padrão de metilação do DNA, e consequentemente, alterações no perfil de expressão gênica de genes importantes durante o desenvolvimento embrionário e fetal. Nesse estudo, nós determinamos os níveis de mRNA para 6 genes alvos (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* e *TET3*) relacionados à reprogramação da metilação do DNA em cotilédone fetal de 13 bezerros provenientes de TNCS. O RNA total foi extraído das amostras de cotilédone fetal e submetido à transcrição reversa para análises em PCR em tempo real. Os resultados mostraram padrões de expressão gênica diferentes entre os clones e os animais controles produzidos por inseminação artificial para todos os genes avaliados, exceto para a *TET3*. Os níveis de mRNA de *DNMT1* ($p=0,0044$), *DNMT3A* ($p=0,0044$) e *TET2* ($p=0,0044$) foram maiores nos controles, enquanto que, para *DNMT3B* ($p=0,0308$) e *TET1* ($p=0,0308$) os níveis foram maiores nos clones. Além disso, foi identificado que os clones que morreram na primeira semana de vida apresentaram diferenças de expressão gênica em relação aos controles para os genes *DNMT1* ($p=0,0244$), *DNMT3A* ($p=0,0279$), *DNMT3B* ($p=0,0364$), *TET1* ($p=0,0103$) e *TET2* ($p=0,0184$), enquanto que os que sobreviveram foram diferentes dos controles somente para *TET1* ($p=0,0344$). Esses resultados mostraram que os animais clones que sobrevivem não são apenas fisicamente mais saudáveis, mas também relativamente mais próximos dos controles no nível molecular. Isto sugere que uma expressão adequada das enzimas relacionadas com a reprogramação epigenética do DNA na placenta é essencial para a sobrevivência do animal proveniente de TNCS.

Palavras-chave: transferência nuclear de células somáticas, clonagem, expressão gênica, epigenética, metilação do DNA, placenta, DNMT, TET.

ABSTRACT

Cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is an assisted reproductive technique with several applications in livestock. However, it is still a technique that shows low efficiency due to the high frequency of fetal and placental abnormalities. The somatic genome must be correctly reprogrammed after nuclear transfer to achieve normal embryo development. However, in cloned embryos this reprogramming does not occur efficiently, leading to changes in DNA methylation patterns and consequently alterations in gene expression profile of important genes for embryo and foetal development. In this study, we determined the mRNA levels for six target genes (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 and TET3) related to DNA methylation reprogramming in the placental cotyledon of 13 calves produced by SCNT. Total RNA was extracted from the placental cotyledon samples and subjected to reverse transcription for real-time PCR analysis. Results showed different gene expression profiles, comparing placenta from cloned calves and placenta from animals produced by artificial insemination, except for TET3. The mRNA level of DNMT1 ($p=0.0044$), DNMT3A ($p=0.0044$) and TET2 ($p=0.0044$) were higher in the controls, while DNMT3B ($p=0.0308$) and TET1 ($p=0.0308$) were higher in the clones. In addition, it was identified that clones that died in the first week of life had differences in gene expression compared to the controls for the genes DNMT1 ($p=0.0244$), DNMT3A ($p=0.0279$), DNMT3B ($p=0.0364$), TET1 ($p=0.0103$) and TET2 ($p=0.0184$), while those that survived were different from controls only for TET1 ($p=0.0344$). These results showed that surviving clones are not only physically healthier but also relatively closer to the controls at the molecular level. This suggests that an adequate expression profile of enzymes related to epigenetic reprogramming is essential for the survival of cloned animals.

Key-words: somatic cell nuclear transfer, cloning, gene expression, epigenetics, DNA methylation, placenta, DNMT, TET.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Clonagem

A clonagem animal por meio da transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é uma biotecnologia da reprodução com um vasto campo de aplicações, estando já em uso comercial. Essa técnica envolve a transferência de um núcleo doador para um ovócito no qual os cromossomos foram removidos, criando então, animais geneticamente idênticos (WILMUT; BAI; TAYLOR, 2015). O primeiro estudo a demonstrar que a TNCS era capaz de gerar animais viáveis a partir de um animal adulto foi publicado em 1997 quando foi divulgado o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clone (WILMUT et al., 1997). Desde então, essa tecnologia vem sendo utilizada em outras espécies, dentre elas, camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), gado (KATO et al., 1998), suíno (POLEJAEVA et al., 2000), coelho (CHESNÉ et al., 2002), cavalo (GALLI et al., 2003), cachorro (LEE, B. C. et al., 2005), búfalo (SHI et al., 2007) e em primatas (LIU et al., 2018).

A partir do nascimento da ovelha Dolly, juntamente com o crescente domínio da técnica ao longo dos anos de pesquisa, as razões para o estudo da clonagem evoluíram. Na agropecuária, a transgenia associada à clonagem abriu novas perspectivas para a produção de gado com resistência a ataque de patógenos (CHENG et al., 2015; WANG, Y. S. et al., 2015), expressando proteínas recombinante no leite (LUO et al., 2015) e até a produção de embriões clones transgênicos por meio da TNCS interespecies (GUPTA et al., 2013). Além da transgenia, a clonagem também permite a produção de cópias de animais com características produtivas desejáveis (FABER et al., 2004).

No entanto, a clonagem ainda é uma técnica com baixa eficiência; em bovinos somente 1-5% dos embriões transferidos para as receptoras se desenvolvem e nascem a termo, existindo também uma alta frequência de perda pós-natal (SU, J. et al., 2015). A maioria das perdas geralmente ocorre muito precocemente durante o desenvolvimento, levando à reabsorção embrionária no útero (SMITH et al., 2012). Nas gestações de clones várias anormalidades podem ocorrer, como a síndrome do bezerro gigante, crescimento anormal dos órgãos, anormalidades placentárias, cordão umbilical grosso, dentre diversas outras

(BUCZINSKI et al., 2009; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006). Esses fenótipos aberrantes, possivelmente resultantes de uma interação materno-fetal anormal, levam a insuficiência placentária e consequentemente, na maioria das vezes, a perda da gestação (HILL, J. R. et al., 2000; KOHAN-GHADR et al., 2008).

Dentre as principais causas responsáveis pelo desenvolvimento anormal da maioria dos animais clones está um padrão anormal de metilação do DNA nos estágios iniciais da embriogênese (BOURC'HIS et al., 2001; ZHANG, S. et al., 2016). Uma reprogramação incompleta do núcleo doador pode resultar em mudanças no perfil de expressão gênica e consequentemente alterações de desenvolvimento durante a gestação (SAINI, M. et al., 2017). Assim, estudos de expressão gênica já encontraram genes com expressão diferencial entre animais produzidos por TNCS e animais produzidos por fecundação *in vitro* (MIN et al., 2016), e também quando compararam clones com animais provenientes de inseminação artificial (IA) (WANG, G. N. et al., 2017). No entanto, análises de metilação do DNA em espermatozoides e ovócitos bovinos não encontraram diferenças entre animais clones e não-clones (KANEDA et al., 2017). Isto sugere que, como a causa das alterações encontradas nos clones é de falhas durante a reprogramação epigenética, o genoma do animal foi reprogramado eficientemente durante a gametogênese, garantindo a saúde da progênie dos clones (KANEDA et al., 2017).

1.2 Epigenética

Epigenética é a área da genética que estuda as mudanças herdáveis na função gênica e/ou fenótipo que não estão relacionadas a mudanças na estrutura primária do DNA (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009). Embora todas as células de um organismo contenham a mesma informação genética, nem todos os genes são expressos igualmente em todas as células. O perfil de expressão gênica é controlado por mecanismos epigenéticos em uma grande variedade de células e tecidos em organismo multicelular (MOORE, L. D.; LE; FAN, 2013). As marcas epigenéticas são modificações químicas herdáveis presentes na cromatina, transmitidas e mantidas nas células-filhas após uma divisão mitótica ou meiótica, influenciando a atividade transcricional (NAGY; TURECKI, 2015). Em mamíferos, o estabelecimento dessas marcas ocorre durante os períodos de embriogênese e

gametogênese, possuindo um papel importante durante o desenvolvimento embrionário (BOURC'HIS et al., 2001; ROSS et al., 2008; SANTOS et al., 2003).

As modificações epigenéticas são reversíveis, podendo ser moduladas por fatores ambientais como a exposição a fatores químicos, nutricionais, comportamentais, estresse e efeitos estocásticos, alterando a expressão gênica devido a modificação dessas marcas. Esses fatores funcionam individualmente e em conjunto afetando o epigenoma (FAULK; DOLINOY, 2011).

Os principais mecanismos ou fatores epigenéticos são: metilação do DNA, modificações covalentes pós-traducionais principalmente nas caudas de histonas (metilação, acetilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, sumoilação, fosforilação, etc) e RNAs não codificantes (SMOLLE; WORKMAN, 2013). Assim, o epigenoma refere-se ao conjunto de marcas epigenéticas sobre o genoma que regulam a estrutura da cromatina e a acessibilidade da maquinaria de transcrição ao DNA (HEIJMANS et al., 2009).

1.3 Metilação do DNA

Dentre as modificações epigenéticas, a metilação do DNA é a mais estudada e caracterizada. A metilação ocorre a partir da doação de um grupo metil no ciclo da metionina pela S-adenosil-metionina (SAM), sendo que este grupo metil é adicionado covalentemente ao carbono 5 do anel de uma citosina com maior frequência em um contexto de dinucleotídeos CpG, criando uma base chamada 5-metilcitosina (5mC). Essa marca é a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações e é geralmente associada com silenciamento transcricional e estabilidade cromossomal (DEAN; SANTOS; REIK, 2003).

A metilação do DNA em eucariotos ocorre principalmente em sítios CpG (PORTELA; ESTELLER, 2010) distribuídos ao longo do genoma e que estão predominantemente metilados (70-80%) (LARSEN et al., 1992; RASMUSSEN, KASPER DINDLER; HELIN, 2016). No entanto, as regiões com alta densidade de CpG, chamadas de ilhas CpG, se encontram em maior parte nos promotores gênicos e são pouco metiladas (DEATON; BIRD, 2011; LARSEN et al., 1992; SU, J. et al., 2014).

A metilação do DNA pode estar envolvida tanto na repressão quanto na ativação da transcrição gênica (SPRUIJT; VERMEULEN, 2014). Quando os sítios CpGs localizados nos promotores gênicos estão metilados os fatores de transcrição não conseguem acessar ao seu sítio no DNA para iniciar a transcrição. Além disso, a presença do grupo metil no DNA atrai proteínas de ligação a DNA metilado (MBD1, MBD2, MBD3 e MeCP2) que irão compactar a cromatina, levando então, à repressão da transcrição gênica (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002; BUCK-KOEHN TOP; DEFOSSEZ, 2013). No entanto, a metilação no corpo do gene é uma característica dos genes transcritos, pois essa metilação não impede o acesso dos fatores de transcrição ao seu sítio, e consequentemente, ocorre a transcrição gênica (WOLF et al., 1984). O corpo gênico, apesar de possuir menos sítios CpG, é altamente metilado e contém múltiplas regiões repetitivas e elementos transponíveis (JONES, 2012). A metilação desses elementos é importante para a estabilidade cromossômica, portanto, essas regiões tendem a ser fortemente metiladas para suprimir a sua expressão e dar estabilidade ao genoma (BESTOR; EDWARDS; BOULARD, 2015). Dessa forma, a metilação no corpo do gene bloqueia a iniciação da transcrição de elementos transponíveis e, ao mesmo tempo, permite a transcrição do gene hospedeiro (JONES, 2012).

A metilação do DNA desempenha um papel fundamental para que o desenvolvimento embrionário e a diferenciação celular ocorram da forma correta. Durante o desenvolvimento, a metilação do DNA está relacionada com o controle da expressão gênica, regulação do *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e a manutenção da integridade do genoma (DEAN et al., 2003).

1.4 Maquinaria enzimática para metilação do DNA

As enzimas responsáveis por transferir o grupo metil para o DNA são as DNA metiltransferases (DNMTs). Essas enzimas metilam o DNA por dois mecanismos distintos, metilação de manutenção e metilação *de novo*. No processo de metilação de manutenção, após cada ciclo de replicação do DNA a enzima reconhece o padrão de DNA hemi-metilado e copia os padrões de metilação preexistentes para a nova fita recém-sintetizada. Portanto, esse processo ocorre em células mitoticamente ativas (**Figura 1A**) (CHEN; LI, 2004; KISHIKAWA et al., 2003). Já a metilação *de novo* estabelece novos padrões de metilação durante a

gametogênese e embriogênese (**Figura 1B**) (REIK; WALTER, 2001), além de estar envolvida com algumas patologias (WANG, X. M. et al., 2010).

