RODRIGO DA SILVA NUNES BARRETO

Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados

São Paulo

2015

RODRIGO DA SILVA NUNES BARRETO

Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Co-orientador:
Prof. Dr. Felipe Perecin

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3173
FMVZ

Barreto, Rodrigo da Silva Nunes
Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados / Rodrigo da Silva Nunes Barreto. -- 2015.
106 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Co-orientador:
Prof. Dr. Felipe Perecin.

1. Placenta bovina. 2. Transferência nuclear. 3. MHC. 4. Modificações de histona. 5. Metilação do DNA. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados", protocolado sob o CEUA nº 9408110315, sob a responsabilidade de **Prof Dr Flavio Vieira Meirelles** *e equipe; Rodrigo da Silva Nunes Barreto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 01/07/2015.

We certify that the proposal "Modulation of bovine trophoblast in cloned pregnancy", utilizing 22 Bovines (22 females), protocol number CEUA 9408110315, under the responsibility of **Prof Dr Flavio Vieira Meirelles** *and team; Rodrigo da Silva Nunes Barreto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 07/01/2015.

Vigência da Proposta: de 07/2013 a 07/2015 Área: Departamento De Cirurgia/vci

Procedência: Bancos de amostras do laborátorio (Certificados CEUA nº 447/2004 e 1678/2009).

Espécie:	Bovino	Gênero:	Fêmeas	idade: adulta	N: 22
Linhagem:	Zebuina			Peso: 400kg	

São Paulo, 02 de julho de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARRETO, Rodrigo da Silva Nunes

Título: Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A Deus, pois tudo é realizado pela vontade Dele.

A minha mãe, Nilcéa da Silva Nunes Barreto, e ao meu pai, José Nunes Barreto. Por serem responsáveis por tudo que eu sou, e por serem minha base, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento deste doutorado, assim como o programa CAPES/DFAIT (Department of Foreign Affairs, Trade and Development – Canadá) por ter possibilitado o estágio de intercâmbio.

A Universidade de São Paulo, que por meio das instalações das Faculdades de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) permitiram o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Université Laval (UL), que por meio das instalações da Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation (FSAA) permitiu a realização de estágio de intercâmbio.

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles e ao Prof. Dr Felipe Perecin, pela confiança depositada durante o desenvolvimento do projeto e pela orientação (e co-orientação) concedida durantes esses últimos anos, sempre me norteando nos momentos necessários.

A Dr. Lilian de Jesus Oliveira, que desde o mestrado é amiga, irmã, orientadora, companheira de baladas noturnas e aos finais de semana no laboratório, por todo o auxílio, ensinamentos, conselhos. Agradeço também por ser uma peça chave no desenvolvimento desse trabalho e de grande parte do meu pequeno saber científico.

A Profa. Dra. Maria Angelica Miglino por toda confiança e apoio profissional (e pessoal), principalmente na fase final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Allan W. King por todo apoio para realização do estágio de intercâmbio. E ao Prof. Dr. Claude Robert por ter me recebido em seu laboratório, permitido novos e grandes aprendizados.

A toda equipe de funcionários da FZEA (Arina, Nilton, Márcia, Sílvia, Giovana) e da FMVZ (Jaqueline, Ronaldo, Rose, Daura e Henrique) que muito ajudaram na realização do projeto e “traduzindo” as burocracias durante a pós-graduação.

Ao Dr. Dominic Gagné pelos ensinamentos preciosíssimos que me concedeu durante o meu estágio na UL. E a toda equipe da UL Dra. Isabelle Gilbert, Dra. Isabelle Dufort, Dra. Isabelle Laflamme, Dra. Julie Nieminen que muito me ajudaram durante a minha estadia lá.

Ao irmãos que Pirassununga me deu Rafa, Ju, Kellinha e Carol, com vocês todos experimentos, festas, almoços, cafés da manhã, viagens de final de semana, tornaram meus dias em Pirassununga muito mais fáceis, mesmo terem todos ido fazer intercâmbio sozinho e me abandonando em Pirassununga.

Aos grandes amigos do LMMD Annie, Naira, Aninha, Aline, Arina, Fer, Gabi, Kátia, Ju Casals, Yonara, Pamela, Tiago (Deba), Ramon, Lídia, Mari, Hugo, Tiago Milanin, Mateus, Maite, Lais, Pedrinho, Martini, Juliano (Sambica).

Ao Angus Macaulay, Ernesto Orosco, Annie Girard, Habib Shojaei, Luis Baldeon pelo convívio durante a temporada na UL. Pelos amigos Fernando e Raquel Carneiro e Vanessa Villela, por me ajudarem a desbravar Quebec e tornarem mais aconchegantes aqueles dias glaciais (Quebec, Je me Souviens).

Aos alunos de IC, Gustavo, Monalisa, Léo e Laura, que muito me ajudaram neste projeto de doutorado e me deram uma leve amostra do que é orientar.

As turmas 04 e 05 de veterinária que muito me ensinaram durante o programa PAE juntos as disciplinas de Biologia Celular e Histologia Veterinária.

RESUMO

BARRETO, R. S. N. **Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados.** [Modulation of bovine trophoblast in cloned pregnancy]. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O sucesso da gestação, e nascimento da prole saudável, depende da adequada formação, desenvolvimento e funcionamento da placenta. Entretanto, são observadas altas perdas durante o primeiro terço da gestação de embriões bovinos produzidos por transferência de núcleo de célula somática (TNCS), principalmente causadas por alterações placentárias, decorrentes da incompleta reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário. Normalmente, após a fecundação, o DNA paterno é desmetilado durante as primeiras horas do desenvolvimento, enquanto o DNA materno é desmetilado de forma passiva. Entretanto nos embriões TNCS a desmetilação do DNA é tardia e incompleta, resultando numa alteração do padrão epigenético, principalmente nos níveis de metilação (5mC) e hidroximetilação (5hmC) do DNA e nas histonas. Além disso, na gestação TNCS há expressão precoce das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I), associada ao aumento de infiltrados inflamatórios na placenta e à rejeição imunológica ao feto. O objetivo desse trabalho foi de verificar, na placenta bovina TNCS e controle, os níveis globais de 5mC e 5hmC, e de algumas modificações de histonas importantes na formação do trofectoderma ou por serem modificações clássicas, além de imunolocalizar moléculas de MHC-I. Para tanto foram utilizadas amostras de placentônio TNCS no primeiro (n = 5) e terceiro (n = 6) terço gestacional; e como controle, placentônios com controle no primeiro (n = 6) e terceiro (n = 6). Foram realizadas reações de imunohistoquímica para modificações no DNA (5mC, 5hmC) e nas histonas (H3K4me3, H3K27me3, H3K9ac, H3K9me2/3) e para MHC-I (Qa-2 e IL-A88); além de reações de PCR quantitativo para enzimas responsáveis pelas modificações no DNA (DNMT1, TET1, TET3), para alguns genes relacionados com o desenvolvimento da placenta (PAG9, PHDLA2, SNRPN e TSSC4) e para isoformas de MHC-I (NC1-4 e JSP-1). Houve aumento dos níveis globais de metilação, e diminuição de hidroximetilação, na placenta TNCS durante o primeiro trimestre gestacional. Os níveis de H3K4me3 foram estáveis na placenta controle e crescentes na placenta TNCS, enquanto que a H3K27me3 decresceu na

placenta controle e foi estável na placenta TNCS. Na placenta TNCS, aos 60 dias, foram observados os menores níveis globais H3K9ac, porém H3K9me2/3 não diferiram entre as idades e tipos gestacionais estudados. Foi identificado MHC-I no trofoblasto do placentônio bovino nas idades analisadas, com variações de intensidade dependendo da isoforma detectada, além de que a placenta controle e a TNCS apresentam padrões diferentes na expressão de MHC-I. De modo geral, o menores níveis de metilação do DNA encontrados na placenta TNCS aos 60 dias de gestação, indica ser um mecanismo compensatório para ativar a expressão gênica. Visto que a as modificações de histona levam a um estado repressivo da expressão gênica, já que a bivalência entre H3K4me3 e H3K27me3 e os níveis de H3K9ac estão diminuídos. Ainda na placenta TNCS aos 60 dias, há uma alta expressão de MHC-I, levando a resposta imune do sistema materno contra os tecidos fetais. Portanto vários eventos são presentes e parecem contribuir para instabilidade da gestação inicial em clones, coincidindo com a alta taxa de perdas gestacionais nessa fase.

Palavaras-chave: Placenta bovina. Transferência nuclear. MHC. Modificações de histona. Metilação do DNA.

ABSTRACT

BARRETO, R. S. N. **Modulation of bovine trophoblast in cloned pregnancy.** [Modulação do trofoblasto bovino na gestação de embriões clonados]. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pregnancy success depends of adequate placental formation, development and function. Therefore, the highest loses rates are found during first trimester pregnancies of bovine embryos produced by somatic cell nuclear transfer (NT), majorly by placental alterations, due to incomplete epigenetic reprogramming during embrionary development. Normally, after fecundation, paternal DNA is actively demethylated at first hours of development; where as maternal DNA is passively demethylated. However in NT embryos the DNA demethylation is late and incomplete, resulting in changes of epigenetic patterns, majorly in methylation (5mC), hydroxymethylation (5hmC) and histone levels. Furthermore, in NT pregnancy there is premature expression of class I major histocompatibility complex (MHC-I), associated with inflammatory infiltrates increases and immunological rejection against fetus. The aim of this work was to evaluate global levels of 5mC, 5hmC and some posttranslational histone modifications and MHC-I molecules expression of bovine placenta in NT and control models. For this, NT and control bovine placentome were collected at first (n = 6) and third (n = 6) trimester of pregnancy. Immunohistochemistry reactions were performed to assay DNA methylation (5mC) and (5hmC) and posttranslational histone modifications (H3K4me3, H3K27me3, H3K9ac, H3K9me2/3) and MHC-I molecules (Qa-2 e IL-A88). Quantitative PCR reactions were performed to evaluate the expression of DNA modifications related enzymes (DNMT1, TET1 and TET2), MHC-I classical (JSP-1) and non-classical (NC1-4) isoforms, and imprinted genes expression (SNRPN, TSSC4 and PHDLA2). In the NT placenta there was an increase in the global methylation and decreased hydromethylation level at first trimester. Levels of H3K4me3 were constant at control placenta while increased in NT placenta. For H3K27me3, the levels decreased in control placenta and were stable at NT counterparts. At 60 days of pregnancy in NT placenta, were observed low levels of global H3K9ac, but no differences of H3K9me2/3 levels were found between pregnancy ages or type. We identified MHC-I at bovine placentomal trophoblast in all ages analyzed, with intensity variation of

different isoforms. In general, low levels of DNA methylation at day 60 of pregnancy of TNCS placenta, indicates a compensatory mechanism to active genic expression. Since histone modifications, in this period, leads to repressive status, because bivalence of H3K4me3 and H3K27me3 and levels of H3K9ac were diminished. Also at day 60 of pregnancy of TNCS placenta, MHC-I is highly expressed and leads to maternal immune response against fetus tissue. In conclusion, several events are present and apparently contribute to early clone pregnancy instability, coinciding with high pregnancy losses in that phase.

Keywords: Bovine placenta. Nuclear transfer. MHC. Histone modifications. DNA methylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático da metilação do DNA 22

Figura 2 - Modelo esquemático da conversão da 5-mC à 5-hC e consequentemente a C 24

Figura 3 - Modelo esquemático dos diferentes mecanismos de desmetilação 25

Figura 4 - Modelo esquemático de um nucleossomo 27

Figura 5 - Modelo esquemático da reprogramação epigenética em embriões bovinos 29

Figura 6 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de 5mC global.. 42

Figura 7 - Gráficos representando a quantificação global da 5mC e 5hmC em placentônios bovinos 43

Figura 8 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de 5hmC global 45

Figura 9 - Expressão dos genes DNMT1, PAG9, PHDLA2, SNRPN e TSSC4 em placentônios bovinos 47

Figura 10 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K4me3 global 59

Figura 11 - Gráficos representando a quantificação global da H3K4me3 em placentônios bovinos 60

Figura 12 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K4me3 60

Figura 13 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K27me3 global 63

Figura 14 - Gráficos representando a quantificação global da H3K27me3 em placentônios bovinos 64

Figura 15 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K27me3 64

Figura 16 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9me2 global 67

Figura 17 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9me3 global 68

Figura 18 - Gráficos representando a quantificação global das H3K9me2 e H3K9me3 em placentônios bovinos 69

Figura 19 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9me2 70

Figura 20 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9me2 70

Figura 21 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9ac global 73
Figura 22 - Gráficos representando a quantificação global da H3K9ac em placentônios bovinos 74
Figura 23 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9ac 74
Figura 24 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção do peptídeo Qa-2 murino 87
Figura 25 - Fotomicrografia da reação de imunohistoquímica para Qa2 em placentônio de gestação clone aos 90 dias 88
Figura 26 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção do peptídeo IL-A88 89
Figura 27 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção do peptídeo Qa-2 90
Figura 28 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção do peptídeo IL-A88 91
Figura 29 - Expressão dos genes BoLA-NC1, BoLA-NC2, BoLA-NC3, BoLA-NC4 e JSP-1 em placentônios bovinos 92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.....40

Quadro 2- Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.....84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 17
1.1 INTRODUÇÃO 18
1.2 REVISÃO DE LITERATURA 18
1.2.1 Placentação em clones bovinos 18
1.2.2 Complexo de histocompatibilidade principal bovino 20
1.2.3 Marcações epigenéticas 21
1.2.3.1 Metilação do DNA 21
1.2.3.2 Hidroximetilação do DNA 23
1.2.3.3 Modificações de histonas 26
1.2.4 Reprogramação epigenética – da formação do zigoto ao trofoblasto diferenciado 29
1.2.4.1 Reprogramação epigenética durante a embriogênese inicial 29
1.2.4.2 Diferenciação do trofectoderma 30
1.3 HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL 33

2 A METILAÇÃO DO DNA É MENOS PRESENTE NA GESTAÇÃO INICIAL DE CLONES 34
2.1 INTRODUÇÃO 35
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 37
2.2.1 Materiais 37
2.2.2 Obtenção dos placentônios 37
2.2.3 Detecção global de 5mC e 5hmC 38
2.2.3.1 Análise das imagens 39
2.2.4 Detecção da expressão gênica 39
2.3 RESULTADOS 40
2.3.1 Imunolocalização de 5mC 40
2.3.2 Imunolocalização de 5hmC 44
2.3.3 Analise da expressão gênica de DNMT1 e genes “imprinted” 46
2.4 DISCUSSÃO 48
2.5 CONCLUSÕES 50

3 A H3K4ME3 É DESREGULADA ENTRE GESTAÇÕES CONTROLE E CLONES 51
3.1 INTRODUÇÃO 52
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS 53
3.2.1 Materiais utilizados 53
3.2.2 Obtenção dos placentônios 54
3.2.3 Detecção global por imunohistoquímica 55
3.2.3.1 Análise das imagens 55
3.2.4 Detecção global por western blotting 56
3.3 RESULTADOS 57
3.3.1 H3K4me3 57
3.3.2 H3K27me3 61
3.3.3 H3K9me2/3 65
3.3.4 H3K9ac 71
3.4 DISCUSSÃO 75
3.5 CONCLUSÕES 77

4 A EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE MHC-I SÃO DESREGULADAS NA GESTAÇÃO DE CLONES 78
4.1 INTRODUÇÃO 79
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 81
4.2.1 Materiais utilizados 81
4.2.2 Obtenção dos placentônios 82
4.2.3 Imunolocalização de proteínas MHC-I reconhecidas por anticorpos anti-QA-2 e anti-MHC bovino (IL-A88) na placenta bovina 82
4.2.4 Detecção de moléculas do MHC-I com os anticorpos anti-Qa-2 e anti-IL-A88 na placenta bovina por western blotting 83
4.2.5 Detecção das isoformas clássicas e não clássicas do MHC bovino . 84
4.3 RESULTADOS 85
4.3.1 Os anticorpos anti-QA-2 e IL-A88 reconhecem proteínas de MHC-I em padrões de expressão distintos no primeiro trimestre da gestação bovina 85
4.3.2 Duas isoformas de MHC-I são reconhecidas pelo anticorpo anti-Qa-2 90

4.3.3 As moléculas de MHC-I expressas no primeiro trimestre da gestação bovina são em maioria não clássicas 91
4.4 DISCUSSÃO 93
4.5 CONCLUSÕES 95

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 96

REFERENCIAS 99

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da gestação, e consequentemente nascimento de uma prole saudável, depende da adequada formação, desenvolvimento e funcionamento da placenta. A origem do embrião tem grande influencia no processo de placentação, Por exemplo, alterações/anormalidades placentárias são muito frequentes em embriões produzidos por transferência de núcleo de célula somática (TNCS), e como consequência apenas 5% dos embriões transferidos resultam em nascimentos de indivíduos saudáveis.

Os embriões produzidos por TNCS são alogênicos, e os antígenos da classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) expressados são desconhecidos pelo sistema imune da receptora, o que pode induzir uma imunomodolução diferenciada do endométrio frente aos antígenos fetais.

Além disso, na TNCS há uma desregulação na reprogramação epigenética desde o início do desenvolvimento embrionário. Pois na formação do zigoto, o DNA paterno é completamente desmetilado durante as primeiras horas do desenvolvimento, enquanto o DNA materno é desmetilado de ocorre de forma passiva a cada divisão celular. Entretanto nos embriões TNCS a desmetilação do DNA, originado da célula doadora, é tardia e incompleta, sugerindo a persistência de marcas epigenéticas da célula doadora de núcleo.

Essa desregulação dos mecanismos epigenéticos em embriões TNCS leva a expressão anormal de genes responsáveis pelo desenvolvimento do feto e/ou da placenta, que podem ser responsáveis pela baixa taxa de nascimentos. Dentre esses genes podemos citar os genes *imprinted* e os genes de origem retroviral, além daqueles responsáveis pelo reconhecimento materno-fetal.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Placentação em clones bovinos

A placenta tem a maior diversidade morfológica entre todos os órgãos em mamíferos (MOSSMAN, 1987). Visto que animais filogeneticamente distantes como

os golfinhos e suínos, por exemplo, possuem uma placenta com o mesmo tipo de interface materno-fetal, epitéliocorial difusa. Enquanto que animais muito próximos como a toupeira do leste (*Scalopus aquaticus*) possuem uma interface materno-fetal epitéliocorial e a toupeira comum (*Talpa Europaea*) é endotéliocorial (ENDERS; CARTER, 2004).

Os bovinos, assim como os outros ruminantes, possuem uma placenta corioalantoidiana (predominância das membranas coriônica e alantoidiana), zonária cotiledonária (região de interação materno-fetal formadas por unidades funcionais chamadas placentônios), vilosa (interdigitação materno-fetal em forma de vilos), sineptéliocorial (todas as seis camadas de tecidos preservadas na interface materno-fetal, além da ocorrência de sincício) e com vascularização contra-corrente (corrente sanguínea materna e fetal em direções opostas (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFMANN, 1994).

A estrutura e função da placenta bovina é profundamente influenciada pela origem do embrião, ou seja, se foi produzido a partir de monta natural, inseminação artificial, fertilização *in vitro* ou clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Dentre as biotecnologias da reprodução, a TNCS tem o maior comprometimento da placentação (MIGLINO et al., 2007) que provavelmente contribuem para as suas baixas taxas de nascimentos (em torno de 5%) (MIGLINO et al., 2007; MEIRELLES et al., 2010).

A maioria das perdas gestacionais de conceptos bovinos TNCS ocorre entre 30 e 60 dias de gestação (WELLS, 2005). Frequentemente, estas perdas estão associadas a deficiências placentárias (HILL et al., 2000). Exatamente nesse período (de 40-60 dias de gestação), ocorre a transição da nutrição fetal de vitelínica para a corioalantoidiana, sendo crucial para a sobrevivência do feto em desenvolvimento (ASSIS NETO et al., 2010).

Ainda, em receptoras gestando embriões TNCS, tanto no início (HILL et al., 2000) como no final da gestação (HEYMAN et al., 2002), a placenta apresenta uma diminuição da vascularização, áreas hemorrágicas, hipoplasia placentária (MIGLINO et al., 2007), alterações no número, tamanho e formato dos placentônios (MIGLINO et al., 2007; BARRETO et al., 2009), presença de hidroalantóide, e de malformações do cordão umbilical que são via de regra associados ao bezerro macrossômico (“Large offspring syndrome”) (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998; SOUSA et al., 2001).

Essas alterações morfológicas na placenta de gestações de embriões TNCS influenciam diretamente na sua função e desenvolvimento do feto (MIGLINO et al., 2007; MEIRELLES et al., 2010). E está relacionado com a alteração do padrão de expressão gênica nesse tipo de gestação (MANSOURI-ATTIA et al., 2009). Que por sua vez foram alterados pela desregulação do perfil epigenético, consequência da baixa eficiência na reprogramação da célula doadora de núcleo pelo oócito enucleado (SANTOS et al., 2003).

1.1.2 Complexo de histocompatibilidade principal bovino

A expressão de antígenos paternos pelo trofoblasto é geralmente suprimida nas espécies estudadas, tais como camundongos (HUNT et al., 1985), ovelhas (GOGOLIN-EWENS et al., 1989), éguas (DONALDSON et al., 1990; KYDD et al., 1991) e vacas (LOW et al., 1990; DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000).

