

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Caracterização epigenética do *locus* H19/IGF2 na placenta de bezerros clones

Natália Souza Costa

Uberlândia
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Caracterização epigenética do *locus* H19/IGF2 na placenta de bezerros clones

Natalia Souza Costa

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ciências veterinárias.

Uberlândia
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C837 Costa, Natalia Souza, 1995-
2019 Caracterização epigenética do locus H19/IGF2 na placenta de
bezerros clones [recurso eletrônico] / Natalia Souza Costa. - 2019.

Orientador: Maurício Machaim Franco.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2187>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Franco, Maurício Machaim, 1965-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Caracterização epigenética do *locus* H19/IGF2 na placenta de bezerros clones

Natalia Souza Costa

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Homologado pelo programa da Pós em Ciências Veterinárias em __/__/__

Coordenadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

Uberlândia
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/014/2019				
Data:	19 de julho de 2019	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:25
Matrícula do Discente:	11712MEV024				
Nome do Discente:	NATALIA SOUZA COSTA				
Título do Trabalho:	CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DO <i>locus</i> H19/IGF2 NA PLACENTA DE BEZERROS CLONES				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	CONTROLE EPIGENÉTICO DA GAMETOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE INICIAL				

Reuniu-se no Sala 54, bloco 2D, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Robson Carlos Antunes - Universidade Federal de Uberlândia; Márcia Marques Silveira - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Maurício Machaim Franco orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Maurício Machaim Franco, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robson Carlos Antunes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2019, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Marques Silveira, Usuário Externo**, em 19/07/2019, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maurício Machaim Franco, Usuário Externo**, em 19/07/2019, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1390330** e o código CRC **7CA38ED9**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida. Por ter me dado tudo que preciso inclusive força para superar as dificuldades.

Aos meus familiares, meu amor e amigos, pelo amor, incentivo, apoio incondicional, paciência e compreensão pela distancia. Vocês foram de extrema importância para a concretização dessa conquista.

Ao meu orientador Maurício Machaim Franco por ter me acolhido e guiado como sua orientanda. Pela orientação, prestatividade, apoio, amizade, confiança e conselhos.

As pessoas maravilhosas que conheci no laboratório que além de contribuir para meu aprendizado, me apoiaram e auxiliaram incessantemente nesse período longe de meus familiares. A amizade dessas pessoas me possibilitou mesmo não estando em casa, me sentir em casa.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por fornecer toda a estrutura para a realização desse trabalho.

À Empresa Geneal Genética e Biotecnologia Animal, por ter cedido as amostras biológicas utilizadas neste estudo.

A minha banca Márcia Silveira, Robson Antunes e Thiago Braga por terem aceitado atenciosamente o meu convite.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS-Clonagem) é uma técnica que se baseia na produção de indivíduos geneticamente idênticos. A TNCS possui potencial aplicação em várias áreas, como na transgênese, na preservação de animais em extinção, na produção animal, nas ciências básicas e na medicina humana. No entanto, sua eficiência ainda é baixa. As taxas de nascimento variam em torno de 0 a 10%. Estudos sugerem que a principal causa dessa baixa eficiência da técnica seja uma reprogramação epigenética inadequada nos estágios iniciais do desenvolvimento. Os genes *IGF2* e *H19* são genes *imprinted*, ou seja, caracterizados pela expressão monoalélica e dependente da origem parental do alelo. Esses genes estão relacionados ao desenvolvimento embrionário, da placenta e crescimento fetal. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o padrão de metilação de uma região do éxon 10 do gene *IGF2* e da Região Controladora de *Imprinting* (ICR) do gene *H19* na placenta de animais clonados. Para a execução do trabalho foram selecionados clones bovinos fêmeas e machos, apresentando diferentes fenótipos. O DNA da placenta desses animais foi extraído, e em seguida foi tratado com bissulfito de sódio e amplificado para os loci *ICR/H19* e *IGF2*. Os produtos da PCR foram clonados em bactérias competentes e por fim sequenciados. Foi encontrada uma diferença significativa entre os controles e os clones com fenótipos saudáveis para a região da *ICR/H19*. Nesta região, os controles tiveram um padrão hemimetilado, como previsto pela literatura, devido essa região ser *imprinted*. Enquanto os clones encontravam-se menos metilados. Para a região do éxon 10 do *IGF2*, não foi encontrada diferença significativa entre controles e clones, e entre clones com fenótipos aberrantes e saudáveis. Estes resultados sugerem que as diferentes regiões do genoma podem se reprogramar independente umas das outras e que falhas na reprogramação do padrão de metilação do DNA de genes *imprinted* podem ser uma das causas da baixa eficiência da TNCS.

Palavras Chaves: Clonagem, Metilação, Imprinting, Reprogramação Epigenética, Bovino

ABSTRACT

Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT- Cloning) is a technique that is based on the production of genetically identical individuals. SCNT has potential application in several areas, such as transgenesis, preservation of endangered animals, animal production, basic sciences and human medicine. However, its efficiency is still low. Birth rates range from 0 to 10%. Studies suggest that the main cause of this low efficiency of the technique is an inadequate epigenetic reprogramming in the early stages of development. IGF2 and H19 genes are imprinted genes that are characterized by monoallelic expression and dependent on the allele's parental origin. These genes are related to embryonic development, placenta and fetal growth. The objective of this study was to characterize the methylation pattern of an exon 10 region of the IGF2 gene and the H19 gene Imprinting Control Region (ICR) in the placenta of cloned animals. For this study female and male cloned calves presenting different phenotypes were used. Genomic DNA from placenta of these animals was isolated, then treated with sodium bisulfite and amplified to the ICR/H19 and IGF2 loci. PCR products were cloned into competent bacteria and finally sequenced. A significant difference was found between controls and clones with healthy phenotypes for the ICR/H19 region. In this region controls showed a hemimethylated pattern, as predicted in the literature due to this region has an imprinted control, while clones were showed less methylated. For the IGF2, no significant differences were found between controls and clones, and between clones with aberrant and healthy phenotypes. These results suggest that different genomic regions in the genome may be independently reprogrammed and that failures in reprogramming the DNA methylation patterns of imprinted genes may be one of the causes of the low efficiency of SCNT.

Keywords: Cloning, Methylation, Imprinting, Epigenetic Reprogramming, Cattle

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.A JUSTIFICATIVA.....	1
2 OBJETIVO.....	2
2.A Objetivos específicos.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.A Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS).....	2
3.B Epigenética.....	4
3.B.1 Metilação do DNA.....	6
3.B.2 Modificações pós-traducionais de histonas.....	7
3.B.3 RNAs não codantes.....	9
3.B.4 Reprogramação epigenética no desenvolvimento inicial de mamíferos.....	9
3.B.5 <i>Imprinting</i> Genômico.....	12
3.B.6 Os genes IGF2 e H19.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.A Delineamento Experimental.....	15
4.B Isolamento do DNA genômico.....	16
4.C Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio.....	16
4.D Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio.....	17
4.E Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial.....	18
4.F Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências.....	19
4.G Análises Estatísticas.....	19
5 RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CH3	Grupo metil
CGPs	Células germinativas primordiais
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CTCF	Fator ligante CCCTC
DMR	Região diferencialmente metilada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA Metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIV	Fecundação in vitro
gDMR	Região diferencialmente metilada germinativa
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Desacetilase
HDMT	Histona Desmetilase
HMT	Histona Metiltransferase
H3K4me	Metilação da lisina 4 da histona 3
H3K9me2	Dimetilação da lisina 9 da histona 3
H3K27me3	Trimetilação da lisina 27 da histona 3
ICR	Região controladora de imprinting
ICR/H19	Região controladora de imprinting dos genes IGF2 e H19
IGF2	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2

IGF2R	Receptor do Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria-Bertani
lncRNAs	RNA longos
LOS	Large offspring syndrome
M	Molar
mA	Miliampere
MCI	Massa celular interna
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
miRNA	microRNAs
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pmol	Picomol

PRC2	Complexo Repressivo Policomb tipo 2
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SAH	S-adenosil L-homocisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPTZ	Espermatozóide
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TDG	Thymine DNA glycosylase
TET	Ten-eleven translocation
TRA	Técnica de Reprodução Assistida
U	Unidades
UI	Unidades Internacionais
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
XIST	Transcrito específico do cromossomo X inativo
°C	Graus Celsius
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
ng	Nanograma
μ m	Micrômetro

5hmC 5-hidroximetilcitosina

5mC 5-metilcitosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reprogramação epigenética em mamíferos.	11
Figura 2: Mecanismo de regulação do gene H19 e do IGF2.	14
Figura 3: Padrão de metilação da ICR/H19 na placenta (cotilédone) de clones bovinos fêmeas e machos, saudáveis e aberrantes, e de fêmeas e machos concebidos por Inseminação Artificial (controles).	21
Figura 4: Padrão de metilação do éxon 10 do gene IGF2 na placenta (cotilédone) de clones bovinos fêmeas e machos, saudáveis e aberrantes, e de fêmeas e machos concebidos por Inseminação Artificial (controles).	22
Figura 5: Taxa de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para a ICR/H19-aberrantes e saudáveis).	22
Figura 6: Taxa de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante.	23
Figura 7: Padrão de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA, TNCS saudável, TNCS aberrante.	24
Figura 8: Taxa de metilação para a região do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para o éxon 10 do IGF2 -aberrantes e saudáveis).	24
Figura 9: Taxa de metilação para a região do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante.	25
Figura 10: Padrão de metilação para a região do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA, TNCS saudável, TNCS aberrante.	26
Figura 11: Comparação entre taxa de metilação para a região da ICR do H19 e do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para as duas regiões).	26
Figura 12: Comparação da taxa de metilação para a região ICR do H19 e para o Éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante, para as duas regiões.	27
Figura 13: Comparação do padrão de metilação dos clones selecionados para a região da ICR/H19 e dos clones selecionados para a região do éxon 10 do IGF2. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Animais selecionados para o estudo, de acordo com o sexo, fenótipos e a viabilidade (sobrevivência na primeira semana do nascimento).	16
Tabela 2: Identificação do gene, sequências dos <i>primers</i> , código de acesso ao <i>GenBank</i> , localização dos <i>primers</i> , posição da ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado....	17
Tabela 3: Condições de amplificação utilizadas nas PCR para a região controladora de <i>imprinting</i> ICR/H19 e para a região diferencialmente metilada do gene IGF2.....	18

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia na reprodução animal tem proporcionado avanços nos índices produtivos, assim como na multiplicação de animais nos rebanhos com material genético superior. A clonagem é uma dessas biotecnologias, com a capacidade de produzir indivíduos geneticamente idênticos. Essa técnica vem sendo objeto de várias pesquisas devido ao fato de ter potenciais aplicações, como, a multiplicação de animais geneticamente superiores em um rebanho comercial, a preservação de animais em risco de extinção, a produção de animais transgênicos e geneticamente editados e por fim na biomedicina, com a produção de tecidos e órgãos para clonagem terapêutica.

Entretanto, a eficiência desta técnica ainda é muito baixa, verificando altas taxas de mortalidade embrionária, fetal, peri e pós-natal, além de anormalidades nos clones e na placenta que podem comprometer o desenvolvimento do animal (WESTHUSIN et al., 2001; SMITH et al., 2012). Diante desse fato, estudos sugerem que a principal causa seja uma reprogramação epigenética errônea, que ocorre em grande parte dos clones.

Pouco se sabe a respeito do desenvolvimento embrionário e fetal nesses animais. No entanto, já se sabe que dois genes são muito importantes tanto para o desenvolvimento inicial do embrião, quanto da placenta. Esses genes são o *IGF2*, que atua no desenvolvimento e crescimento placenta/embrião, e o *H19* que regula a expressão do *IGF2*. Esses genes são genes *imprinted*, pois se caracterizam pela expressão monoalélica, determinada de acordo com a origem parental (HAIG; GRAHAM, 1991). Esse perfil de expressão monoalélica é basicamente controlado por um padrão de metilação de DNA diferencial entre os dois alelos do gene, sendo um alelo metilado e o outro não metilado.

1.A JUSTIFICATIVA

A clonagem é uma técnica com grande potencial biotecnológico, com várias aplicações, sendo importante na multiplicação rápida de animais com maior valor econômico. Entretanto, sua eficiência permanece baixa. Especula-se que seja consequência de uma reprogramação epigenética incorreta das células doadoras do núcleo. Por esse motivo, foi realizada uma caracterização epigenética de regiões que

abrangem os genes *IGF2* e *H19*, que são genes *imprinted*, que possuem um controle epigenético e regulam o desenvolvimento embrionário.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi caracterizar o padrão de metilação da região diferencialmente metilada do exon 10 do gene *IGF2* e da região controladora de *imprinting* do *locus* *IGF2/H19* na placenta fetal de bezerros clonados.