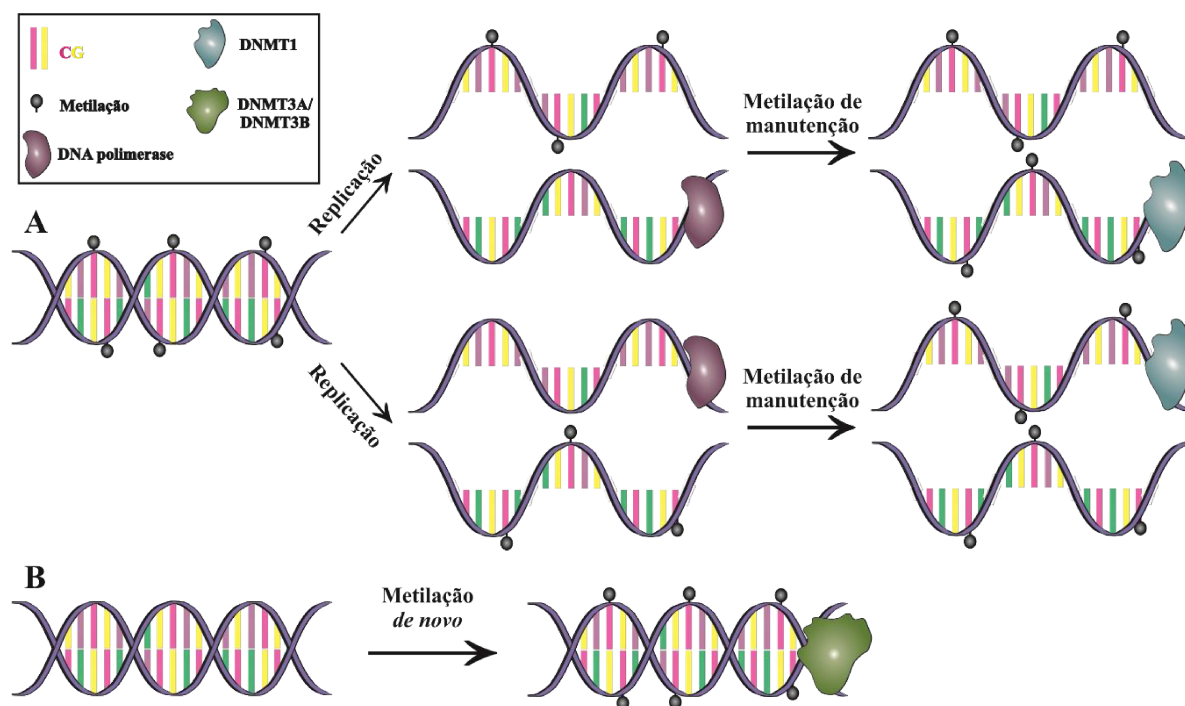


Figura 1. Atividades das DNA metiltransferases. (A) Mecanismo de metilação de manutenção pela DNA metiltransferase 1 (DNMT1). Durante cada ciclo de replicação do DNA a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA sem o padrão epigenético de metilação. A DNMT1 reconhece o DNA hemi-metilado e copia os padrões pré-existentes na nova fita. (B) Mecanismo de metilação *de novo* pelas DNA metiltransferases 3A/3B. Durante a gametogênese e a embriogênese as enzimas DNMT3A/3B estabelecem um novo padrão de metilação no DNA. Fonte: a autora (2018).

Em mamíferos, as enzimas que pertencem ao grupo das DNMTs são DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A atividade dessas enzimas é essencial para o desenvolvimento embrionário, visto que mutações nesses genes levam a uma redução de metilação no DNA, causando desenvolvimento anormal e letalidade embrionária (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992). A DNMT1 é responsável principalmente pelo processo de metilação de manutenção (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011), mas também possui um papel descrito na metilação *de novo* (SHIRANE et al., 2013), participando também da metilação do DNA mitocondrial (SHOCK et al., 2011) (SAINI, S. K. et al., 2017). A DNMT1 é uma proteína composta por uma grande região N-terminal reguladora e uma região

catalítica C-terminal, na qual existem domínios catalíticos essenciais para a interação com a SAM (**Figura 2**) (HERVOUET et al., 2018). Nas células germinativas, o RNA do gene da DNMT1 sofre um *splicing* alternativo nos primeiros éxons controlando a expressão e/ou localização das isoformas geradas em períodos específicos do desenvolvimento (MERTINEIT et al., 1998; TUREK-PLEWA; JAGODZIŃSKI, 2005). Três isoformas são geradas a partir de *splicing* alternativos, DNMT1s, DNMT1p e DNMT1o (RUSSELL; BETTS, 2008). A DNMT1s é expressa em células somáticas, enquanto as DNMT1p e DNMT1o são expressas em células germinativas masculinas e femininas, respectivamente (MERTINEIT et al., 1998).

A DNMT2 não possui um papel de DNA metiltransferase (RADDATZ et al., 2013), mas estudos relatam seu papel na metilação de RNA transportador (GOLL et al., 2006) (TUORTO et al., 2015). Essa enzima apresenta na região C-terminal as sequências dos motivos que estão presentes nas outras metiltransferases, no entanto, não possui o domínio N-terminal (**Figura 2**) (BESTOR, 2000).

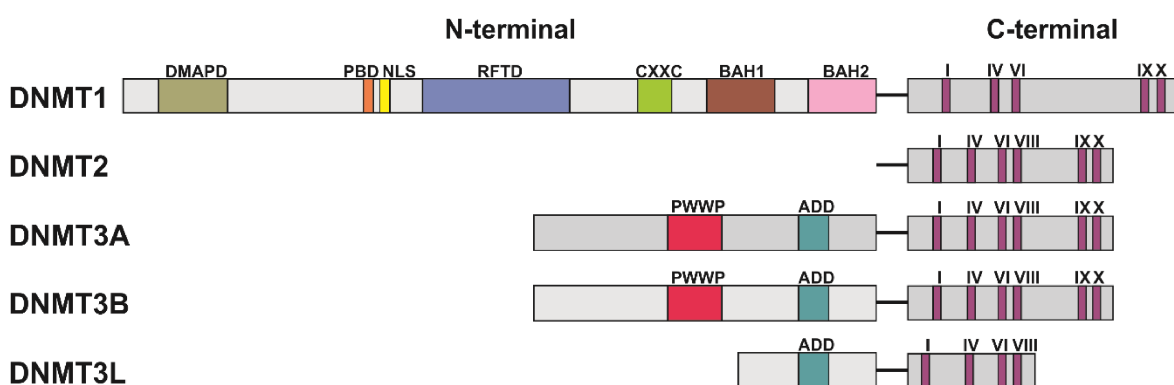


Figura 2. Representação da estrutura das DNA metiltransferases. DMAPD - DNA methyltransferase associated protein 1 interacting domain; PBD - Binding domain; NLS - Nuclear localization signal; RFTD - Replication foci targeting domain; CXXC - Domain CXXC; BAH1 e BAH2 - Bromo-adjacent homology domains 1 and 2; PWWP - Proline-tryptophan motif; ADD - ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. Domínios catalíticos na região C-terminal representados como I, IV, VI, VIII, IX e X. Adaptado de (HERVOUET et al., 2018) (JELTSCH; JURKOWSKA, 2016).

As DNMT3A DNMT3B e DNMT3L são responsáveis pela metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário e gametogênese (BOURC'HIS et al., 2001; OKANO et al., 1999). Por isso são altamente expressas em células indiferenciadas

e células germinativas, apesar de também estarem presentes em células somáticas em níveis mais baixos (JELTSCH; JURKOWSKA, 2016). Essas enzimas não apresentam nenhuma preferência significativa entre DNA hemi-metilado e não-metilado (GOWHER; JELTSCH, 2001; OKANO; XIE; LI, 1998). Além da metilação ocorrer predominantemente nas citosinas no contexto de dinucleotídeos CpG, essas enzimas também podem metilar o DNA em um contexto não-CpG (AOKI et al., 2001; RAMSAHOYE et al., 2000). As estruturas das proteínas DNMT3A e DNMT3B são muito semelhantes, sendo compostas por uma região N-terminal com domínio PWWP essencial para a ligação ao DNA, um domínio ADD rico em cisteína, que media uma interação proteína-proteína e uma região C-terminal responsável pela atividade catalítica (**Figura 2**) (HERVOUET et al., 2018) (JURKOWSKA et al., 2011).

Apesar da alta homologia de sequência, os fenótipos observados dos nocautes para as duas enzimas demonstram que estas possuem funções biológicas que não se sobrepõe. Em camundongos, a DNMT3A, juntamente com a DNMT3L, são necessárias para o estabelecimento adequado dos padrões de *imprinting* genômico durante a gametogênese (JURKOWSKA et al., 2011) (KANEDA et al., 2004). Enquanto isso, a DNMT3B é especificamente responsável pela metilação de regiões satélites menores centroméricas e pericentroméricas (JURKOWSKA et al., 2011; OKANO et al., 1999). Adicionalmente, em humanos, um estudo sugeriu que a DNMT3B também pode estar envolvida na metilação do retrotransposon LINE-1 (HE, Z.-M. et al., 2014). O recrutamento das enzimas DNMT3 para a cromatina durante a gametogênese e embriogênese pode ser controlado pelas histonas. O domínio ADD, presente nas três isoformas de DNMT3, é capaz de interagir com as caudas das histonas H3 não modificadas na lisina 4, sendo que a identificação da ausência de metilação na histona promove o recrutamento de DNMT3A/3B para se ligar à cromatina (HERVOUET et al., 2018; OOI et al., 2007; ZHANG, Y. et al., 2010). Isso indica que este domínio pode guiar a metilação do DNA em resposta a modificações específicas de histonas (JURKOWSKA et al., 2011).

Na estrutura da DNMT3L não estão presentes o domínio PWWP de ligação ao DNA e resíduos catalíticos importantes no domínio C-terminal (**Figura 2**)

(JURKOWSKA et al., 2011). Portanto, a DNMT3L não tem atividade catalítica, mas atua como um fator regulatório estimulando as DNMT3A/3B, mostrando capacidade de reconhecimento de cromatina (MARGOT; EHRENHOFER-MURRAY; LEONHARDT, 2003; WIENHOLZ et al., 2010). O estímulo da DNMT3L depende da interação dos domínios catalíticos das DNMT3A e 3B com o domínio C-terminal da DNMT3L (GOWHER et al., 2005; SUETAKE et al., 2004). Especificamente para a DNMT3A, a formação do complexo DNMT3L-DNMT3A leva a uma mudança na conformação da DNMT3A tornando sua estrutura mais aberta, e dessa forma, facilitando a ligação ao DNA. Após a ligação desse complexo ao DNA, a afinidade entre as duas enzimas é reduzida levando à liberação da DNMT3L (GOWHER et al., 2005).

A DNMT3L é expressa especificamente em células germinativas durante a gametogênese e durante os estágios embrionários iniciais (BOURC'HIS; BESTOR, 2004; HATA et al., 2002). Durante a espermatogênese, contribui para a aquisição de metilação em regiões de *imprinting* paterno, sequências de heterocromatina não pericêntricas e elementos de transposição (HATA et al., 2002; WEBSTER et al., 2005). Dessa forma, camundongos machos *knockout* para a DNMT3L mostraram reativação de retrotransposons, causando assim uma desordem na meiose, levando a perda de todas as células germinativas e tornando esses animais estéreis por não conseguirem produzir espermatozoides maduros (BOURC'HIS; BESTOR, 2004; WEBSTER et al., 2005). A perda dessa enzima em ovócitos leva à hipometilação específica de genes maternalmente *imprinted*, resultando em sua expressão bialélica (BOURC'HIS et al., 2001).

Além dessas principais DNA metiltransferases que já estão identificadas em várias espécies, uma nova DNA metiltransferase denominada DNMT3C foi recentemente identificada no genoma de roedores, sendo que essa enzima possui um papel essencial na metilação de retrotransposon em linhas germinativas masculinas (BARAU et al., 2016; JAIN et al., 2017).

1.5 Maquinaria enzimática para desmetilação do DNA

Inversamente ao processo de metilação do DNA, existe uma atividade de desmetilação do DNA que ocorre nas células de mamíferos (GEHRING; REIK; HENIKOFF, 2009). A desmetilação do DNA se deve à retirada do grupo metil que

está ligado ao DNA, e isto pode ocorrer de duas formas, passiva ou ativa. A desmetilação passiva ocorre quando a célula perde a maquinaria de metilação de manutenção, ou seja, as fitas de DNA recém-sintetizadas durante a replicação não são metiladas, resultando na diminuição de 5mC a cada ciclo de replicação do DNA (WU; ZHANG, 2017). Já o processo de desmetilação ativa é realizado por um mecanismo enzimático (GUO, J. U. et al., 2011).

A família das *Ten-eleven translocation* (TET), que inclui TET1, TET2 e TET3, desempenha um papel importante no processo de desmetilação ativa. Essas enzimas oxidam o grupo metil convertendo 5-metilcitosina (5mC) sequencialmente em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC) (HE, Y. F. et al., 2011; ITO et al., 2010; ITO et al., 2011; TAHILIANI et al., 2009). As bases oxidadas 5fC e 5caC podem ser reconhecidas pela proteína de reparo DNA timina glicosilase e substituídas por uma citosina não modificada por meio da via de reparo por excisão de base (HARDWICK; LANE; BROWN, 2018). A desmetilação ativa do DNA, portanto, ocorre devido a uma série de reações químicas que modificam a 5mC e o produto final é reconhecido pela via de reparo de DNA para substituir a base modificada por uma citosina (MOORE, L. D. et al., 2013; WEBER et al., 2016; WU; ZHANG, 2017). Além disso, essas enzimas também atuam na oxidação de 5mC somente a 5hmC, como é possível observar pela alta abundância de 5hmC em alguns tecidos (DOEGE et al., 2012; HAHN et al., 2013). Devido a uma perda passiva de 5hmC, esses níveis são diluídos no genoma após cada ciclo de replicação (INOUE; ZHANG, 2011).

A família das enzimas TET compartilha um alto grau de homologia dentro de seu domínio catalítico C-terminal, na qual contém um domínio de hélice- β de cadeia dupla (*double-stranded β -helix* - DS β H), um domínio rico em cisteína e locais para ligação dos co-fatores Fe (II) e 2-oxoglutarato, que juntos formam o núcleo catalítico (RASMUSSEN, KASPER DINDLER; HELIN, 2016; TAHILIANI et al., 2009). No domínio N-terminal de TET1 e TET3 é encontrado o domínio de dedo de zinco CXXC, sendo que em TET2 este domínio é perdido (**Figura 3**) (TAN; SHI, 2012).