A repressão da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês “Major Histocompatibility Complex”) na placenta reduz a exposição do sistema materno a antígenos paternos (MOFFETT-KING, 2002). No entanto, a baixa ou não expressão de MHC de classe I pelas células trofoblásticas as tornam susceptíveis à lise pelas células NK (HEEMSKERK et al., 2005). Por essa razão, as células trofoblásticas expressam isoformas monomórficas de antígenos do MHC de classe I, classificadas como não clássicas ou de classe Ib (BULMER; JOHNSON, 1985). Em humanos, o trofoblasto expressa o antígeno leucocitátio humano (HLA, do inglês “Human Leucocitary Antigen”) C (TILBURGS et al., 2009), HLAE e HLAG (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000; ISHITANI et al., 2003; HVIID, 2006).

Na vaca, o tecido coriônico do placentônio, semi-alogênico em relação a vaca, é negativo para o MHC de classe Ib, embora o cório da região interplacentomal possa expressar MHC de classe I nos últimos quatro meses de gestação (LOW et al., 1990; DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000; DAVIES et al., 2004). Entretanto nas gestações TNCS, que possuem caráter alogênico, a expressão de MHC de classe I é predominantemente não clássica (DAVIES et al., 2004), e pode ser detectada precocemente aos 36 dias de gestação (DAVIES et al., 2004, 2006). Entretanto, essas proteínas não clássicas expressas, podem impedir a lise das

células trofoblásticas pelas células NK além de regular a função do macrófago, em semelhança ao HLAG humano (LI et al., 2009) e ao PED murino (FAIR et al., 2004),

Além disso, a expressão anormal de MHC de classe I pode levar ao aborto espontâneo durante o primeiro terço gestacional. Durante este período gestacional, de 70 a 90% das gestações TNCS são perdidas (HILL et al., 2000; EDWARDS et al., 2003), provavelmente associada à expressão alterada de MHC de classe I nas células trofoblásticas e o acúmulo anormal de linfócitos no estroma endometrial (HILL et al., 2002; DAVIES et al., 2004). Também é nesse período que ocorre a transição da nutrição placentária vitelínica para a corioalantoidiana, sendo este outro ponto crítico para o estabelecimento da placentação e manutenção da gestação.

1.1.3 Marcações epigenéticas

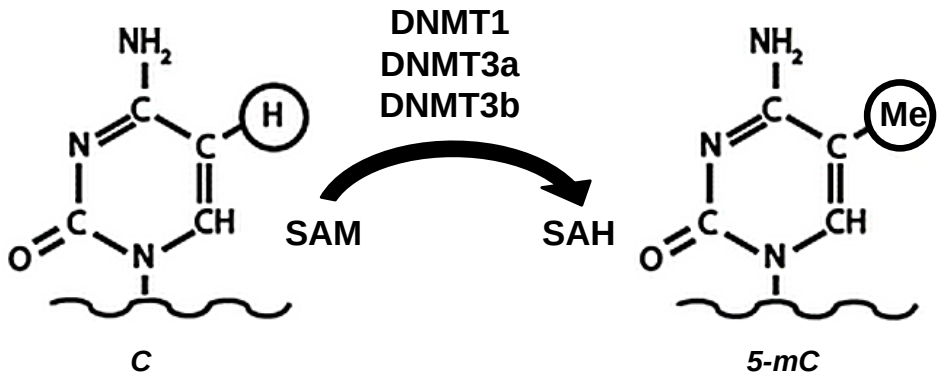
Todas as células de um organismo animal possuem a mesma cadeia de nucleotídeos de ácido desoxirribonucleico (DNA). Assim sendo, a diferenciação em cada um dos tipos celulares é regulada por fatores extrínsecos a sequência do DNA, conhecidos como marcações epigenéticas. Essas marcações epigenéticas modulam a forma em que o DNA interage com as histonas e fatores de transcrição, promovendo ou reprimindo a expressão de grupos de genes, sem alterar a sequência de DNA. Entre essas marcações estão a metilação e hidroximetilação das ilhas CpG do DNA, as modificações pós-traducionais das caudas das histonas, os RNAs não codificantes e a metilação e oxidação do RNA.

1.1.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a marcação epigenética mais amplamente conhecida e estudada. Essa marcação é caracterizada pela adição de um grupo metil ($CH3^-$) no carbono de número cinco da citosina (C) quando esta é sucedida por uma guanina (G). Essa reação de metilação da citosina é catalisada pelas metiltransferases de DNA (DNMTs, do inglês DNA methyltransferases) usando a S-adenosilmetiotina (SAM, do inglês S-adenosylmethionine) como doador do grupo metil e tendo como

resultado a 5-metilcitosina (5-mC, ver Figura 1) (GOLL; BESTOR, 2005; PIYATHILAKE et al., 2005; DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011; GRAZUL-BILSKA et al., 2011). A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação após cada replicação celular (GOLL; BESTOR, 2005; GOPALAKRISHNAN; VAN EMBURGH; ROBERTSON, 2008). Enquanto que as DNMT3a e 3b são responsáveis pela metilação “de novo” (GOPALAKRISHNAN; VAN EMBURGH; ROBERTSON, 2008). Existe também outro tipo de DNMT3, a DNMT3l, que especificamente regula o silenciamento dos sequências transponíveis na linha germinativa (MALONE; HANNON, 2009). A DNMT2 está relacionada com a metilação do RNA (GOLL; BESTOR, 2005; NIU et al., 2013).

Figura 1 - Modelo esquemático da metilação do DNA



Fonte: Adaptado de Pogribny e Beland (2009)
Legenda: A adenosilmetionina é catalisada pela DNMT1 (manutenção da metilação) ou pelas DNMT3a e 3b (metilação “de novo”) doando um grupo metil e transformando-se em adenosilhomocisteina. Como resultado dessa reação a citosina (C) modifica-se para 5-metilcitosina (5-mC).

No genoma de mamíferos cerca de metade dos genes possuem regiões, de aproximadamente 1 kb, ricas na sequência CG chamadas de ilhas CpG, e cerca de 85% dessas ilhas são metiladas (JONES, 2012). Em humanos são presentes cerca de 28 milhões de ilhas CpG (SMITH; MEISSNER, 2013). Quando não metiladas tem aproximadamente 0,5-2 kb de comprimento e estão frequentemente associadas aos domínios 5’ de genes endógenos (“housekeeping”) ou reguladores de desenvolvimento, que necessitam estar sempre ativos (LEWIS; BIRD, 1991). Entretanto, quanto metiladas estão presentes próximas as regiões promotoras de genes (TSS, do inglês “Transcriptional Start Sites”) ou intragenes (JONES, 2012).

A metilação das ilhas CpG estão associadas a repressão da expressão gênica. Em regiões repetitivas do genoma, como nos centrômeros, a metilação é importante para a estabilidade do cromossomo e também suprime a expressão de elementos transponíveis (MOAREFI; CHÉDIN, 2011). A metilação próxima às regiões TSS bloqueia a expressão do gene, porém quando presente no corpo do gene pode estimular a transcrição. Novas evidências sugerem que a metilação no corpo do gene pode ter impacto nos processos de “splicing” alternativos (JONES, 2012).

As ilhas CpG metiladas em regiões promotoras de genes são associadas com genes que possuem um estado de repressão bem estabilizado, como são os casos dos genes “imprinted”, os genes localizados no cromossomo X inativo, e genes que são expressos exclusivamente nas células germinativas (JONES, 2012).

Na placenta humana, o nível de metilação global na placenta humana é 20% menor que em outros órgãos; como o cérebro, fígado, e linfócitos do sangue periférico; devido a alta atividade metabólica da placenta (FUKE et al., 2004). Porém, os tipos celulares da placenta possuem diferentes níveis de metilação global, além disso esses níveis também são alterados no decorrer da gestação, muito provavelmente para mediar a comunicação materno-fetal (SUGIMOTO; SCHUST, 2009; KOUKOURA; SIFAKIS; SPANDIDOS, 2012). Além disso, o aumento da metilação global na placenta é positivamente correlacionada com a idade gestacional e negativamente correlacionada com a expressão de retrovírus endógenos (ERV, “Endogenous Retroviruses”) (FUKE et al., 2004), e estes tem sido correlacionados com a formação das células trofoblásticas gigantes binucleadas (ESNAULT et al., 2008; BLACK et al., 2010).

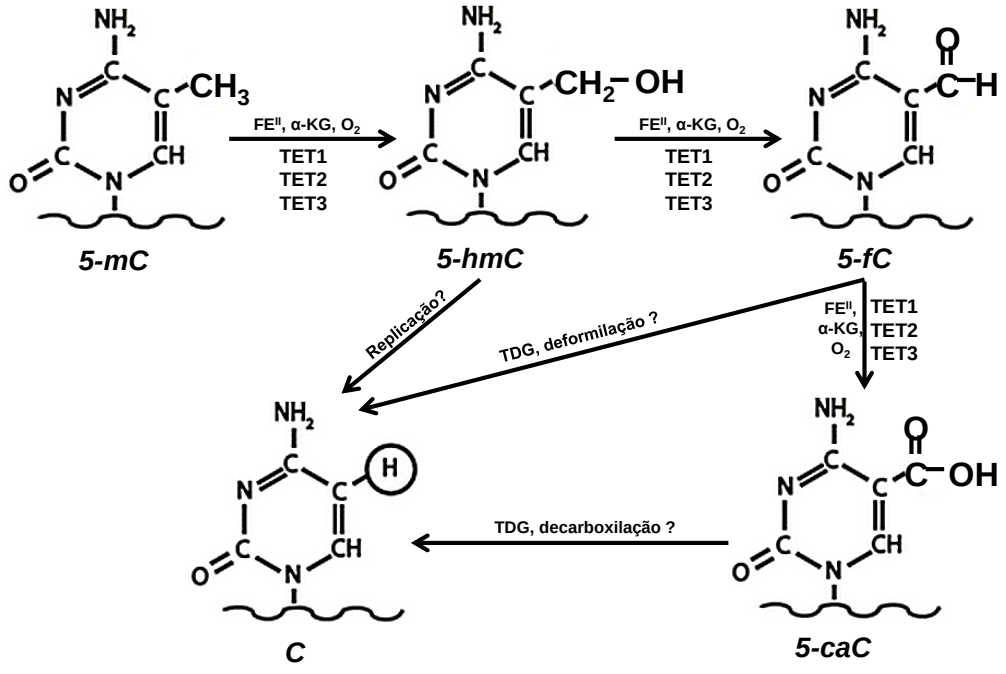
1.1.3.2 Hidroximetilação do DNA

A metilação do DNA pode ser apagada de forma dependente ou independente da replicação celular. Recentemente foi relatada a presença da hidroximetilação do citosina metilada do DNA, que está envolvida no processo de desmetilação ativa do DNA (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009).

A desmetilação das ilhas CpGs do DNA é catalisada pela família de enzimas

“ten-eleven translocation” (TET) 1, 2 e 3. Essas enzimas são dependentes de ferro (II) e α-cetoglutarato e controlam tanto a conversão de 5-mC para 5-hmC, como também de 5-hmC para C (TAHILIANI et al., 2009).

Figura 2 - Modelo esquemático da conversão da 5-mC à 5-hC e consequentemente a C



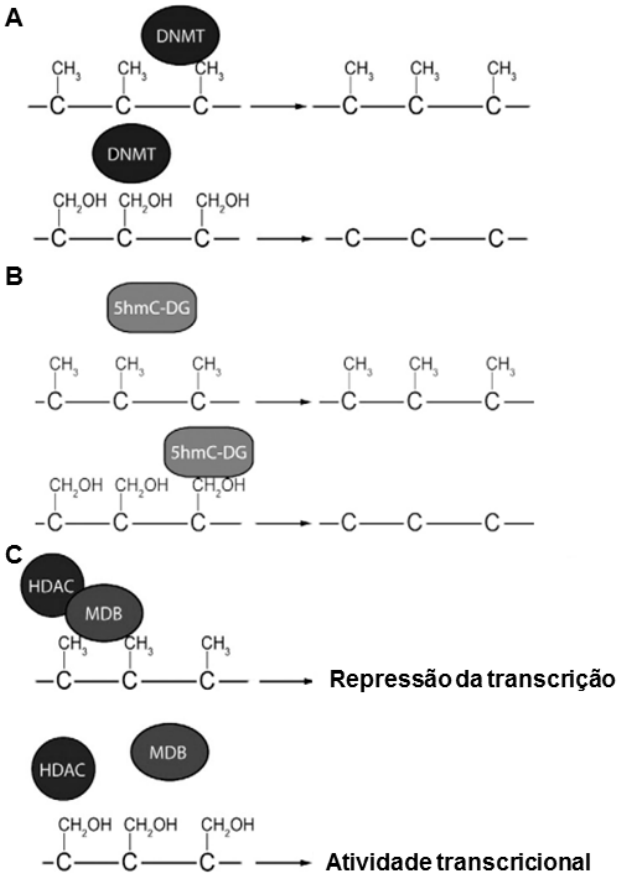
Fonte: Adaptado de Branco et al (2012).
Legenda: Tanto a 5-hmC como a 5-fC podem, possivelmente, ser convertidas diretamente à C pela replicação celular e deformilação, respectivamente. Tanto a 5-fC e a 5-caC podem ser clivadas pela TDG e serem convertidas a C.

A oxidação da 5-mC ocorre com adição de O_2 ao grupo metil (CH_3) formando um grupo hidroximetil (CH_2OH) e consequentemente uma 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). Após a oxidação começa o processo de desmetilação do DNA, onde mais um oxigênio é adicionado e é retirada H_2O, transformando o grupo hidroximetil em um grupo formil, convertendo a 5-hmC à uma 5-formilcitosina (5-fC). Em seguida, ocorre a adição de H^+ e retirada de H_2O, convertendo o grupo formil a um grupo carboxil, formando uma 5-carboxilcitosina (5-caC). O grupo carboxil é catalisado pelo oxalosuccinato liberando α-cetoglutarato e CO_2, finalmente obtendo a citosina não metilada (Figura 2). A 5-mC pode ser convertida diretamente à 5-C após replicação celular; enquanto que a 5-fC e 5-caC podem ser clivadas a 5-C pela timina DNA glicosilase (TDG) (BRANCO; FICZ; REIK, 2012).

Conhecendo as reações e os passos que levam à desmetilação das ilhas

CpGs, Dahl et al (2011) sugeriram três mecanismos de desmetilação: a desmetilação ativa, a desmetilação passiva e a desmetilação dependente da repressão transcricional (Figura 3).

Figura 3 - Modelo esquemático dos diferentes mecanismos de desmetilação



Fonte: Adaptado de Dahl et al (2011).
Legenda: Em **A**, desmetilação passiva, onde a desmetilação ocorre com a replicação do DNA devido o não reconhecimento das DNMTs. Em **B**, desmetilação ativa, onde a 5-hmC-DG "apaga" a metilação independente de replicação. E em **C**, o não reconhecimento da MDB previne o recrutamento da HDAC, deixando a cromatina ativa.

Na desmetilação ativa, a 5-hmC é ligada às proteínas de reparo de DNA, por exemplo, a DNA glicosilase específica de 5-hmC (5-hmC-DG, do inglês "5-hmC-Specific DNA Gycosylase"), gerando a desmetilação independente da replicação celular. Na metilação passiva, a 5-mC é hidroxilada impedindo o seu reconhecimento pelas DNMTs, fazendo com que na replicação do DNA não ocorra a manutenção da metilação. Na desmetilação dependente da repressão transcricional, a 5-hmC não é reconhecida pelas proteínas ligantes a CpG metiladas (MDB, do

inglês “Methyl-CpG-Binding Proteins”), que previne o recrutamento das desacetilases de histonas (HDAC, do inglês “Histone Deacetylases”), levando a formação de cromatinas transcripcionalmente ativas (DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011).

Em estudos sobre a distribuição global de 5-hmC no genoma de células tronco embrionárias de camundongos, pode-se encontrar que a 5-hmC está distribuída nas regiões ricas em genes, e geralmente não presentes em regiões de sequências repetitivas (FICZ et al., 2011; WU; ZHANG, 2011; XU et al., 2011).

As regiões enriquecidas com 5-hmC está relacionada com regiões de promotores de genes ricas em CpG, locais de ligação com fatores de transcrição de pluripotência (FICZ et al., 2011; PASTOR et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; WU et al., 2011). Nas regiões ricas em ilhas CpG o enriquecimento de 5-hmC está especificamente localizado imediatamente após as TSSs e ao final 5’ dos corpos dos genes “Polycomb” reprimidos, que são funcionalmente relacionados com o desenvolvimento (WU; ZHANG, 2011; WU et al., 2013).

Nas regiões intragênicas de genes ativos, relacionados à H3K4me3, a 5-hmC está localizada no final 3’ dos corpos dos genes envolvidos com atividades endógenas (“housekeeping”) (WU; ZHANG, 2011; WU et al., 2013).

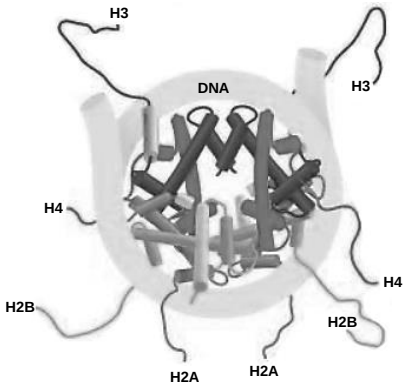
1.1.3.3 Modificações de histonas

As histonas são as proteínas responsáveis pela organização (H2A, H2B, H3 e H4) e união dos nucleossomos (H1). O nucleossomo é formado por dímeros de cada uma das quatro histonas H2A, H2B, H3 e H4, elas se organizam formando um octâmero. Um fragmento da dupla hélice de DNA, com comprimento de 147 pb, se enrola neste octâmero formando 1,7 voltas (Figura 4) (ALBERTS et al., 2010).

As proteínas histonas possuem suas caudas amino terminais externamente livres ao nucleossomo. Essas caudas livres que interagem com outros nucleossomo ou com a própria molécula de DNA, tornando os genes transcricionalmente ativos ou reprimidos (ALBERTS et al., 2010). As caudas amino terminais, principalmente das histonas H3 e H4, são passíveis de modificações pós-traducionais, sendo elas: fosforilação (nos resíduos de serina e treonina), acetilação (lisina), metilação (lisina e

arginina), ubiquitinação (lisina), sumoilação (lisina), ribosilação do ADP, glicosilação, biotinilação e carbonilação. Porém apenas a fosforilação, acetilação e metilação são intensamente estudadas, enquanto isso, pouco se sabe sobre as outras modificações (MARGUERON; TROJER; REINBERG, 2005).

Figura 4 - Modelo esquemático de um nucleossomo



Fonte: Adaptado de Alberts et al (2010).
Legenda: Octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) envoltos por 1,7 voltas de DNA.

A acetilação das histonas é associada com a ativação da transcrição reduzindo a interação entre o DNA e o nucleossomo e a deacetilação reverte esse efeito (MARGUERON; TROJER; REINBERG, 2005). A acetilação é catalisada pelas famílias de enzimas acetiltranferases de histona (HATs, do inglês "Histone Acetyltransferases"), que adicionam a acetilação nos resíduos das caudas das histonas; e as HDACs, que retiram a acetilação (STRAHL; ALLIS, 2000). Em cada uma dessas famílias há várias enzimas, sendo cada uma responsável por uma modificação em um resíduo específico em uma histona específica. Por exemplo, a enzima GCN5, uma HAT, tem preferência por acetilar a lisina 14 da histona H3 (KUO et al., 1996).

A metilação das histonas está relacionada tanto com a ativação como com a repressão da expressão gênica, dependo da quantidade de grupos metil adicionado a cada resíduo. A lisina pode ser mono-, di- ou trimetilada, enquanto que a arginina pode acomodar dois grupos metil de forma simétrica ou assimétrica (MARGUERON; TROJER; REINBERG, 2005).

As enzimas que catalisam a metilação e desmetilação dos resíduos das caudas das histonas foram inicialmente nomeadas usando a mesma linha de raciocínio que as HAT e as HDAC. Sendo então nomeadas como histona metiltransferase (HMT, do inglês

“Histone Methyltransferases”) que eram divididas em dois grupos: metiltransferases de lisina nas histonas (HKMT, do inglês “Histone Lisine Methyltransferases”) que catalisam a metilação para um resíduo de lisina; e proteínas metiltransferases de arginina (PRMT, do inglês “Protein Arginine Methyltransferases”) que catalisam a metilação para um resíduo de arginina (MARGUERON; TROJER; REINBERG, 2005).

Porém, foi descoberto que estas famílias de enzimas não eram específicas de histona e então elas foram renomeadas. Portanto as enzimas que catalisam a metilação para os resíduos de lisina são agora nomeadas metiltransferases de histona (KMT, do inglês “Lisine Methyltransferases”) e lisina demetilases (KDM, do inglês “Lisine Demethylases”) (ZHANG; WEN; SHI, 2012). As KMTs são dividas em oito famílias de acordo com seu domínio proteico. Assim como as KMTs, as KDMs são classificadas em sete famílias.

Mais de 100 diferentes modificações pós-traducionais ocorrem nos resíduos das caudas das histonas, e estão relacionadas com a transcrição, replicação e reparo de DNA (KOUZARIDES, 2007). Contudo essas modificações não ocorrem isoladamente, ou seja, várias modificações podem ocorrer em uma mesma cauda de histona (STRAHL; ALLIS, 2000). Além de que, essas modificações ocorrem tão próximas umas das outras que podem influenciar, positivamente ou negativamente, a habilidade das enzimas modificar seus resíduos (STRAHL; ALLIS, 2000).