2.A Objetivos específicos

- Caracterizar o padrão de metilação do gene *IGF2* e da *ICR/H19* em placenta de clones bovinos e verificar uma relação desse padrão entre esses *loci*.
- Avaliar se diferentes fenótipos de animais clonados estão relacionados com uma reprogramação epigenética incorreta do gene *IGF2* e da *ICR/H19*.
- Verificar se existem erros na reprogramação dessas regiões genômicas mesmo em clones considerados saudáveis.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.A Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS)

Durante muitos anos, pesquisadores buscaram descobrir os aspectos embrionários e fisiológicos envolvidos na reprodução, com o intuito de produzir animais geneticamente superiores, gerando assim, maior rentabilidade na pecuária. Desta forma, a biotecnologia na reprodução animal surgiu para atingir essa finalidade (GALLI et al., 1999, LUCIFERO et al., 2004). Uma das biotecnologias de maior relevância é a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS).

A TNCS é baseada em uma reprodução assexuada em que o produto gerado será geneticamente idêntico ao doador do núcleo (WILMUT et al., 1997). Isto é, o citoplasma de ovócitos contém uma maquinaria epigenética específica que é capaz de

reprogramar o núcleo de células somáticas em um estado indiferenciado, que por sua vez é capaz de gerar um embrião viável (WILMUT et al., 1997). Esta técnica possui potenciais aplicações na produção de animais de alto valor comercial, na biomedicina com a utilização dos xenotransplantes, na preservação de animais em risco de extinção e na produção de animais transgênicos (CIBELLE et al., 1998), e geneticamente editados (PETERSEN, 2017).

O procedimento da TNCS é dividido em quatro etapas: iniciando na maturação *in vitro* e enucleação de ovócitos (preparação do citoplasma do receptor); em segundo, o isolamento, sincronização e cultivo de células somáticas do doador de núcleo; depois a reconstrução embrionária e cultivo “*in vitro*” e por fim a transferência dos embriões para receptoras (WELLS, 1999).

A origem dessa técnica se deu em 1952, quando Robert Briggs e Thomas King ao trabalhar em experimentos que tinha como objetivo investigar a totipotência nuclear, observaram o desenvolvimento de girinos logo após a injeção de núcleos embrionários em ovos enucleados de *Rana pipiens* (BRIGGS; KING, 1952). Desse modo, esses trabalhos tornaram-se os precursores da técnica de transferência nuclear (BRIGGS; KING, 1952).

A técnica de clonagem por TN apresenta-se como um dos maiores avanços no campo das técnicas de reprodução assistida (TRAs) em mamíferos. Após o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero adulto a ser clonado, várias espécies de animais, incluindo espécies domésticas e selvagens, foram clonadas eficientemente (WILMUT et al., 1997). Há registros de mais 20 espécies de mamíferos clonados com essa técnica (MATOBA e ZHANG, 2018), dentre elas encontram-se ratos (WAKAYAMA et al., 1998), bovino (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).

Apesar dos avanços nos procedimentos de TNCS ao longo das últimas décadas, sua eficiência permanece muito baixa (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2012). As taxas de desenvolvimento de embriões bovinos clones variam de valores menores que 5% a maiores que 65% (WESTHUSIN et al., 2001). Quanto às gestações com desenvolvimento e nascimento a termo, as taxas obtidas de embriões reconstruídos

são, em grande parte, inferiores a 5% (WELLS et al., 1999; SMITH et al., 2012; MATOBA e ZHANG, 2018). Entre as causas mais comuns para a perda durante a gestações de clones encontram-se as falhas no desenvolvimento da placenta, redução na taxa de implantação, o aumento de taxa de mortalidade fetal e perinatal. Além disso, várias anomalias são observadas, como, cordão umbilical grosso, edema de placenta, placentoma grande, presença de líquido placentário tingido de mecônio (HILL et al., 2000; HEYMAN et al., 2002b). E mesmo em animais que se desenvolvem a termo são encontradas anormalidades placentárias (LOI et al., 2006).

Os problemas encontrados nos clones após o nascimento incluem: distúrbios renais, problemas cardíacos, disfunções imunes, problemas músculo-esqueléticos, alterações respiratórias e hepáticas, síndrome da cria gigante (LOS), entre outras (SMITH et al., 2012). Apesar disso, as anormalidades observadas nesses animais não são herdáveis (TAMASHIRO et al., 2002; WELLS et al., 2004; WELLS, 2005).

Os principais motivos relacionados nos problemas na TN estão relacionados a falhas na reprogramação nuclear, o tipo celular utilizado como doador de núcleo, a qualidade do ovócito, as condições de maturação e cultivo *in vitro* e as metodologias utilizadas nos processos de enucleação e reconstrução (CAMPBELL et al., 2007). Em grande parte, a ineficiência é devido à reprogramação nuclear incorreta, levando à expressão gênica aberrante que prejudica o desenvolvimento embrionário (RIDEOUT et al., 2001). Assim, são necessários mais estudos sobre os efeitos da TNCS na reprogramação epigenética para subsidiar o desenvolvimento de melhores protocolos e o aumento da eficiência da técnica (SMITH et al., 2012). Portanto, os cientistas estão cada vez mais encorajados a procurarem respostas para dúvidas relacionadas à TNCS, uma vez que é uma técnica reprodutiva promissora.

3.B Epigenética

A epigenética é uma área da genética que estuda mudanças na função gênica que não estão diretamente relacionadas às mudanças na sequência primária do DNA (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009). São os mecanismos epigenéticos que

determinam quando e onde os genes devem ser transcritos permitindo, apesar da mesma sequência de DNA, que as células tenham características diferentes, constituindo diferentes tecidos (GIBBS, 2007). Portanto, apesar da maioria das células de um indivíduo ter o mesmo DNA, cada tipo celular tem um perfil epigenético específico, responsável por coordenar seu DNA para transcrever uma população específica de RNAs. As marcas epigenéticas são a metilação do DNA, várias modificações pós-traducionais de histonas, remodeladores de cromatina e alguns micro e longos RNAs não codificantes (STRAHL; ALLIS, 2000).

Os perfis epigenéticos podem persistir por gerações, portanto são herdáveis. No entanto, eles podem ser alterados por fatores externos, tais como, nutrição, ambiente, uso de fármacos, toxinas, etc (REIK, 2007). Um exemplo de como fatores externos intervêm nos padrões epigenéticos é quando sua influência desencadeia uma hipermetilação dos promotores de genes supressores de tumores, devido a um modo de vida não saudável (como o uso de cigarro e maus hábitos alimentares), conseqüentemente silenciando esses genes, evitando que eles sejam expressos, e assim, desencadeando tumores (FAULK E DOLINOY, 2011). Desta forma, os mecanismos epigenéticos regulam uma variedade de processos e doenças, como o desenvolvimento embrionário inicial, a obesidade, câncer, estresse (LACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Logo, apesar dessas marcas epigenéticas nas células somáticas serem estáveis, elas podem sofrer modificações externas e serem alteradas. As células somáticas podem ser reprogramadas para se tornar uma célula totipotente é o que ocorre na TNCS (SU et al., 2011).

Pesquisas têm mostrado que as técnicas de reprodução assistida (TRAs) acarretam alterações epigenéticas nos conceptos. Por exemplo, na TNCS os embriões são expostos a microambientes diferentes, na maturação *in vitro* e no cultivo *in vitro*, que podem interferir no desenvolvimento dos mesmos (WELLS, 1999). Acerca disso, pode-se concluir que essas técnicas, também agem como um fator externo afetando o potencial de desenvolvimento a termo ou até mesmo na concepção de animais saudáveis (SMITH et al., 2012; URREGO et al., 2014; LUCIFERO et al., 2004).

3.B.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma das principais marcas epigenéticas responsáveis pela herança epigenética entre gerações (MIGICOVSKY; KOVALCHUK, 2011). Essa marca é caracterizada pela adição de um grupo metil (CH₃) a uma citosina que precede uma guanina em um local denominado 5'-CpG-3', formando uma 5-metilcitosina - 5mC (SMITH; MEISSNER, 2013). Entretanto, metilações em citosinas que não estão presentes em sítios CpGs também são encontradas (IMAMURA et al, 2005). Os padrões de metilação do indivíduo são inicialmente estabelecidos na linhagem germinativa dos parentais (REIK; DEAN; WALTER, 2001).

A metilação do DNA presente em citosinas dedinucleotídeos CpG dentro de promotores gênicos regula a expressão gênica (JAENISCH; BIRD, 2003). O silenciamento gênico ocorre devido à 5mC, em promotores gênicos, impedindo fisicamente a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016). Além disso, proteínas que reconhecem a presença do grupo metil, as Methyl-CpG-Binding Domain, ligam-se ao DNA metilado compactando a cromatina, e dessa forma, contendo a transcrição gênica (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016).

O precursor e substrato essencial para o fornecimento de grupos metil no processo de metilação do DNA é a S-adenosilmetionina (SAM) (JAENISCH; BIRD, 2003). As enzimas que catalisam o processo de metilação do DNA são as DNA-metiltransferases (DNMT), que transportam um grupamento metil do SAM para uma citosina. Após transportar o metil, o SAM transforma-se em S-adenosil L-homocisteína (SAH) (SZYF, 2003).

As DNMTs inicialmente descobertas na reprogramação epigenética são a DNMT 1, que atua na replicação do DNA hemimetilado (somente uma fita está metilada), conservando seu padrão de metilação para a fita recém sintetizada, ou seja, ela é responsável pela manutenção dos padrões de metilação durante a replicação do DNA, garantindo assim a herança do padrão epigenético através das divisões celulares (BIRD, 2002). A DNMT3A, a DNMT3B e a DNMT3L que atuam preferencialmente na metilação “de novo”, metilando o DNA que se encontra com a

ausência de grupos metil, sendo responsáveis pelo estabelecimento de padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento embrionário inicial e na gametogênese (SZYF, 2003). A DNMT3L, apesar da ausência de atividade enzimática, estimula a metilação de novo através de sua interação com a DNMT3A e DNMT3B (JIA et al., 2007).

As vias de desmetilação do DNA classificam-se em passivas e ativas (SEISENBERGER et al., 2013). Na desmetilação ativa, a atuação de dois grupos de enzimas são essenciais: as *Ten-eleven translocation* (TETs) e a thymine DNA glycosylase (TDG). As enzimas TETs formam novas estruturas, a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), a 5-formilcitosina (5fC) e a 5-carboxicitosina (5caC), através de processos de oxidação (IURLARO et al., 2016). Primeiro a oxidação do CH₃ da 5mC, formando a 5hmC, depois da oxidação da 5hmC formando a 5fC e logo após pela oxidação da 5fC gerando a 5caC. Já a TDG identifica e remove a 5fC ou a 5caC, fazendo um reparo no DNA e colocando uma citosina não metilada no lugar. Na desmetilação passiva, as novas fitas de DNA, com a ausência da ação das DNMT1, deixam de receber o CH₃ durante a replicação do DNA (KOHLLI; ZHANG, 2013).

Portanto, a metilação do DNA é um mecanismo essencial na regulação da expressão gênica (SIMONSSON; GURDON, 2004). Inclusive, um padrão de metilação do DNA anormal nos estágios iniciais do desenvolvimento pode ser uma das principais causas epigenéticas responsáveis pela baixa eficiência na clonagem (BOURC'HIS et al., 2001). Finalmente, a metilação do DNA exerce um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma, regulação do *imprinting* genômico e na inativação do cromossomo X, sendo indispensável na diferenciação celular e desenvolvimento embrionário inicial (DEAN et al., 2003).

3.B.2 Modificações pós-traducionais de histonas

A cromatina compreende o DNA, proteínas e RNAs. As principais proteínas da cromatina são as histonas, as quais estão sujeitas a muitas modificações pós-traducionais, que podem mudar a conformação do DNA, alterando a estrutura da cromatina (SMOLLE; WORKMAN, 2012).

Mudanças na cromatina, como a compactação da mesma é um dos mecanismos que regulam a ligação dos fatores de transcrição ao DNA. Quando a cromatina está mais compactada, é chamada de heterocromatina e deixa os locais de ligação relacionados à transcrição inacessíveis aos fatores de transcrição. Quando a cromatina está menos compactada é denominada eucromatina permitindo que fatores de transcrição acessem os promotores gênicos (ALBERT et al, 2011).