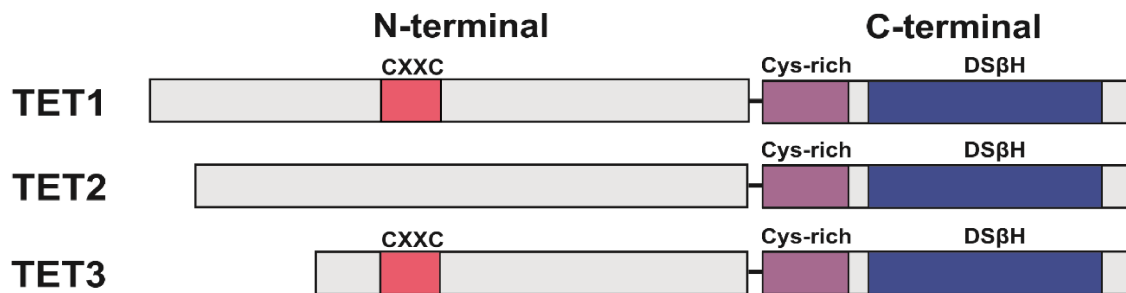


Figura 3. Representação da estrutura das enzimas TETs. CXXC - CXXC domain; Cys-rich - Cysteine rich domain; DSβH - Double-stranded β-helix Adaptado de (KOHLI; ZHANG, 2013; YIN; XU, 2016).

Análises bioquímicas indicam que o domínio CXXC de TET1 se liga ao DNA em CpG metiladas e não metiladas (XU et al., 2011). Enquanto um outro estudo indicou que o domínio CXXC de TET3 se liga preferencialmente em citosinas não metiladas em contexto CpG ou não-CpG (XU et al., 2012). O domínio CXXC de TET1 pode se ligar em CpG não metilada dificultando o acesso das DNMTs. A ligação em CpG metiladas, em um estado de eucromatina, permite que a enzima converta 5mC a 5hmC (XU et al., 2011), enquanto que em regiões ricas em CpGs metiladas, em um estado heterocromático, a acessibilidade de TET1 está bloqueada (XU et al., 2011). Como a enzima TET2 não apresenta este domínio, para exercer sua função ela associa-se à IDAX (*Inhibition Of The Dvl And Axin Complex*), uma proteína independente contendo o domínio CXXC (KO, M. et al., 2013).

A desmetilação ativa do DNA nos estágios iniciais do desenvolvimento é dependente de TET3, visto que sua expressão em ovócitos e zigotos é alta (GU et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011). Dessa forma, TET3 parece mediar a desmetilação ativa do genoma paterno durante a embriogênese em estágios mais precoces (IQBAL et al., 2011). Por outro lado, TET1 e TET2 são mais expressas em células-tronco embrionárias, sendo essenciais para o controle da pluripotência e potencial de diferenciação celular (KOH et al., 2011; WALTER, 2011). Em conjunto, o triplo nocaute dessas enzimas (Tet1/2/3) leva ao silenciamento de genes específicos e como consequência a redução do potencial de desenvolvimento de células-tronco embrionárias (DAWLATY et al., 2014). As proteínas TET também são altamente expressas no cérebro, com funções

importantes no desenvolvimento do sistema nervoso (HAHN et al., 2013; KAAS et al., 2013). Além disso, a atividade dessas enzimas está envolvida em importantes mecanismos de supressão de tumores. TET2 é um dos genes frequentemente mutados em malignidades hematopoiéticas (RASMUSSEN, KASPER D et al., 2015). Portanto, a metilação e desmetilação do DNA são processos epigenéticos dinâmicos que regulam a expressão gênica sendo essenciais para o desenvolvimento (HOANG et al., 2017).

1.6 Imprinting genômico

O *imprinting* genômico resulta na expressão monoalélica de genes dependendo de sua origem parental (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014). As marcas *imprinting* são caracterizadas por um padrão de metilação diferencial no DNA que ocorrem nas chamadas regiões diferencialmente metiladas da linhagem germinativa (gDMR), que são classificadas em transientes (tDMR) e *imprinted* (iDMR). As marcas de *imprinting*, ou seja, o padrão de metilação das gDMRs é estabelecido durante a gametogênese, na primeira onda de reprogramação epigenética (MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. W., 2014)

Os genes que possuem essa marca, os genes *imprinted*, possuem um papel importante durante o desenvolvimento placentário e crescimento fetal (GUNTRUM; VLASOVA; DAVIS, 2017). De acordo com a “hipótese do conflito parental”, o *imprinting* genômico evoluiu em mamíferos criando um conflito entre os interesses dos genes maternos e paternos na distribuição de recursos à prole (MOORE, T.; HAIG, 1991; PERVJAKOVA et al., 2016). Outra teoria, chamada de “bomba-relógio ovariana” sugere que a evolução do *imprinting* ocorreu para evitar o desenvolvimento de embriões partenogênicos dentro do ovário, protegendo a fêmea de doenças trofoblásticas ovarianas (VARMUZA; MANN, 1994). Dessa forma, o estabelecimento de marcas *imprinting* permite um balanço da expressão dos genomas materno e paterno, sendo isso crucial para o desenvolvimento embrionário (GUNTRUM et al., 2017).

1.7 Reprogramação epigenética no desenvolvimento inicial

A reprogramação epigenética durante o desenvolvimento inicial em mamíferos ocorre em dois diferentes estágios de desenvolvimento (MAYER et al.,

2000). A primeira onda acontece durante a gametogênese, a partir da formação das células germinativas primordiais (CGP) ainda na fase fetal (REIK; DEAN; WALTER, 2001). Nesse estágio, inicia-se uma perda do padrão de metilação global DNA, inclusive nas regiões *imprinted*. Essa desmetilação do DNA envolve a oxidação de 5mC a 5hmC seguido por uma perda passiva de 5hmC por meio da replicação do DNA (HILL, P. W.; AMOUROUX; HAJKOVA, 2014). Após a desmetilação, ocorre uma subsequente metilação *de novo* nas células precursoras dos gametas, com o estabelecimento de novos padrões *imprinted*, específicos de acordo com o sexo do indivíduo (**Figura 4**) (LEE, J. et al., 2002; UNGERER; KNEZOVICH; RAMSAY, 2013).

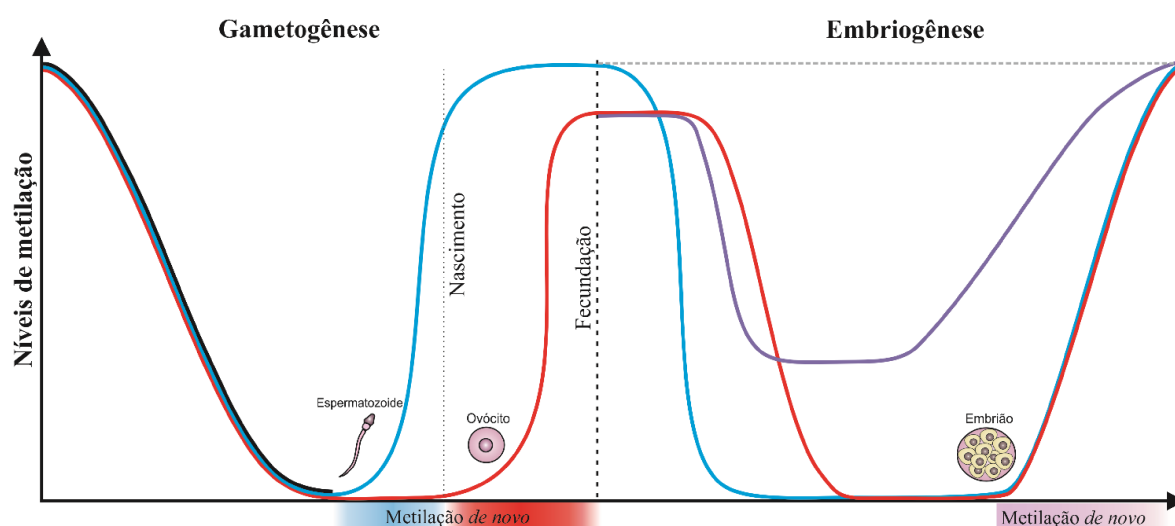


Figura 4. Dinâmica de metilação do DNA em bovinos durante a reprogramação epigenética em células germinativas e embriões. Gametogênese: Nas células primordiais germinativas, os genomas paterno e materno (linhas azul e vermelha, respectivamente) sofrem uma desmetilação global do genoma, inclusive também nas gDMRs (linha preta). Em fetos machos, a metilação *de novo* começa ainda durante a vida fetal e ao nascimento o genoma paterno já tem um alto nível de metilação (linha azul). Em fêmeas, a aquisição da metilação *de novo* inicia-se sempre que um ovócito é recrutado para prosseguir na ovogênese, mas só se completa após a puberdade, com estímulos hormonais adequados (linha vermelha). Embriogênese: Após a fecundação e antes da replicação do DNA, as enzimas TET desmetilam ativamente o genoma paterno (linha azul), enquanto que o genoma materno é desmetilado após várias divisões celulares por um mecanismo passivo (linha vermelha). Em embriões bovinos, a metilação *de novo* dos dois genomas parentais começa em torno do estágio de 8-16 células. A linha roxa representa os embriões clones, mostrando que após a transferência nuclear ocorre uma ineficiente perda de metilação e a metilação *de*

novamente iniciando-se precocemente. A linha cinza tracejada no topo representa as iDMRs que são protegidas da desmetilação global. O gráfico não está representado em escalas e não mostra a proporção exata de metilação. Fonte: a autora (2018).

Durante a gametogênese, as CGP masculinas e femininas seguem caminhos divergentes em direção à maturação dos gametas, que resultam na produção de epigenomas distintos (MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. W., 2014). Nos fetos femininos, após a desmetilação, as CGP param de se multiplicar por mitose, iniciam a meiose e permanecem retidas na prófase I até a puberdade, quando a estimulação hormonal ovulatória leva à conclusão da primeira divisão meiótica (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; EWEN; KOOPMAN, 2010). Já nos fetos masculinos, as CGP se multiplicam por mitose formando as proespermatogônias, que diferente dos ovócitos, não entram em meiose I até o início da puberdade (EWEN; KOOPMAN, 2010). Nesse estágio, as proespermatogônias começam a receber a metilação *de novo* no DNA (TANG et al., 2014). Assim, ao nascimento, as proespermatogônias têm seu padrão específico de metilação quase completamente estabelecido, enquanto os ovócitos estão com níveis baixos de metilação (MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. W., 2014). Esta dinâmica de metilação pode ser vista na **Figura 4**, na qual a metilação *de novo* ocorre em períodos diferentes nas duas linhagens germinativas (FERGUSON-SMITH; SURANI, 2001; MACDONALD, W. A.; MANN, M. R., 2014; REIK et al., 2001).

A segunda onda de reprogramação epigenética ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial, quando ocorre a perda de metilação do DNA mas algumas regiões *imprinted* do genoma não são afetadas (DEAN et al., 2003; SMALLWOOD; KELSEY, 2012). As iDMRs são as regiões protegidas dessa onda de desmetilação após a fecundação (PROUDHON et al., 2012; SMALLWOOD; KELSEY, 2012; THAKUR et al., 2016), enquanto que as tDMRs são reprogramadas (PROUDHON et al., 2012). Os dois genomas parentais sofrem desmetilação global do genoma durante a embriogênese inicial, mas de forma diferente. O genoma paterno é desmetilado por um mecanismo ativo, iniciado imediatamente após a fecundação e antes da replicação do DNA (IQBAL et al., 2011). Tem sido sugerido que a desmetilação do pronúcleo masculino ocorre

devido a atividade de TET3, que oxida 5mC a 5hmC, seguida por uma perda passiva de 5hmC por meio da replicação do DNA (INOUE; ZHANG, 2011). Em combinação com o achado acima, foi demonstrado que o DNA hemi-hidroxilado não é eficientemente reconhecido pela DNMT1 como substrato (VALINLUCK; SOWERS, 2007). Por outro lado, a desmetilação do genoma materno ocorre mais tardiamente, por um mecanismo passivo depende de replicação (**Figura 4**) (MAYER et al., 2000; OSWALD et al., 2000). Acredita-se que a 5mC no pronúcleo materno está protegida da desmetilação ativa pela proteína PGC7/Dppa3/Stella2 (BAKHTARI; ROSS, 2014; IQBAL et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011). No entanto, alguns estudos relataram uma desmetilação ativa em uma proporção significativa do genoma materno (GUO, F. et al., 2014; WANG, L. et al., 2014).

O mecanismo ativo de desmetilação é realizado pelas enzimas TETs (WOSSIDLO et al., 2011). Dentre as TETs, a TET3 é a principal enzima a atuar no processo de desmetilação ativa no genoma do embrião bovino (GU et al., 2011; PAGE-LARIVIERE; SIRARD, 2014). Já o mecanismo passivo de desmetilação ocorre devido à retenção da enzima DNMT1 no citoplasma (CARDOSO; LEONHARDT, 1999; LODDE et al., 2009; UYSAL; OZTURK; AKKOYUNLU, 2017). Após a desmetilação do DNA, o processo de metilação *de novo* começa no estágio de 8-16 células em embriões bovinos, coincidindo com a ativação de genoma embrionário (**Figura 4**) (REIK; WALTER, 2001; YANG et al., 2007).