Além disso, as várias modificações pós-traducionais presentes em uma mesma cauda de histona produzem um efeito combinado, formando o chamado código de histonas (PETERSON; LANIEL, 2004). Por exemplo, a combinação da H4K8ac, H3K14ac e H3S10p é associada à transcrição. Enquanto que, H3K9me3 e a perda de acetilação na H3 e H4 são associadas à repressão transcricional (PETERSON; LANIEL, 2004). A H3S10p tem efeito na condensação da cromatina durante a mitose, porém quando associada a H3K14 promove a descondensação e transcrição (STRAHL; ALLIS, 2000).

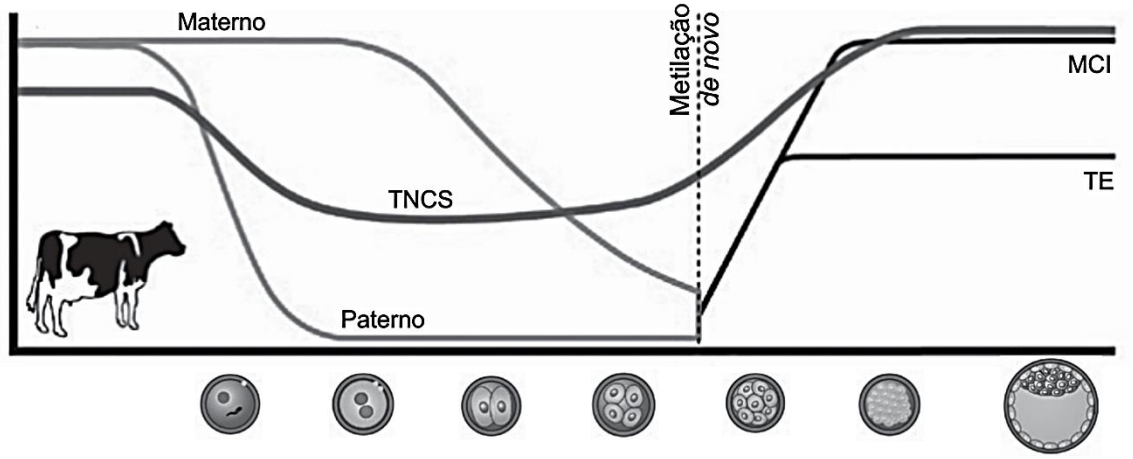
Também há interação entre as modificações pós-traducionais das histonas e a metilação do DNA. Por exemplo, as ilhas CpGs podem ser silenciadas pela H3K27me quando as DNMTs são inibidas, (SMITH; MEISSNER, 2013). Em contraste a KMT2a, que catalisa a metilação para a H3K4me3, protege as regiões promotoras de genes “Homeobox” de sofrerem metilação de DNA (ERFURTH et al., 2008).

1.1.4 Reprogramação epigenética – da formação do zigoto ao trofoblasto diferenciado

1.1.4.1 Reprogramação epigenética durante a embriogênese inicial

Em bovinos, após a fusão dos gametas, para que ocorra uma correta embriogênese, acontece uma completa reprogramação epigenética. Primeiramente o prónucleo paterno sofre uma desmetilação ativa antes mesmo da formação do zigoto. Já o pronúcleo materno, após a primeira divisão celular, começa a sofrer uma desmetilação passiva que se completa antes da terceira divisão celular. Neste momento, ambos pronúcleos sofrem uma metilação "de novo", reestabelecendo seus os níveis de metilação e reativando o genoma. Porém, no estágio de mórula até o estágio de blastocisto começa a diferenciação entre a massa celular interna (MCI) e o trofectoderma (TE), tornando a primeira hipermetilada e a segunda hipometilada (Figura 5) (YANG et al., 2007).

Figura 5 - Modelo esquemático da reprogramação epigenética em embriões bovinos



Fonte: Adaptado de Yang et al. (2007)
Legenda: Observar a desmetilação diferencial dos pronúcleos materno e paterno, como também, a diferença na intensidade da metilação "de novo" na massa celular interna (MCI) e no trofectoderma (TE). Em embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) não ocorre a desmetilação completa e tanto a MCI como o TE sofrem a mesma intensidade de metilação "de novo".

Diferentemente disso, em uma gestação de embrião bovino produzido por transferência nuclear de célula somática (TNCS), há a ausência dos pronúcleos paterno e materno. Por isso, não ocorre a desmetilação diferencial e completa do material genético. Em consequência disso, após a metilação “de novo”, tanto a MCI como o TE apresentam o mesmo nível de metilação, ou seja, hipermetiladas (Figura 5) (YANG et al., 2007).

O padrão da modificação da H3K9 é semelhante ao da metilação do DNA. Há uma redução na acetilação da H3K9 no estágio de duas células e um aumento no estágio de oito células. Assim como DNA, a H3K9 é hipermetilada na MCI e hipometilada no TE, no estágio de blastocisto. Em embriões bovinos produzidos por TNCS, assim como a metilação do DNA, a H3K9 encontra-se alterada apenas no TE, onde é hipermetilada (YANG et al., 2007).

1.1.4.2 Diferenciação do trofectoderma

No estágio de blastocisto é onde ocorre a diferenciação das primeiras linhagens celulares, o trofectoderma (TE) e a massa celular interna (MCI).

A diferenciação inadequada do trofoblasto pode comprometer a formação do epiblasto pela deleção da proteína 3 com domínio ligante ao grupo metil em regiões CpG (MBD3, do inglês “Methyl-CpG Binding Domain protein 3”) e consequente interferência na atividade do complexo de remodelamento e de deacetilação do nucleossomo (NuRD, do inglês “Nucleossome Remodeling and Deacetylase Complex”) (KAJI; NICHOLS; HENDRICH, 2007). A falha na interação MBD3-NuRD altera o padrão das modificações de histonas (H3K9me3, H3K27me3 e ubH2A) e dos níveis de 5-hmC, reprimindo a expressão de CDX2 e GATA4 e 6 (LEEB; WUTZ, 2012).

A diferenciação do trofectoderma e a formação dos diferentes tipos celulares do trofoblasto são iniciadas com a expressão do membro 4 da família dos genes com domínio de ativação de transcrição (TEAD4, do inglês “Transcriptional Enhancer Activators Domain Family Member 4”) que ativa diretamente ou indiretamente o fator de transcrição Homeobox 2 tipo caudal (CDX2, do inglês “Caudal Type Homeobox 2”). E este é requerido para ativação de Eomesdermina

(EOMES, do inglês “Eomesodermin”) (HEMBERGER, 2010).

A cascata TEAD4-CDX2-EOMES, amplamente estudada em camundongos, é essencial para a diferenciação do trofectoderma e formação das células trofoblásticas gigantes (TGC), do espongiotrofoblasto (SPT, do inglês “Spongiotrophoblast”) e do sinciotrofoblasto (SynT, do inglês “Syncytiotrofoblast”). Em bovinos sabe-se apenas da expressão destes genes no trofectoderma, mas pouco se sabe exatamente sobre os mecanismos para sua diferenciação em TGC e trofoblasto mononuclear (FUJII et al., 2010).

Muitos fatores podem influenciar direta ou indiretamente na cascata TEAD4-CDX2-EOMES e consequentemente na formação das TGCs, SPT e SynT. Por exemplo, o CDX2 pode ser ativado, mas não somente, pela proteína 3 ligante ao GATA (GATA3, do inglês “GATA binding protein 3”) ao invés do TEAD4 (HOME et al., 2009). Os fatores de transcrição, AP-3 gama (TFAP2C, do inglês “Transcription Factor AP-2, gamma”), membro 2 da família E26 (ETS2, do inglês “E-Twenty Six 26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain”) e o receptor beta relacionado ao estrógeno (ESRRB, do inglês “Estrogen Related Receptor Beta”) podem regular essa cascata e definir a linhagem trofoblástica a ser diferenciada (HEMBERGER, 2010).

O ERV RLTR13D5 está presente em várias cópias na região de ativação dos principais genes relacionados à diferenciação trofoblástica. Sugere-se que o RLTR13D5 está relacionado com o recrutamento da maquinária de diferenciação trofoblástica, ou seja, os fatores de transcrição CDX2, EOMES e ELF5 (CHUONG et al., 2013). O fator de transcrição 5 semelhante ao E74 (ELF5, do inglês “E74-Like Factor 5”) quando hipometilado faz uma retroalimentação positiva entre o CDX2 e EOMES, favorecendo a diferenciação trofoblástica. Porém quando metilado a diferenciação trofoblástica é interrompida (WADDINGTON, 1940).

O fator de indução de hipóxia (HIF, do inglês “Hypoxia Inducible Fator”) modula a expressão de HDAC. A ausência de HIF inibe a expressão de HDAC, que por sua vez leva a menor diferenciação do TE para TGCs e SPT, e maior para SynT (MALTEPE et al., 2005).

Vários genes são relacionados com a formação das TGCs, por exemplo a baixa expressão do inibidor 1C de quinase dependente de ciclinas (CDKN1C, do inglês “Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C”) inibe a formação de TGCs (MALTEPE; BAKARDJIEV; FISHER, 2010). Outros dois genes são tidos como essenciais na diferenciação trofoblástica: o semelhante ao complexo mamífero

“chaete-scute” 2 (MASH2, do inglês “mammalian achaete–scute complex homologue-like 2”) e o derivador celular da crista neural e coração 1 (HAND1, do inglês “heart and neural crest cell derivative 1”). Em camundongos, o MASH2 estimula a proliferação celular e inibe a formação das TGCs (GUILLEMOT et al., 1994), enquanto que o HAND1 estimula a formação das TGCs (RILEY; ANSON-CARTWRIGHT; CROSS, 1998). Em bovinos o MASH2 é altamente expresso durante a proliferação trofoblástica pré-implantacional (ARNOLD et al., 2006).

1.2 HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL

Avaliar as modificações da interface materno-fetal na gestação bovina, quantificando isoformas do BoLA e modificações da cromatina.

A desregulação da reprogramação nuclear nas gestações de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas leva a uma alteração dos padrões normais da marcas epigenéticas e resultando no desbalanço da expressão das moléculas do MHC de classe I.

A METILAÇÃO DO DNA É MENOS PRESENTE NA GESTAÇÃO INICIAL DE CLONES

2 A METILAÇÃO DO DNA É MENOS PRESENTE NA GESTAÇÃO INICIAL DE CLONES

2.1 INTRODUÇÃO

A placenta humana é um órgão transitório que possui alta atividade metabólica. Os níveis de metilação global da placenta humana estão reduzidos em 20% quando comparado aos demais órgãos, tais como, o cérebro, fígado e linfócitos circulantes (FUKE et al., 2004). Além disso, os níveis de metilação global do DNA placentário são altamente variáveis, provavelmente em consequência da plasticidade das células placentárias para o suprimento das exigências maternas e fetais para o sucesso da gestação (SUGIMOTO; SCHUST, 2009; KOUKOURA; SIFAKIS; SPANDIDOS, 2012). Esses níveis são positivamente correlacionada à idade gestacional e negativamente à expressão de genes retrovirais endógenos (FUKE et al., 2004) que provavelmente estão relacionados à formação de células trofoblásticas binucleadas que são formadas desde o primeiro terço gestacional (GREENSTEIN; MURRAY; FOLEY, 1958; BJÖRKMAN, 1968).

A metilação do DNA é uma reação catalisada pelas enzimas metiltransferases de DNA (DNMTs, do inglês “DNA Methyltransferases”) que adiciona um grupo metil no carbono na posição 5 do anel de pirimidina de citosinas localizadas em dinucleotídeos CpG, formando a 5-metilcitosina (5mC) (GRAZUL-BILSKA et al., 2011). A presença da 5mC na fita de DNA está, via de regra, ligada ao silenciamento da expressão gênica e expressão dos genes “imprinting” (PIYATHILAKE et al., 2005; GRAZUL-BILSKA et al., 2011). A metilação do DNA pode ser revertida temporariamente ou definitivamente (DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011). Um mecanismo envolvido nessa reversão é a hidroxilação da 5mC pelas proteínas Ten-Eleven-Translocation (TET) (TAHILIANI et al., 2009), o que resulta na formação da 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Levando a desmetilação ativa do DNA e regula a transcrição gênica em curto ou longo prazo (DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário, há um desmetilação ativa do DNA paterno logo após a fecundação, enquanto que o DNA materno é passivamente desmetilado a cada divisão celular. Em bovinos, no estágio de 8-16 células ocorre uma metilação “de novo” (YANG et al., 2007). No estágio de blastocisto, a massa celular

interna (MCI) tem maior abundância de 5mC que o trofectoderma (TE) (YANG et al., 2007). Em embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) há uma desmetilação incompleta do DNA e, além disso, a metilação “de novo” ocorre precocemente no estágio de 4 células, fazendo com que a MCI e o TE tenham os mesmos níveis de metilação global (YANG et al., 2007). Entretanto, no dia 80 da gestação bovina, houve uma hipermetilação do fígado fetal em relação ao cotilédone, porém não houve diferenças entre as gestação TNCS e as controle (HIENDLEDER et al., 2004), sugerindo que nessa fase gestacional a diferença entre os níveis de metilação global dos tecidos fetais e placentários é reestabelecida.

As células da placenta possuem diferentes padrões de metilação do DNA, como exemplo, o trofoblasto humano possui menores níveis de metilação global (NELISSEN et al., 2011), no entanto a presença de sítios de DNA metilados são cruciais para o desenvolvimento e função da placenta (VLAHOVIĆ et al., 1999; SERMAN et al., 2007). Ainda, nas linhagens trofoblásticas o padrão de metilação de oncogenes é semelhante ao encontrados em tumores, provavelmente devido a alta proliferação e invasividade do trofoblasto humano (NOVAKOVIC et al., 2008).

Diferentemente dos níveis de metilação, a hidroximetilação do DNA apresenta um padrão tecido-específico, em humanos, sendo que o cérebro, fígado, testículos e placenta apresentam altos níveis de 5hmC (NESTOR et al., 2012). Esses achados indicam que altos níveis de 5hmC são encontrados em tecidos com alta atividade metabólica (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009). Também pode ser observada a expressão hierárquica de 5hmC; como por exemplo, no epitélio estratificado intestinal, as células da região basal (mais indiferenciadas) apresentam menor presença de 5hmC do que a região apical (mais diferenciadas). Entretanto, a associação entre a presença de 5mC e 5hmC não foi encontrada neste tecido (HAFFNER et al., 2011).

Além disso, a expressão gênica do trofoblasto, incluindo os retrovírus endógenos, é controlada pela metilação do DNA, portanto é possível que a inadequada reprogramação epigenética das células trofoblásticas no período pré-implantacional, resulte em um anormal estabelecimento da comunicação materno-fetal, consequentemente a perdas gestacionais pós-implantacionais e a anomalias placentárias em gestações produzidas por TNCS (HEMBERGER, 2010).

Nossa hipótese neste estudo, é de que os tecidos fetais dos placentônios na gestação inicial de embriões produzidos por TNCS possui menores níveis de metilação e hidroximetilação globais para favorecer a interação e a comunicação materno fetal.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Foram usados como anticorpos primários: anti-5 metilcitidina (5mC, clone 33D3, #sc-56615; Santa Cruz Biotechnology, INC - Santa Cruz, CA, USA) e anti-5 hidroximetilcitosina (5hmC, polyclonal, #AP9160a; Abgent - San Diego, CA, USA). Como controle de isotipo foram usados anti-IgG murina (clone MOPC-21, #M5284; Sigma-Aldrich - Saint Luis, MS, USA) e anti-IgG de coelho (polyclonal, # ab27478; Abcam - Cambridge, MA, USA). Como anticorpo secundário e amplificador de sinal foram utilizados os kits Dako Advance^{tm} HRP (#K4069; DAKO - Carpinteria, CA, USA) para anti-5mC e anti-IgG murino; e o Vectastain ABC Kit (Rabbit IgG, #PK-4001; Vector Laboratories - Burlingame, CA, USA) para anti-5hmC e anti-IgG de coelho. As reações foram reveladas 3,3-diaminobenzidina (DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, #K346811; DAKO).

Ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio foram comprados da Synth (Diadema, SP, Brasil). Para os tampões biológicos foram utilizados os seguintes reagentes: ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio tribásico anidro, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio mono báscio (KH2PO4), fosfato de sódio dibásico heptaidratado (Na2HPO4.7H2O) e 3-(Aminopropyl)triethoxysilane, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Triton x-100 (# 0694-1L) foi adquirido da Amresco (Solon, Ohio USA).

2.2.2 Obtenção dos placentônios

O experimento foi conduzido com placentônios de bovinos clonados produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (MIGLINO et al., 2007), e como controle foram utilizados placentônios de gestações provenientes de abatedouro, o modo de coleta foi realizado segundo Pereira e colaboradores (2013). As amostras de placentônios foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, desidradatas e embebidas em parafina ou criopreservadas em nitrogênio líquido. Para as reações de imunohistoquímica as amostras de placentônio TNCS foram separadas em três grupos

com 60 dias (n = 3), 90 dias (n =2) e 285 dias (termo, n = 6) de gestação. Nas amostras controle, os grupos foram organizados da seguinte forma: 64 dias (± 5,7; n = 3 - denominado 60 dias), 81 dias (± 7; n = 3 - denominado 90 dias) e 251 dias (± 21; n = 6 - denominado termo) de gestação. Entretanto para as reações de PCR em tempo real, as amostras foram agrupadas em dois grupos: primeiro e terceiro trimestre. Na placenta TNCS, o grupo de primeiro terceiro foi composto por amostras com 75 dias de gestação (± 17,3; n = 4) e o de terceiro trimestre por amostras com 285 dias (termo; n = 4). Na placenta controle, os grupos foram formados com amostras de 73 (± 16,2; n = 4) e 240 (± 7,4; n = 4) dias de gestação, respectivamente.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética dos Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 9408110315).

2.2.3 Detecção global de 5mC e 5hmC

Os protocolos de imunohistoquímica para 5mC e 5hmC foram adaptados de Grazul-Bilska et al (GRAZUL-BILSKA et al., 2011) e Haffner et al (HAFFNER et al., 2011). As amostras de placentônios foram seccionadas com 5 µm de espessura e montadas em lâminas silanizadas, desparafinadas e reidratadas. As lâminas foram permeabilizadas três vezes de três minutos em solução tampão fosfato (PBS; 136,9 mM de NaCl; 26,8 mM de KCl, 14,7 mM de KH_2PO_4 e 8,1 mM de $Na_2HPO_4.7H_2O$; pH 7.2) adicionado de 0,3% de Triton X-100. Em seguida o DNA foi desnaturado com 3,5 N de HCl (292,26 mL de HCL e complete o volume para 1 L com água destilada) por 20 minutos a 37° C. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada por 15 minutos no escuro. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com 2% de soro equino em PBS durante 30 minutos seguido de incubação com o anticorpo primário 5-mC (1:50) ou 5-hmC (1:250), por 16 horas, em câmara úmida a 4º C. Os anticorpos primários foram detectados com os kits Dako Advance^{tm} HRP e Vectastain ABC para 5-mC e 5-hmC, respectivamente. As reações foram detectadas com DAB e contra corados com hematoxilina. Os cortes controle foram incubados com anti-IgG murina e anti-IgG de coelho no lugar dos anticorpos primários anti-5mC e anti-5hmC, respectivamente. Entre cada passo, os cortes foram lavados três vezes de cinco minutos em PBS; após a

incubação com anticorpo primário, foi adicionado 0,2% de soro equino ao PBS de lavagem. Para as reações com o anti-5hmC, antes da denaturação do DNA com HCl, foi realizada a recuperação de antígeno com tampão citrato (1,83 mM de ácido cítrico monoidratado e 8,9 mM de citrato de sódio tribásico anidro, pH 6,0) em forno microondas por quatro vezes de cinco minutos.

2.2.3.1 Análise das imagens

Cinco campos aleatórios (de cada amostra) foram fotografados com magnificação de 400 vezes, usando o microscópio Zeiss Axioplan 2 e câmera Axiocan HRc e analisados com ImageJ software (v. 1.44p). Para comparação entre os resultados de 5-mC e 5-hmC, o método de Remele and Stegnerl (REMMELE; STEGNER, 1987) foi utilizado. Resumidamente, o campo de células foram ranqueadas por porcentagem de células positivas (negativo = 0; 1–25% = 1; 26–50% = 3; 51–75% = 3; e 76–100% = 4) e pela intensidade de marcação (negativa = 0, baixa = 1, moderada = 2 e intensa = 3). Por fim os dois ranques (porcentagem e intensidade de marcação) foram multiplicados que resultou em um escore total.

Os dados foram analisados pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo e idade gestacional) e erro padrão.

2.2.4 Detecção da expressão gênica

O mRNA total das amostras foram extraídos usando o kit RNeasy Plus Mini, a digestão de DNA com DNAse I amplification grade e a transcrição reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; todos sob orientações do fabricante.

Para cada reação de qPCR, foram utilizados 7,5 µL de SyBr Green PCR master mix; 1,0 mM de cada primer (Quadro 1); 1,0 µL de cDNA diluído (63,0 µL de água ultra pura para 1,0 µL de cDNA), e água ultra pura para um total de 15,0 µL. Foi utilizado programa de ciclagem padrão do 7500 fast real-time PCR system (Invitrogen). Os

oligonucleotídeos iniciadores utilizados já foram previamente padronizados em amostras bovinas.