Dentre as modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas estão, a acetilação, ubiquitinação, metilação, fosforilação, glicosilação, SUMOilação, ADP-ribosilação, dentre outras (BERNSTEIN et al., 2007; SHI; WHETSTEIN, 2007). Uma das principais modificações é a acetilação de histonas que permite ou mantém um ambiente propício à transcrição, enquanto a desacetilação funciona de forma antagônica (D' ALESSIO; SZYF, 2006). A adição de grupos acetil a grupos aminos de resíduos de lisina, através do composto acetil-Coenzima A, é o que se denomina acetilação das histonas. A acetilação é catalisada pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs) e a desacetilação é catalisada pelas enzimas histona desacetilases (HDACs) (KOUZARIDES, 2007). Histonas acetiladas estão relacionadas a um estado de eucromatina em razão de reduzir as cargas positivas das histonas que interagem com as cargas negativas do DNA, descompactando a cromatina (KOUZARIDES, 2007). Além disso, histonas acetiladas podem recrutar complexos de remodelação, descondensando a cromatina (NAN; CROSS; BIRD, 1998).

As enzimas responsáveis por catalisar a metilação e desmetilação de histonas são respectivamente denominadas, histonas metiltransferases (HMTs) e histonas desmetilases (HDMTs) (XU; ANDREASSI, 2011). Quando ocorre metilação em resíduos de arginina e lisina nas caudas das histonas H3 e H4 podem alterar a conformação da cromatina, dependendo do local e da quantidade de grupos metil adicionadas às histonas. Os resíduos de lisinas podem ser mono, di ou trimetilados (KOUZARIDES, 2007). A trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) por exemplo, eleva o número de cargas positivas aumentando a interação com o DNA, que contém carga negativa, tornando a cromatina mais compactada e assim menos propensa a transcrição (INOUE et al., 2017).

3.B.3 RNAs não codantes

Os RNAs não codantes são divididos em: RNA longos (lncRNAs- mais de 200 nucleotídeos) e os microRNAs (miRNA- menos de 200 nucleotídeos). Os lncRNAs são classificados através de sua localização referente a genes codificantes de proteína no genoma (PONTING; OLIVER; REIK, 2009). Eles desempenham ações como: scaffolds, buscando múltiplas proteínas e formando complexos ribonucleoprotéicos; guias; controladores transcricionais, regulando interações da RNA polimerase e fatores de transcrição; modificadores de estruturas da cromatina, por influenciar a interação de proteínas e DNA; e decoy (artefato), quando se liga a uma estrutura e impede que a mesma se ligue a sua estrutura de origem (PONTING; OLIVER; REIK, 2009). O primeiro lncRNA encontrado relacionado a regulação epigenética foi o XIST (Transcrito específico do X inativo) (CLEMSON et al, 1996).

Os miRNAs controlam a expressão gênica impedindo a tradução ou degradando os miRNAs complementares. Por exemplo, os microRNAs tem o potencial de regular negativamente a trimetilação da lisina 9 da H₃ (H3K9me3), através da ligação do miR125b à região 3' UTR da SUV39H1 (histona-lisina N metiltransferase) bloqueando a região, e promovendo a reprogramação nuclear em animais clones (ZHANG et al., 2017).

3.B.4 Reprogramação epigenética no desenvolvimento inicial de mamíferos

Os gametas são responsáveis por transmitir informações genéticas e epigenéticas para a próxima geração. Passam por uma extensa reprogramação epigenética, tornando assim, estas células aptas à fecundação e à embriogênese (REIK, 2007). Ovócitos e espermatozoides maduros se comportam de maneiras diferentes, sendo a cromatina dos espermatozoides mais compactada e os ovócitos com maior presença de histonas (PURI et al., 2010).

No período inicial de desenvolvimento e na formação das células germinativas que os padrões epigenéticos são reprogramados em duas ondas de desmetilação e remetilação (Figura 1) (REIK, 2007). As duas ondas de reprogramação epigenética ocorrem na gametogênese e durante o início da embriogênese (FRANCO;

MARINHO; LUNARDELLI, 2016). A primeira onda inicia-se nas células germinativas primordiais (CGPs), durante a migração dessas células para a crista gonadal, onde vai se perdendo o padrão de metilação do DNA e sofrendo mitoses sucessivas (HYLDIG et al., 2011). Nesse processo ocorre também a perda das marcas *imprinted* e a reativação do cromossomo X inativo (Xi), tanto pelo processo de desmetilação passiva quanto ativa (HILL; AMOUROUX; HAJKOVA, 2014).

Nos fetos fêmeas inicia-se a meiose e para em prófase I, com o gameta retomando a meiose apenas após a puberdade (MACDONALD; MANN, 2014). A remetilação inicia-se antes da puberdade, no momento em que os folículos recrutados estão crescendo, porém, somente depois da puberdade que o processo de metilação “*de novo*” se completa (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016). Nesse período, ocorre o estabelecimento do estoque materno de RNA mensageiro e as modificações de histonas (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016). Nos fetos machos o acúmulo transitório de 5hmC e outras modificações das citosinas é resultado da desmetilação ativa (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016). O processo de remetilação começa nas proespermátogônias, no entanto, a meiose se iniciará somente no início da puberdade (BIERMANN; STEGER, 2007). Dessa forma, o primeiro ciclo de reprogramação é finalizado, e no momento da fecundação, ambos os gametas se encontram altamente metilados (REIK; DEAN; WALTER, 2001).

Logo após a fecundação, o genoma de ambos os gametas não está transcrevendo e está altamente metilado (BESTOR, 2000). A seguir, os cromossomos de origem paterna descondensam a cromatina com a substituição das protaminas por histonas maternas, e então ocorre um processo de desmetilação ativo e rápido do DNA, através da atuação das TETs e da TDG (PURI et al., 2010). Por outro lado, no genoma materno, ocorre um processo de desmetilação passiva, dependente da replicação do DNA, através da saída da DNMT1 do núcleo (PURI et al., 2010).

O processo de metilação “*de novo*” inicia-se, em bovinos, a partir do estágio embrionário de 8-16 células (CHAILLET et al., 1991; STÖGER et al., 1993). As células do trofoblasto, que darão origem aos tecidos extraembrionários (placenta fetal), recebem um nível menor de metilação em relação às células da massa celular interna (FRANCO; MARINHO; LUNARDELLI, 2016).

Na clonagem por transferência nuclear de células somática (TNCS), para que se obtenha sucesso no desenvolvimento embrionário, as marcas epigenéticas precisam ser reprogramadas da mesma forma que se fosse à de um embrião fruto de uma fecundação. Porém, essa reprogramação é feita em um período mais curto e em um contexto celular diferente, pois na TNCS trata-se da união de um ovócito com o núcleo de uma célula diferenciada que está sendo reprogramada, e não a união de um espermatozoide com um ovócito, aumentando assim as probabilidades de falhas no processo (BOURC'HIS et al, 2001; DEAN et al., 2001). Isto é, além de reduzir o nível de desmetilação, é notada uma metilação “*de novo*” precoce quando comparadas a de embriões produzidos por fecundação natural (BOURC'HIS et al, 2001; DEAN et al., 2001).

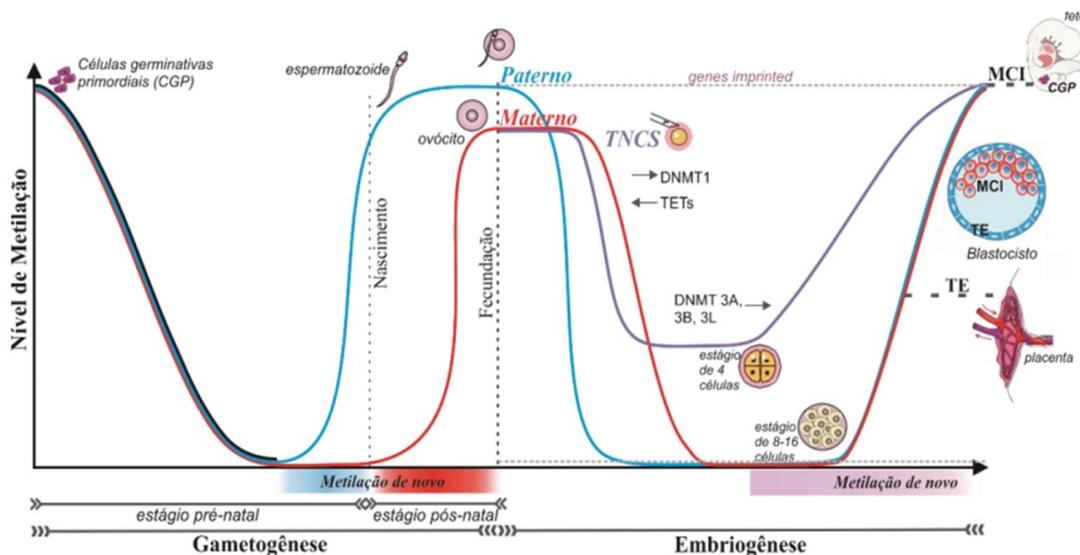


Figura 1: Reprogramação epigenética em mamíferos. Na gametogênese as células germinativas primordiais (CGP), os genomas paterno e materno (linhas azul e vermelha, respectivamente) sofrem uma desmetilação global do genoma, inclusive também nas regiões diferencialmente metiladas da linhagem germinativa (gDMRs) (linha preta). Em fetos machos, a metilação de novo começa ainda durante a vida fetal (estágio pré-natal) e ao nascimento o genoma paterno já tem um alto nível de metilação (estágio pós-natal) (linha azul). Nos fetos do sexo feminino, 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 (estágio pós-natal) (linha vermelha). Na embriogênese, após a fecundação e antes da replicação do DNA, as enzimas TETs desmetilam ativamente o genoma paterno (linha azul) e ocorre uma remodelação global com a troca de protaminas por histonas maternas (não demonstrado), enquanto o genoma materno é desmetilado após várias divisões celulares por um mecanismo passivo (linha vermelha), devido à remoção da DNMT1 do núcleo. Em embriões bovinos, a metilação de novo dos dois genomas parentais, catalisada pelas DNMTs 3A, 3B e 3L, inicia-se em torno do estágio de 8-16 células. A linha roxa representa a reprogramação da metilação do DNA em embriões clones, mostrando que após a transferência nuclear ocorre uma ineficiente perda de metilação e a metilação de novo iniciando-se precocemente, no estágio de 4 células. A primeira diferenciação celular ocorre na fase de blastocisto, gerando as células do trofoblasto (TE), que originarão a placenta, e a massa celular interna (MCI), as quais originarão o feto. As linhas cinzas tracejadas representam os alelos dos genes imprinted, sendo que a linha superior representa os alelos metilados e a inferior, os alelos não metilados. O gráfico não está representado em escalas e não mostra a proporção exata de metilação. Fonte: Adaptado Vargas , 2018.

3.B.5 *Imprinting* Genômico

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético que leva a expressão monoalélica de genes de acordo com a origem parental do alelo, ou seja, das duas cópias herdadas, apenas um alelo é expresso (ELHAMAMSY, 2017). Sua principal marca epigenética é a metilação do DNA, estabelecida durante a gametogênese (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014). Os genes *imprinted* geralmente estão relacionados a comportamento, metabolismo, crescimento fetal e desenvolvimento pós-natal (DAELEMANS et al., 2010).

No *imprinting* genômico, enquanto alelo de origem materna tende a diminuir o crescimento fetal, o alelo de origem paterna tende a estimular o crescimento e o desenvolvimento fetal (HAIG; GRAHAM, 1991). Assim, as fêmeas são capazes de ter vida reprodutiva longa se restringirem o tamanho do feto, possibilitando o sucesso reprodutivo à longo prazo, enquanto que o macho espera uma progênie maior e mais forte, mesmo que seja prejudicial à fêmea, ou seja, apresentam efeitos antagônicos no controle da gestação (ISLES; DAVIES; WILKINSON, 2006). Esta é a teoria do conflito entre os sexos (MOORE; HAIF, 1991).

Outra teoria para o *imprinting* genômico seria em função do modelo evolutivo, onde as espécies que possuem o *imprinting* genômico seriam mais hábeis para responder as pressões do ambiente alterando alelo a ser expresso (BEAUDET; JIANG, 2002). Tem ainda a teoria da “bomba-relógio ovariana,” segundo a qual o *imprinting* ocorre para preservar a fêmea, evitando o desenvolvimento partenogênético de embriões dentro do ovário (VARMUZA; MANN, 1994).

Os padrões de metilação de regiões *imprinted* são estabelecidos na primeira onda de reprogramação durante a gametogênese, e devem ser mantidos durante a segunda onda de reprogramação, durante a embriogênese inicial caso contrário, afetaria o desenvolvimento embrionário e fetal normais (REIK; WALTER, 2001). Este fenômeno epigenético é de suma importância para a regulação do crescimento fetal e desenvolvimento placentário (REIK et al., 2003). A ocorrência de erros pode levar a anormalidades, síndromes ou doenças durante o desenvolvimento embrionário e após o nascimento (REIK et al., 2003). Um dos importantes motivos que leva a erros deste processo é a estimulação ovariana no contexto das técnicas de reprodução assistida

(TRA) (CHANG et al., 2005), como também na clonagem por transferência nuclear em animais (SMITH et al., 2012).