Em embriões clones, a reprogramação epigenética durante a embriogênese frequentemente não ocorre de forma eficiente. Embora ocorra uma perda dos níveis de metilação do DNA nesses embriões, essa perda é menos substancial do que ocorre normalmente (PEAT; REIK, 2012). Isso talvez ocorra porque o núcleo somático contenha a isoforma somática da DNMT1 (DNMTs), que é capaz de manter os níveis de metilação (REIK et al., 2001; SONG et al., 2017). Além disso, a metilação *de novo* ocorre precocemente, o que resulta em uma desregulação global da reprogramação epigenética (**Figura 4**) (YANG et al., 2007). Essa desregulação na reprogramação epigenética deve ocorrer porque o processo de clonagem por transferência nuclear é um processo atípico para o ovócito. No processo natural, o ovócito é fecundado por um espermatozoide, que possui um padrão epigenético que é reconhecido por ele. Enquanto que, na clonagem as

células somáticas doadoras de núcleo são células diferenciadas, ou seja, já possuem um padrão de metilação característico de sua origem, que é diferente do padrão dos gametas. Portanto, quando um núcleo somático é inserido em um ovócito enucleado este não o reconhece, e então, a reprogramação epigenética não ocorre de forma correta. Corroborando essas informações, a avaliação do perfil de metilação de DNA em embriões clones de camundongos mostrou um perfil mais semelhante ao fibroblasto doador do núcleo que de um zigoto (CHAN et al., 2012). Essa reprogramação errônea causa mudanças na expressão gênica de vários genes importantes para o desenvolvimento embrionário, e que consequentemente, leva a alta incidência de anormalidades nos tecidos extraembrionários (PARK, J. Y. et al., 2009; WANG, D. et al., 2014). De acordo com isso, estudos já identificaram vários genes diferencialmente expressos em embriões e tecidos extraembrionários de bovinos clones (BIASE et al., 2016; MIN et al., 2015). Portanto, para que os embriões clones se desenvolvam normalmente a célula doadora diferenciada deve perder toda sua memória e se desdiferenciar para um estado totipotente, para que a reprogramação epigenética ocorra de forma eficiente e possibilite a formação de um novo indivíduo.

Como descrito, um correto estabelecimento de todos os eventos epigenéticos envolvidos nos primeiros estágios de desenvolvimento são de extrema importância para o desenvolvimento normal do embrião e feto. Nos clones, quando esses eventos não ocorrem corretamente, levam à alteração da expressão gênica que afeta vias importantes do desenvolvimento. Portanto, para que possamos compreender melhor como as alterações de reprogramação epigenética afetam o desenvolvimento embrionário e a viabilidade pós-natal em animais clones é importante e necessária uma investigação do perfil de expressão das enzimas relacionadas com a reprogramação epigenética durante todos os estágios do desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo quantificar os níveis de RNA mensageiro das enzimas envolvidas na reprogramação da metilação do DNA DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 na placenta (cotilédone fetal) de bezerros obtidos por transferência nuclear de células somáticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se os animais produzidos por diferentes técnicas (clonagem ou inseminação artificial) apresentam diferentes níveis de RNA mensageiro dessas enzimas.
- Avaliar se os níveis de RNA mensageiro dessas enzimas estão correlacionados com a sobrevivência pós-natal na primeira semana de vida dos animais clones.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra biológica

O Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-protocolo nº 078/16) da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, aprovou todos os procedimentos realizados.

Biópsias de pele foram coletadas cirurgicamente de dois animais Nelore (*Bos taurus indicus*) machos. Os fibroblastos foram cultivados *in vitro* e posteriormente utilizados em procedimentos de TNCS (Geneal Genética e Biotecnologia Animal, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Os embriões produzidos por TNCS foram transferidos para vacas receptoras e amostras de placenta (cotilédone fetal) de treze bezerros clonados (**Tabela 1**) foram coletadas durante os partos cesariana. Como controle, foram utilizadas amostras de placenta (cotilédone fetal) de três bezerros Nelore saudáveis (machos) produzidos por IA.

Na **Tabela 1** está descrito as principais alterações fenotípicas que afetam cada um dos clones, como: placentoma grande, edema de placenta, cordão umbilical grosso, tingimento de mecônio (indicação de sofrimento fetal) e síndrome do bezerro gigante (cria com o tamanho acima do normal). Os bezerros clones que não sobreviveram à primeira semana de vida foram considerados inviáveis, enquanto que os bezerros que sobreviveram além desse período foram considerados vivos. As amostras de placenta foram coletadas em triplicata durante as cesarianas, imediatamente congeladas em gelo seco e posteriormente armazenadas em *ultrafreezer* a -80°C até a extração do RNA.

Tabela 1. Lista dos animais estudados e seus fenótipos.

Animal doador de núcleo	Animais Clones	Identificação	Fenótipos	Alterações Fenotípicas
1	1	1.1	Inviável	Edema de placenta; Cordão umbilical grosso
1	2	1.2	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
1	3	1.3	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
1	4	1.4	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
1	5	1.5	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
1	6	1.6	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
2	7	1.7	Inviável	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio
1	8	2.1	Vivo	Placentoma grandes; Cordão umbilical grosso
1	9	2.2	Vivo	Nenhuma alteração
1	10	2.3	Vivo	Placentoma grande; Edema de placenta; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
1	11	2.4	Vivo	Placentoma grande; Edema de placenta; Tingimento de mecônio; Cordão umbilical grosso; Síndrome do bezerro gigante
2	12	2.5	Vivo	Nenhuma alteração
2	13	2.6	Vivo	Cordão umbilical grosso

3.2 Extração de RNA total

A extração do RNA total das 16 amostras de cotilédone fetal foi realizada utilizando o kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Inicialmente, cerca de 50-100 mg de amostra foi macerada em nitrogênio líquido. O pó resultante foi transferido para um microtubo de 1,5mL e adicionado 1mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para cada 50-100 mg de tecido. Os próximos passos do protocolo seguiram as recomendações do fabricante, optando-se pelo tratamento com 10U de DNase durante a extração do RNA (Anexo II). Ao final, o RNA total obtido foi quantificado e armazenado em *ultrafreezer* a -80°C.

3.3 Tratamento com DNase

As amostras de RNA total foram novamente tratadas com DNase imediatamente antes da síntese de cDNA. Foi realizado o tratamento para 1µg de RNA utilizando 1U da RQ1 RNase-Free DNase® (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C por 30 minutos. A solução de parada foi adicionada seguindo de um passo de incubação a 65°C por 10 minutos para a inativação da enzima. O protocolo foi seguido conforme as recomendações do fabricante.

3.4 Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase (1µg) foi submetido à síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para um volume final de 20µL de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas a 25°C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1µL de RNase H seguido de um passo de incubação a 37°C por 20 minutos. O material resultante foi armazenado a -20°C até o uso.

3.5 PCR em tempo real

Seis genes relacionados com a reprogramação da metilação do DNA foram selecionados para ter seus níveis de mRNA analisados por RT-qPCR. São eles, *DNA methyltransferase 1* (DNMT1), *DNA methyltransferase 3 alfa* (DNMT3A), *DNA*

methyltransferase 3 beta (DNMT3B), *Ten eleven translocation 1* (TET1), *Ten eleven translocation 2* (TET2) e *Ten eleven translocation 3* (TET3). As análises de RT-qPCR foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA), usando o Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O SYBR Green é uma das moléculas repórter fluorescente mais utilizadas para monitorizar o progresso da reação de amplificação, devido a sua ligação ao sulco menor de qualquer DNA dupla fita. Quando ocorre a excitação do corante SYBR Green ligado ao DNA este produz um sinal fluorescente muito mais forte do que quando o corante não está ligado. No entanto, como esse corante se acumula em qualquer DNA dupla fita, a curva de dissociação ou curva de *melting* é uma estratégia para avaliação da especificidade da reação.

A curva de *melting* consiste em aumentar gradualmente a temperatura (65°C a 95°C), e à medida em que o DNA é submetido a uma temperatura elevada ocorre a sua desnaturação, ou seja, a separação das duas fitas. Com isso, o SYBR Green que estava ligado ao DNA dupla fita formado durante a PCR começa a se perder, levando a uma redução da emissão de sua fluorescência. As temperaturas de *melting* são específicas para cada produto específico de PCR gerado, ou seja, cada *amplicon* possui uma temperatura de *melting* (T_m) específica que é usada para identificar o alvo. Além disso, a amplificação específica de um produto é caracterizada por um único pico na curva.

A determinação da eficiência de amplificação de cada par de iniciadores utilizados foi realizada por meio de uma curva de diluição seriada. Para isto, amostras de cDNA foram diluídas em H₂O nuclease-free de forma seriada (1:4), e foram utilizadas quatro diluições em duplicata como moldes para amplificação. As reações foram otimizadas para promover a eficiência máxima de amplificação para cada gene e foram utilizados pares de iniciadores com eficiências de amplificação entre 90-115%. Posteriormente, cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e pelo tamanho do *amplicon* em gel de agarose.

As reações de PCR foram preparadas utilizando-se 12,5µL de SYBR Green; 0,5µL do iniciador *forward* (0,2µM); 0,5µL do iniciador *reverse* (0,2µM); 1µL de cDNA e 10,5µL de H₂O *nuclease-Free*. As condições do PCR foram 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 30 segundos. As informações sobre os iniciadores como sua sequência, tamanho do *amplicon* e número de acesso ao *GenBank* estão descritos na **Tabela 2**.

Foram utilizados dois genes endógenos, *Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e β -*Actin* (ACTB) para a normalização dos dados. Para isso foi usado a média geométrica do Ct (*cycle threshold*) de ambos, bem como a média geométrica das suas eficiências. Como amostra referência foi utilizado o grupo controle (animais produzidos por IA), que recebeu então o valor de *ratio* igual a 1. A quantidade relativa de mRNA para cada gene foi calculada e comparada entre os grupos experimentais utilizando o método de $\Delta\Delta$ Ct, com correção da eficiência pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001).

Tabela 2. Identificação do gene, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb), eficiência dos iniciadores e número de acesso ao *Genbank*.

Genes	Sequências dos iniciadores	Tamanho <i>amplicon</i> (pb)	Eficiência de amplificação (%)	Número de acesso ao <i>GenBank</i>
DNMT1	F: 5' TTG GCT TTA GCA CCT CAT TTG CCG 3' R: 5' TCC TGC ATC ACG CTG AAT AGT GGT 3'	82	91,244	NM_182651.2
DNMT3A	F: 5' TTT CCA ATG TGC CAT GAC AGC GAC 3' R: 5' GGG CCC ACT CGA TCA TTT GTT TGT 3'	82	114,726	NM_001206502.1
DNMT3B	F: 5' CAA CAA GCA ACC AGA GAA TAA G 3' R: 5' CAA CAT CCG AAG CCA TTT G 3'	161	112,048	NM_181813.2
TET1	F: 5' GTA TGC TCC AGC TGC TTA TC 3' R: 5' CCA CTG TGC TCC CAT TAT TC 3'	167	108,166	XM_015469834.1
TET2	F: 5' GTA GGG ACA TTT CCT CCT TAT TC 3' R: 5' CAG CTG CAC TGT AGT TAT GG 3'	157	105,302	XM_010828077.2
TET3	F: 5' GTA ACC CAG GTG ATT CTG ATA C 3' R: 5' CAG CAG CCT ATC TGC TAA TC 3'	200	101,853	XM_015465317.1
GAPDH	F: 5' GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA 3' R: 5' CCC TCC ACG ATG CCA AAG T 3'	119	101,988	NM_001034034.2
ACTB	F: 5' GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA 3' R: 5' ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA 3'	134	109,929	NM_173979.3

F: iniciador *forward*; R: iniciador *reverse*

3.6 Análise Estatística

Inicialmente foi feita uma avaliação descritiva para todos os genes, e posteriormente, uma comparação da quantidade relativa de mRNA entre os grupos. Nesta primeira avaliação, um animal (2.5), foi identificado como um *outlier*. Devido a isso, este foi retirado das análises de comparação de expressão gênica entre os grupos.

As análises de comparação da expressão dos genes foram realizadas utilizando-se testes estatísticos paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos foi utilizada ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Para os dados não paramétricos foram utilizados o teste de *Mann-Whitney* para análise comparativa entre duas amostras, enquanto que para as comparações múltiplas se usou o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), considerando-se o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A especificidade dos ensaios de RT-qPCR pode ser observado devido a presença de um único pico nas curvas de *melting* para todos os genes analisados (Anexo I).

Uma análise descritiva, para cada animal clone individualmente, foi realizada para apresentar o comportamento de todos os genes estudados. Como os valores de expressão estão apresentados como *log fold change*, valores acima de 0 estão aumentados, enquanto que os valores abaixo estão diminuídos em relação ao grupo controle (**Figura 5**). Os clones que não sobreviveram foram identificados com os valores de 1.1 a 1.7, enquanto que os clones que sobreviveram foram identificados de 2.1 a 2.6 (**Figura 5**). Observa-se que o padrão de regulação *up* e *down* dos genes se mantém o mesmo para a maioria dos animais, com exceção de dois animais (2.4 e 2.5), na qual o padrão de comportamento dos genes se diferenciou dos demais (**Figura 5**).

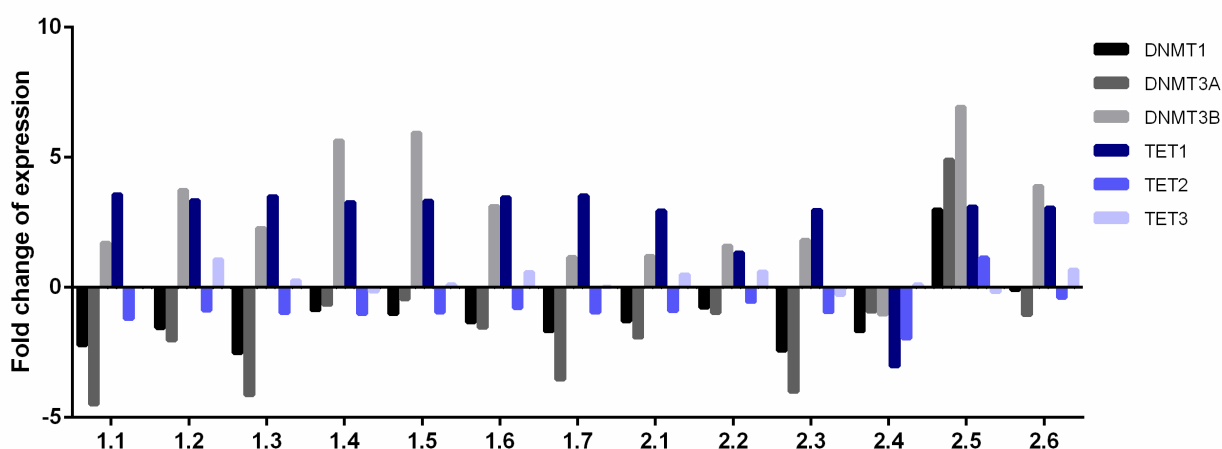


Figura 5. Valores de *fold change* para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 para cada animal clone individualmente em comparação ao grupo controle (valor 0). Numeração de 1.1 a 1.7 representa os animais clones que não sobreviveram, enquanto que de 2.1 a 2.6 representam os animais clones que sobreviveram.