Quadro 1- Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Símbolo	Nome oficial	Gene ID	Sequência (5' – 3')	Tam
DNMT-1	DNA methyltransferase 1	281119	F: GCAGTACCAGCCCATCCT R: GCGGGCAGCCACCAA	64
PAG9	Pregnancy-associated glycoprotein 9	337903	F: GGGTGCCCTCCTTTTGTACC R: ACAAGGTCCCCAATCCGAAC	166
PHLDA2	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	258513 338	F: GCCACTATAAAGGCGGCTC R: CTTGACGGTTGGAGGGAGAC	89
SNURF	SNRPN upstream reading frame	282076	F: GGGACCGTTTACACTTGAGAC R: GGAAATCCACCACAGGTACT	153
TSSC4	Tumor suppressing subtransferable candidate 4	509559	F: TGCCACCAAGAACCTTCG R: CCTCTGCCATGTGTCACC	106
ACTB	Beta-actin	280979	F: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC R: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	108
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	281418	F: CATACAGGTCCTGGCATC R: CACGTGCTTGCCATCCAA	91
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	287022	F: GCATCCCACAGACTATTTCC R: GCAAAGACAATGACAGACCA	150

Fonte: Barreto (2015)

Os dados foram analisados segundo o método de dCt de Livak et al (2001) e a análise estatística foi realizada pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo e animal) e erro padrão. Os gráficos foram feitos no programa SigmaPlot (versão 12.0).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Imunolocalização de 5mC

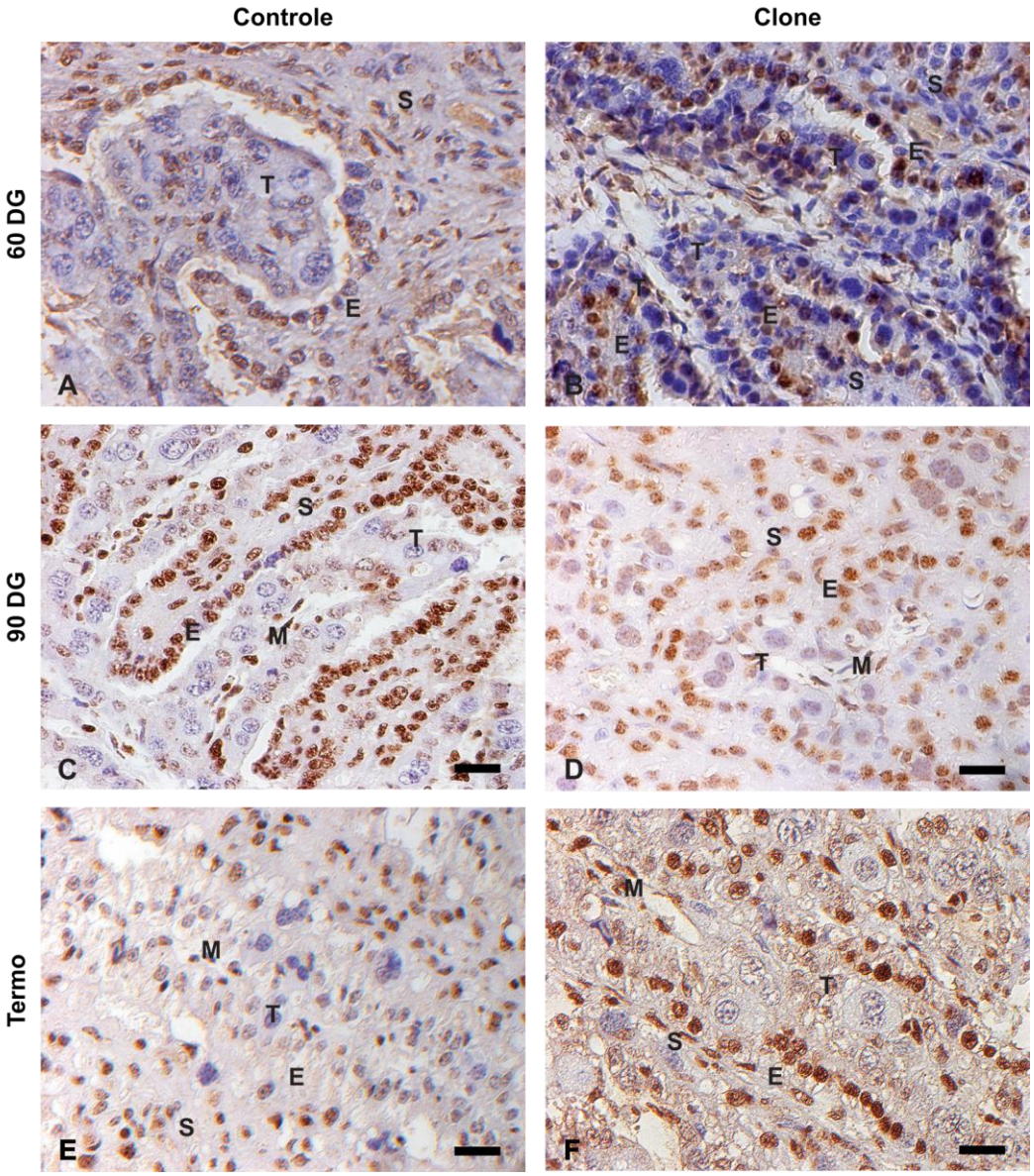
Em geral, a marcação de 5mC pode ser visualizada como um núcleo marrom com região mais densas e fortemente marcadas. O tecido materno do placentônio apresentou alta marcação de 5mC quando comparado com os tecidos fetais. Além disso, as células trofoblásticas binucleadas (TGCs) variam entre baixa e ausente

marcação para 5mC (Figura 6). Aos 60 dias de gestação, tanto a placenta controle como a placenta de animais produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) apresentaram marcação para 5mC principalmente na porção materna, sendo esta mais fortemente marcada na placenta TNCS (Figura 6 A-B). Aos 90 dias de gestação, a placenta controle apresentaram uma forte marcação na porção materna (principalmente no epitélio uterino) em relação à placenta TNCS. Na porção fetal, algumas células trofoblásticas apresentaram uma leve marcação para 5mC enquanto que as células mesenquimais apresentam uma forte marcação (Figura 6 C-D). A termo, a placenta controle apresentou uma menor marcação para 5mC tanto nos tecidos maternos como nos fetais, enquanto que a placenta TNCS apresentou predominantemente ausência de marcação para 5mC nas células fetais, enquanto que o epitélio materno manteve-se fortemente marcado (Figura 6 E-F).

A porcentagem de células positivas para 5mC em placenta TNCS aumentou com o avanço da idade gestacional, sendo que maiores níveis da metilação global foram encontrados na placenta TNCS a termo. Enquanto que a placenta controle apresentou níveis constantes de 5mC em todas as idade analisadas (Figura 7 a). A intensidade de marcação na placenta controle aos 90 dias de gestação foi mais intensa que na placenta TNCS no mesmo período (P = 0,05) e que na placenta controle a termo (P = 0,032) (Figura 7 c).

A análise do escore total do nível global de metilação, demonstrou que na placenta controle a metilação global foi maior aos 90 dias de gestação em relação ao termo (P = 0,03). Na placenta TNCS termo, houve um aumento dos níveis globais de 5mC em relação aos 60 e 90 dias (P = 0,03) (Figura 7 e).

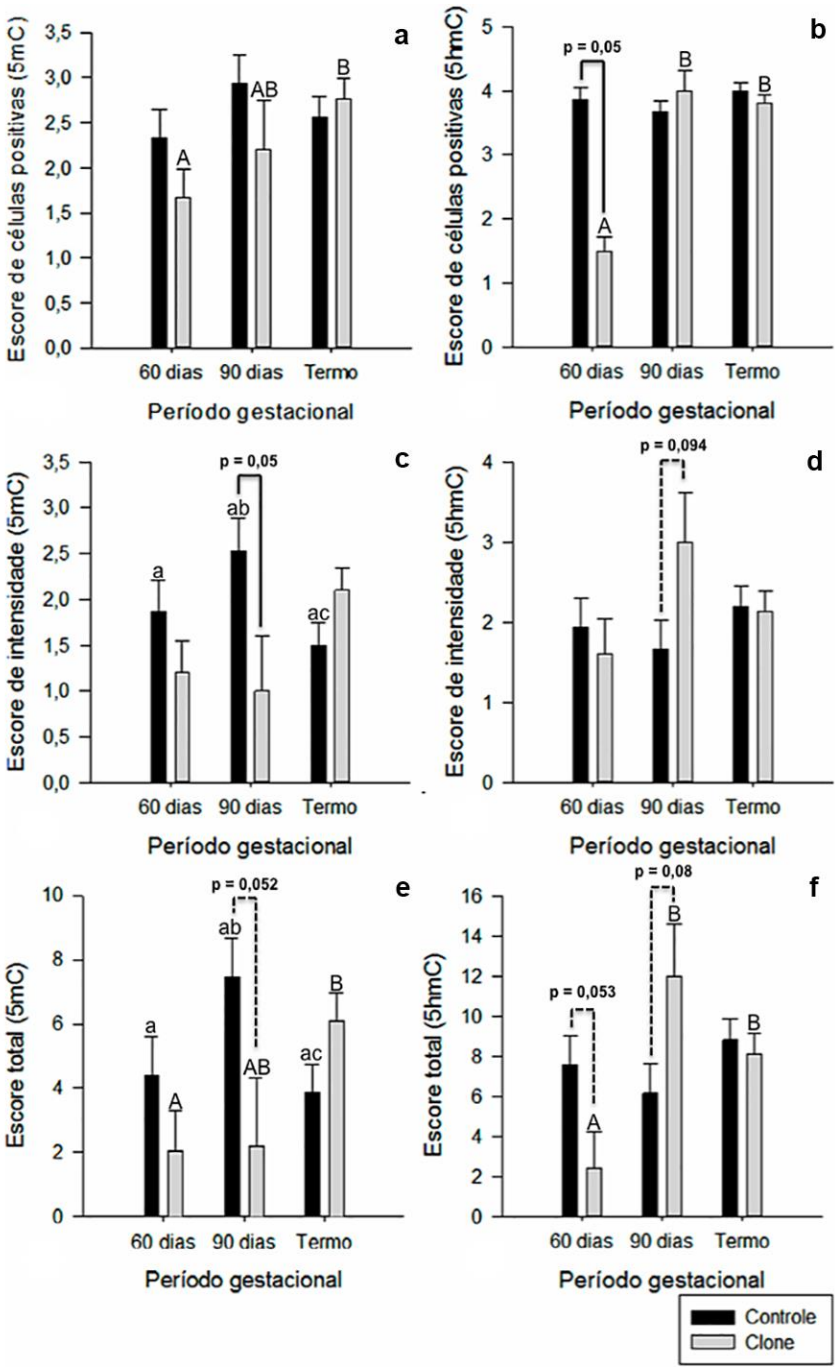
Figura 6 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de 5mC global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle aos 60 dias de gestação. Observar maior intensidade de marcação para 5mC no epitélio materno em relação ao trofoblasto; os núcleos celulares do estroma endometrial apresentam marcação de leve a negativa. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Observar maior quantidade de células positivas para 5mC no epitélio materno em relação ao trofoblasto, apesar das células terem marcação mais intensas elas estão em menor quantidade que nos placentônios controle aos 60 dias. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Observar intensa marcação no estroma endometrial (S) no epitélio materno (E) e no mesênquima fetal (M); porém ocorre uma marcação leve no trofoblasto (T) e muito discreta nas TGCs. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Observar uma menor intensidade de marcação para 5mC nos tecidos maternos, e a marcação levemente mais intensa no trofoblasto. Em **E**, placentônio controle a termo. Observar uma menor intensidade de marcação para 5mC nos tecidos maternos, e a marcação levemente mais intensa no trofoblasto. Em **F**, placentônio clone a termo. Ainda em relação ao grupo controle, os tecidos maternos e fetais apresentam mesmo padrão de marcação. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

Figura 7 - Gráficos representando a quantificação global da 5mC e 5hmC em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Presença global de 5mC (A, C e E) e 5hmC (B, D e F), apresentadas pelos Escore de células positivas (A e B), Escore de intensidade (C e D) e Escore total (E e F, multiplicação dos dois primeiros escores) pelo período gestacional (60 e 90 dias de gestação e termo). Letras minúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios controle. Letras maiúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios clone. Barras contínuas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os grupos dentro de um mesmo período gestacional . Barras pontilhadas representam tendência ($p \leq 0,10$).

2.3.2 Imunolocalização de 5hmC

A marcação nuclear da 5hmC apresentou de forma semelhante a encontrada para 5mC, entretanto, a 5hmC também apresentou marcação citoplasmática em consequência da alta concentração de 5hmC no DNA mitocondrial (SHOCK et al., 2011) (Figura 8).

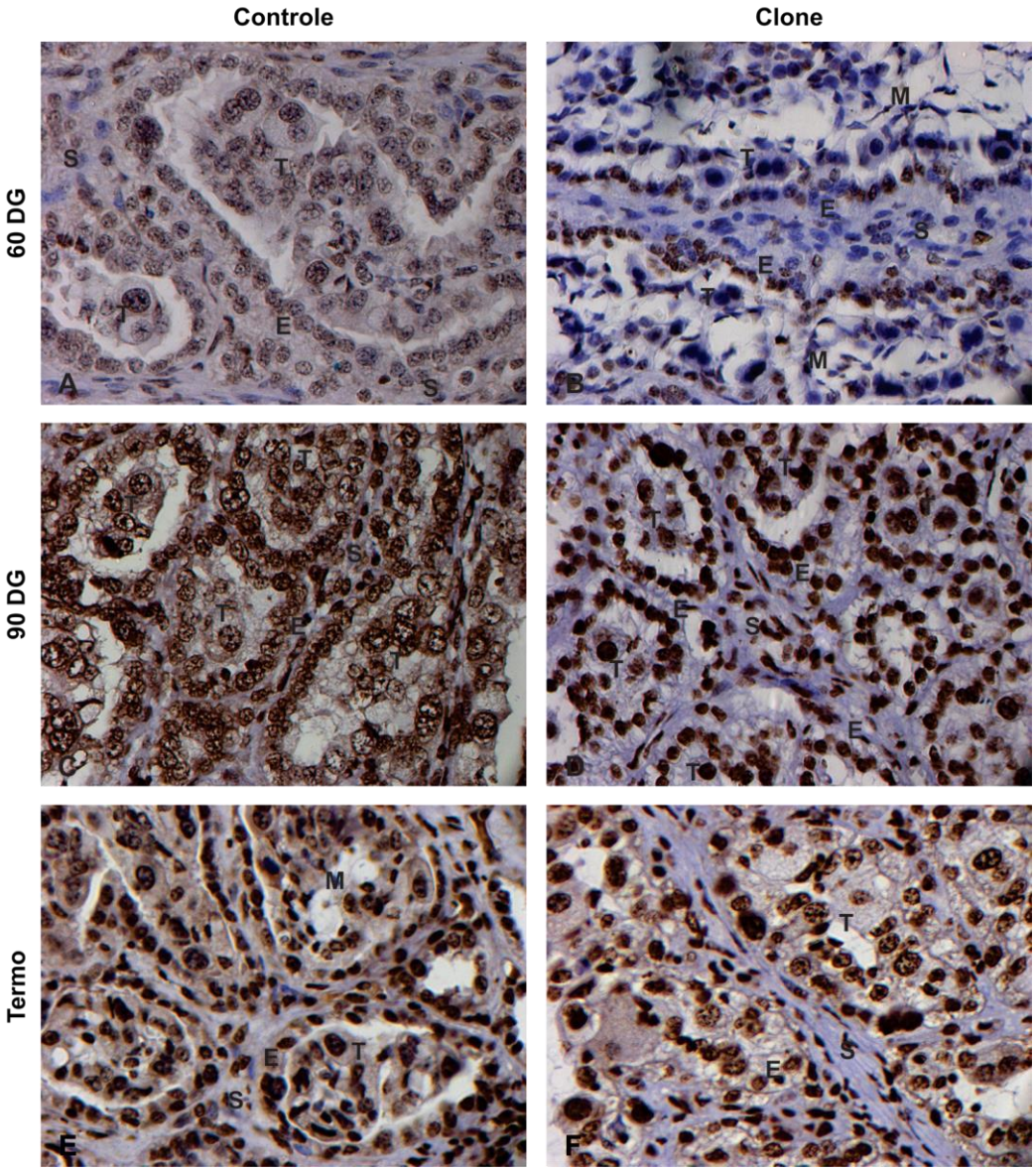
Em todos os grupos analisados a 5hmC foi encontrada tanto nos tecidos maternos como nos fetais. Aos 60 dias a placenta controle apresentou marcação em todas as células fetais e epitélio materno, com a presença de algumas células negativas no estroma materno (Figura 8 A). Neste mesmo período gestacional, a placenta TNCS apresentou marcação para 5hmC na maioria das células epiteliais maternas, enquanto que as células trofoblásticas, mesenquimais e do estroma materno apresentaram ser predominantemente negativas (Figura 8 B).

Aos 90 dias e a termo, todas as células tanto maternas como fetais de ambos grupos analisados apresentaram ser largamente positivas (Figura 8 C-F). Em geral, os núcleos das TGCs apresentam níveis globais de 5hmC maior que os tipos celulares. Enquanto que algumas células, do estroma endometrial, com núcleo alongado permaneceram negativas para 5hmC (Figura 8 C-F).

Quanto a porcentagem de células positivas, a placenta TNCS, aos 60 dias, apresentou menor número de células positivas para 5hmC global que a placenta controle do mesmo período ($P < 0,001$) (Figura 7 B) e a termo ($P < 0,001$) (Figura 7 B). Não foram encontradas diferenças de intensidade de marcação de 5hmC entre os grupos e idades gestacionais analisadas (Figura 7 D).

A análise de escore total revelou que na placenta controle não houve alteração nos padrões de 5hmC entre as idades gestacionais analisadas. Porém na placenta TNCS, houve um aumento de 5hmC aos 90 dias de gestação ($P = 0,011$). Entre os tipos gestacionais, aos 60 dias de gestação, a placenta controle apresentou maiores níveis de 5hmC global que a placenta TNCS ($P = 0,053$), enquanto que aos 90 dias essa relação se inverteu ($P = 0,077$) (Figura 7 F).

Figura 8 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de 5hmC global



Fonte: Barreto (2015)

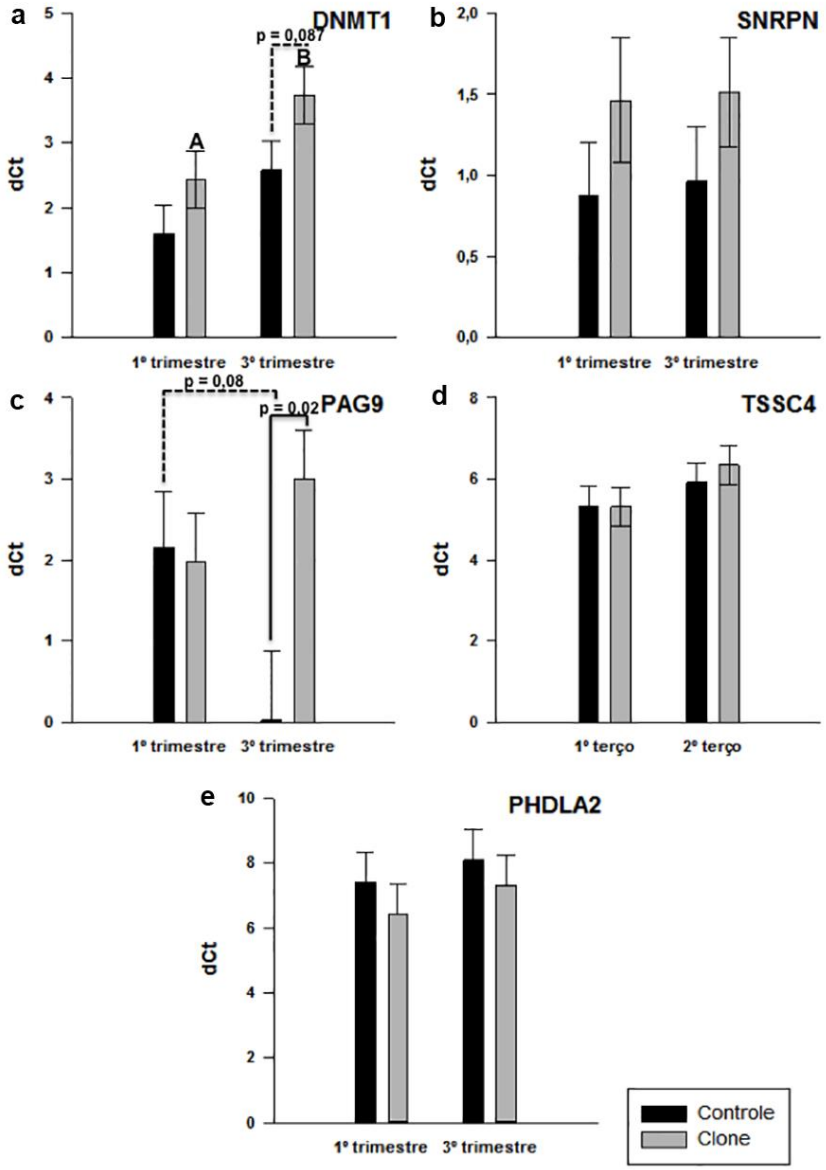
Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Observar trofoblasto e epitélio materno com forte marcação para 5hmC, enquanto que no estroma endometrial e no mesênquima fetal há núcleos celulares com diversos padrões de marcação. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Observar intensidade de marcação para 5hmC mediana no epitélio materno e no trofoblasto, porém o estroma endometrial e o mesênquima fetal encontram-se negativos para 5hmC. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Observar marcação muito intensa em todos os tecidos maternos e fetais, sendo esta ainda mais intensa nas TGCs. Notar algumas células totalmente negativas no estroma endometrial. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Padrão de marcação semelhante à placenta controle aos 90 dias. Em **E**, placentônio controle a termo. Padrão de marcação semelhante à placenta controle aos 90 dias.. Em **F**, placentônio clone a termo. Padrão de marcação semelhante à placenta controle aos 90 dias.. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

2.3.3 Analise da expressão gênica de DNMT1 e genes “imprinted”

Quanto a expressão de DNMT1, a placenta TNCS no terceiro trimestre de gestação apresentou uma forte tendência ao aumento da expressão de DNMT1 quando comparados placentas de primeiro trimestre do mesmo grupo (P = 0,057) (Figura 9 A). A comparação entre grupos (controle vs TNCS) no terceiro trimestre, a placenta TNCS apresentou uma tendência ao aumento da expressão de DNMT1 em relação à placenta controle (P = 0,087) (Figura 9 A).