3.B.6 Os genes IGF2 e H19

Existem dois genes, envolvidos com crescimento e desenvolvimento embrionário e crescimento, controlados por *imprinted* que são o fator de crescimento semelhante a insulina 2 (IGF2) e o gene H19 que transcreve um RNA longo não codante (ZHANG et al., 2004). O gene IGF2 na espécie bovina possui 10 éxons, está localizado no cromossomo 29 e já foram identificados quatro promotores distintos desse gene (GEBERT et al., 2006). O IGF2 é responsável pela indução do crescimento e desenvolvimento fetal e está relacionado ao desenvolvimento da placenta por seu poder mitogênico, promovendo a divisão e diferenciação celular (O'DELL; DAY, 1998; GEBERT ET AL., 2006). Após o nascimento, o IGF2 se torna menos ativo, exceto no músculo esquelético (WEBER et al., 2001). A proteína advinda do gene IGF2 é constituída por 67 aminoácidos, possui homologia com a insulina e o IGF1, e, além disso, grande parte é produzida no fígado (O'DELL; DAY, 1998). Essa proteína pode controlar a disponibilidade de glicose armazenada, transportar aminoácidos e estimular a síntese de RNA e DNA, se ligando, ao receptor da insulina ou ao receptor do IGF1 (SIBLEY et al., 2004). Já o receptor do tipo 2 (IGF2R) é responsável por transportar o IGF2 para os lisossomos degradá-lo (O'DELL; DAY, 1998). O gene H19 transcreve uma molécula de RNA não codante, responsável pela inibição da expressão de IGF2 (BRANNAN et al., 1990). Como tem um padrão *imprinted*, apenas o alelo materno é transcrito. O contrário acontece com o IGF2, para o qual apenas o alelo paterno é expresso (DAELEMANS et al., 2010).

Os genes H19 e IGF2 sofrem ações do mesmos *enhancers* e localizam-se no mesmo *cluster* (CHAO; D' AMORE, 2008). Regiões diferencialmente metiladas (DMRs) controlam a expressão dos genes H19 e IGF2 (THORVALDSEN et al., 1998), e são encontradas em uma região denominada região controladora de *imprinting* (ICR). Essa ICR do *locus* IGF2/H19, possui regiões (*zinc-finger*) de ligação para uma proteína chamada CTCF, que se liga preferencialmente no alelo não-metilado (DELAVAL e FEIL, 2004). Quando CTCF se liga a ICR impede a

interação entre o gene IGF2 e os *enhancers* localizados *downstream* ao H19, transcrevendo apenas o gene H19, o que ocorre no alelo materno (DELAVAL e FEIL, 2004). No alelo paterno, o CTCF não se liga devido a ICR estar metilada, permitindo assim a interação dos *enhancers* com os promotores de IGF2, transcrevendo IGF2 e impedindo a transcrição do H19, o qual também tem seu promotor metilado (SCHOENHERR et al., 2003; DELAVAL e FEIL, 2004). A figura 2 mostra o controle *imprinted* de regulação do locus IGF2/H19

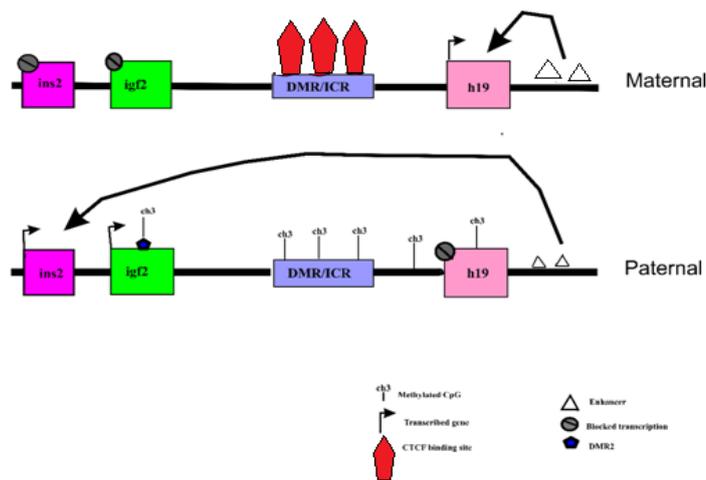


Figura 2: Mecanismo de regulação do gene H19 e do IGF2. Nesta figura estão representados os alelos materno e paterno para o locus IGF2/H19. No alelo materno, o CTCF se liga à região desmetilada da ICR/H19 bloqueando a ligação dos enhancers à região promotora do gene IGF2, silenciando o mesmo. Os *enhancers* promovem a transcrição do gene H19 no alelo materno. No alelo paterno a região ICR/H19 está metilada, portanto não há ligação do CTCF e os *enhancers* se aproximam do promotor de IGF2, desencadeando a transcrição do IGF2. Fonte: Adaptado de Bartolomei, 2009.

Foram identificadas em murinos três DMRs ligadas ao controle do gene IGF2, sendo que duas são metiladas no alelo paterno (MURREL et al, 2001). No éxon 10 do gene IGF2, em bovinos, foi encontrado uma DMR intragênica que é capaz de ativar a transcrição no alelo paterno, se metilada (GEBERT et al, 2006). Em camundongos essa DMR é denominada DMR2, que após a fecundação é reprogramada e durante o desenvolvimento embrionário retorna ao estado hipermetilado (GEBERT et al, 2006). No alelo paterno, a ausência da CTCF ligada na ICR/H19 metilada, eleva a afinidade pela DMR2 metilada do IGF2, aproximando

os fatores de transcrição do promotor de IGF2, inclusive os *enhancers*, possibilitando a expressão do gene (GEBERT et al., 2016). Um dos mecanismos que impedem a ligação de CTCF à ICR é o fato da mesma estar com a marca H3K9me (FRANCO; PRICKETT; OAKEY, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, Distrito Federal.

4.A Delineamento Experimental

O material biológico utilizado neste estudo foi cotilédone fetal de placenta bovina, da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Todo o material foi coletado na empresa Geneal Genética e Biotecnologia Animal, em Uberaba-MG. Com esse material foi analisado o padrão de metilação da DMR do exon 10 do gene IGF2 e da ICR H19 na placenta de clones fêmeas e machos, com fenótipos saudáveis e aberrantes. Os clones foram considerados aberrantes quando apresentaram pelo menos um dos fenótipos a seguir: cordão umbilical grosso, mortalidade na primeira semana, LOS, edema de placenta, placentoma grande, líquido placentário tingido de mecônio. Como controles, foram utilizadas placentas de dois animais, um macho e uma fêmea, produzidos por inseminação artificial./ (Tabela 1). O Comitê de Ética em uso Animal (protocolo CEUA nº 078/16) da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, aprovou todos os procedimentos realizados.

Tabela 1: Animais selecionados para o estudo, de acordo com o sexo, fenótipos e a viabilidade (sobrevivência na primeira semana do nascimento).

Animais selecionados para o estudo				
Indivíduo	Sexo	Fenótipo	Viabilidade	Classificação
Clone	Femêa	Nenhuma alteração	Sobreviveu à 1ª semana	Saudável
Clone	Femêa	Placentoma grande, LOS, Cordão Umbilical grosso,	Mortalidade 1ª semana	Aberrante
Clone	Macho	Nenhuma alteração	Sobreviveu à 1ª semana	Saudável
Clone	Macho	LOS, Edema de Placenta, Cordão Umbilical grosso, Placentoma Grande, Líquido placentário-mecônio.	Mortalidade 1ª semana	Aberrante
I.A.	Fêmea	Nenhuma alteração	Sobreviveu à 1ª semana	Saudável
I.A.	Macho	Nenhuma alteração	Sobreviveu à 1ª semana	Saudável

Material cedido pela empresa Geneal Genética e Biotecnologia Animal – Uberaba-MG
 I.A. _ Inseminação artificial

4.B Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado pelo método de *salting out* como descrito por Biase et al.(2002). Em seguida, foi submetido a avaliação de qualidade por eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração e pureza foram avaliadas com um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras de DNA genômico foram armazenadas a -20°C.

4.C Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio

Essa técnica permite a análise da metilação do DNA, pois o bissulfito de sódio converte citosinas não metiladas em uracilas. O kit utilizado para esse tratamento foi o EZ DNA Methylation[®] (Zymo Research, Irvine, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA tratado foi armazenado a -80°C. De acordo, com Zhang et al (2016) o padrão de metilação é classificado em: hipometilado (0 % - 20 %), hemimetilado (21 % - 50 %) e hipermetilado (51 % - 100 %).

4.D Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio

As amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas a PCR utilizando o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). As regiões de interesse foram a ICR do gene H19 e a DMR do éxon 10 do gene IGF2. As sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do DNA, o número de acesso ao *GenBank*, a posição da ilha CpG, a localização e o tamanho dos fragmentos amplificados estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Identificação do gene, sequências dos *primers*, código de acesso ao *GenBank*, localização dos *primers*, posição da ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos primers (5' ->3')	Acesso ao <i>GenBank</i>	Número de sítios CpGs	Posição da ilha CpG	Tamanho do amplicon
ICR / H19	<p style="text-align: center;">F: GGTGATATAGGGTAGTGTAGAGGATATTGGG</p> <hr/> <p style="text-align: center;">R: ATACTACTAAAAATCCCATAAAAAAATCTCTCTC</p>	Nc-037356.1	23	DMR1 ICR/H19 *	423pb
IGF 2	<p style="text-align: center;">F: TGGGTAAGTTTTTTAATATGATATT</p> <hr/> <p style="text-align: center;">R: TTAAAAACCAATTAATTTTATACATT</p>	X53553.1	28	Éxon 10	455pb

(F) forward; (R) reverse; (pb) pares de base; (DMR1) região diferencialmente metilada 1 dentro da ICR/H19*. Primer IGF2: GEBERT et al, 2006; Primer ICR/H19: Jenna et al 2014

As reações de PCR para ambas as regiões foram realizadas utilizando solução tampão 1X; MgCl₂ 2,0mM; dNTP 0,4mM; 1U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1uM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume ajustado para 20uL com água Milli-Q. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 3.

Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídio (10mg/ml) a uma corrente elétrica constante de 50mA em meio TBE 0,5 X. O marcador utilizado foi o de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel foi fotografado em um foto documentador (BioRad). Os amplicons foram recortados do gel e purificados utilizando o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. Em seguida, as amostras foram

quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop[®] (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

Tabela 3: Condições de amplificação utilizadas nas PCR para a região controladora de *imprinting* ICR/H19 e para a região diferencialmente metilada do gene IGF2.

<i>Locus</i>	Desnaturaç ão inicial	Ciclos (40 para ICR e 45 para IGF2)			Extensão Final
		Desnaturaç ão	Anelamen to	Extensã o	
ICR/H1	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
9	3min	40s	1 min	1 min	15 min
DMR	94°C	94°C	45°C	72°C	72°C
IGF2	3min	40s	1 min	1 min	15 min

(min) minutos; (s) segundos. ICR - região controladora de *imprinting*; DMR - região diferencialmente metilada

4.E Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial

O kit TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen) foi utilizado para a clonagem dos amplicons. As células DH5 α foram transformadas utilizando um protocolo de choque térmico. Depois foram colocadas em placa petri 90x15 mm contendo ágar com ampicilina 100ug/mL, 40 μ L de X-Gal (Sigma) a 20 mg/mL e 4 μ L de IPTG 0,1 M (Sigma), seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37°C por 14 horas.

As colônias brancas foram selecionadas para serem cultivadas em meio Luria Bertani (LB) mais ampicilina a 100ug/mL. Com um palito de madeira estéril as colônias foram retiradas e depositadas dentro de um tubo coletor de 15 mL, contendo 3 mL de meio LB. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA). Metade do conteúdo dos tubos foi utilizada para a extração do DNA plasmidial, segundo o protocolo de mini-preparação de plasmídeo (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), com pequenas modificações. As células foram centrifugadas e lavadas em PBS pH 7,4. Em seguida foram tratadas com uma solução contendo Tris 25 mM e EDTA 10 mM, acrescida de RNase A em uma concentração final de 10 μ g/mL por amostra. A lise celular foi realizada com detergente em meio alcalino (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e o DNA foi precipitado com acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M. As amostras foram

incubadas *overnight* a -20°C com isopropanol 100% e tratadas com cloreto de lítio 500 mM. O DNA foi lavado sucessivamente com etanol 100% e 70% para purificação. Os *pellets* secos foram eluídos em 20 μL de água deionizada e o DNA quantificado em espectrofotômetro NanoDrop[®] (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

4.F Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências

A digestão das amostras de miniprep para a confirmação da clonagem foi realizada com o uso da enzima ECOR1 (5U), o tampão H (1X) e o DNA do miniprep (2 μL) ajustado com água Milli-Q para 10 μL . As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C *overnight*. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL para confirmação da presença dos fragmentos. Amostras do DNA plasmidial (~300ng) foram sequenciadas pelo método de Sanger utilizando o primer universal M13 *reverse*.