Os mRNA para todos os genes avaliados, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 foram detectados em todas as amostras analisadas. A primeira comparação entre os níveis de mRNA para esses genes foi realizada entre os animais clones e os animais controle produzidos por IA.

A quantidade de transcritos para os genes DNMT1 e DNMT3A foi maior nos animais controle quando comparados aos animais clones ($p=0,0044$) (**Figura 6**). Diferentemente, para o gene DNMT3B, os níveis de transcritos foram maiores nos animais clones quando comparados aos controles ($p=0,0308$) (**Figura 6**). Para o gene TET1 a abundância relativa de mRNA foi maior nos animais clones ($p=0,0308$), enquanto que para TET2 os níveis foram maiores nos animais controle ($p=0,0044$) (**Figura 6**). Para o gene TET3, diferentemente dos outros genes, não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados (**Figura 6**).

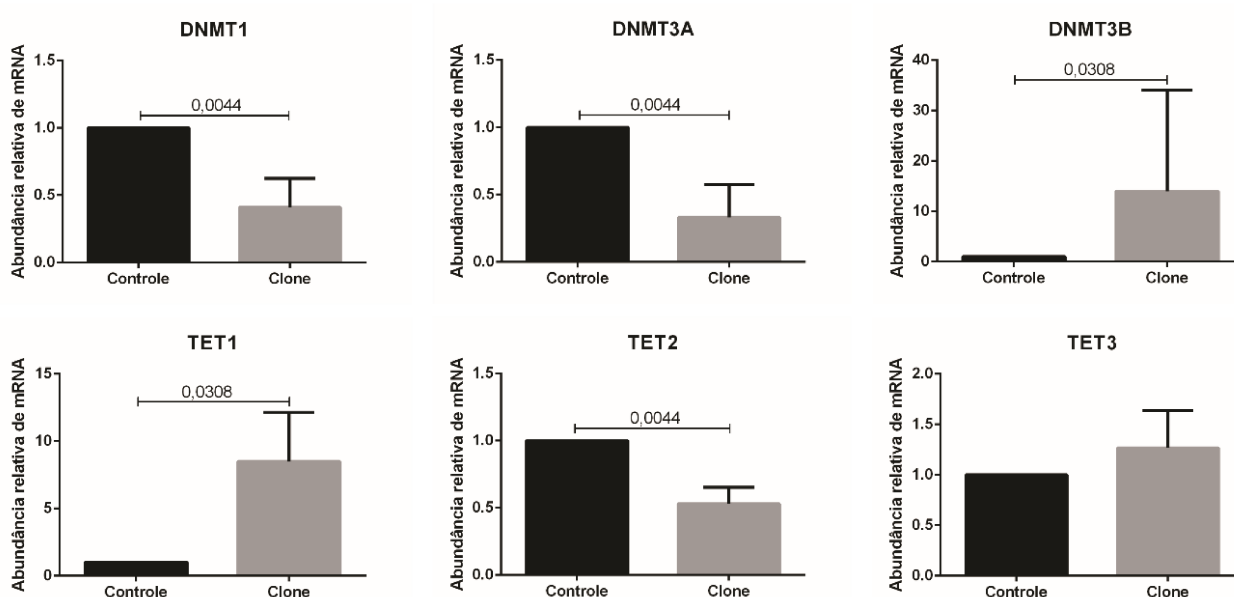


Figura 6. Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 quantificados por RT-qPCR em cotilédone (placenta) fetal bovino. Análise comparativa entre animais produzidos por inseminação artificial (controle) e animais produzidos por transferência nuclear de células somáticas (clone). Os dados foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

De acordo com a classificação dos animais clones, com relação aos seus fenótipos e à sobrevivência ou não na primeira semana de vida (**Tabela 1**), comparações múltiplas também foram realizadas com esses grupos para cada gene específico.

O grupo de animais clones que sobreviveram não apresentou diferenças para nenhum dos genes das DNMTs quando comparados com os animais controle e os animais clones que não sobreviveram (**Figura 7**). No entanto, para o gene

DNMT1, a abundância relativa de mRNA foi diferente entre os controles e os clones que não sobreviveram, no qual o grupo controle apresentou níveis de transcritos maiores em relação aos clones que não sobreviveram ($p=0,0244$) (**Figura 7**). Da mesma forma, para o gene DNMT3A, os níveis de mRNA foram maiores no grupo controle em comparação com o grupo dos clones que não sobreviveram ($p=0,0279$) (**Figura 7**). Os níveis de mRNA para o gene DNMT3B também apresentou diferença para os mesmos grupos, no entanto, ao contrário dos outros genes, os níveis de transcritos foram maiores no grupo dos clones que não sobreviveram em relação ao grupo controle ($p=0,0364$) (**Figura 7**).

Para o gene TET1, a abundância relativa de mRNA do grupo dos clones que não sobreviveram foi maior que para os outros dois grupos, clones que sobreviveram ($p=0,0344$) e grupo controle ($p=0,0103$) (**Figura 7**). Por outro lado, os níveis de mRNA para o gene TET2 foi diferente somente entre o grupo controle e o grupo dos clones que não sobreviveram, sendo que os níveis maiores para esse gene foram encontrados no grupo controle ($p=0,0184$) (**Figura 7**). Já para o gene TET3 nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos analisados (**Figura 7**).

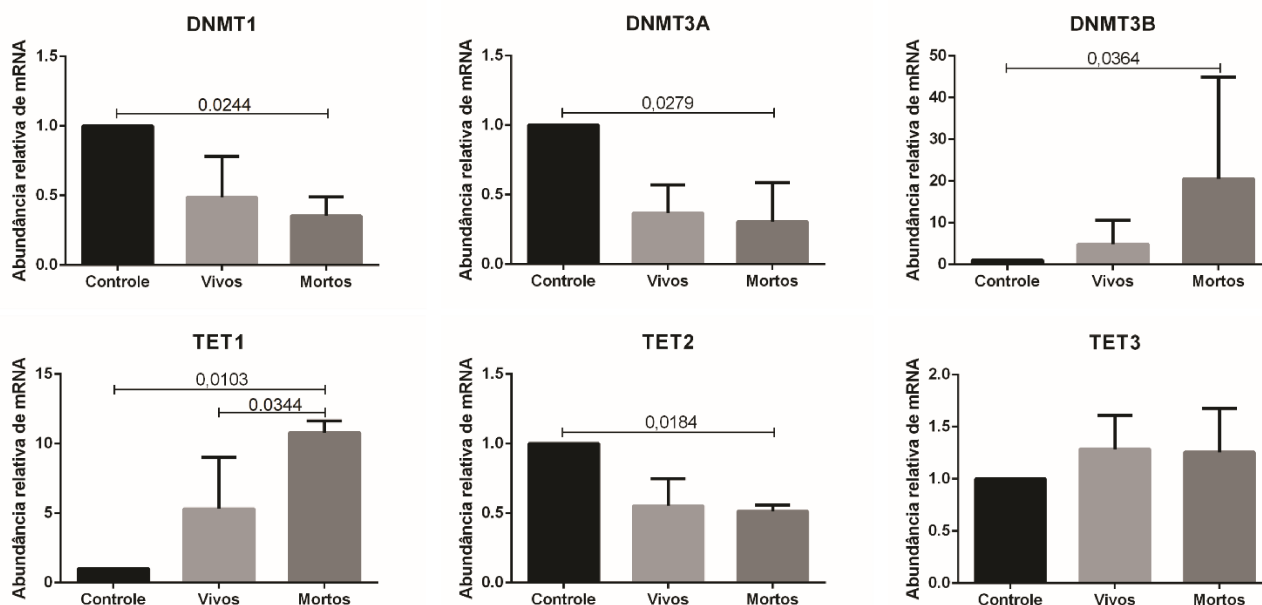


Figura 7. Quantidade relativa de mRNA para os genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 quantificados por RT-qPCR em cotilédone (placenta) fetal bovino. Análise comparativa entre os animais produzidos por inseminação artificial (controle), clones que sobreviveram à primeira semana de vida (vivos) e clones que não sobreviveram à primeira

semana de vida (inviáveis). Os dados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Comparando-se os níveis de mRNA entre as diferentes isoformas das DNMTs observa-se que os níveis de mRNA de DNMT3B foram maiores que para DNMT1 ($p=0,0006$) e DNMT3A ($p=0,0001$) (**Figura 8**). Com relação às TETs, os níveis de mRNA de TET1 foram maiores que para TET2 e TET3 ($p=0,0001$). Dessa forma, é possível observar que existe um predomínio da expressão de DNMT3B e TET1 nas placentas dos animais clones (**Figura 8**). Diferente do que é observado na placenta dos animais controle, na qual o predomínio é somente da isoforma TET2 (**Figura 8**).

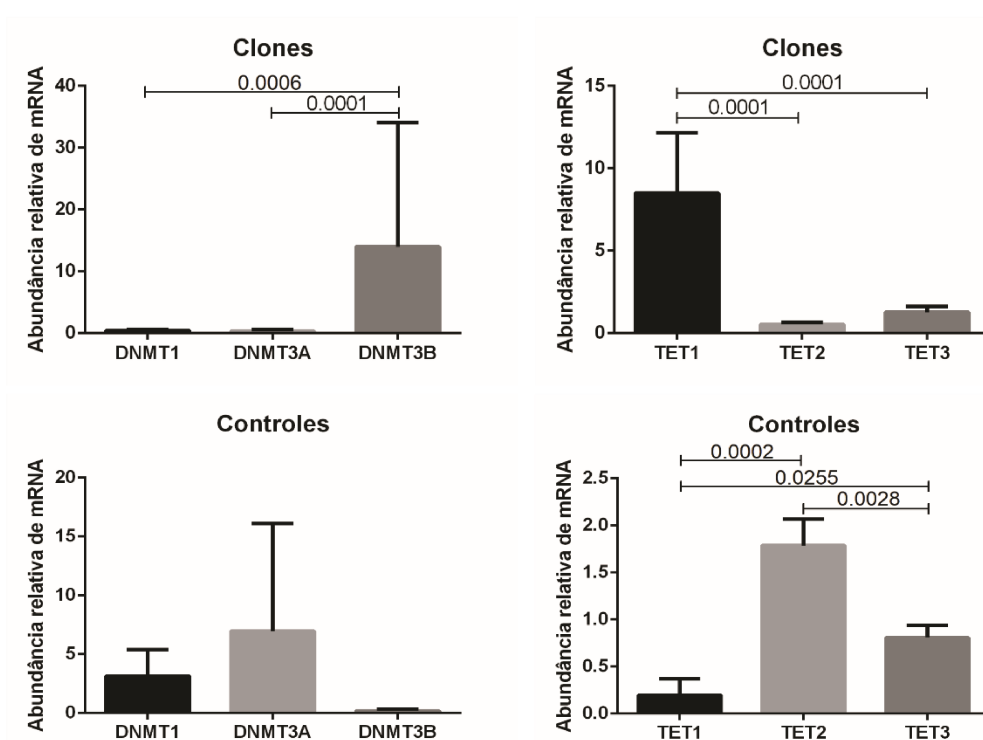


Figura 8. Quantidade relativa de mRNA nos animais clones e controles em uma análise comparativa entre as DNMTs e TETs. Os dados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* para as DNMTs e ANOVA para as TETs. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Animais produzidos pela técnica de TNCS frequentemente apresentam alterações fenotípicas, possivelmente devido à expressão alterada de genes importantes para o desenvolvimento. A principal causa dessas alterações na expressão gênica e consequentemente das anormalidades de desenvolvimento apresentadas por esses animais é uma incompleta reprogramação epigenética do genoma da célula somática doadora de núcleo. Dentre as modificações epigenéticas que podem ser alteradas está o padrão de metilação do DNA. Estudos já demonstraram que a reprogramação anormal do perfil de metilação do DNA é encontrada em embriões, fetos e placentas de clones (ARNOLD et al., 2006; EVERTS et al., 2008; SU, J.-M. et al., 2011).

A expressão das enzimas relacionadas com a reprogramação epigenética, especificamente relacionadas à metilação de DNA, já foi avaliada na placenta de camundongos (RAKOCZY et al., 2017), suínos (KO, Y.-G. et al., 2014) e humanos (HE, Z.-M. et al., 2014; ROBERTSON et al., 1999). Em bovinos, no entanto, ainda existe pouca informação na literatura sobre a expressão dessas enzimas em placenta, principalmente em placenta de bovinos clones. Devido a isso, muitas informações de outras espécies de mamíferos são utilizadas para tentar entender o comportamento dessas enzimas em bovinos.