Para o PAG9, durante o primeiro trimestre não houve diferença entre o tipos de gestação, porém no terceiro trimestre a placenta TNCS apresentou uma expressão cerca de dez vezes maior que os controles (P = 0,018). No terceiro trimestre da gestação a placenta controle mostrou uma expressão reduzida de PAG (P = 0,082) (Figura 9 B). Entretanto a expressão de PHDLA2, SNRPN e TSSC4 não diferiu entre os grupos ou idade gestacional (Figura 9 C-E).

Figura 9 - Expressão dos genes DNMT1, PAG9, PHDLA2, SNRPN e TSSC4 em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Expressão gênica dos genes DNMT1 (A), SNRPN (B) PAG9 (C), TSSC4 (D) e PHDLA2 (E) apresentada em valores de dCt pela idade gestacional (primeiro e terceiro trimestres). Letras maiúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios clone. Barras contínuas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os grupos dentro de um mesmo período gestacional. Barras pontilhadas representam tendência ($p \leq 0,10$).

2.4 DISCUSSÃO

Os níveis globais de 5mC e 5hmC foram avaliados em placentônios bovinos durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação de clones e controles. Durante o primeiro terço gestacional, houve uma menor presença de 5mC no trofoblasto em relação ao epitélio materno, tanto na placenta controle como na placenta TNCS. Os níveis menores de metilação global foram também reportados durante o primeiro trimestre em placentas humanas, provavelmente em consequência ao aumento da proliferação e migração das células trofoblásticas (KOUKOURA; SIFAKIS; SPANDIDOS, 2012; RUGG-GUNN, 2012). A diminuição dos níveis de metilação das células trofoblásticas, pode ter origem ainda no estágio de blastocisto, onde o trofectoderma é hipometilado em relação a massa celular interna, estabelecendo as diferenças epigenéticas entre as duas linhagens (YANG et al., 2007).

Ainda no primeiro trimestre, a placenta TNCS apresentou menores níveis de metilação global, o que pode ter um papel importante no retardo do estabelecimento da interação materno fetal e de alterações placentárias (MIGLINO et al., 2007) sugerindo que menores níveis de 5mC global seriam necessários para melhorar a comunicação entre mãe e feto (SUGIMOTO; SCHUST, 2009; KOUKOURA; SIFAKIS; SPANDIDOS, 2012). Visto que a desmetilação promove a diferenciação da células trofoblásticas em células invasivas e também parece estar envolvida no aumento da poliploidia, características encontradas nas células trofoblásticas binucleadas (NG et al., 2008).

Em gestações TNCS, aos 80 dias, o cotilédone viloso não apresentou diferença nos níveis de metilação global em relação ao controle (HIENDLEDER et al., 2004). Em nossos resultados observamos que aos 60 dias de gestação os níveis de 5mC eram similares entre os tipos gestacionais, porém aos 90 dias a placenta controle estava hipermetilada em relação à placenta TNCS. Porém vale salientar que em nosso trabalho analisamos os níveis globais de 5mC no placentônio e não apenas no cotilédone viloso.

No dia 60 da gestação, a placenta TNCS apresentou hidroximetilação apenas no epitélio materno e no trofoblasto, enquanto que no mesmo período na placenta

controle a hidroximetilação esteve presente em todos os tecidos. Porém aos 90 dias de gestação e a termo, os níveis de 5hmC globais são iguais entre controle e clone, mostrando que com a diferenciação e maturação dos tecidos, há um aumento na hidroximetilação global (HAFFNER et al., 2011).

Uma baixa metilação global do trofoblasto foi observada em nossos resultados, o que pode levar a ativação dos elementos repetitivos e transposons, e agir no estabelecimento e regulação do trofoblasto (RUGG-GUNN, 2012) e formação das células trofoblásticas binucleadas (KOSHI et al., 2012). Além disso, nas células trofoblásticas gigantes (TGCs) a marcação para 5mC foi muito fraca ou ausente o que pode levar a baixa estabilidade do genoma, perda da capacidade proliferativa, diminuindo as chances da sua sobrevivência pós parto, ou seja, reduzindo a possibilidade de uma formação tumoral pós migração (PETERS et al., 2001). Ainda pode levar a uma alterada comunicação materno-fetal anormal e perdas gestacionais pós-implantacionais, como também a síndrome do bezerro macrossômico nas gestações de clones (HEMBERGER, 2010).

Neste estudo, altos níveis globais para 5hmC foram encontrados nas TGCs, enquanto que os níveis globais para 5mC apresentaram ser diminuídos, sugerindo uma relação da razão 5hmC/5mC nas células trofoblásticas. Entretanto, não houve relação entre os níveis de 5mC e 5hmC nos outros tipos celulares analisados. Em adenocarcinomas de cólon e próstata humanos, também não houve correlação entre os níveis de 5mC e 5hmC (HAFFNER et al., 2011).

A expressão de DNMT1 não diferiu durante o primeiro terço, porém a termo há uma tendência de maior expressão de DNMT1 na placenta TNCS. Apesar das DNMTs serem responsáveis pela metilação do DNA, a DNMT1 e 3a pode se apresentar inversamente proporcionais em relação aos níveis de metilação na placenta (GRAZUL-BILSKA et al., 2011).

A expressão do PAG-9 foi similar entre a placenta controle a placenta TNCS durante o primeiro trimestre, assim como encontrado no cotilédone viloso aos 60 e 100 dias de gestação (PATEL et al., 2004). Além disso, a expressão de PAG9 no cotilédone em gestações TNCS é praticamente ausente entre os dias 17 (ARNOLD et al., 2006) e 30 (PATEL et al., 2004). Portanto, isso pode indicar que a placenta TNCS, ao final do primeiro terço, possui uma população de TGCs funcionais semelhante à placenta controle, visto que a PAG9 é produzida por essas células (GREEN et al., 2000). Entretanto no terceiro trimestre, na placenta controle a

expressão de PAG9 é quase nula, enquanto que na placenta TNCS é altamente expressa, podendo provavelmente indicar que nessa fase as TGCs, apesar de presentes, não produzem PAG9, visto que a possível atividade imunossupressora (GREEN et al., 2000) desta proteína não seria tão necessária nessa fase na placenta controle.

Os genes “imprinted” são epigeneticamente regulados, e em sua maioria, desregulados nas gestações de clones (TIAN, 2014), entretanto os genes “imprinted” analisados nesse trabalho (PHDLA2, SNRPN e TSSC4) não apresentaram diferenças na expressão nos grupos e idades analisadas.

2.5 CONCLUSÕES

A diminuição dos níveis globais de metilação no trofoblasto bovino na placenta controle, e ainda mais intensificada na placenta TNCS, durante o primeiro trimestre gestacional pode facilitar a comunicação materno-fetal. Na gestação a termo, os clones possuem padrões de 5mC e 5hmC semelhantes aos controles, provavelmente devido a uma melhor reprogramação nuclear e consequentemente o sucesso da gestação. A ausência de metilação na maioria das células trofoblásticas gigantes, possivelmente leva a ativação de elemento repetitivos, importantes para a formação, regulação e função dessas células.

A H3K4ME3 É DESREGULADA ENTRE GESTAÇÕES CONTROLE E CLONES

3 A H3K4ME3 É DESREGULADA ENTRE GESTAÇÕES CONTROLE E CLONES

3.1 INTRODUÇÃO

As histonas são as proteínas responsáveis pela organização e união dos nucleossomos. As caudas amino terminais livres externamente ao nucleossomo são passíveis de modificações pós traducionais, que podem modular a sua interação com os nucleossomos ou com a própria molécula de DNA, ativando ou reprimindo a expressão de determinados genes (ALBERTS et al., 2010).

Dentre as modificações de histonas, a acetilação é associada com a ativação da transcrição reduzindo a interação entre os nucleossomos, enquanto que a deacetilação é associada com uma interação mais íntima entre os nucleossomos, favorecendo repressão da transcrição gênica. Ao passo que a metilação das histonas pode resultar tanto na ativação como na repressão da expressão gênica, dependo do número de grupos metil adicionado a cada resíduo (MARGUERON; TROJER; REINBERG, 2005). Como exemplo, as H3K9me2, H3K9me3 e H3K27me3 são repressivas, enquanto que a H3K4me3, assim como a H3K9ac, são modificações permissivas da transcrição gênica (PETERSON; LANIEL, 2004).

Além disso, as modificações pós-traducionais das histonas interagem com a metilação do DNA, como por exemplo, as ilhas CpGs podem ser silenciadas pela H3K27me3 quando as DNMTs são inibidas, (SMITH; MEISSNER, 2013). Assim como a H3K4me3, protege as regiões promotoras de genes “Homeobox” de sofrerem metilação de DNA, mantendo-os ativos (ERFURTH et al., 2008). Entretanto, nas histonas, as marcas repressivas permitem um silenciamento gênico mais plástico que a metilação do DNA (NELISSEN et al., 2011).

Durante a formação da massa celular interna e do trofectoderma, a H3K4me3 e a H3K27me3 são bivalentes e agem antagonicamente (RUGG-GUNN, 2012). Na massa celular interna a H3K27me3 é enriquecida e permite a expressão dos três marcadores de pluripotência (OCT4, NANOG e SOX2) (PAN et al., 2007). Entretanto no trofectoderma, os genes promotores da diferenciação trofoblástica (CDX2 e EOMES) são enriquecimentos com marcas permissivas (H3K4me3 e H3K9ac) e as marcas repressivas (H3K27me3) são encontrados em baixos níveis (LEWIS et al., 2004; WAGSCHAL et al., 2008). Nas células

trofoblásticas os menores níveis de modificações de histona, assim como a metilação do DNA, são necessários para a normalidade do desenvolvimento extraembrionário (NELISSEN et al., 2011). Em estágios mais avançados da placentação, a H3K27me3 pode manter o "imprinting genômico" independente da metilação de DNA na região dos promotores gênicos (LEWIS et al., 2004; WAGSCHAL et al., 2008).

A deleção da enzima G9a, responsável pela trimetilação da H3K9 leva a letalidade e retardo no crescimento embrionário. Além disso a G9a parece ser mais importantes para células diferenciadas do que para as indiferenciadas (TACHIBANA et al., 2002). Entretanto a deleção das enzimas Suv39h1 e Suv39h2, catalizadoras da dimetilação da H3K9, induz a endoreduplicação celular "in vitro" (PETERS et al., 2001). Portanto a H3K9me3 (G9a) parece estar mais relacionada ao desenvolvimento embrionário, enquanto que a H3K9me2 (SUV39H1/2) pode ter alguma influência na formação das células gigantes binucleadas.

Portanto de modo geral, as modificações de histonas são menos intensas na placenta do que no embrião, mostrando que o controle da repressão gênica é mais plástico nas linhagens trofoblásticas do que nas embrionárias (WAGSCHAL et al., 2008). Contudo, pouco se sabe sobre os padrões globais das modificações de histonas na placenta, visto que a grande maioria dos trabalhos são realizados com embriões pré-implantacionais, focando nas diferenças entre os perfis do trofectoderma e da massa celular interna. Em paralelo, sabe-se que as gestações bovinas produzidas por transferência nuclear apresentam alta desregulação epigenética (GENG-SHENG et al., 2009). Portanto nossa hipótese é de que durante a gestação de clones bovinos, a interação materno fetal possui uma maior presença de marcas permissivas do que repressivas. Para tanto serão avaliados, por meio de imunohistoquímica e western blot, os níveis globais das principais modificações de histonas em placentas bovinas durante a gestação de fetos controle e clonados.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais utilizados

Foram utilizados os anticorpos primários policlonais anti-H3K4me3 (# 07-473), anti-H3K9ac (# 04-1003), anti-H3K9me2 (# 07-441), anti-H3K9me3 (# 07-523), anti-

H3K27me3 (#07-449), todos adquiridos pela Millipore (Billerica, MA, USA). Como controle de isotipo foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho (policlonal, # ab27478; Abcam - Cambridge, MA, USA). O anticorpo secundário e amplificador de sinal foram utilizados do kit Dako Advancetm HRP (#K4069), e a reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidina (DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, #K346811), ambos adquiridos da DAKO (Carpinteria, CA, USA).

Para as reações de western blotting, foram utilizados os mesmos anticorpos primários, como anticorpo secundário foi usado o anti-coelho conjugado com HRP (#70745, Cell signaling, Danvers, MA, USA). Para bloqueio a albumina sérica bovina (BSA, #A6003, Sigma). Para quantificação da proteína total e revelação da membrana, foram usados Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#5000006) e Clarity™ Western ECL Substrate (#1705061) ambos da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Para transferência e revelação utilizou-se, respectivamente, o TransBlot System Turbo e ChemiDoc MP System, ambos da Bio-Rad.

Para os tampões biológicos foram utilizados os seguintes reagentes: ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio tribásico anidro, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio (H2O2), cloreto de potássio (KCl), trizma base (C4H11NO3), e 3-(Aminopropyl)triethoxysilane, todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.2.2 Obtenção dos placentônios

O experimento foi conduzido com placentônios de bovinos clonados produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (MIGLINO et al., 2007) separados em três grupos com 60 dias (n = 3), 90 dias (n =2) e 285 dias (termo, n = 6) de gestação. Como controle foram utilizados placentônios de gestações provenientes de abatedouro, com 64 dias (± 5,7; n = 3 - denominado 60 dias), 81 dias (± 7; n = 3 - denominado 90 dias) e 251 dias (± 21; n = 6 - denominado termo) de gestação. Para todas as amostras o modo de coleta foi realizado segundo Pereira e colaboradores (2013), seguidas elas foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, desidradatas e embebidas em parafina ou criopreservadas em nitrogênio líquido. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética dos Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 9408110315).

3.2.3 Detecção global por imunohistoquímica

Os protocolos de imunohistoquímica para as modificações de histona foram adaptados de Grazul-Bilska et al (GRAZUL-BILSKA et al., 2011) e Haffner et al (HAFFNER et al., 2011). As amostras de placentônios foram seccionadas com 5 µm de espessura e montadas em lâminas silanizadas, desparafinadas e reidratadas. A recuperação de antígeno foi realizadas com tampão citrato (1,83 mM de ácido cítrico monoidratado e 8,9 mM de citrato de sódio tribásico anidro, pH 6,0) em forno microondas por 4 vezes de cinco minutos. O bloqueio da peroxidade endógena foi com 3% de peróxido de hidrogênio em água, por meia hora no escuro. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com 10% de soro de cavalo em solução tampão de tris (TBS – 2,0 mM de Trizma base e 1,36 mM de cloreto de sódio, pH 7,5) por uma hora seguido de incubação com os anticorpos primários na diluição de 1:200, em câmara úmida, por 16 horas, a 4° C. Os anticorpos primários foram detectados com kit Dako Advance^{tm} HRP, as reações reveladas com DAB e contra-coradas com hematoxilina. Os cortes controle foram incubados com anticorpo anti-IgG de coelho irrelevantes ao invés dos anticorpos primários. Entre cada passo, as lâminas foram lavadas, três vezes de cinco minutos, com TBS adicionado de 1% e soro de cavalo. Para as reações com o anticorpo anti-H3K9ac, foi o DNA foi desnaturado com 3,5 N de HCl (v/v; 292,26 mL de HCL em 1 L de água destilada) por 20 minutos a 37° C. As reações foram visualizadas em microscópio Zeiss Axioplan 2 microscope e fotodocumentads com a câmera Axiocan HRc.

3.2.3.1 Análise das imagens

Cinco campos aleatórios (de cada amostra) foram fotografados com magnificação de 40 vezes, usando o microscópio Zeiss Axioplan 2 e câmera Axiocan HRc e analisados com ImageJ software (v. 1.44p). Para comparação entre os resultados de 5-mC e 5-hmC, o método de Remele and Stegnerl (REMMELE; STEGNER, 1987) foi utilizado. Resumidamente, o campo de células foram ranqueadas por porcentagem de células positivas (negativo = 0; 1–25% = 1; 26–50%

= 3; 51–75% = 3; e 76–100% = 4) e pela intensidade de marcação (negativa = 0, baixa = 1, moderada = 2 e intensa = 3). Por fim os dois ranques (porcentagem e intensidade de marcação) foram multiplicados.

Os dados foram analisados pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo e idade gestacional) e erro padrão.

3.2.4 Detecção global por western blotting

As proteínas foram extraídas com o TRIzol Reagent de acordo com recomendações do fabricante, e eluidos em uréia a 6%. Os homogenatos de proteínas foram quantificados pelo método de Bradford com o reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. As amostras foram agrupadas, em quantidade iguais, em grupos de acordo com idade (60 ou 90 dias de prenhez e termo) e origem da prenhez (controle ou clone), formando 6 amostras representativas de cada um grupos analisados. Em seguida, 20 ng de proteína total foram denaturadas a 100°C por 5 minutos e separadas em gel de poliacrilamida de 12% por eletroforese (100V, 120 min). As proteínas foram transferidas para membranas de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) utilizando o TransBlot System Turbo de acordo com recomendações do fabricante. As membranas foram bloqueadas com solução tampão Tris (TBS-T; 10 mM Tris pH 7,6; 0,9% de cloreto de sódio; 0,3% de Tween -20) adicionada de 5% de albumina sérica bovina por 1 hora. Após isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário na diluição 1:5000 em TBS-T adicionado de 1% de BSA, overnight a 4º C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas, por 1 hora, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP, na diluição de 1:3000 em TBS-T com 1% de BSA. A reação foi revelada com Clarity™ Western ECL Substrate e visualizada no ChemiDoc System de acordo com recomendações do fabricante. As análises de intensidade de sinal e peso molecular das bandas, foram realizadas no programa Image Lab (versão 5.1) da Bio-Rad.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 H3K4me3

O trofoblasto apresentou a marcação para H3K4me3 mais heterogênea, alguma células apresentaram núcleos fortemente marcados enquanto outras com marcação tênue para H3K4me3. O mesmo padrão de marcação foi observado nas células trofoblásticas gigantes (TGCs), onde os núcleos de uma mesma célula apresentavam padrões distintos de marcação para H3K4me3 (Figura 10). O estroma endometrial, aparentemente, possui duas populações celulares distintas, sendo uma com maior abundância de H3K4me3 e outra com pouca abundância dessa modificação de histona (Figura 10).

Aos 60 dias de gestação, na placenta controle as células trofoblásticas e o epitélio materno apresentaram, na sua maioria, fortemente marcadas para H3K4me3, enquanto que as células do estroma endometrial apresentaram-se alta variabilidade na marcação para H3K4me3 (Figura 10 A). No mesmo período na placenta de animais produzidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS), o epitélio materno apresentou maiores níveis globais de H3K4me3 do que o trofoblasto, mesênquima e estroma endometrial (Figura 10 B).

Na placenta controle aos 90 dias de gestação, houve menor variedade na abundância de H3K4me3 entre os tecidos maternos e fetais (Figura 10 C). Na placenta TNCS o epitélio materno apresentou maiores níveis globais de H3K4me3, quanto comparado com o trofoblasto. Entretanto o trofoblasto apresentou alta variabilidade nos níveis de H3K4me3, variando desde células negativas a células fortemente positivas. Assim como o trofoblasto, as células do estroma endometrial apresentaram níveis globais de H3K4me3 variáveis, porem com menor intensidade (Figura 10 D).

A termo, o trofoblasto da placenta controle mostrou uma alta variação na intensidade da marcação para H3K4me3, entretanto no epitélio materno os níveis globais de H3K4me3 foram altos e constante. No estroma endometrial, foram observadas algumas células com maior abundância de H3K4me3 (Figura 10 E). Na placenta TNCS, o trofoblasto apresentou níveis globais de H3K4me3 levemente

maiores que o epitélio materno. O estroma endometrial, na sua maioria, apresentou altos níveis globais de H3K4me3, porém algumas células mostraram ausência H3K4me3 (Figura 10 F).