O programa Chromas[®] verificou a qualidade do sequenciamento e para a quantificação do padrão de metilação foi utilizado o programa QUMA (Kumaki, Oda e Okano, 2008), comparando as sequências obtidas com uma referência depositada no *GenBank*, tanto para a ICR/H19 (X53553.1) quanto para o IGF2 (NC-037356.1). Neste trabalho considerou-se apenas sequências que apresentaram no mínimo 97% de conversão pelo bissulfato de sódio – quando se observou a taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina e sequências com no mínimo de 95% de identidade – quando comparadas com a sequência referência.

4.G Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Os animais foram

comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se a análise de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. As médias e desvios padrões foram averiguados utilizando o programa Action versão 2.9 (Equipe Estatcamp, 2014). Os resultados foram descritos como média \pm erro padrão da média. Valor de $P \leq 0,05$ denota uma diferença estatisticamente significante.

5 RESULTADOS

A ICR/H19 apresentou os seguintes percentuais de metilação: $20,916 \pm 7,016\%$ para clone fêmea com fenótipo saudável, $24,907 \pm 9,785\%$ para clone macho com fenótipo saudável, $32,592 \pm 10,598\%$ para clone fêmea com fenótipo aberrante e $28,584 \pm 9,771\%$ para clone macho com fenótipo aberrante. A porcentagem de metilação para o grupo controle foi $30,06 \pm 10,910\%$ para fêmea e $75,016 \pm 10,667\%$ para macho (Figura 3).

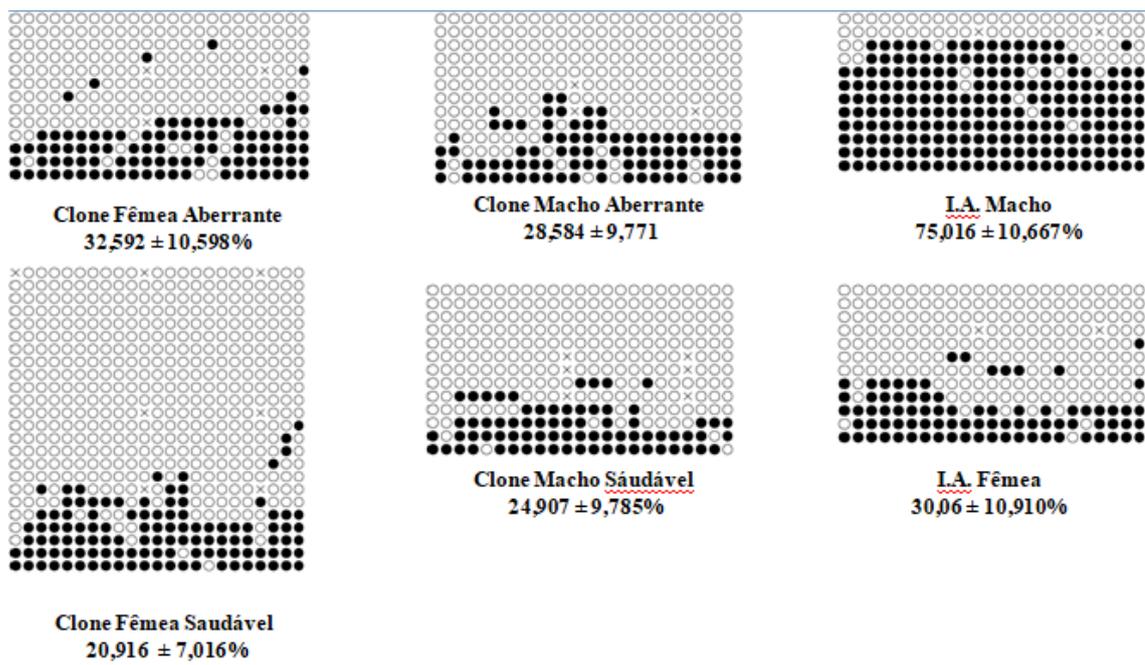


Figura 3: Padrão de metilação da ICR/H19 na placenta (cotilédone) de clones bovinos fêmeas e machos, saudáveis e aberrantes, e de fêmeas e machos concebidos por Inseminação Artificial (controles). Cada linha representa um, onde cada círculo equivale a uma citosina no contexto de dinucleotídeo CpG. Os círculos brancos representam citosinas não metiladas e círculos pretos as citosinas metiladas. As citosinas que não puderam ser analisadas estão representadas por um X. Os animais e as porcentagens de metilação do DNA estão representados embaixo de cada grupo e foram apresentadas como média.

Em relação, ao éxon 10 do IGF2, verificou-se os seguintes percentuais de metilação: $20,644 \pm 11,968\%$ para clone fêmea com fenótipo saudável, $35,571 \pm 16,065\%$ para clone macho com fenótipo saudável, $34,34 \pm 13,909\%$ para clone fêmea com fenótipo aberrante e $10,727 \pm 8,288\%$ para clone macho com fenótipo aberrante. A porcentagem de metilação para o grupo controle foi $44,65 \pm 41,05\%$ para fêmea e $30,858 \pm 8,928\%$ para macho (Figura 4).

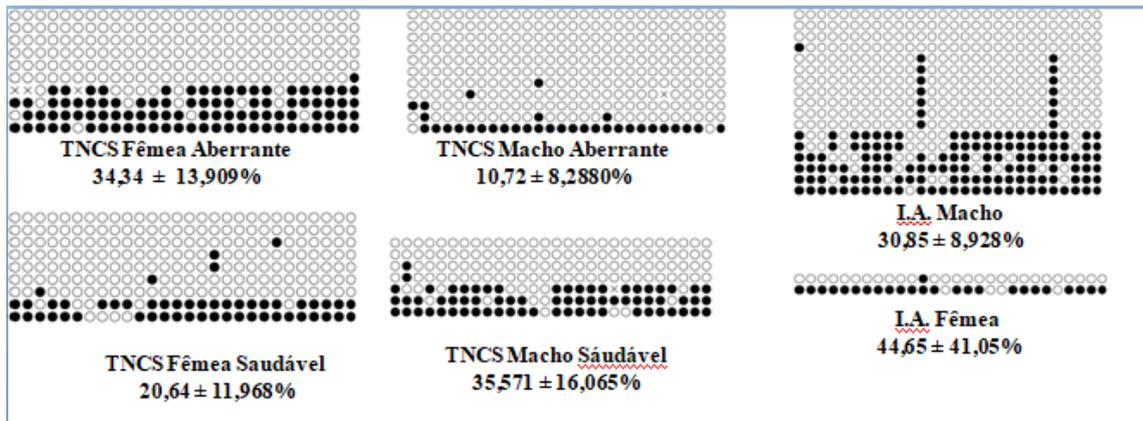


Figura 4: Padrão de metilação do éxon 10 do gene IGF2 na placenta (cotilédone) de clones bovinos fêmeas e machos, saudáveis e aberrantes, e de fêmeas e machos concebidos por Inseminação Artificial (controles). Cada linha representa um alelo, onde cada círculo equivale a uma citosina no contexto de dinucleotídeo CpG. Os círculos brancos representam citosinas não metiladas e círculos pretos as citosinas metiladas. As citosinas que não puderam ser analisadas estão representadas por um X. Os animais e as porcentagens de metilação do DNA estão representados embaixo de cada grupo e foram apresentadas como média.

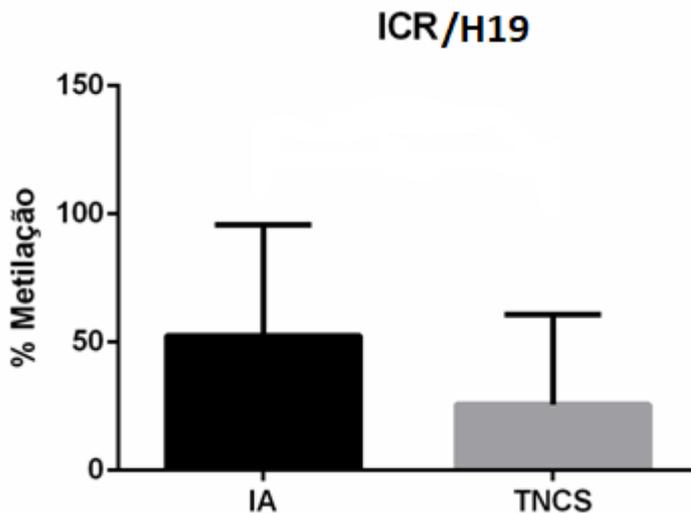


Figura 5: Taxa de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para a ICR/H19-aberrantes e saudáveis). Os resultados são representados como média \pm desvio padrão da média. ($p < 0,05$)

De acordo, com os resultados obtidos para a região ICR/H19, os animais controles, como previsto pela literatura, obteve na média, um padrão de metilação de aproximadamente 50%, enquanto os clones encontram-se menos metilados (Figuras 5 e 7).

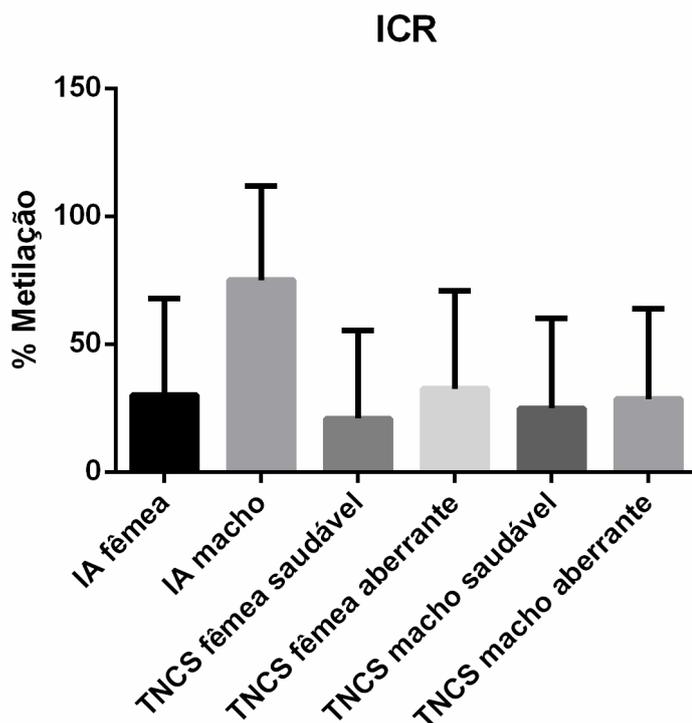


Figura 6: Taxa de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

Além do mais, individualizando a comparação de clones com os controles, foram encontrados na ICR do H19 em placenta de bezerros clones, uma diferença significativa dos controles apenas com os clones de fenótipo saudável (0,0089) (Figuras 6 e 7), os demais clones não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

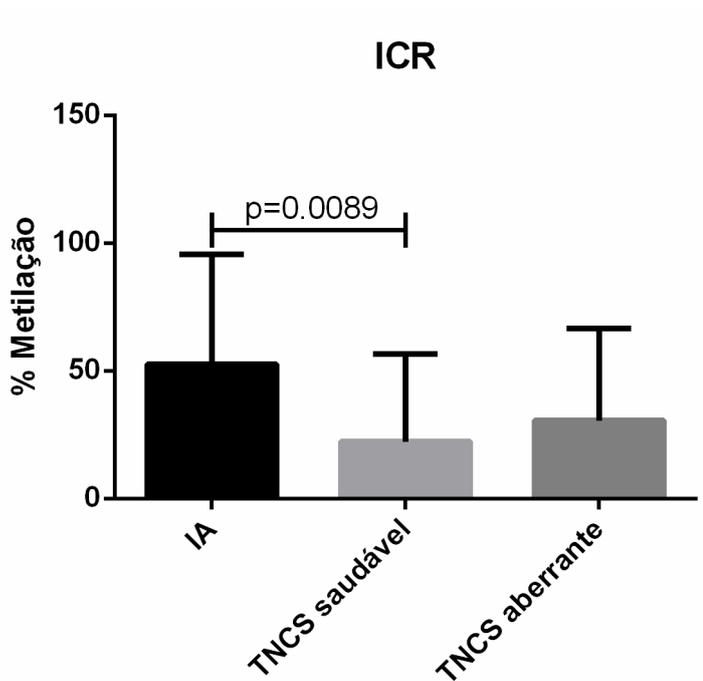


Figura 7: Padrão de metilação para a região ICR/H19. Cada barra representa um grupo estudado: IA, TNCS saudável, TNCS aberrante. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).