Alterações do perfil de metilação durante a reprogramação epigenética em embriões e fetos clones pode levar a uma expressão gênica global alterada. Em estágios iniciais do desenvolvimento do embrião, alterações do perfil de expressão gênica já vem sendo descrita. No estágio de pré-implantação, o conceito bovino produzido por TNCS apresenta uma desregulação do transcriptoma, no qual mais de 5000 genes foram diferencialmente expressos quando comparados com animais controles produzidos por IA (BIASE et al., 2016). Além disso, em bovinos a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do trofotoderma é diferente entre embriões produzidos *in vitro* (PIVE) e por TNCS (MIN et al., 2015). Esses resultados são corroborados por BIASE et al. (2016) e SALILEW-WONDIM et al. (2013), que mostraram alterações do transcriptoma na placenta de clones. Além disso, expressão alterada de micro-RNAs também já foi mostrada em placenta de bovinos produzidos por TNCS (HOSSAIN et al., 2014; SU, JIANMIN et al., 2015).

Como descrito nos estudos acima, é consenso na literatura de que os animais clones possuem problemas de reprogramação epigenética e expressão gênica. Entretanto, existem comportamentos variados entre os animais. Devido a esse aspecto particular, a primeira análise qualitativa foi realizada por animal, na qual observamos que o mesmo padrão de expressão dos genes em relação ao controle foi mantido na maioria dos animais clones (**Figura 5**). No entanto, dois desses animais (2.4 e 2.5) apresentaram um padrão diferente (**Figura 5**). Com isso, pode-se aferir que a desregulação da expressão gênica de cada clone individualmente pode apresentar padrões de expressão distintos.

Em outras espécies, essas alterações da expressão gênica associada à TNCS também são encontradas. Análises de microarranjo em placentas de camundongos clones encontraram 206 genes com expressão aberrante em relação aos controles (SIM et al., 2017). Em suínos, a expressão gênica também é alterada nos tecidos extraembrionários de animais provenientes de TNCS quando comparado aos controles (CHAE et al., 2009; PARK, M.-R. et al., 2013). Por exemplo, nesses tecidos, a enzima DNMT1 é altamente expressa nos controles quando comparada com os clones (KO, Y.-G. et al., 2014). Em contraste, a expressão de DNMT3A e DNMT3B é alta nos suínos provenientes de TNCS e baixa nos controles (KO, Y.-G. et al., 2014). Apesar dos dados serem em suínos, estes estão em concordância com os resultados desse trabalho, nos quais detectamos maiores níveis de DNMT1 nos controles e maiores níveis de DNMT3B nos clones, no entanto, para DNMT3A os resultados são discordantes. Da mesma forma, os menores níveis de DNMT1 encontrados na placenta dos clones nesse trabalho corroboram com os baixos níveis de transcrição de DNMT1 encontrados em embriões bovino clones (GOLDING et al., 2011). Estes níveis mais baixos de mRNA para a DNMT1 e DNMT3A observados nos clones (**Figura 6**) pode sugerir que a desregulação dessas enzimas está relacionada a um estado hipometilado da placenta de clones, como foi encontrado para os genes *imprinted* SNRPN, H19 e IGF2R (SMITH et al., 2012) e em regiões repetitivas (satellite I) (dados de nosso laboratório sob revisão para publicação). Além disso, análises em outros tecidos de fetos bovinos clones também apresentam níveis globais de citosinas metiladas diminuídos (CEZAR et al., 2003).

Além da função de metilação de manutenção global do DNA, a DNMT1 também é necessária para a manutenção da metilação de regiões *imprinted* (WEI et al., 2011). Portanto, alteração nos níveis de DNMT1 nos clones é um fator importante que pode afetar o desenvolvimento embrionário, como é visto em embriões clones mutante nulo para DNMT1, que não conseguem se desenvolver a termo e chegam somente até o estágio de blastocisto (GOLDING et al., 2011). Assim como a DNMT1, a enzima DNMT3A também possui um papel importante na metilação de genes *imprinted* (KANEDA et al., 2004), que são fundamentais para o desenvolvimento placentário. Devido a isso, alterações no padrão de expressão desses genes pode levar a problemas desde o período do desenvolvimento inicial, até o período pós-parto. Portanto, de acordo com os esses resultados, nos quais encontramos menores níveis de DNMT1 e DNMT3A nas placentas dos clones (**Figura 6**), e a função dessas enzimas, estudos também identificaram alterações no controle do *imprinting* genômico. Em embriões bovinos produzidos por TNCS, uma região de controle do gene *imprinting* H19 se mostrou hipometilada em relação ao controle (ZHANG, S. et al., 2016). Além disso, em várias espécies a alteração de genes *imprinted* é encontrada em placenta de animais clones. Em suínos, a expressão de 18 genes *imprinted* com papel importante no desenvolvimento embrionário estavam alterados na placenta de clones (ZHANG, X. et al., 2014).

Visto isso, além da quantidade de mRNA para a DNMT1 e DNMT3A estarem diminuídas nos clones (**Figura 6**), quando a análise é realizada comparando-se os controles com os clones que sobreviveram e os que não sobreviveram, a diferença é entre os controles e os clones que não sobreviveram (**Figura 7**). Em concordância com esses resultados, estudos relatam que clones que não sobreviveram apresentaram-se com expressão de quatro genes *imprinted* (IGF2, H19, PEG3, GRB10) diminuída na placenta quando comparados com clones que sobreviveram e animais controle (WEI et al., 2010). Da mesma forma, o gene *imprinted* IGF2 se mostrou hipometilado na placenta de bezerros clones que não sobreviveram (SU, J. et al., 2014). Essa perda do *imprinting* correto também foi detectada em vários tecidos de clones que não sobreviveram (ZHANG, SHOUQUAN et al., 2004).

Em concordância com esses resultados da literatura mostrando que animais clones que não sobreviveram apresentaram padrões aberrantes de expressão

gênica e metilação de DNA, os resultados desse trabalho mostrou níveis de mRNA significativamente alterados para todas as três formas de DNMTs nos clones que não sobreviveram quando comparados aos controles (**Figura 7**). Portanto, é possível observar que os clones que sobrevivem não são apenas fenotipicamente normais, mas também semelhantes aos controles no nível molecular (**Figura 7**). Esses resultados indicam que as alterações epigenéticas encontradas nesse estudo podem estar associadas à viabilidade de animais clones, podendo ser utilizado como uma potencial ferramenta de diagnóstico para a sobrevivência pós-natal.

Diferente do papel descrito para as outras DNA metiltransferases, a DNMT3B é especializada na metilação de partes específicas do genoma, como sequências repetitivas (OKANO et al., 1999). Essa função específica da DNMT3B está mais bem documentada em camundongos (OKANO et al., 1999). Portanto, é necessário extrapolar para a espécie de estudo devido à escassez de informações. Dessa forma, de acordo com os resultados nos quais maiores níveis de mRNA do gene DNMT3B foi encontrado em clones (**Figura 6**), uma análise de metilação global em embriões bovinos clones demonstrou que genes de pluripotência (POU5F1 e NANOG) e regiões de DNA repetitivo (satélite I e α -satélite) estão hipermetilados nos embriões clones (ZHANG, S. et al., 2016). Além disso, regiões repetitivas α -satélite apresentaram-se hipermetiladas em tecidos extraembrionários (COULDREY; WELLS, 2013). No entanto, uma análise da região repetitiva α -satélite em cotilédone fetal bovino de clones não demonstrou diferenças de metilação, enquanto que, a região satélite I se mostrou hipometilada em relação aos controles (dados de nosso laboratório sob revisão para publicação). Da mesma forma, enquanto nesse trabalho foi identificado níveis maiores de mRNA para o gene DNMT3B nos clones que não sobreviveram (**Figura 7**), um estudo demonstrou que a metilação na placenta de clones que sobreviveram foi maior em comparação com clones que não sobreviveram, para a região satélite I (dados de nosso laboratório sob revisão para publicação). Considerando-se esses resultados aparentemente contraditórios, vale ressaltar que cada clone individualmente pode apresentar padrões de expressão e epigenéticos distintos, como é possível observar na análise dos clones individuais (**Figura 5**). Além disso, observa-se que

dentre as DNMTs, a DNMT3B é aquela que possui os maiores níveis de mRNA nas placentas de bovinos clones (**Figura 8**). Portanto, apesar das particularidades dos animais clones, essa alta expressão pode sugerir que a DNMT3B possua um papel importante que não esteja bem caracterizado na placenta de bovinos clones.

Além das DNMTs, as enzimas da família TET também participam do processo de reprogramação da metilação do DNA, atuando no mecanismo de desmetilação do DNA, sendo assim também essenciais para a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento. Nesse trabalho os resultados mostraram maiores níveis de mRNA para TET1 nos clones, enquanto que TET2 foi maior nos controles (**Figura 6**). Extrapolando para outras espécies, esses achados podem estar relacionados com o papel dinâmico que essas enzimas desempenham na regulação da atividade transcricional na placenta de camundongos e humanos (RAKOCZY et al., 2017). Além disso, estudos recentes em humanos identificaram que a expressão de TET2 e TET3 são mais abundantes nas placentas comparados a outros tecidos (HERNANDEZ MORA et al., 2018).

Os resultados desse trabalho demonstraram que, os níveis maiores de TET1 em conjunto com os menores níveis de DNMT3A/3B na placenta de bovinos clones (**Figura 6**), podem estar relacionados com os baixos níveis de metilação encontrado em placentas de clones (SU, J. et al., 2014). No entanto, ao contrário de TET1, os níveis de mRNA de TET2 foram menores nos clones quando comparados ao controle (**Figura 6**), demonstrando a expressão dinâmica dessas enzimas em placenta de bovinos.

Diferente das outras TETs, a expressão alta de TET3 em ovócitos e zigotos demonstra um papel fundamental dessa enzima nos primeiros estágios de desenvolvimento (GU et al., 2011). No entanto, sua importância em estágios mais tardios ainda não foi demonstrada (TAN; SHI, 2012). Nas análises desse trabalho não foi identificada nenhuma diferença significativa nos níveis de mRNA de TET3 entre os controles e os clones, bem como entre os clones que não sobreviveram, os que sobreviveram e os controles (**Figuras 6 e 7**). Esses resultados podem sugerir que essa isoforma talvez não tenha um papel fundamental no desenvolvimento placentário, pelo menos nesse estágio da gestação, e que a técnica de TNCS não afeta sua expressão.

Nesse trabalho os resultados mostraram que nenhum gene apresentou diferença significativa nos níveis de transcritos entre os animais clones que não sobreviveram e os que sobreviveram, exceto para a TET1 (**Figura 7**). Além disso, dentre as TETs, TET1 é o gene com maior quantidade de mRNA na placenta (**Figura 8**). Isto demonstra que os altos níveis de mRNA de TET1 podem ter um papel importante na placenta de bovinos. Além disso, se os níveis de transcrito desse gene diferem entre os clones viáveis e os não viáveis, como foi mostrado nesse estudo (**Figura 7**), este resultado sugere a TET1 como uma potencial ferramenta de diagnóstico para viabilidade de clones.

Além disso, os resultados desse trabalho mostram que existe uma diferença nos níveis de transcritos entre os animais clones que não sobreviveram e os controles (**Figura 7**), demonstrando que é essencial um controle transcricional correto dessas enzimas para a sobrevivência dos clones. Dessa forma, sugere-se que os animais clones que sobrevivem são aqueles que possuem um perfil de expressão da maquinaria enzimática relacionada com a reprogramação epigenética mais próximo do perfil apresentado pelos animais produzidos por inseminação artificial.

De forma geral, é válido ressaltar que esses resultados corroboram com a literatura ao demonstrar que os principais genes relacionados com a reprogramação da metilação do DNA estão desregulados. Independente se os níveis de mRNA desses genes aumentaram ou diminuíram em relação ao controle, é possível sugerir que essas alterações estejam relacionadas às falhas na reprogramação epigenética frequentemente observadas quando se utiliza a técnica de TNCS.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados desse trabalho demonstram que existe uma desregulação na maquinaria de reprogramação da metilação do DNA na placenta dos animais clones e que o perfil de expressão de mRNA de TET1 pode ser utilizado como uma provável ferramenta de diagnóstico entre clones viáveis e inviáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, A. et al. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 17, p. 3506-3512, 2001.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3506>
- ARNOLD, D. R. et al. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 279-90, Aug 2006.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.01217>
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 241-257, 2002.
<https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
- BAKHARI, A.; ROSS, P. J. DPPA3 prevents cytosine hydroxymethylation of the maternal pronucleus and is required for normal development in bovine embryos. **Epigenetics**, v. 9, n. 9, p. 1271-1279, 2014.
<https://doi.org/10.4161/epi.32087>
- BARAU, J. et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. **Science**, v. 354, n. 6314, p. 909-912, 2016.
<https://doi.org/10.1126/science.aah5143>
- BARLOW, D. P.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting in mammals. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 2, p. a018382, 2014.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p. 2395-2402, 2000.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>
- BESTOR, T. H.; EDWARDS, J. R.; BOULARD, M. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 22, p. 6796-6799, 2015.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1415301111>
- BIASE, F. H. et al. Massive dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned cattle conceptus and maternal endometrium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, p. 14492-14501, 2016.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1520945114>
- BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. **Science**, v. 294, p. 2536-2539, 2001.
<https://doi.org/10.1126/science.1065848>
- BOURC'HIS, D.; BESTOR, T. H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. **Nature**, v. 431, p. 96-99, 2004.
<https://doi.org/10.1038/nature02886>
- BOURC'HIS, D. et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, v. 11, p. 1542-1546, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00480-8)

BUCK-KOEHNTOP, B. A.; DEFOSSEZ, P.-A. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. **Epigenetics**, v. 8, n. 2, p. 131-137, 2013.
<https://doi.org/10.4161/epi.23632>

BUCZINSKI, S. et al. Ultrasonographic fetal well-being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: A preliminary study on 10 fetuses and calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 261-269, 2009.