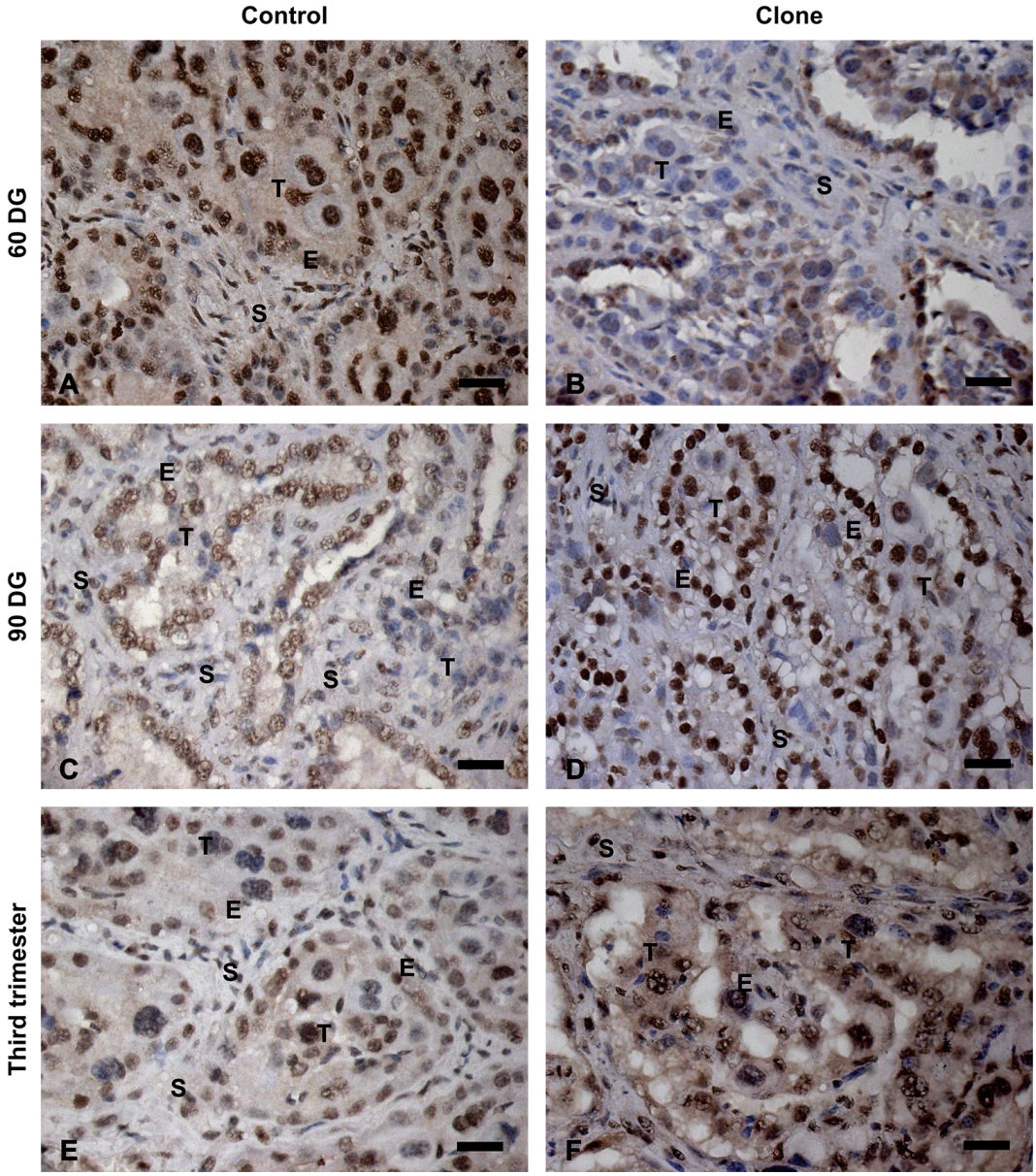
A análise do escore de porcentagem de células positivas mostrou menores níveis de H3K4me3 na placenta TNCS aos 60 dias de gestação em relação à placenta controle com mesma idade (P = 0,03), à placenta TNCS aos 90 dias (P = 0,02) e à termo (P < 0,01) (Figura 11 A).

Além disso, na placenta controle a intensidade de marcação manteve-se constante nas idades analisadas, enquanto que na placenta TNCS houve uma maior intensidade de marcação aos 90 dias de gestação (P = 0,02) quanto comparada à outras idades gestacionais. A placenta controle diferiu da placenta TNCS apenas a termo, onde apresentou níveis maiores (P = 0,0561).

No escore total dos níveis de H3K4me3 a placenta TNCS foram maiores aos 90 dias de gestação (P < 0,01). Além disso, os níveis globais de H3K4me3 diferiram entre a placenta controle e a placenta TNCS aos 60 dias de gestação (P = 0,03) enquanto que nas outras idades analisadas não houveram diferenças (Figura 11 C).

A análise de western blotting revelou a presença de duas bandas para H3K4me3, sendo uma mais intensa de 13,64 kDa (± 0,55) e outra mais tênue de 9,84 kDa (± 0,92). Na placenta controle, a isoforma de 13,64 kDa mostrou intensidade constante entre as idades estudadas, enquanto que na placenta TNCS as intensidades aumentaram, oscilando de 0,73 a 1,3 vezes a intensidade dos controles. A isoforma 9,84 kDa apresentou intensidade mais tênue na placenta controle (Figura 12).

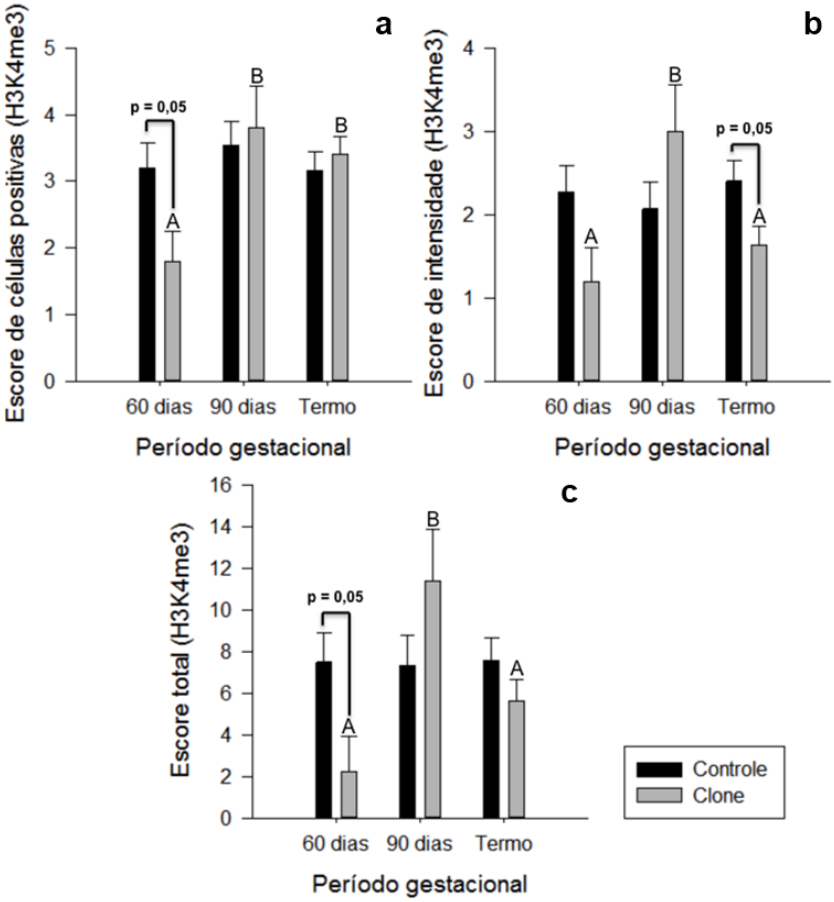
Figura 10 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K4me3 global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Observar intensa presença de H3K4me3 trofoblasto, assim como no epitélio materno; as células do estroma endometrial apresentam heterogeneidade na presença de H3K4me3, visto a diferença de intensidade de marcação. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Observar diferença de intensidade de marcação entre os núcleos das células trofoblásticas, inclusive entre os núcleos de uma mesma TGC; menor presença de H3K4me3 no epitélio endometrial, quando comparado com o controle; estroma endometrial com marcação heterogênea. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Em todos os tecidos há heterogeneidade na presença de H3K4me3. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. O epitélio materno apresenta grande quantidade de H3K4me3, enquanto que os outros tecidos a intensidade é heterogênea entre as células. Em **E**, placentônio controle a termo. Trofoblasto e epitélio materno com alta presença de H3K4me3, porém as TGCs apresenta grande heterogeneidade de marcação, mesmo entre os núcleos de uma mesma célula. Em **F**, placentônio clone a termo. Semelhante ao padrão encontrado para o controle com mesma idade gestacional, porém levemente mais tênue. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

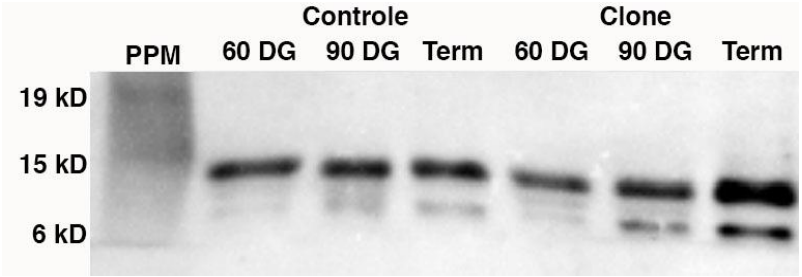
Figura 11 - Gráficos representando a quantificação global da H3K4me3 em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Presença global de H3K4me3, apresentadas pelos Escore de células positivas (A), Escore de intensidade (B) e Escore total (C, multiplicação dos dois primeiros escores) pelo período gestacional (60 e 90 dias de gestação e termo). Letras maiúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios clone. Barras contínuas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os grupos dentro de um mesmo período gestacional.

Figura 12 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K4me3



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Observar que nos placentônios controle, o peptídeo de 14 kDa é constante, enquanto que o peptídeo de 10 kDa apresenta uma intensidade de sinal mais tênue aos 60 dias de gestação.

3.3.2 H3K27me3

Os níveis globais de H3K27me3 mostraram-se abundantes no epitélio materno e no trofoblasto. No estroma endometrial foi obeservado uma população de células fracamente marcadas para H3K27me3 e outra população com maior intensidade. De modo geral, dentro de um mesmo tecido, as células apresentaram diferentes níveis de intensidade de marcação, principalmente nas formações sinciciais (Figura 13).

A reação positiva para o anticorpo anti-H3K27me3 mostrou ser predominantemente nuclear com áreas de marcação mais densa (Figura 13). Também foi visualizada uma marcação no citoplasma das células epiteliais, sendo esta característica para H3K27me3 (LIU et al., 2013) (no prelo[1])

Aos 60 dias de gestação, na placenta controle as células trofoblásticas se mostraram mais fortemente marcadas que os outros tipos celulares. No epitélio materno os níveis globais de H3K27me3 foram menores que o trofoblasto e maiores que o estroma endometrial (Figura 13 A). Na placenta TNCS, durante o mesmo período, os níveis globais de H3K27me3 foram baixos em todos tipos celulares (Figura 13 B).

Na placenta controle, aos 90 dias de gestação, os níveis globais de H3K27me3 estavam mais baixos que aos 60 dias, com intensidades similares entre o trofoblasto e epitélio materno, e mais baixas no estroma endometrial. Ainda no trofoblasto, foi possível observar células trofoblásticas gigantes com ausência de H3K27me3 (Figura 13 C). Ademais, na placenta TNCS, o trofoblasto apresentou baixou ou ausente níveis de H3K27me3. No epitélio materno os níveis de H3K27me3 foram variáveis, assim como no trofoblasto, entretanto com intensidades de marcação mais intensas. As células do estroma endometrial apresentaram baixos níveis globais de H3K27me3 (Figura 13 D). Nas gestações a termo, tanto na placenta controle como na placenta TNCS, houve uma grande diminuição nos níveis globais de H3K27me3. Em ambos o trofoblasto apresenta níveis baixos de

---

[1] FOGARTY, N. M. E.; BURTON, G. J.; FERGUSON-SMITH, A. C. Different Epigenetic States Define Syncytiotrophoblast and Cytotrophoblast Nuclei in the Trophoblast of the Human Placenta. **Placenta** (no prelo).

H3K27me3, principalmente nas células trofoblásticas gigantes (Figura 13 E-F).

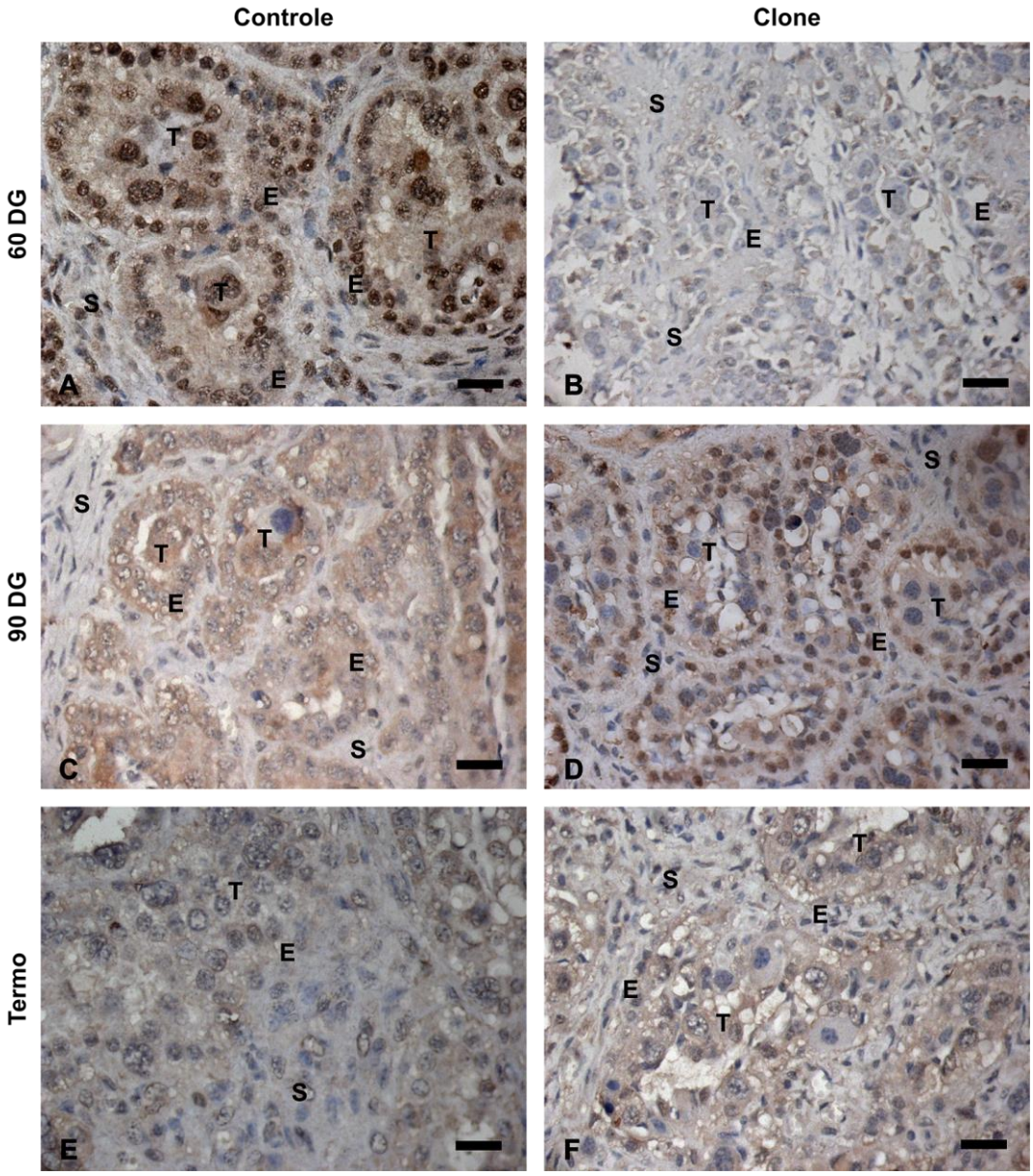
Não houve diferença no escore de porcentagem de células positivas para H3K27me3 tanto para a placenta controle como para placenta TNCS. Mas aos 60 dias de gestação na placenta controle houve uma tendência a aumentar os níveis de H3K27me3 em relação a placenta TNCS com mesma idade gestacional (P = 0,09). Os níveis globais de H3K27me3 na placenta controle aos 90 dias, tendeu a ser menor que na placenta TNCS com mesma idade (P = 0,09) e que a placenta controle aos 60 dias (P = 0,07) (Figura 14 A).

Em relação à intensidade de marcação para H3K27me3, a placenta controle aos 60 dias de gestação foi duas vezes maior do que aos 90 dias (P < 0,01) e que o termo (P < 0,01), além disso apresentou uma tendência de ser mais intenso que a placenta TNCS (P = 0,08) (Figura 14 B).

Assim como a intensidade, o escore total foi maior na placenta controle aos 60 dias de gestação, tanto em relação à placenta controle aos 90 dias (P = 0,01) e a termo (P < 0,01), como em relação às placenta TNCS aos 60 dias (P = 0,02) (Figura 14 C).

Foi detectada, por western blotting, com o anticorpo anti-H3K27me3, uma banda com 16,38 kDa (± 0,37). Na placenta controle essa banda diminuiu de intensidade conforme o avanço da idade gestacional, enquanto que na placenta TNCS aumentou a intensidade (Figura 15).

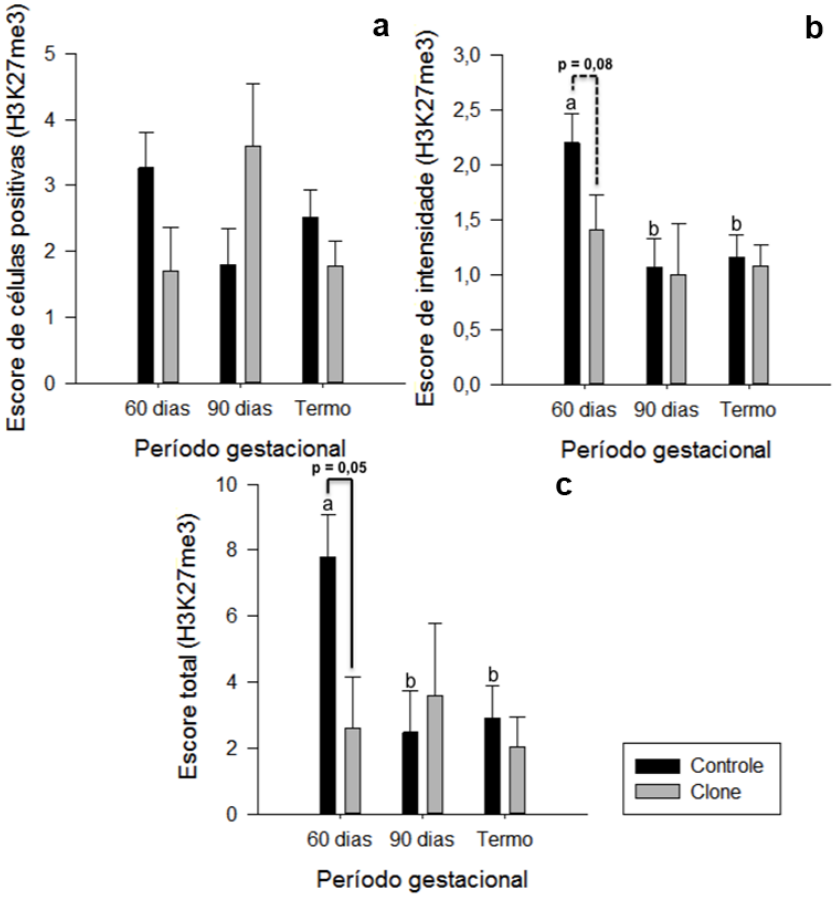
Figura 13 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K27me3 global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Observar marcação mais intensa para H3K27me3 no trofoblasto e no epitélio materno; estroma endometrial com marcação heterogênea. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Marcação muito tênue em todos os tecidos. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Marcação tênue em todos os tecidos, exceto pela marcação inespecífica de fundo nos epitélios. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Trofoblasto e epitélio materno com marcação mais intensa do que os outros tecidos, porém é possível observar diferentes níveis de marcação para H3K27me3 nesses tecidos. Em **E**, placentônio controle a termo. Marcação para H3K27me3 bastante tênue. Em **F**, placentônio clone a termo. Marcação tênue para H3K27me3, observar marcação inespecífica de fundo nos epitélios. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

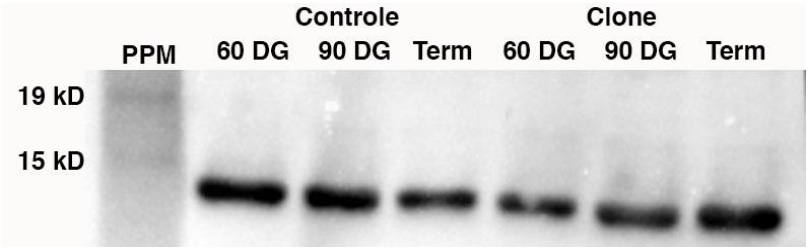
Figura 14 - Gráficos representando a quantificação global da H3K27me3 em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Presença global de H3K27me3, apresentadas pelos Escore de células positivas (A), Escore de intensidade (B) e Escore total (C, multiplicação dos dois primeiros escores) pelo período gestacional (60 e 90 dias de gestação e termo). Letras minúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios controle. Barras contínuas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os grupos dentro de um mesmo período gestacional. Barras pontilhadas representam tendência ($p \leq 0,10$).

Figura 15 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K27me3



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Observar banda de 16,38 kDa, apresentando uma diminuição na placenta controle e aumento na placenta TNCS.

3.3.3 H3K9me2/3

O epitélio materno e o trofoblasto foram os tecidos que apresentaram maiores níveis globais de H3K9me2 e H3K9me3. Entretanto o estroma endometrial, na sua maioria, apresentou células com baixa presença de ambas marcações. No trofoblasto, as células trofoblásticas gigantes (TGCs, do inglês "Trophoblastic Giant Cells") apresentaram níveis mais baixos de H3K9me2 e H3K9me3 que as outras células do trofoblasto, exceto na placenta TNCS a termo (Figura 16 E e Figura 17 E).