Em referência a comparação de clones aberrantes e clones saudáveis, para a ICR do H19, não houve uma diferença significativa do padrão de metilação (Figuras 6 e 7).

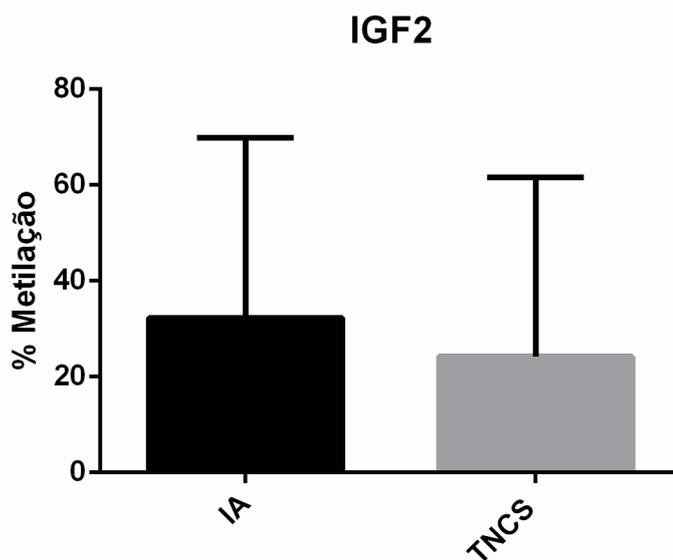


Figura 8: Taxa de metilação para a região do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para o éxon 10 do IGF2 -aberrantes e saudáveis). Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

Avaliando o padrão de metilação do éxon 10 do *IGF2* na placenta de clones em comparação ao grupo controle concebido por inseminação artificial, não verificou-se diferença significativa entre os grupos (Figuras 8 e 10).

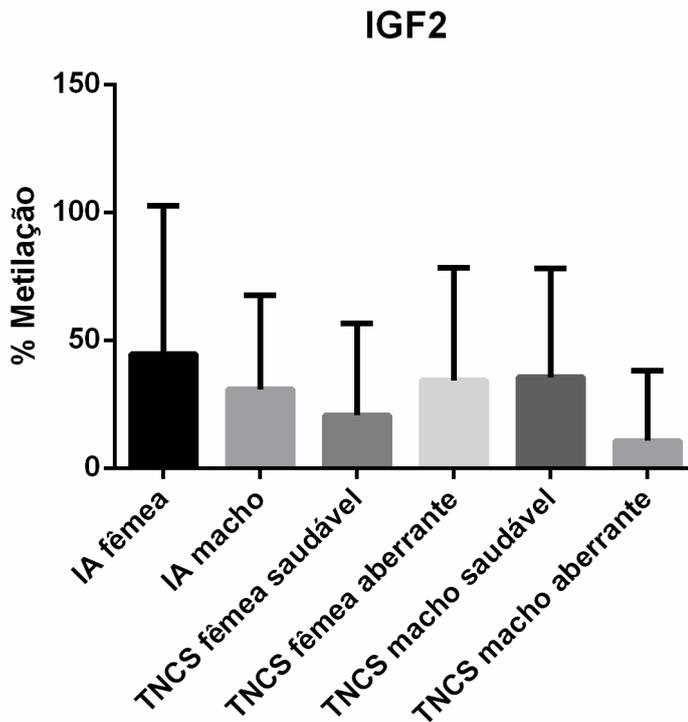


Figura 9: Taxa de metilação para a região do éxon 10 do *IGF2*. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

Em relação, a comparação do padrão de metilação de clone aberrante X clone saudável, para o éxon 10 do *IGF2*, também não tiveram alterações significativas (Figuras 9 e 10). Porém, pode-se observar um padrão hipometilado nos clones aberrantes, para região do éxon 10 do *IGF2* (Figuras 8, 9 e 10).

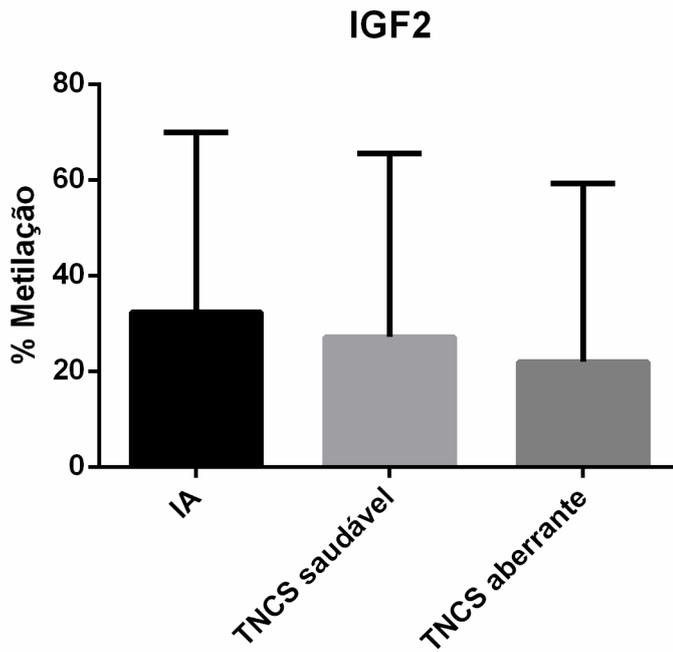


Figura 10: Padrão de metilação para a região do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA, TNCS saudável, TNCS aberrante. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

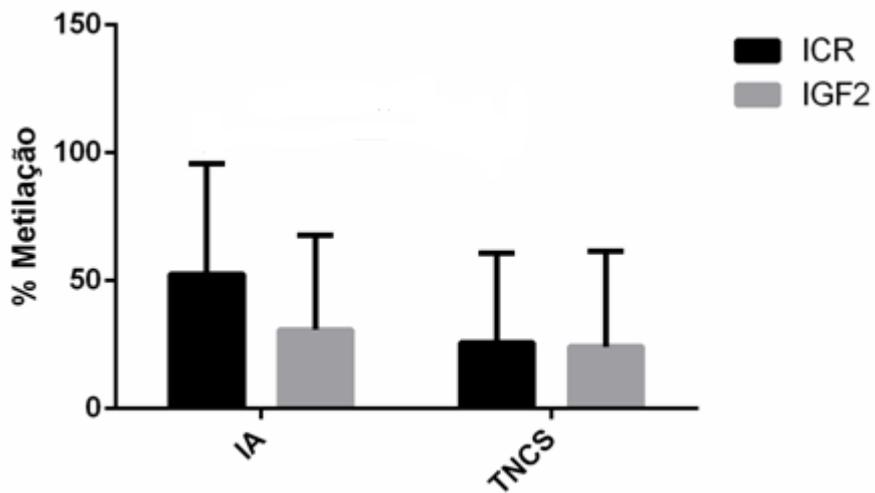


Figura 11: Comparação entre taxa de metilação para a região da ICR do H19 e do éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA (controles por inseminação artificial) e TNCS (todos os clones estudados para as duas regiões). Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

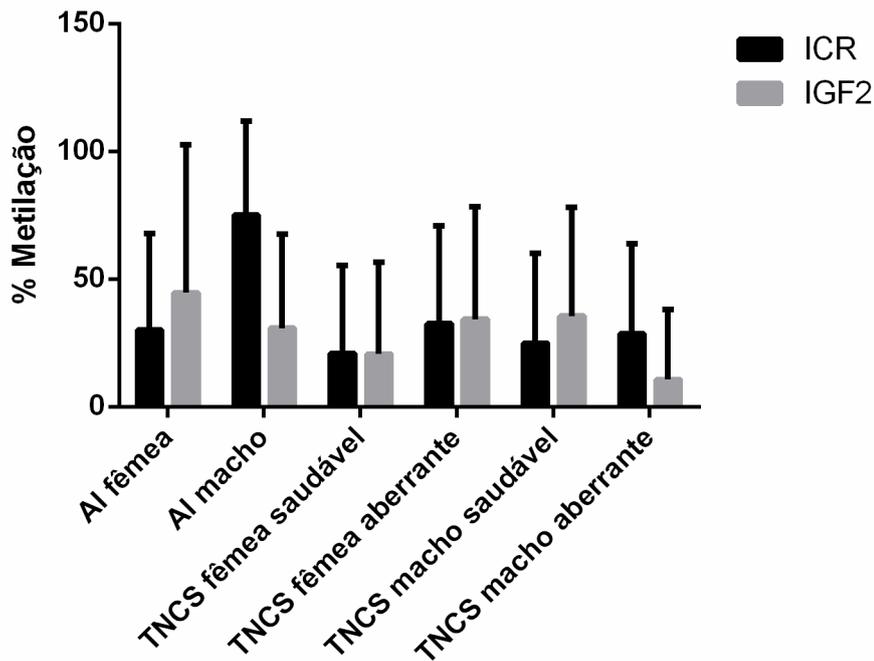


Figura 12: Comparação da taxa de metilação para a região ICR do H19 e para o Éxon 10 do IGF2. Cada barra representa um grupo estudado: IA fêmea, IA macho, TNCS fêmea saudável, TNCS fêmea aberrante, TNCS macho saudável e TNCS macho aberrante, para as duas regiões. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

O padrão de metilação tanto da ICR/H19 quanto do éxon 10 do IGF2 para os clones utilizados nesse estudo, mostrou um padrão menos metilado em relação aos controles (Figuras 11, 12 e 13).

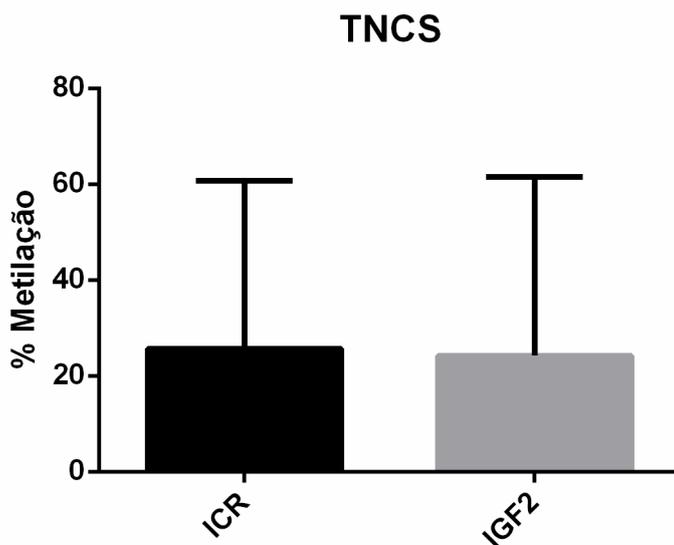


Figura 13: Comparação do padrão de metilação dos clones selecionados para a região da ICR/H19 e dos clones selecionados para a região do éxon 10 do IGF2. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Apesar do grande avanço da técnica de clonagem por transferência nuclear, a sua eficiência ainda permanece baixa (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2012). É possível verificar altas taxas de perdas no decorrer de toda gestação e também após o nascimento em várias espécies devido a distúrbios placentários e fenótipos aberrantes nos animais clones (CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Dentre os diversos distúrbios que os clones apresentam em seus anexos embrionários estão: cordão umbilical muito grosso, edema na placenta, placentomas grandes (HASHIZUME et al., 2002). Acredita-se que a causa principal desses problemas nos fetos e em suas placentas, esteja relacionada com erros epigenéticos envolvidos no desenvolvimento embrionário, como falhas no processo de reprogramação nuclear (CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Por exemplo, o *imprinting* genômico é indispensável para o desenvolvimento normal do indivíduo (REIK et al., 2003). Caso não seja estabelecido corretamente, pode trazer danos na regulação do crescimento e desenvolvimento do feto, assim como da placenta (REIK et al., 2003).

De acordo com os resultados deste trabalho, ao comparar o padrão de metilação de todos os clones com os animais controles (concebidos por inseminação artificial), para a região da ICR/H19, pode-se observar um padrão *imprinted* nos animais controles com uma porcentagem de metilação ao redor de 50%. Esse padrão de metilação pode ser confirmado no estudo de Park et al (2009) com células somáticas de suínos, em específico o tecido pulmonar, um padrão hemimetilado, comprovando um modelo *imprinted*, com expressão apenas de um alelo dependendo da origem parental. Por outro lado, nesse estudo, os clones encontravam-se menos metilados. Como já mostrado em outros trabalhos, esse padrão pode ser devido a uma reprogramação incompleta que ocorre em clones, e que pode ser a causa da eficiência baixa da técnica (XUEXIONG et al, 2017). No trabalho de Xuexiong et al (2017), com fibroblastos de fetos suínos clonados, enquanto os controles (originados de uma fecundação natural) apresentavam para essa mesma região um padrão de 50% metilado, os clones eram avaliados com um padrão de metilação hipometilado. No estudo de Silveira (2018), na região satélite I, a placenta de bezerros clonados também mostraram menos metiladas em relação aos animais controles.