CARDOSO, M. C.; LEONHARDT, H. DNA Methyltransferase Is Actively Retained in the Cytoplasm during Early Development. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 25-32, 1999.
<https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.25>

CEZAR, G. G. et al. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 3, p. 1009-1014, 2003.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010181>

CHAE, J. et al. Abnormal gene expression in extraembryonic tissue from cloned porcine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 323-333, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.025>

CHAN, M. M. et al. Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 978, 2012.
<https://doi.org/10.1038/ng.2382>

CHEN, T.; LI, E. Structure and Function of Eukaryotic DNA Methyltransferases. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 60, 2004.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)60003-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)60003-2)

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

CHESNÉ, P. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 20, p. 366-369, 2002.
<https://doi.org/10.1038/nbt0402-366>

COULDREY, C.; WELLS, D. N. DNA methylation at a bovine alpha satellite I repeat CpG site during development following fertilization and somatic cell nuclear transfer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55153, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055153>

DAWLATY, M. M. et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. **Dev Cell**, v. 29, n. 1, p. 102-11, Apr 14 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.003>

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic Reprogramming in early mammalian development. **Cell & Developmental Biology**, v. 14, p. 93-100, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(02\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00141-6)

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & Development**, v. 25, p. 1010-1022, 2011.
<https://doi.org/10.1101/gad.2037511>

DOEGE, C. A. et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 652, 2012.
<https://doi.org/10.1038/nature11333>

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in reproductive medicine*, 2009. NIH Public Access. p.351.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009.
<https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>

EVERTS, R. E. et al. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. **Physiol Genomics**, v. 33, n. 1, p. 65-77, Mar 14 2008.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00223.2007>

EWEN, K. A.; KOOPMAN, P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 76-93, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.013>

FABER, D. et al. Agro-economic impact of cattle cloning. **Cloning & Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 198-207, 2004.
<https://doi.org/10.1089/1536230041372463>

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178-91, Jan 07 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.022>

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 791-797, 2011.
<https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209>

FERGUSON-SMITH, A. C.; SURANI, M. A. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1086-9, Aug 10 2001.
<https://doi.org/10.1126/science.1064020>

GALLI, C. et al. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v. 424, 2003.
<https://doi.org/10.1038/424635a>

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends Genet**, v. 25, n. 2, p. 82-90, Feb 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.001>

GOLDING, M. C. et al. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. **Molecular reproduction and development**, v. 78, n. 5, p. 306-317, 2011.
<https://doi.org/10.1002/mrd.21306>

GOLL, M. G. et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 395-8, Jan 20 2006.
<https://doi.org/10.1126/science.1120976>

GOWHER, H.; JELTSCH, A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites. **Journal of molecular biology**, v. 309, n. 5, p. 1201-1208, 2001.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4710>

GOWHER, H. et al. Mechanism of Stimulation of Catalytic Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5) methyltransferases by Dnmt3L. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 13341-13348, 2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M413412200>

GU, T. P. et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 606-10, Sep 04 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature10443>

GUNTRUM, M.; VLASOVA, E.; DAVIS, T. L. Asymmetric DNA methylation of CpG dyads is a feature of secondary DMRs associated with the Dlk1/Gtl2 imprinting cluster in mouse. **Epigenetics Chromatin**, v. 10, p. 31, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s13072-017-0138-0>

GUO, F. et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 4, p. 447-58, Oct 02 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.08.003>

GUO, J. U. et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 423-34, Apr 29 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>

GUPTA, M. K. et al. Transgenic chicken, mice, cattle, and pig embryos by somatic cell nuclear transfer into pig oocytes. **Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")**, v. 15, n. 4, p. 322-328, 2013.

<https://doi.org/10.1089/cell.2012.0074>

HAHN, M. A. et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 291-300, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.011>

HARDWICK, J. S.; LANE, A. N.; BROWN, T. Epigenetic Modifications of Cytosine: Biophysical Properties, Regulation, and Function in Mammalian DNA. **BioAssays**, 2018.

<https://doi.org/10.1002/bies.201700199>

HATA, K. et al. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. 2002.

HE, Y. F. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1303-7, Sep 02 2011.

<https://doi.org/10.1126/science.1210944>

HE, Z.-M. et al. Transition of LINE-1 DNA methylation status and altered expression in first and third trimester placentas. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96994, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096994>

HEIJMANS, B. T. et al. The epigenome: archive of the prenatal environment. **Epigenetics**, v. 4, n. 8, p. 526-531, 2009.

<https://doi.org/10.4161/epi.4.8.10265>

HERNANDEZ MORA, J. R. et al. Profiling of oxBS-450K 5-hydroxymethylcytosine in human placenta and brain reveals enrichment at imprinted loci. **Epigenetics**, v. 13, n. 2, p. 182-191, 2018.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1344803>

HERVOUET, E. et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. **Clinical Epigenetics**, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s13148-018-0450-y>

HILL, J. R. et al. Evidence for Placental Abnormality as the Major Cause of Mortality in First-Trimester Somatic Cell Cloned Bovine Fetuses. **Biol Reprod**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1787>

HILL, P. W.; AMOUROUX, R.; HAJKOVA, P. DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. **Genomics**, v. 104, n. 5, p. 324-333, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.012>

HOANG, T. V. et al. Lens development requires DNMT1 but takes place normally in the absence of both DNMT3A and DNMT3B activity. **Epigenetics**, v. 12, p. 27-40, 2017.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1253651>

HOSSAIN, M. M. et al. Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 43, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-43>

INOUE, A.; ZHANG, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. **Science**, v. 334, n. 6053, p. 194-194, 2011.

<https://doi.org/10.1126/science.1212483>

IQBAL, K. et al. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3642-3647, 2011.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1014033108>

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell selfrenewal, and ICM specification. **Nature**, p. 1129-1133, 2010.

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

ITO, S. et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1300-3, Sep 02 2011.

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

JAIN, D. et al. rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. **PLoS Genet**, v. 13, n. 8, p. e1006964, Aug 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006964>

JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R. Z. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases – a new regulatory paradigm. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 8556-8575, 2016.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nrg3230>

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **ChemBiochem**, v. 12, n. 2, p. 206-22, Jan 24 2011.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201000195>

KAAS, G. A. et al. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. **Neuron**, v. 79, n. 6, p. 1086-1093, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.032>

KANEDA, M. et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. **Nature**, v. 429, p. 900-903, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nature02633>

KANEDA, M. et al. Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis. **Anim Sci J**, v. 88, n. 11, p. 1678-1685, Nov 2017.

<https://doi.org/10.1111/asj.12846>

KATO, Y. et al. Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. **Science**, v. 282, p. 2095-2097, 1998.

<https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2095>

KISHIKAWA, S. et al. Control elements of Dnmf1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. **Nucleic Acids Research Supplement**, v. 3, p. 307-308, 2003.

<https://doi.org/10.1093/nass/3.1.307>

KO, M. et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 122, 2013.

<https://doi.org/10.1038/nature12052>

KO, Y.-G. et al. Proteomic analysis of the extraembryonic tissues from cloned porcine fetus at day 35 of pregnancy. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 861, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-861>

KOH, K. P. et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. **Cell stem cell**, v. 8, n. 2, p. 200-213, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.008>

KOHAN-GHADR, H. R. et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 218-230, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.028>

KOHLI, R. M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 472, 2013.

<https://doi.org/10.1038/nature12750>

LARSEN, F. et al. CpG Islands as Gene Markers in the Human Genome **Genomics**, v. 13, p. 1095-1107, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90024-M](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90024-M)

LEE, B. C. et al. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 641, Aug 4 2005.

<https://doi.org/10.1038/436641a>

LEE, J. et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. **Development**, v. 129, p. 1807-1817, 2002.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Target Mutation of the DNA methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality. **Cell Press**, v. 69, p. 915-926, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)

LIU, Z. et al. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cell**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>

LODDE, V. et al. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. v. 53, p. 199-208, 2009.

<https://doi.org/10.4081/ejh.2009.e24>

LUO, Y. et al. Production of transgenic cattle highly expressing human serum albumin in milk by phiC31 integrase-mediated gene delivery. **Transgenic research**, v. 24, n. 5, p. 875-883, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s11248-015-9898-0>

MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 2, p. 126-40, Feb 2014.

<https://doi.org/10.1002/mrd.22220>

MARGOT, J. B.; EHRENHOFER-MURRAY, A. E.; LEONHARDT, H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. **BMC Molecular Biology**, 2003.

<https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-7>

MAYER, W. et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, p. 501-502, 2000.

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

MERTINEIT, C. et al. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. **Development**, v. 125, p. 889-897, 1998.

MIN, B. et al. The HIST1 Locus Escapes Reprogramming in Cloned Bovine Embryos. **G3 (Bethesda)**, v. 6, n. 5, p. 1365-71, May 03 2016.

<https://doi.org/10.1534/g3.115.026666>

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

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

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan 2013.

<https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends Genet**, v. 7, p. 45-49, 1991.
[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90230-N](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90230-N)

NAGY, C.; TURECKI, G. Transgenerational epigenetic inheritance: an open discussion. **Epigenomics**, v. 7(5), p. 781-790, 2015.
<https://doi.org/10.2217/epi.15.46>

OKANO, M. et al. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. **Cell Press**, v. 99, p. 247-257, 1999.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature genetics**, v. 19, n. 3, p. 219, 1998.
<https://doi.org/10.1038/890>

OOI, S. K. T. et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. **Nature**, v. 448, p. 715-717, 2007.
<https://doi.org/10.1038/nature05987>

OSWALD, J. et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology**, v. 10, p. 475-478, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00448-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00448-6)

PAGE-LARIVIERE, F.; SIRARD, M. A. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. **Cell Reprogram**, v. 16, n. 1, p. 40-53, Feb 2014.
<https://doi.org/10.1089/cell.2013.0055>

PARK, J. Y. et al. Comparative proteomic analysis of malformed umbilical cords from somatic cell nuclear transfer-derived piglets: implications for early postnatal death. **BMC Genomics**, v. 10, p. 511, 2009.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-511>

PARK, M.-R. et al. Aberrant gene expression patterns in extraembryonic tissue from cloned porcine embryos. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 531-538, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.004>

PEAT, J. R.; REIK, W. Incomplete methylation reprogramming in SCNT embryos. **Nat Genet**, v. 44, n. 9, p. 965-6, Sep 2012.
<https://doi.org/10.1038/ng.2393>

PERVJAKOVA, N. et al. Imprinted genes and imprinting control regions show predominant intermediate methylation in adult somatic tissues. **Epigenomics**, v. 8, p. 789-799, 2016.
<https://doi.org/10.2217/epi.16.8>

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

POLEJAEVA, I. A. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 407, p. 86-90, 2000.
<https://doi.org/10.1038/35024082>

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1685>

PROUDHON, C. et al. Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. **Mol Cell**, v. 47, n. 6, p. 909-20, Sep 28 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.010>

RADDATZ, G. et al. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 21, p. 8627-31, May 21 2013.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306723110>

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

RAMSAHOYE, B. H. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5237-5242, 2000.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5237>

RASMUSSEN, K. D.; HELIN, K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. **Genes & development**, v. 30, n. 7, p. 733-750, 2016.
<https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>

RASMUSSEN, K. D. et al. Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. **Genes & development**, v. 29, n. 9, p. 910-922, 2015.
<https://doi.org/10.1101/gad.260174.115>

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-93, Aug 10 2001.
<https://doi.org/10.1126/science.1063443>

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. **Nature Genetics**, v. 2, p. S21-32, January 2001.
<https://doi.org/10.1038/35047554>

ROBERTSON, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 11, p. 2291-2298, 1999.
<https://doi.org/10.1093/nar/27.11.2291>

ROSS, P. J. et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 777-85, Dec 2008.
<https://doi.org/10.1530/REP-08-0045>

RUSSELL, D. F.; BETTS, D. H. Alternative splicing and expression analysis of bovine DNA methyltransferase 1. **Dev Dyn**, v. 237, n. 4, p. 1051-9, Apr 2008.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21474>

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

SAINI, S. K. et al. DNA Methyltransferase1 (DNMT1) Isoform3 methylates mitochondrial genome and modulates its biology. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1525, May 8 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01743-y>

SALILEW-WONDIM, D. et al. Aberrant placenta gene expression pattern in bovine pregnancies established after transfer of cloned or in vitro produced embryos. **Physiol Genomics**, v. 45, n. 1, p. 28-46, Jan 07 2013. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00076.2012>

SANTOS, F. et al. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos. **Current Biology**, v. 13, n. 13, p. 1116-1121, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00419-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00419-6)

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

SHIRANE, K. et al. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. **PLoS Genet**, v. 9, n. 4, p. e1003439, Apr 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003439>

SHOCK, L. S. et al. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, p. 3630-3635, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012311108>

SIM, B.-W. et al. Abnormal gene expression in regular and aggregated somatic cell nuclear transfer placentas. **BMC biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0355-4>

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends Genet**, v. 28, n. 1, p. 33-42, Jan 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>

SMITH, L. C. et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 4, p. 107-14, Aug 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02063.x>

SMOLLE, M.; WORKMAN, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 1, p. 84-97, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2012.08.008>

SONG, X. et al. Dnmt1s in donor cells is a barrier to SCNT-mediated DNA methylation reprogramming in pigs. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 34980, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16507>

SPRUIJT, C. G.; VERMEULEN, M. DNA methylation: old dog, new tricks? **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 11, p. 949-954, 2014.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2910>

SU, J.-M. et al. Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1346-1359, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.045>

SU, J. et al. Identification of differentially expressed microRNAs in placentas of cloned and normally produced calves by Solexa sequencing. **Animal reproduction science**, v. 155, p. 64-74, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.02.001>

SU, J. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 12, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-12>

SU, J. et al. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, v. 59, p. 455-468, 2015.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12275>

SUETAKE, I. et al. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27816-27823, 2004.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930-5, May 15 2009.
<https://doi.org/10.1126/science.1170116>

TAN, L.; SHI, Y. G. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. **Development**, v. 139, n. 11, p. 1895-1902, 2012.
<https://doi.org/10.1242/dev.070771>

TANG, M. C. et al. High histone variant H3. 3 content in mouse prospermatogonia suggests a role in epigenetic reformatting. **Chromosoma**, v. 123, n. 6, p. 587-595, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00412-014-0475-8>

THAKUR, A. et al. Widespread recovery of methylation at gametic imprints in hypomethylated mouse stem cells following rescue with DNMT3A2. **Epigenetics Chromatin**, v. 9, p. 53, 2016.
<https://doi.org/10.1186/s13072-016-0104-2>

TUORTO, F. et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. **EMBO J**, v. 34, n. 18, p. 2350-62, Sep 14 2015.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201591382>

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cell & Molecular Biology**, v. 10, p. 631-647, 2005.