A reação positiva tanto para o anticorpo anti-H3K9me2 e como para o anti-H3K9me3 puderam ser visualizadas nos núcleos de coloração amarronzada, sendo mais evidente em algumas regiões mais densas do núcleo. Entretanto, apresentaram uma tênue marcação inespecífica de fundo, principalmente, no epitélio materno e no trofoblasto, com exceção das (TGCs) (Figura 16 e Figura 17).

Aos 60 dias de gestação, na placenta controle o epitélio materno apresentou maiores níveis de H3K9me2 que o trofoblasto e o estroma endometrial (Figura 16 A). Na placenta TNCS, os níveis de H3K9me2 foram baixos em todos os tipos celulares, entretanto, o epitélio materno apresentou níveis levemente maiores (Figura 16 B). Aos 90 dias de gestação, a placenta controle apresentou uma tênue marcação para H3K9me2, sendo esta constante para todos os tipos celulares, exceto para as TGCs que apresentaram níveis ainda mais baixos de H3K9me2 (Figura 16 C). Entretanto, na placenta TNCS, o epitélio materno estava fortemente marcado para H3K9me2 enquanto que o trofoblasto e o estroma endometrial apresentavam níveis inferiores (Figura 16 D). Na placenta controle a termo, a marcação para H3K9me2 manteve-se similar aos 90 dias (Figura 16 E), entretanto na placenta TNCS, houve um aumento na abundância de H3K9me2 no trofoblasto (inclusive nas TGCs) e no mesênquima (Figura 16 F).

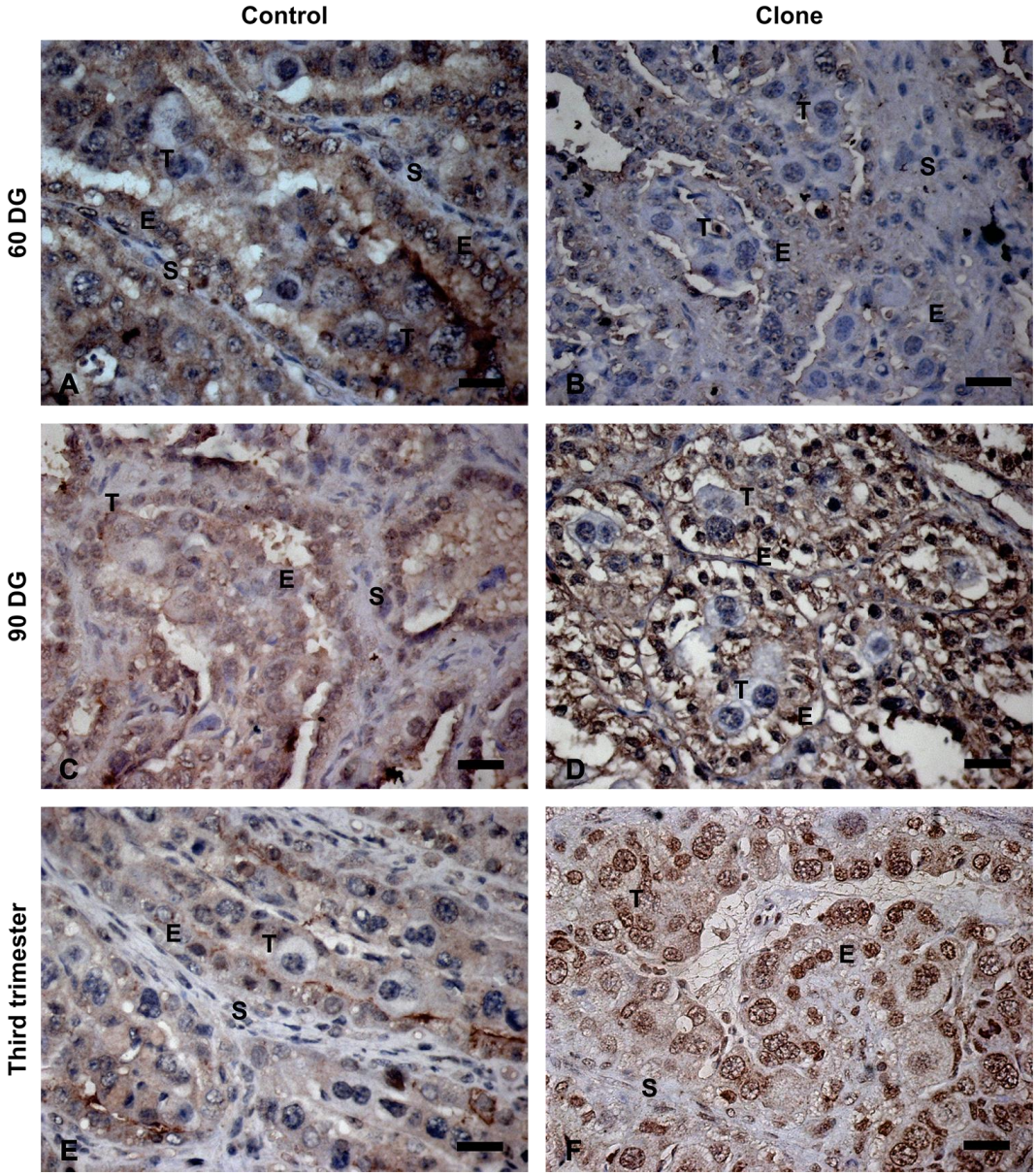
A marcação para H3K9me3 aos 60 dias de gestação na placenta controle foi tanto o epitélio materno como o trofoblasto foram semelhantes, porém as TGCs (principalmente aquelas em possível processo de fusão com o epitélio materno) apresentaram maiores níveis globais de H3K9me3 (Figura 17 A). Na placenta TNCS o epitélio materno apresentou maior abundância de H3K9me3, entretanto foi visível

algumas células com baixos níveis da modificação de histona (Figura 17 B). Aos 90 dias de gestação e a termo, tanto na placenta controle como na placenta TNCS, houve uma variabilidade da intensidade de marcação para H3K9me3 entre as células de um mesmo tecido, contudo, esse padrão foi comparável em todos os tipos celulares (Figura 17 C-F).

A H3K9me2 não diferiu no escore de porcentagem de células positivas entre os grupos estudados. Além disso, houve uma tendência de aumento de H3K9me2 na placenta TNCS em relação à placenta controle aos 90 dias de gestação, tanto para intensidade de marcação (P = 0,09) como para o escore total (P = 0,09). Para H3K9me3 não foram observadas diferenças para nenhum dos escores, independente da idade e tipo gestacional (Figura 18).

A intensidade de sinal para H3K9me2 foi captada, por western blotting, em banda única de 9,92 (± 0,44) kDa, assim como na imunohistoquímica, apresentou um leve aumento na presença de H3K9me2 placenta TNCS (Figura 19). Para H3K9me3 também foi observada uma banda com 14,55 (± 0,42) kDa, com intensidade de marcação constante entre os grupos, apenas uma leve diminuição na placenta controle a termo (Figura 20).

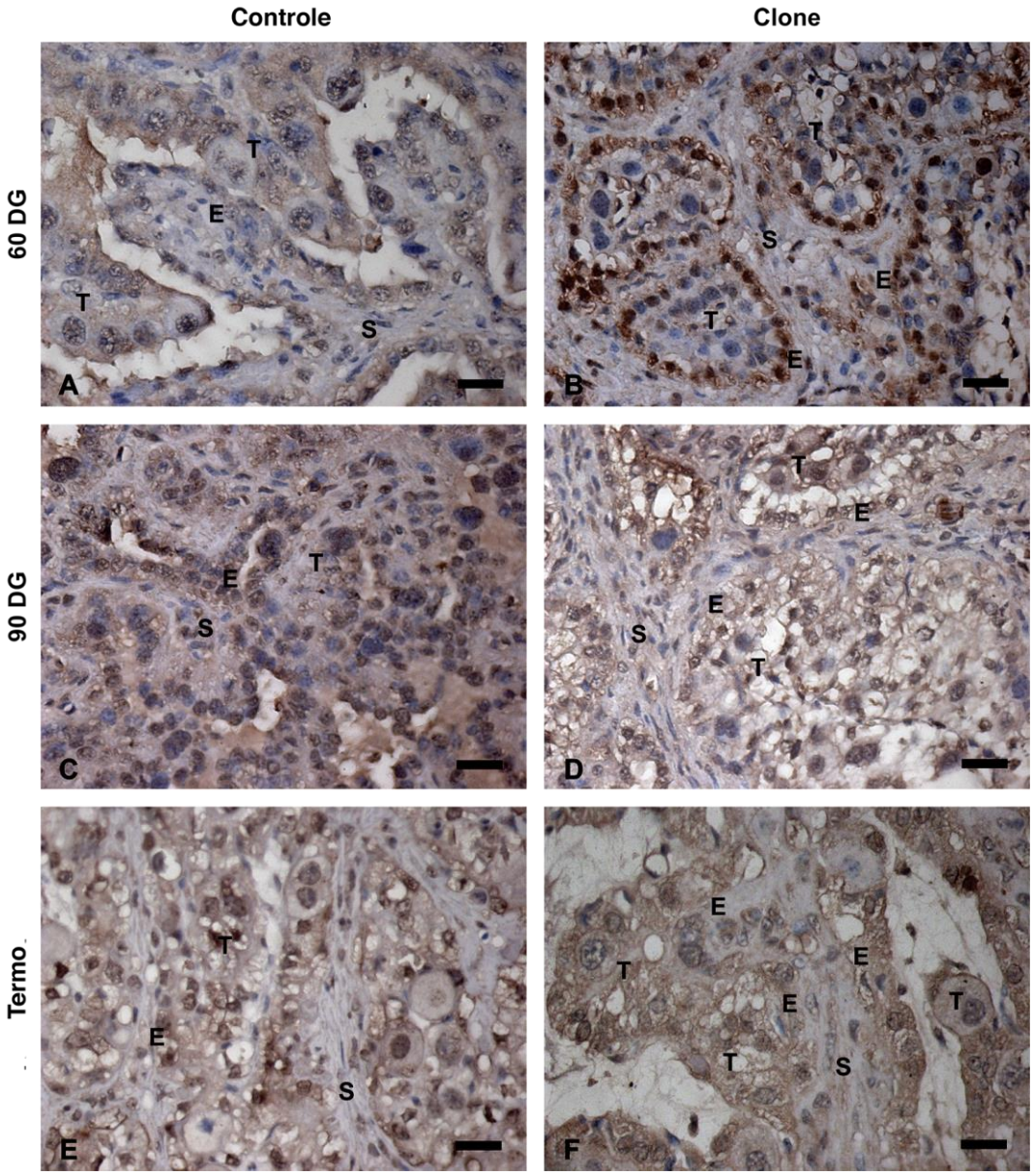
Figura 16 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9me2 global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Observar a intensa presença de H3K9me2 no epitélio materno, enquanto que nos outros tecidos a H3K9me2 está presente em diferentes níveis. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Presença tênue de H3K9me2 em todos os tecidos. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Epitélio materno mais fortemente marcado pela H3K9me2 em relação aos outros tecidos; o estroma endometrial praticamente negativo para H3K9me2. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Epitélio materno e trofoblasto fortemente marcado para H3K9me2, enquanto que as TGCs apresentam-se fracamente marcadas. Em **E**, placentônio controle a termo. Tênue presença de H3K9me2 em todos tecidos, epitélios com marcação inespecífica de fundo. Em **F**, placentônio clone a termo. Todos tecidos com marcação intensa para H3K9me2. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

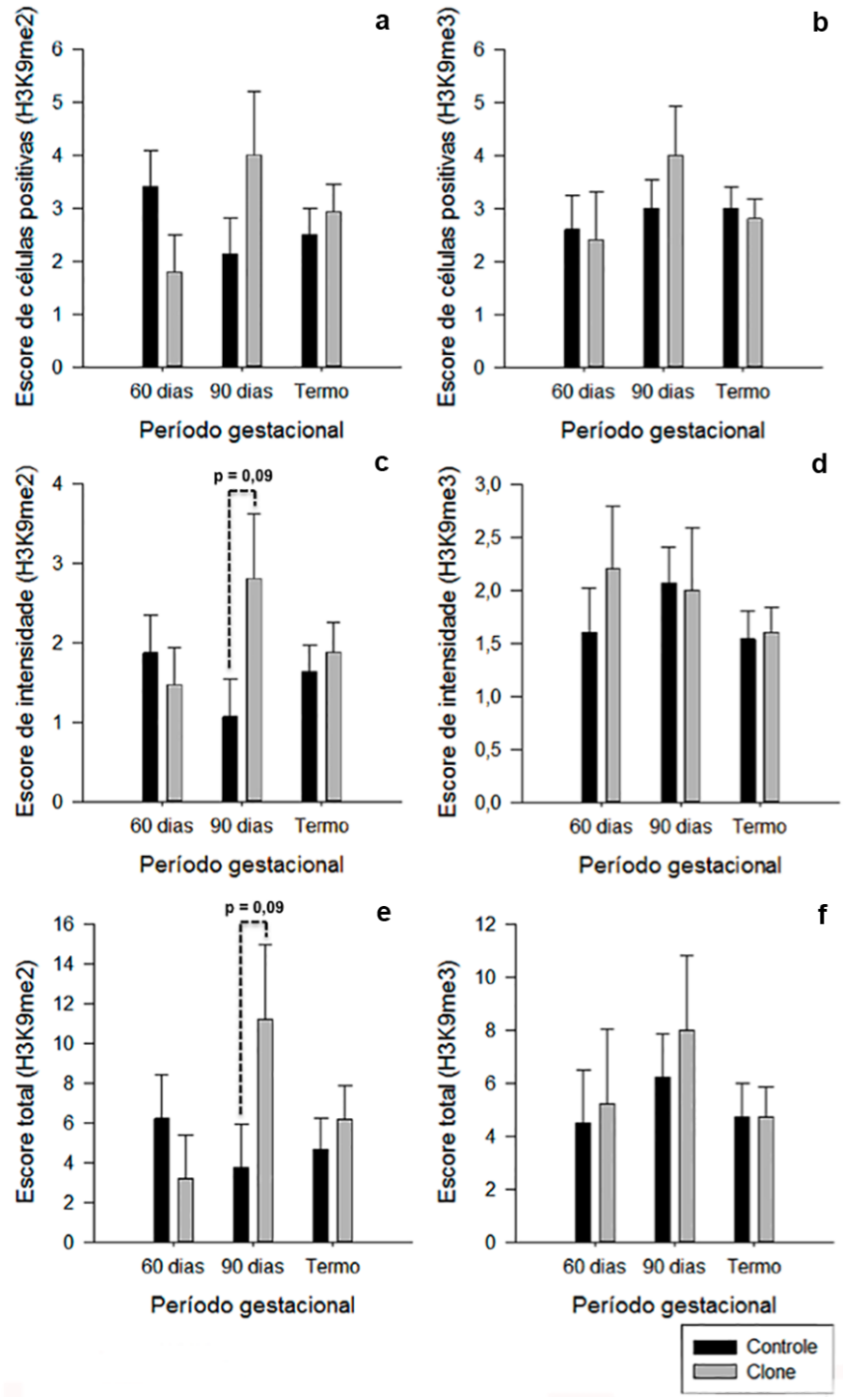
Figura 17 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9me3 global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Marcação para H3K9me3 levemente mais intensa no epitélio materno do que nos outros tecidos. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Epitélio materno fortemente marcados, porém com algumas células com presença de H3K9me3; as TGCs apresentam marcação mais branda do que o trofoblasto. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Marcação para H3K9me3 com diferentes níveis em todos os tecidos observados. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Marcação para H3K9me3 de fraca a ausente entre todos os tecidos. Em **E**, placentônio controle a termo. Marcação para H3K9me3 de fraca a ausente entre todos os tecidos. Em **F**, placentônio clone a termo. Marcação para H3K9me3 de fraca a ausente entre todos os tecidos. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

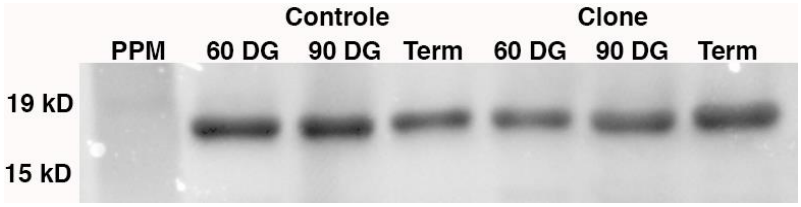
Figura 18 - Gráficos representando a quantificação global das H3K9me2 e H3K9me3 em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

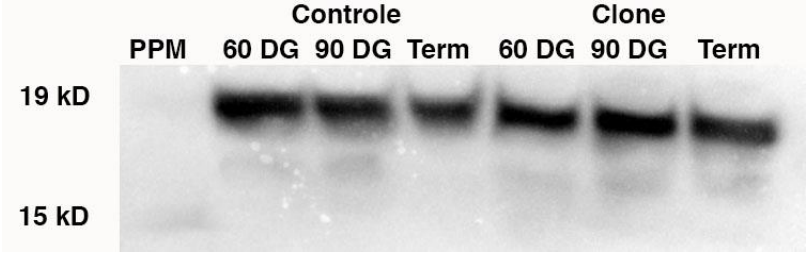
Legenda: Presença global de H3K9me2 (A, C e E) e H3K9me3 (B, D e F), apresentadas pelos Escore de células positivas (A e B), Escore de intensidade (C e D) e Escore total (E e F, multiplicação dos dois primeiros escores) pelo período gestacional (60 e 90 dias de gestação e termo). Barras pontilhadas representam tendência ($p \leq 0,10$).

Figura 19 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9me2



Fonte: Barreto (2015)
Legenda: Observar banda de 9,92 kDa, mostrando um leve aumento na presença de H3K9me2 na placenta controle aos 60 e 90 dias de gestação.

Figura 20 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9me2



Fonte: Barreto (2015)
Legenda: Observar banda de 14,55 kDa, mostrando intensidade de sinal constante entre os grupos, apenas uma leve diminuição para o controle a termo.

3.3.4 H3K9ac

De modo geral pode-se observar marcação heterogênea para H3K9ac no epitélio materno e no trofoblasto, onde são encontradas células com diferentes níveis de H3K9ac global. Nas formações sinciciais observou-se núcleos com intensidades de marcação bastante distintas. Na sua grande maioria, o estroma endometrial e o mesênquima possuem uma reação positiva muito tênue. A marcação específica para H3K9ac pode ser visualizada pelos núcleos de coloração amarronzada, porém são menos evidenciadas as regiões mais densas e fortemente coradas, diferentemente das histonas metiladas (Figura 21).

Aos 60 dias de gestação, na placenta controle o trofoblasto apresentou maiores níveis de H3K9ac que o epitélio materno, porém em ambos a intensidade de marcação variou de negativa a forte. No mesênquima foi possível observar algumas células com intenso nível global de H3K9ac, enquanto que no estroma endometrial a maioria das células eram negativas (Figura 21 A). Na placenta TNCS, foi possível observar marcações um pouco mais intensas somente no epitélio materno, enquanto que os outros tecidos apresentam fraca ou nenhuma marcação para H3K9ac (Figura 21 B).