No estudo de Yang et al (2005), com clones bovinos neonatos, metade dos animais apresentaram um aumento significativo do padrão de expressão do *H19*, ou seja, a ICR do *H19* que controla essa região se encontrava pouco metilada nesses clones, como encontramos no nosso estudo. Assim como já foi relatado também, a expressão bialélica deste mesmo gene (ZHANG et al., 2004).

Segundo Yamazaki, (2006), em seu estudo sobre o mecanismo do *imprinting* genômico em placenta de clones bovinos foi encontrada uma reprogramação nuclear incompleta na placenta de clones viáveis nascidos a termo. O que pode justificar nesse trabalho o fato dos controles apresentarem uma diferença significativa em relação a clones com fenótipos saudáveis, para a região da ICR/*H19*.

Não foi encontrado para o éxon 10 do *IGF2* uma diferença significativa entre controles X clones e clones aberrantes X clones saudáveis. A queda da atividade do *IGF2* em placentas bovinas pode levar a anormalidades placentárias, como diminuição dos números de placentomas, hipovascularização da placenta e desenvolvimento rudimentar de alguns anexos placentários (YAMAZAKI, 2006). No entanto, sua elevação pode levar a uma gama de síndromes, como a síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), caracterizada pelo crescimento exacerbado (ENGEL et al, 2000; ROBBINS, 2012). Provavelmente, com um número amostral maior, seria encontrado uma diferença significativa entre os grupos avaliados aqui neste estudo.

Novamente sobre o estudo de Yamazaki (2006), foi revelado uma alteração significativa no padrão de expressão dos genes *H19* e *IGF2* na placenta de clones bovinos comparado aos controles, com uma menor expressão desses genes “*imprinted*”, contribuindo para elevação da mortalidade pós-natal. Acredita-se que a taxa de perda seja consequência dos distúrbios placentários, o que pode ser explicado pelo fato da placenta ser responsável pela troca de gases e nutrientes entre mãe e feto, além de ser importante no processo de implantação e início do reconhecimento da gestação pela mãe (CROSS, 2006). Portanto, uma placenta diferente da ideal, com a presença de distúrbios fenotípicos, pode interferir mais no processo de reprogramação do núcleo e regulação da expressão gênica do feto. Ao contrário do estudo de Yamazaki, na placenta de clones murinos foi encontrado um padrão de expressão para essa região elevado (INOUE et al., 2002), sugerindo uma alteração

espécie específica, inclusive sendo diferente o processo de placentação entre camundongos e bovinos (HUMPHERYS et al., 2001; KATO et al., 1998).

Nesse estudo pode ser notada uma correlação positiva entre as duas regiões estudadas, com padrões de metilação semelhantes. Em relação à expressão, em camundongos foi encontrado uma correlação negativa entre *IGF2* e *H19*, assim como em muitas espécies (HUMPHERYS et al., 2001), diferente do estudo de Yamazaki (2006), em que foi possível notar uma correlação positiva entre os genes. Nesse último caso, a diminuição do H19 não levou ao aumento do *IGF2*, sugerindo que o mecanismo de regulação dos genes *imprinted* pode apresentar diferenças entre espécies (YAMAZAKI, 2006), ou indica que o *IGF2* não é apenas regulado pelo *H19*. Mesmo que existam poucos estudos destes genes em placenta de clones bovinos, a análise de tecidos de neonatos clones e clones mortos logo após o nascimento demonstraram que os padrões de expressão do *IGF2* estavam significativamente mais altos do que nos bezerros controles (YANG et al., 2005). Entretanto, na análise de tecidos de neonatos clones ovinos, não foi detectada nenhuma diferença para expressão dos genes *IGF2* e *H19* em relação aos controles (YOUNG et al., 2003). Em vista disso, é notada uma diversidade nos resultados de pesquisas relacionadas com essas regiões para clones, indício de uma reprogramação gênica incompleta, variando de acordo com a estabilidade epigenética do núcleo doador (HUMPHERYS et al., 2001) ou também pode indicar que não é apenas essas regiões que determinam o sucesso no desenvolvimento embrionário, mas sim um conjunto de genes, sendo bem reprogramados (CHAVATTE-PALMER et al., 2004).

Embora seja possível a produção eficiente de clones bovinos, é notado uma alta taxa de mortalidade durante as gestações e após os nascimentos (CHAVATTE-PALMER et al., 2004), consequência de um conjunto de fatores, que não se refletem apenas em uma reprogramação incorreta dos genes *IGF2* e *H19*, localizados nas regiões de estudo, mas sim de uma reprogramação incompleta de vários genes envolvidos no desenvolvimento da placenta (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002; CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Portanto, mais informações são necessárias para esclarecer o mecanismo de controle epigenético durante o desenvolvimento de animais clones.

7. CONCLUSÃO

De modo geral, nesse trabalho pôde ser compreendido que a baixa eficiência na TNCS pode estar relacionada a erros na reprogramação nuclear, principalmente para a região da ICR/H19.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D; HOPKIN, K. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª edição. Editora Artmed, v. único, 2011.

BARLOW, D. P.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting in mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Cold Spring Harbor NY, v. 6, n. 2, p. a018382, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>

BARTOLOMEI, M. S. Genomic impression: employing and avoiding epigenetic processes. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 23, n. 18, p. 2124-33, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1841409>

BEAUDET, A. L.; JIANG, Y. H. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprinting dependent evolution. **The American Journal of Human Genetics**, New York, v. 70, p. 1389-1397, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1086/340969>

BERNSTEIN, K. A.; BLEICHERT, F.; BEAN, J. M.; CROSS, F. R.; BASERGA, S. J. Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 8, n. 3, p. 953-64, 2007. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0512>

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 9, n. 16, p. 2395-402, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005794>. Acesso em: 20 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>

BIASE, F. H.; FRANCO, M. M.; GOULART, L. R.; ANTUNES, R. C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.3, p.313-315, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300011>

BIERMANN, K.; STEGER, K. Epigenetics in male germ cells. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. 466-480. 2007. DOI: <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002048>

- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 16, p. 6-21, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, London, v.11, p. 1542-1546, 2001b. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00480-8)
- BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, London, v. 11, p. 1542-1546, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00480-8)
- BRANNAN, C. I.; DEES, E. C.; INGRAM, R. S.; TILGHMAN, S. M. The product of the h19 gene may function as a RNA. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 28-36, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.10.1.28>
- BRIGGS, R.; KING, T. J. "Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v 38, p. 455-463, 1952. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.38.5.455>
- CAMPBELL, K. H.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D.; LEE, J. H. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. S214-S231, 2007. Supplement 1. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.059>
- CHAILLET, J. R.; VOGT, T. F.; BEIER, D. R.; LEDER, P. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 66, p. 77-83, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90140-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90140-T)
- CHANG, M.; BELLAOUI, M.; ZHANG, C.; DESAI, R.; MOROZOV, P.; DELGADO-CRUZATA, L.; ROTHSTEIN, R.; FREYER, G. A.; BOONE, C.; BROWN, G. W. RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. [*S. l.: s. n.*], 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600684>
- CHAO, W.; D'AMORE, P. A. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 111-20, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.01.005>

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, p. 1596-1603, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1596>

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v. 6, p. 94-100, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1089/1536230041372274>

CHESNÉ, P.; ADENOT, P. G.; VIGLIETTA, C.; BARATTE, M.; BOULANGER, L.; RENARD, J. P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, London, v. 20, p. 366-369, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0402-366>

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEÓN, F. A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v. 280, p. 1256-1258, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1256>

CROSS, J. C. Nutritional influences on implantation and placental development. **Nutrition Reviews**, New York, v. 64, p. 512, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1301/nr.may.S12-S18>

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 84, p. 463-76, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1139/o06-090>

DAELEMANS, C. RITCHIE, M. E.; SMITS, G.; ABU-AMERO, S.; SUDBERY, I. M.; FORREST, M. S.; CAMPINO, S.; CLARK, T. G.; STANIER, P.; KWIATKOWSKI, D.; DELOUKAS, P.; DERMITZAKIS, E. T.; TAVARÉ, S.; MOORE, G. E.; DUNHAM, I. High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. **BMC genetics**, Londres, v. 11, p. 25, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-25>

DEAN, W.; LEKSEY, G.; REIK, W. An intragenic methylated region in the imprinted *igf2* gene augments transcriptions. **EMBO Reports**, London, v. 2, n. 12, p. 1101-6, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve248>

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic Reprogramming in early mammalian development. **Cell & Developmental Biology**, Palo Alto CA, v. 14, p. 93-100, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/S1084-9521>

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.241522698>

DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 14, n. 2, p. 188-95, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.01.005>

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

ELHAMAMSY, A. R. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. **Journal of assisted reproduction and genetics**, New York, p. 1-14, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0895-5>

ENGEL, J. R.; SMALLWOOD, A.; HARPER, A.; HIGGINS, M. J.; OSHIMURA, M.; REIK, W. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith- -Wiedemann syndrome. **Journal of Medical Genetics**, New York, v. 37, p. 921-6, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.37.12.921>

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

FESSELE, K. L.; WRIGHT, F. Primer in Genetics and Genomics, Article 6: Basics of Epigenetic Control. **Biological Research for Nursing**, Nova York, p. 1099800417742967, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/1099800417742967>

FRANCO, M. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A. Epigenetic modifications and their roles in animal reproduction. **Biotechnology of Animal Reproduction**, Nova York, p. 315, 2016.

FRANCO, M. M.; PRICKETT, A. R.; OAKEY, R. J. The role of CCCTC-binding factor (CTCF) in genomic imprinting, development, and reproduction. **Biology of Reproduction**, Nova York, v. 91, n. 5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.122945>

GALLI, C.; DUCHI, R.; MOOR, R.M.; LAZZARI, G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, Larchmont, v. 1, n. 3, p. 161-170, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1089/15204559950019924>

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, London, v. 424, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/424635a>

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; REINHARDT, R.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.; LEHRACH, H.; NIEMANN, H. The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and

sperm DNA. **Genomics**, San Diego CA, v. 88, n. 2, p. 222-229, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>

GEBERT, C; RONG, Q.; JEONG, S.; IBEN, J.; PFEIFER, K. H19ICR mediated transcriptional silencing does not require target promoter methylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 476, n. 3, p. 121- 126, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.042>

GIBBS, W. W. Além do DNA. Scientific American Brasil, Edição Especial, **Genoma**: o código da vida, {s.L} n. 16, p. 44-51, 2007.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. **Cell**, Cambridge, v. 64, n. 6, p. 1045-6, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90256-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90256-X)

HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KIZAKI, K.; YAMADA, O.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, OV.; AKAGI, S.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, S. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. **Cloning and Stem Cells**, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1089/15362300260339485>

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, p. 6-13, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.6>

HEYMAN, Y.; ZHOU, Q.; LEBOURHIS, D.; CHAVATTE-PALMER, P.; RENARD, J. P.; VIGNON, X. Novel approaches and hurdles to somatic cloning in cattle. **Cloning and Stem Cells**, Larchmont, v. 4, p. 47-53, 2002b. DOI: <https://doi.org/10.1089/153623002753632048>

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, Nova York, v. 63, p. 1787-1794, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1787>

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, Stoneham, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00089-8)

HILL, P. W.; AMOUROUX, R.; HAJKOVA, P. DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. **Genomics**, San Diego CA, v. 104, n. 5, p. 324-333, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.012>

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT III, W.M.; BINISZKIWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, Washington, v.293, p.95-97, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1061402>

HYLDIG, S. M.; CROXALL, N.; CONTRERAS D. A.; THOMSEN P. D.; ALBERIO, R. Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. **BMC Developmental Biology**, London, v. 11, p. 11, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-11>

IACOBUZIO-DONAHUE C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathology**, New York, v. 4, p. 229-49, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.151442>

IMAMURA, T.; KERJEAN, A.; HEAMS, T.; KUPIEC, J.; THENEVIN, C.; PALDI, A. Dynamic CpG and Non- CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocytes and preimplantation embryo. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 280, n. 20, p. 20171-29175, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501749200>

INOUE, A.; JIANG, L.; LU, F.; ZHANG, Y. Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 31, n. 19, p. 1927-1932, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.304113.117>

INOUE, K.; KOHDA, T.; LEE, J.; Ogonuki, N.; MOCHIDA, K.; NOGUCHI, Y.; TANEMURA, K.; KANEKO-ISHINO, T.; ISHINO, F.; OGURA, A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. **Science**, Washington, v.295, p.297, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.295.5553.297>

ISLES, A. R.; DAVIES, W.; WILKINSON, L. S. Genomic imprinting and the social brain. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Science**, Londres, v. 361, n. 1476, p. 2229-37, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1942>

IURLARO, M.; MCINROY, G. R.; BURGESS, H. E.; DEAN, W.; RAIBER, E.-A.; BACHMAN, M.; BERALDI, D.; BALASUBRAMANIAN, S.; REIK, W. In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5- formylcytosine. **Genome Biology**, London, v. 17, n. 1, p. 141, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1001-5>

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 245-54, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1089>

JENA, S. C.; KUMAR, S.; RAJPUT, S.; ROY, B.; VERMA, A.; KUMARESAN, A.; MOHANTY, T. K.; RAKESH KUMAR, S.; DATTA, T. K. Differential Methylation Status of IGF2-H19 Locus Does Not Affect The Fertility of Crossbred Bulls But Some of the CTCF binding Sites Could Be Potentially Important. **Molecular Reproduction & Development**, New York, v. 81, p. 350–362, 2014.

DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22303>

JIA, D.; JURKOWSKA, R. Z.; ZHANG, X.; JELTSCH, A.; CHENG, X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. **Nature**, London, v. 449, n. 7159, p. 248-251, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06146>

KANG, J.; KALANTRY, S.; RAO, A. PGC7, H3K9me2 and Tet3: regulators of DNA methylation in zygotes. **Cell Research**, Beijing, v. 23, n. 1, p. 6-9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2012.117>

KATO, Y. TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. **Science**, Washington, v. 282, p. 2095-2097, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2095>

KOHLI, R. M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, London, v. 502, n. 7472, p. 472-4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12750>

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

LARKIN, D.M.; EVERTS-VAN DER WIND, A.; REBEIZ, M.; SCHWEITZER, P.A.; BACHMAN, S.; GREEN, C.; WRIGHT, C.L.; CAMPOS, E.J.; BENSON, L.D.; EDWARDS, J.; LIU, L.; OSOEGAWA, K.; WOMACK, J.E.; DE JONG, P.J.; LEWIN, H.A. A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. **Genome Research**, New York, v.13, p.1966-1972, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.1560203>

LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; SHAMIM, M. H.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, London, v. 436, n. 7051, p. 641, Aug 4 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/436641a>

LIU, Z.; CAI, Y.; WANG, Y.; WANG, Z.; POO, M.; SUN, Q. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cell**, Cambridge, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FULKA, J. JR.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; DELLA SALDA, L.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1110-1121, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.016>

LUCIFERO, D.; MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S.; TRASLER, J. M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human**

Molecular Genetics, Oxford, v. 13, p. 839-849, 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh104>

MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 81, n. 2, p. 126-140, 2014. DOI:

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

MANN, M. R.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**,

London, v. 3, p. 1003, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf224>

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

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017293>

MATOBA, S.; ZHANG, Y. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.471-485, 2018.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.018>

MIGICOVSKY, Z.; KOVALCHUK, I. .Epigenetic memory in mammals. **eCollection**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 28, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00028>

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

[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90040-W](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90040-W)

MURRELL, A.; HEESON, S.; BOWDEN, L.; CONSTANCIA, M.; MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes igf2 and h19 into parent-specific chromatin loops. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 8, p. 889-93, 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1038/ng1402>

NAN, X.; CROSS, S.; BIRD, A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. **Novartis Foundation Symposium**, [s.l.], v. 214, p. 6-16, 1998a. DOI:

<https://doi.org/10.1002/9780470515501.ch2>

NIEMANN, H.; TIAN, X. C.; KING, W. A.; LEE, R. S. F. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, Cambridge, v. 135, p.151–63, 2008. DOI:

<https://doi.org/10.1530/REP-07-0397>

O'DELL, S. D.; DAY, I. N. Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-

II). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 767-771, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00048-X)

PARK, C.-H.; KIM, H.-S.; LEE, S.-G.; LEE, C.-K. Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation embryos. **Genomics**, San Diego CA, v. 93, n. 2, p. 179-186, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.10.002>

PETERSEN, B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. **Reproduction in domestic animals**, Zuchthygiene, v. 52, Suppl 3, p. 4-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13012>

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S. H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, London, v. 407, p. 86-90, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35024082>

PURI, D.; DHAWAN, J.; MISHRA, R. K.; The paternal hidden agenda: epigenetic inheritance through sperm chromatin. **Epigenetics & chromatin**, London, v. 5, p. 386-391, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4161/epi.5.5.12005>

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, London, v. 24, p. 425- 432, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05918>

REIK, W.; CONSTANCIA, M.; FOWDEN, A.; ANDERSON, N.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; TYCKO, B.; SIBLEY, C. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. **The Journal of Physiology**, Bethesda, v.547, p.35-44, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00035.x>

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, Washington, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1063443>.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Review Genetics**, London, v. 2, p. 21-32, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/35047554>

RENARD, J. P.; CHASTANT, S.; CHESNÉ, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **The Lancet**, London, v. 353, p. 1489-1491, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)12173-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)12173-6)

RIDEOUT, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic

reprogramming of the genome. **Science**, Washington, v. 293, p. 1093-10984, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1063206>

ROBBINS, K. M.; CHEN, Z.; WELLS, K. D.; RIVERA, R. M. Expression of KCNQ1OT1, CDKN1C, H19, and PLAGL1 and methylation patterns with the KvDMR1 and H19 / IGF2 imprinting control regions is conserved between human and bovine. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 19, n. 65, p. 1-10, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-95>

RODRIGUEZ-OSORIO, N.; URREGO, R.; CIBELLI, J. B.; EILERTSEN, K.; MEMILI, E. Reprogramming mammalian somatic cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p. 1869–86, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.030>

SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, C. S.; TETZNER, T. A. D.; SOUZA, M. M.; LIMA, M. R.; MÉO, S. C.; GARCIA, J. M. Métodos alternativos de enucleação oocitária utilizados na transferência nuclear em animais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 4, p. 197-205, out./dez. 2010. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 2 jan 2019.

SCHOENHERR, C. J.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 66-69, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1057>

SEISENBERGER, S.; PEAT, J. R.; HORE, T. A.; SANTOS, F.; DEAN, W.; REIK, W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, Londres, v. 368, n. 1609, p. 20110330, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>

SHI, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; LIU, Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biology of Reproduction**, New York, v. 77, p. 285-291, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>

SHI, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; LIU, Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biology of Reproduction**, New York, v. 77, n. 2, p. 285-91, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>

SHI, Y.; WHETSTEIN, J. R. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases, **Molecular Cell**, Cambridge, v. 12, p. 1-14, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.010>

SIBLEY, C.P.; COAN, P.M.; FERGUSON-SMITH, A.C.; DEAN, W.; HUGHES, J.; SMITH, P.; REIK, W.; BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L.; CONSTÂNCIA, M. Placental-specific Igf-2 regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, Londres, v. 101, p. 8204-8208, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0402508101>

SILVEIRA, M. M.; SALGADO, B.; HENRIQUE, X.; DOS SANTOS, M. A.; BORGES, N. A. ; VARGAS, L. N.; CAETANO, A. R.; RUMPF, R; FRANCO, M. M. DNA methylation profile at a satellite region is associated with aberrant placentation in cloned calves. **Placenta**, Washington, v. 70, p. 25-33, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.08.007>

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature Cell Biology**, London, v. 6, n. 10, p. 984-90, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1176>

SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A. K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A. C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, p. 107-114, 2012. Supplement 4. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02063.x>

SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Review Genetics**, London, v. 14, n. 3, p. 204-220, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3354>

STOGER, R.; KUBICKA, P.; LIU, C. G.; KAFRI, T.; RAZIN, A.; CEDAR, H.; BARLOW, D. P. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. **Cell**, Cambridge, v. 73, p. 61-71, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90160-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90160-R)

STRAHL, B. D; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, London, v. 403, p. 41-45, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/47412>

SU, J.-M.; YANG, B.; WANG, Y. S.; LI, Y. Y.; XIONG, X. R.; WANG, L. J.; GUO, Z. K.; ZHANG, Y. Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 7, p. 1346-1359, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.045>

SZYF, M. Targeting DNA methylation in cancer. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 299-328, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(03)00012-6)

TAMASHIRO, K. L.; WAKAYAMA, T.; AKUTSU, H.; YAMAZAKI, Y.; LACHEY, J. L.; WORTMAN, M. D.; SEELEY, R. J.; D'ALESSIO, D. A.; WOODS, S. C.; YANAGIMACHI, R.; SAKAI, R. R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. **Nature Medicine**, New York, v. 8, p. 262-267, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0302-262>

THORVALDSEN, J. L.; DURAN, K. L.; BARTOLOMEI, M. S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 1, p. 3693-3702, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3693>

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics & chromatin**, London, v. 9, p. 803-815, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4161/epi.28711>

VARGAS, L. M. Perfil transcricional de genes relacionados com a reprogramação da metilação do dna em placenta de bovinos clones. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)- Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/22391/3/PerfilTranscricionalGenes.pdf>. Acesso em: 19 de maio de 2019.

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

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, London, v. 394, p. 369-374, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/28615>

WEBER, M.; MILLIGAN, L.; DELALBRE, A.; ANTOINE, E.; BRUNEL, C.; CATHALA, G.; FORNE, T. Extensive tissue – specific variation of allelic methylation in the igf2 gene during mouse fetal development: relation to expression and imprinting. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 101, n. 1-2, p. 133-41, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00573-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00573-6)

WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizootics**, Paris, v. 24, p. 251-256, 2005. DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.24.1.1566>

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; MCMILLAN, V.; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning and Stem Cells**, Larchmont, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1089/1536230041372300>

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, New York, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.4.996>

WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T.; HILL, J. R.; LOONEY, C. R.; PRYOR, J. H.; PIEDRAHITA, J. A. Cloning to reproduce desired genotypes.

Theriogenology, Stoneham, v. 55, p. 35-49, 2001. DOI:
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00444-1)

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H.
S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, Londres,
1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)70817-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)70817-7)

XU, J.; ANDREASSI, M. Reversible histone methylation regulates brain gene
expression and behavior. **Hormones and Behavior**, New York, v. 59, n. 3, p. 383-
392, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.019>

XUEXIONG, S; LI, F; JIANG, Z; SUN, Y; LI, H; GAO,S; ZHANG, L; XUE, B;
ZHAO, G; LI, J; LIU, Z; HE, H; HUAN, Y. Imprinting disorder in donor cells is
detrimental to the development of cloned embryos in pigs. **Oncotarget**, Londres, v.
8, n. 42, p. 72363-72374, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20390>

YAMAZAKI, W. **Estudo do “genomic imprinting” na placenta de clones
bovinos**. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) - Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, UNESP, 2006. Disponível em:
<http://fcav.unesp.br/download/pgtrabs/ra/d/1263.pdf>. Acesso em: 29 maio 2019.

YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.;
HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C.
Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and
relatively normal in surviving adult clones. **Biology of. Reproduction**, New York,
v.71, p.431- 438, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.20311>

YOUNG, L.; FAIRBURN, H. Improving the safety of embryo technologies:
possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 2, p.
627-648, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00263-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00263-0)

YOUNG, L.E.; SCHNIEKE, A.E.; MCCREATH, K.J.; WIECKOWSKI, S.;
KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A.J.; WILMUT, I.;
LOI, P.; FEIL, R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep:
Effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, Limerick,
v.120, p.1433- 1442, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.09.006>

ZHANG, J.; QU, P.; ZHOU, C.; LIU, X.; MA, X.; WANG, M.; WANG, Y.; SU,
J.; LIU, J.; ZHANG, Y. MicroRNA-125b is a key epigenetic regulatory factor that
promotes nuclear transfer reprogramming. **The Journal of Biological Chemistry**,
Rockville, v. 292, n. 38, p. 15916-15926, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796771>

ZHANG, S.; KUBOTA, C.; YANG, L.; ZHANG, Y.; PAGE, R.; O'NEILL, M.;
YANG, X.; TIAN, X.C. Genomic Imprinting of H19 in Naturally Reproduced and

Cloned Cattle. **Biology of. Reproduction**, New York, v.71, p.540- 1544, 2004.

DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031807>

ZHANG, S.; CHEN, X.; WANG, F.; AN, X.; TANG, B.; ZHANG, X.; SUN, L.; LI, Z. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 30345, 2016. DOI:

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