UNGERER, M.; KNEZOVICH, J.; RAMSAY, M. In Utero Alcohol Exposure, Epigenetic Changes, and Their Consequences. **Alcohol Research**, v. 35, p. 37-46, 2013.

UYSAI, F.; OZTURK, S.; AKKOYUNLU, G. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. **J Mol Histol**, Oct 13 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10735-017-9739-y>

VALINLUCK, V.; SOWERS, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. **Cancer research**, v. 67, n. 3, p. 946-950, 2007.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>

VARMUZA, S.; MANN, M. Genomic imprinting—defusing the ovarian time bomb. **Trends in Genetics**, v. 10, n. 4, p. 118-123, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90212-7)

WAKAYAMA, T. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 369-374, 1998.
<https://doi.org/10.1038/28615>

WALTER, J. An epigenetic Tet a Tet with pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 2, p. 121-122, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.009>

WANG, D. et al. Disruption of imprinted gene expression and DNA methylation status in porcine parthenogenetic fetuses and placentas. **Gene** v. 547, p. 351-358, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.059>

WANG, G. N. et al. Aberrant expression of MICO1 and MICO1OS in deceased somatic cell nuclear transfer calves. **Mol Reprod Dev**, v. 84, n. 6, p. 517-524, Jun 2017.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22807>

WANG, L. et al. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 979-91, May 08 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.017>

WANG, X. M. et al. Identification and functional relevance of de novo DNA methylation in cancerous B-cell populations. **Journal of cellular biochemistry**, v. 109, n. 4, p. 818-827, 2010.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22461>

WANG, Y. S. et al. Transgenic cattle produced by nuclear transfer of fetal fibroblasts carrying lpr1 gene at a specific locus. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 608-616, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.016>

WEBER, A. R. et al. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. **Nat Commun**, v. 7, p. 10806, Mar 2 2016.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10806>

WEBSTER, K. E. et al. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 4068-4073, 2005.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0500702102>

WEI, Y. et al. Unfaithful maintenance of methylation imprints due to loss of maternal nuclear Dnmt1 during somatic cell nuclear transfer. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20154, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020154>

WEI, Y. et al. Aberrant expression and methylation status of putatively imprinted genes in placenta of cloned piglets. **Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")**, v. 12, n. 2, p. 213-222, 2010.

<https://doi.org/10.1089/cell.2009.0090>

WIENHOLZ, B. L. et al. DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. **PLoS Genet**, v. 6, n. 9, p. e1001106, Sep 09 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001106>

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

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

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.

<https://doi.org/10.1038/385810a0>

WOLF, S. F. et al. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 9, p. 2806-2810, 1984.

<https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2806>

WOSSIDLO, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nat Commun**, v. 2, p. 241, 2011.

<https://doi.org/10.1038/ncomms1240>

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nat Rev Genet**, May 30 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>

XU, Y. et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. **Molecular cell**, v. 42, n. 4, p. 451-464, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.005>

XU, Y. et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. **Cell**, v. 151, n. 6, p. 1200-1213, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.014>

YANG, X. et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

<https://doi.org/10.1038/ng1973>

YIN, X.; XU, Y. Structure and Function of TET Enzymes. In: (Ed.). **DNA Methyltransferases-Role and Function**: Springer, 2016. p.275-302.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_12

ZHANG, S. et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Sci Rep**, v. 6, p. 30345, Jul 26 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep30345>

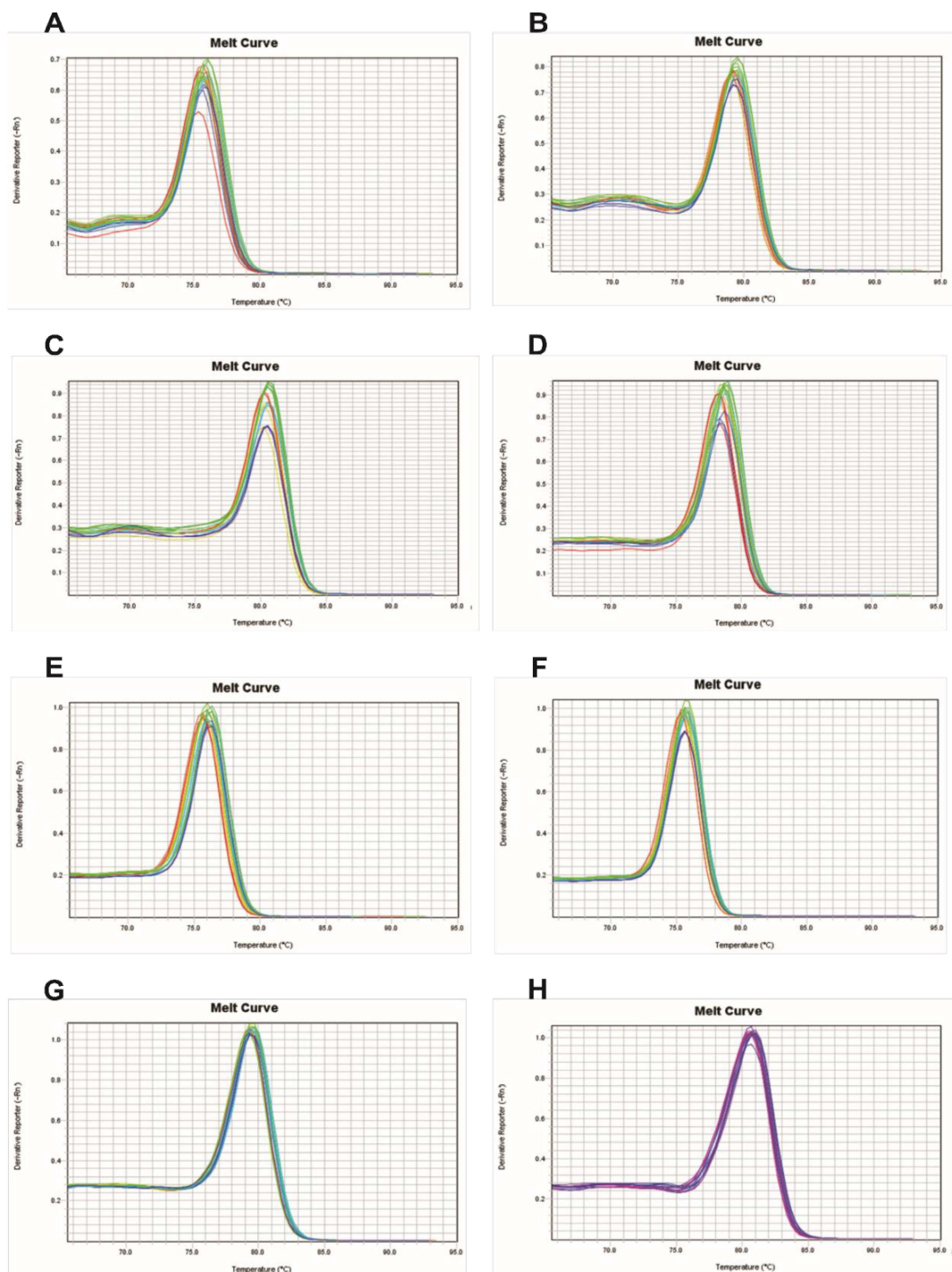
ZHANG, S. et al. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1540-1544, 2004.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031807>

ZHANG, X. et al. Altered imprinted gene expression and methylation patterns in mid-gestation aborted cloned porcine fetuses and placentas. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, n. 11, p. 1511-1517, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s10815-014-0320-2>

ZHANG, Y. et al. Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 4246-4253, 2010.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq147>

ANEXOS

ANEXO I: Curvas de *melting* da reação de qPCR para cada gene. (A) *DNMT1* (B) *DNMT3A* (C) *DNMT3B* (D) *TET1* (E) *TET2* (F) *TET3* (G) *GAPDH* (H) *B-ACTINA*.



ANEXO II: Extração de RNA total.

TRizol™ Plus RNA Purification Kit

Para tecido:

1. Cortar (biópsia) aproximadamente 200 mg:

- a. Usar placa de petri estéril, apoiada sobre o gelo; lâmina bisturi estéril e microtubo 1,5 mL estéril.
- b. Pesar microtubo vazio – tarar balança com o microtubo vazio antes de colocar a amostra.

2. Maceração do tecido:

- a. Usar cadinho e espátula.
- b. Colocar 200 mg do tecido no cadinho, ir colocando nitrogênio líquido aos poucos e amassando a amostra, até tornar-se pó, transferir para o microtubo.
- c. Pesar amostra macerada. Os 200mg da amostra inicial, devem gerar aproximadamente 100mg finais.

3. Homogeneizar as amostras de tecido em 1mL de TRizol Reagent para cada 50-100mg de tecido.

- a. Para homogeneizar melhor e facilitar desfazer os grumos, pode-se cortar a ponta da ponteira P1000.

4. Incubar por 5 minutos no gelo para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos.

5. Add 0,2 mL de clorofórmio gelado por 1 mL de TRizol usado na lise, misture no vortex por 15 segundos e incube por 2-3 minutos no gelo.

6. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 12000 g à 4°C.

A mistura irá se separar em uma fase mais baixa rosa que contém fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa transparente superior.

7. Transferir 600 uL da fase superior que contém o RNA para um novo tubo.

8. Add um volume igual de etanol 70% gelado e misturar no vortex. Inverter o tubo para dispersar qualquer precipitado visível que se forme após a adição do etanol.
9. Transferir 600 uL da amostra para a coluna *spin cartridge* com tubo coletor.
10. Centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
11. Transferir os outros 600 uL da amostra para a coluna e centrifugar a 12000g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
12. Add 350 uL de Wash Buffer I na coluna contendo o RNA ligado, centrifugar por 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e o tubo coletor, reinserir em um novo tubo coletor.
13. Add 80 uL do MIX DNase na membrana e incubar em temperatura ambiente por 15 minutos.
 - a. O mix é preparado da seguinte forma:
 - 10 uL RQ1 RNase-free DNase (1U/uL).
 - 8 uL RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer.
 - 62 uL RNase-free Water.
14. Add 350 uL de Wash Buffer I na coluna e centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e o tubo coletor, reinserir em um novo tubo coletor.
15. Add 500 uL de Wash Buffer II na coluna e centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
16. Repetir o passo 15.
17. Centrifugar a 12000 g por 1 minuto para secar a membrana. Descartar o tubo coletor e inserir a coluna em um novo tubo.
18. Add 30-100 uL RNase-free Water no centro da coluna.
19. Incubar por 1 minuto e centrifugar a 12000 g por 2 minutos.
20. Descartar coluna e estocar RNA à -80°C.

ANEXO III: Layout das placas de qPCR.

DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	TET1	TET2	TET3	GAPDH	B-ACTINA
-------	--------	--------	------	------	------	-------	----------

PLACA 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736	0736
B	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639	0639
C	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435	0435
D	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146
E	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C
F	0736	0736	0736	146	146	146						
G	0639	0639	0639	19C	19C	19C						
H	0435	0435	0435					C-	C-	C-	C-	C-

PLACA 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0559	0559	0559	0559	0559	0 559	0559	0559	0559	0559	0559	0559
B	0738	0738	0738	0738	0738	0 738	0738	0738	0738	0738	0738	0738
C	0682	0682	0682	0682	0682	0 682	0682	0682	0682	0682	0682	0682
D	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452
E	0817	0817	0817	0817	0817	0 817	0817	0817	0 817	0817	0817	0817
F	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C
G	0559	0559	0559	0682	0682	0682	0817	0817	0817	C-	C-	C-
H	0738	0738	0738	1452	1452	1452	1582C	1582C	1582C	C-	C-	

PLACA 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608
B	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856
C	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601
D	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646
E	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C
F	0608	0608	0608	0646	0646	0646						
G	0856	0856	0856	3476C	3476C	3476C						
H	1601	1601	1601					C-	C-	C-	C-	C-

PLACA 4												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639		
B	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639		
C	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639	0736	0639		
D	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146		
E	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146		
F	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146	0435	146		
G	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C	19C		
H	19C	C-	19C	C-	19C	C-	19C	C-	19C	C-		

PLACA 5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559	0559
B	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738	0738
C	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682	0682
D	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452	1452
E	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817	0817
F	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C	1582C
G	0559	0559	0559	0682	0682	0682	0817	0817	0817	C-	C-	C-
H	0738	0738	0738	1452	1452	1452	1582C	1582C	1582C	C-	C-	

PLACA 6												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608	0608
B	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856	0856
C	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601	1601
D	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646	0646
E	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C	3476C
F	0608	0608	0608	0646	0646	0646						
G	0856	0856	0856	3476C	3476C	3476C						
H	1601	1601	1601					C-	C-	C-	C-	C-