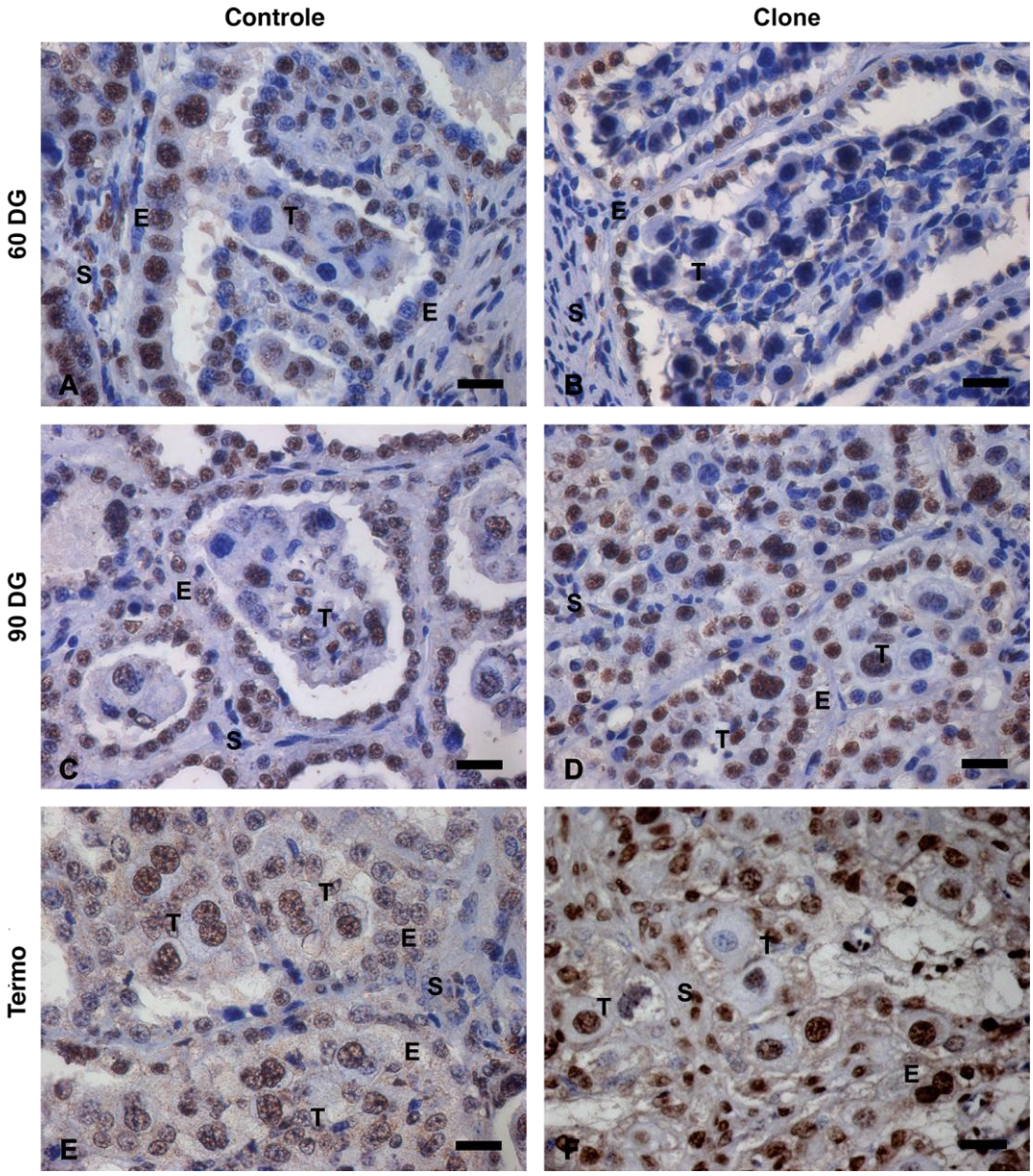
Além disso, aos 90 dias de gestação tanto na placenta controle como na placenta TNCS, houve alta variabilidade nos níveis de H3K9ac em todos os tecidos, porém o estroma endometrial manteve-se, na sua maioria, negativo (Figura 21 C-D). A termo, tanto na placenta controle e como na placenta TNCS, houve um aumento nos níveis globais de H3K9ac, entretanto a placenta controle apresentou menor intensidade do que a placenta TNCS. A variabilidade de intensidade de marcação de H3K9ac diminuiu tanto no trofoblasto como no epitélio materno. Entretanto na placenta controle o estroma endometrial ainda manteve-se, na sua maioria, negativo para H3K9ac, enquanto que na placenta TNCS os níveis dessa modificação de histona foram semelhantes ao dos epitélios. De modo geral, a termo, a placenta controle apresentou menores níveis globais de H3K9ac (Figura 21 E-F).

Para todos os escores (positividade, intensidade e total) a placenta controle manteve os níveis constantes de H3K9ac nas idades estudadas. Ademais na

placenta controle, os níveis globais de H3K9ac aumentaram a termo em relação aos 60 dias de gestação para o escore de porcentagem de células positivas (P = 0,04), de intensidade de marcação (P = 0,03) e escore total (P = 0,02) (Figura 22).

Nas análises de western blotting, foram detectadas duas bandas específicas para o anticorpo anti-H3K9ac, sendo uma tênue com 12,09 kDa (± 1,86) e outra levemente mais intensa com 6,35 kDa (± 0,44). A isoforma de 12,09 kDa apresentou ser menos intensa na placenta controle a termo e na placenta TNCS aos 60 dias de gestação. Enquanto que a intensidade de banda da isoforma de 6,35 kDa, demonstrou ser discretamente menor na placenta controle a termo (Figura 23).

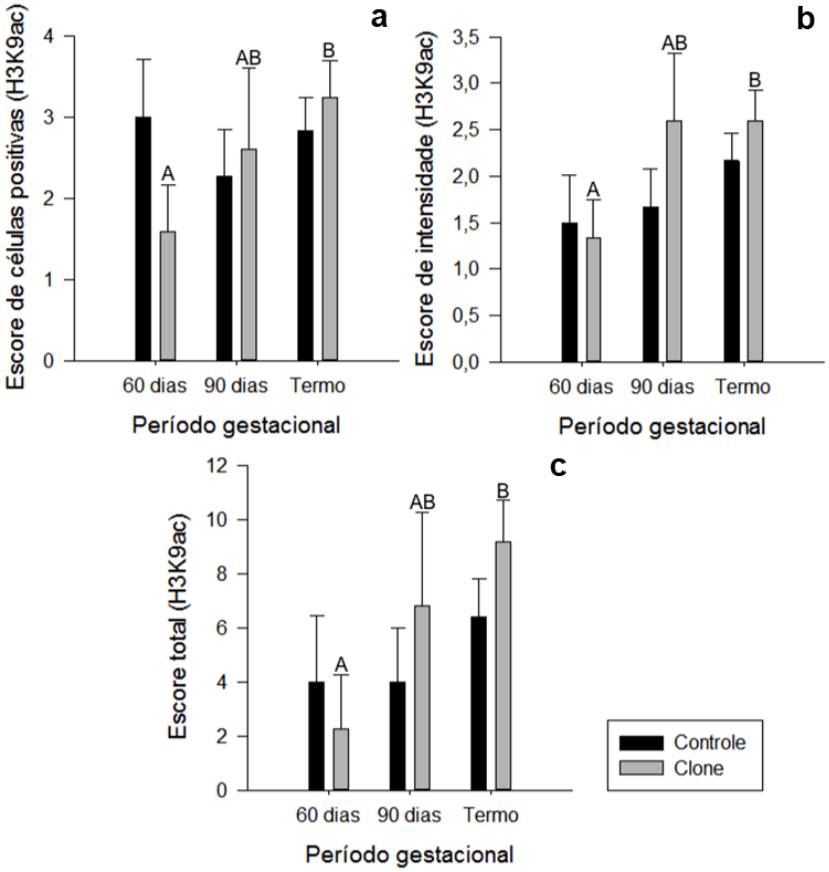
Figura 21 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção de H3K9ac global



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Epitélio materno e trofoblasto com células apresentando diversos níveis globais de H3K9ac. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Epitélio materno com marcação heterogênea, e trofoblasto levemente marcado. Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Epitélio materno e trofoblasto apresentando diversos níveis globais de H3K9ac. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação, marcação para H3K9ac levemente mais intensa no epitélio materno e nas TGCs. Em **E**, placentônio controle a termo. Marcação para H3K9ac tênue e mais homogênea entre os tecidos, exceto por alguma células negativas no estroma endometrial Em **F**, placentônio clone a termo. Padrão de marcação mais intenso para H3K9ac, principalemten nas TGCs. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

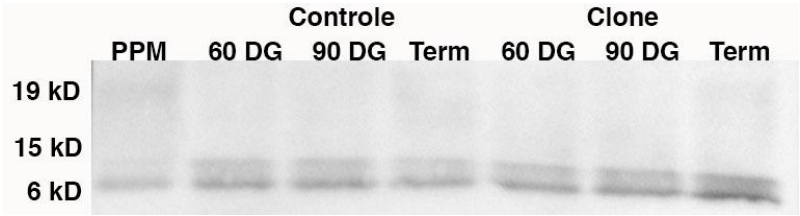
Figura 22 - Gráficos representando a quantificação global da H3K9ac em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Presença global de H3K9ac, apresentadas pelos Escore de células positivas (A), Escore de intensidade (B) e Escore total (C, multiplicação dos dois primeiros escores) pelo período gestacional (60 e 90 dias de gestação e termo). Letras minúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios controle. Letras maiúsculas representam significância ($p \leq 0,05$) entre os placentônios clone.

Figura 23 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção das modificações de histona H3K9ac



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Observar a banda de 6,35 kDa que foi constante entre as amostras analisadas, exceto para a placenta controle a termo, onde houve uma tênue diminuição na intensidade. A banda de 12,09 kDa, mostrou levemente mais intensa na placenta TNCS do que na placenta controle.

3.4 DISCUSSÃO

A placenta bovina é um órgão formado por células maternas e fetais. Cada uma dessas populações possuem diferentes funções e necessidades metabólicas, que são reguladas por diferentes mecanismos epigenéticos, como as modificações pós-traducionais das proteínas histonas. Visto que, durante a reprogramação nuclear incompleta no zigoto produzido por transferência nuclear de célula somática (TNCS) essas marcas epigenéticas são mantidas nas linhagens de células embrionárias e extraembrionárias (MONTEIRO et al., 2010). Neste trabalho avaliou-se os níveis globais de modificações pós-traducionais de histona que permitem (H3K4me3 e H3K9ac) ou reprimem (H3K9me2, H3K9me3 e H3K27me3) a transcrição gênica foram avaliadas em placentônios bovinos durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação de clones e controles.

A H3K4me3 além de estar altamente relacionada com a ativação da transcrição gênica, também é associada com a transcrição recente (ZHOU; ZHOU, 2011). Na placenta controle os níveis de H3K4me3 foram constantes, enquanto que na placenta TNCS houve um aumento dos níveis de H3K4me3 aos 90 dias de gestação. Esse aumento dos níveis de H3K4me3 apenas ao final do primeiro trimestre na placenta TNCS sugere uma menor atividade transcricional que pode ser associada ao retardo do desenvolvimento dos placentônios e da conexão materno-fetal (HILL et al., 2000). Além disso os níveis globais de H3K4me3, foram heterogêneos, apresentando grandes variações mesmo dentro de uma mesma população celular, assim como encontrado na placenta humana (no prelo[2]). No trofoblasto, essas células com menores níveis de H3K4me3 podem estar em processo de diferenciação, visto que células tronco embrionárias diminuem seus de níveis de H3K4me3 durante a diferenciação, retornando a níveis altos após esse processo (QIAO et al., 2015). Portanto as células trofoblásticas com maiores níveis de H3K4me3 indicam ser o trofoblasto indiferenciado (trofoblasto mononuclear) e o

[2] FOGARTY, N. M. E.; BURTON, G. J.; FERGUSON-SMITH, A. C. Different Epigenetic States Define Syncytiotrophoblast and Cytotrophoblast Nuclei in the Trophoblast of the Human Placenta. **Placenta** (no prelo).

diferenciado (célula trofoblástica gigante binucleada). Além disso, níveis menores de H3K4me3 na placenta TNCS pode explicar o maior número de células binucleadas (RICI et al., 2009).

Em relação a H3K27me3, na placenta controle, os níveis globais diminuíram com o avanço da gestação, enquanto que permaneceu constante na placenta TNCS nos períodos gestacionais analisados. A H3K27me3 junto com a H3K4me3 formam um domínio bivalente nas células tronco embrionárias, porém com o comprometimento das linhagens celulares, há a diminuição da presença de H3K27me3 e perda da bivalência (DAHL et al., 2010). Além disso, maiores quantidades de regiões ricas em H3K27me3 são encontradas nas células precursoras de trofoblasto (TEKLENBURG et al., 2012). Portanto a maior especialização da placenta após aos 60 dias na gestação controle pode explicar a diminuição dos níveis globais de H3K27me3.

A deleção de enzimas metiltransferases (G9a, Suv39h1/2, ESET) específicas para H3K9me2 e H3K9me3, e consequentemente diminuição dos níveis dessas modificações de histona, diminuem “in vivo” o desenvolvimento fetal (TACHIBANA et al., 2002). No entanto, nos nossos resultados os níveis globais de H3K9me2 e H3K9me3 não alteraram durante o desenvolvimento da gestação, como também entre controles e clones. Nossos resultados sugerem que na placenta bovina os níveis globais de di ou trimetilação da H3K9 estejam mais relacionados à formação das linhagens trofoblásticas no blastocisto.

Além disso, em nossos resultados, algumas células trofoblásticas gigantes (TGCs, do inglês “Trophoblastic Giant Cells”) apresentaram níveis mais baixos de H3K9me2 e H3K9me3 que as outras células do trofoblasto, exceto na placenta TNCS a termo. Essa diminuição da H3K9me2 e H3K9me3, pode ter sido responsável pela endoreduplicação para formação (PETERS et al., 2001; LOHMANN et al., 2010) e o início da expressão de genes relacionados à função destas células (YUAN et al., 2009). Assim como a H3K4me3, a H3K9me3 também é bivalente a H3K27me3, porém em células diferenciadas (LOHMANN et al., 2010).

Enquanto que na placenta controle os níveis de H3K9ac manteve-se constante, na placenta TNCS os níveis globais dessa modificação aos 60 dias de gestação foram cerca de 4 vezes menor que na placenta TNCS a termo, provavelmente em resposta ao estado de hipóxia, característico da fase inicial da gestação TNCS (MEIRELLES et al., 2010). A hipóxia placentária induz a atividade

das enzimas deacetilases (KIM et al., 2001) e leva a diminuição dos níveis de acetilação das histonas. Ainda, a inibição das enzimas deacetilases leva a diferenciação das células tronco trofoblásticas e formação exagerada de sincíciotrofoblasto (MALTEPE et al., 2005) o que também explicaria o aumento do número TGCs na placenta TNCS no final da gestação (RICI et al., 2009), também visualizado nos nossos resultados, se dá após diminuição do estado de hipóxia. Além disso a o aumento de H3K9ac está associado a atividade do fator 1 seletivo de promotor (SP1, do inglês "Selective Promoter factor 1") (LI et al., 2013), e este com parada do ciclo celular e a morte celular (WABY et al., 2010), características das TGCs (BURTON; JONES, 2009).

3.5 CONCLUSÕES

A bivalência da H3K4me3 e H3K27me3 parece ser perder na placenta bovina controle, devido a diminuição dos níveis globais da H3K27me3, provavelmente porque essa bivalência está relacionada com expressão de genes relacionados com a estruturação inicial da placenta. Na placenta TNCS, essa bivalência parece ser baixa desde os 60 dias, reforçando a ideia de que há uma falha na estruturação da placenta nesse tipo gestacional. Ainda na placenta TNCS, aos 60 dias, há menores níveis de H3K9ac, provavelmente pela hipóxia, característica desse fase nesse tipo gestacional, salientando um estado de repressão gênica e menor desenvolvimento placentário nesse grupo. Apesar dos níveis globais de H3K9me2 e H3K9me3 não diferirem entre as idades e tipos gestacionais estudados, eles são baixos na células trofoblásticas gigantes, podem estar relacionados com alta atividade transcricional dessas células durante toda a gestação. De modo geral, na gestação a termo os níveis das modificações de histona estudadas não diferiam entre a placenta controle e a placenta TNCS, possivelmente pelo fato de que gestações TNCS quando chegam a termo possuem uma reprogramação genética mais próxima à gestação controle.

A EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE MHC-I SÃO DESREGULADAS NA GESTAÇÃO DE CLONES

4 A EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE MHC-I SÃO DESREGULADAS NA GESTAÇÃO DE CLONES

4.1 INTRODUÇÃO

Na placenta sineptéliocorial bovina, há a preservação de todas camadas teciduais entre a mãe e o feto. No entanto a ocorrência de células trofoblásticas gigantes (TGCs) quem migram em direção ao epitélio materno para formar um sincício híbrido (WOODING, 1992) sugere que a placenta bovina possui uma maior permissividade a produtos fetais mesmo com a preservação de todas as camadas teciduais. Essa íntima ligação entre mãe e feto leva à sensibilização do sistema imune materno a antígenos do feto semi-alogênico.

Moffet e Loke (2006) questionaram se a capacidade de formar sincício era controlada por expressão de genes específicos, tais como os genes do complexo de histocompatibilidade principal I (MHC-I). Pois em espécies de placentação hemocorial, as TGCs apresentam uma redução na expressão das moléculas MHC (O'CALLAGHAN; BELL, 1998).

O MHC é divido em duas classes, MHC-I e MHC-II. As proteínas de MHC-I estão envolvidas na discriminação entre o próprio e no não próprio pelo sistema imune, enquanto que as proteínas de MCH-II estão envolvidas no reconhecimento e comunicação entre as células do sistema imune, tais como a ativação e apresentação de antígenos (MURPHY, 2011).

As moléculas de MHC-I são divididas em MHC-Ia (ou MHC clássico) e MHC-Ib (ou MHC não clássico). Durante a gestação inicial, o feto semi-alogênico diminui a expressão de moléculas MHC-I para evitar o reconhecimento de antígenos fetais pelo sistema imune materno (MOFFETT-KING, 2002). Entretanto, essa falta de sinalização de MHC-I faz com que o trofoblasto seja reconhecido pelas células natural "killers" uterinas (NKu) (HEEMSKERK et al., 2005). Para evitar esse reconhecimento, o trofoblasto expressa moléculas MHC não clássicas (BULMER; JOHNSON, 1985).

Em humanos uma molécula MHC não clássica, o HLAG (do inglês "Human Leukocyte Antigen G"), é altamente expresso pelas células placentárias, em duas

isoformas principais: uma forma de membrana e outra forma solúvel (HUNT et al., 2005). Em mulheres grávidas o HLAG foi detectado sistemicamente, indicando um papel do HLAG na modulação do sistema imune materno (STEINBORN et al., 2007). Ainda, o HLAG foi descrito por interagir com receptores inibitórios de células NKu (CAUMARTIN et al., 2007); macrófagos e outras células do sistema imune (LI et al., 2009). A função do HLAG ainda não é completamente conhecida, entretanto a baixa ou não expressão dessa molécula na interface materno fetal resulta na ativação das células NKu, como também pode ser associado com a migração das TGCs (HELIGE et al., 2008).

Em bovinos, o MHC-I é chamado de complexo de antígeno leucocitários bovino (BoLA, do inglês "Bovine Leucocytary Antigen"), também divido em BoLA clássico e BoLA não clássico (BoLA-NC). A expressão anormal dessas moléculas leva ao abortamento espontâneo, que é particularmente observado entre os dias 30 e 90 dias de gestação de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (EDWARDS et al., 2003). Além disso a compatibilidade entre os haplotipos de BoLA entre mãe e feto podem aumentar a ocorrência de retenção de placenta após o parto (JOOSTEN; SANDERS; HENSEN, 1991; BENEDICTUS et al., 2012), pois não há reação inflamatória mediada pelo sistema imune materno contra as membranas fetais.

O tecido coriônico do placentônio bovino, não expressa BoLA clássico, porém o cório interplacentomal aumenta a sua expressão após o quarto mês de gestação (LOW et al., 1990; DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000; DAVIES et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2007). Já em gestações de embriões TNCS, a expressão de BoLA é predominantemente não clássica (DAVIES et al., 2004), e foi detectada aos 36 dias de gestação (DAVIES et al., 2004, 2006). Essas proteínas BoLA-NC são possíveis proteínas homólogas ao PED murino (FAIR et al., 2004) e ao HLAG humano, que podem regular a célula NKu e a função do macrófago (LI et al., 2009).

Este estudo avaliou a expressão das moléculas MHC clássicas e não clássicas em placentônios de gestações clones e controles aos 60 e 90 dias e a termo. Para testar a hipótese de que a placenta TNCS apresenta uma expressão alterada das moléculas MHC-I (clássicas e não clássicas) devido a natureza alogênica do embrião que origem a gestação.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais utilizados

Para as reações de imunohistoquímica, foram utilizados anticorpo primário anti-Qa-2 murino (clone 69H1-9-9, #11-5996, eBioscience, INC – San Diego, CA, USA) e anti-MHC monomórfico bovino (clone IL-A88, #MCA2444GA, AbDSerotec, Kidlington, OX, UK). Como controle de isotipo foi utilizado um anticorpo anti-IgG murina (clone MOPC-21, #M5284; Sigma-Aldrich - Saint Luis, MS, USA). As reações foram marcadas com o kit Dako Advance^{tm} HRP (#K4069), e reveladas com 3,3-diaminobenzidina (DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, #K346811), ambos adquiridos da DAKO (Carpinteria, CA, USA).

No western blotting, foram utilizados os mesmos anticorpos primários, porém como anticorpo secundário foi usado o anti-camundongo conjugado com HRP (#70765, Cell signaling, Danvers, MA, USA). Para bloqueio a albumina sérica bovina (BSA, #A6003, Sigma). Para quantificação da proteína total e revelação da membrana, foram usados Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#5000006) e Clarity™ Western ECL Substrate (#1705061) ambos da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Para transferência e leitura utilizou-se, respectivamente, o TransBlot System Turbo e ChemiDoc MP System, ambos da Bio-Rad.

Para as soluções tamponadas foram utilizados os seguintes reagentes: ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio tribásico anidro, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cloreto de potássio (KCl), trizma base ($C_4H_{11}NO_3$), e 3-(Aminopropyl)triethoxysilane, todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

Para extração do mRNA e proteína total das amostras, foi utilizado o reagente TRIzol (#15596, Ambion - Carlsbad, CA, USA). Para transcrição reversa e as reações de qPCR foram utilizados as enzimas DNAse I amplification grade (#18068-015) e RNAseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor (#10777-019); kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (#4374967); e SyBr Green PCR master mix (#4344463) todos adiquiridos da Invitrogen (Foster City, CA, EUA). Os oligonucleotideos iniciadores (Quadro 2) utilizados foram todos da Exxtend (Paulínia, SP, Brasil).

4.2.2 Obtenção dos placentônios

O experimento foi conduzido com placentônios de bovinos clonados produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (MIGLINO et al., 2007), e como controle foram utilizados placentônios de gestações provenientes de abatedouro, o modo de coleta foi realizado segundo Pereira e colaboradores (2013). As amostras de placentônios foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, desidradatas e embebidas em parafina ou criopreservadas em nitrogênio líquido. Para as reações de imunohistoquímica as amostras de placentônio TNCS foram separadas em três grupos com 60 dias (n = 3), 90 dias (n =2) e 285 dias (termo, n = 6) de gestação. Nas amostras controle, os grupos foram organizados da seguinte forma: 64 dias (± 5,7; n = 3 - denominado 60 dias), 81 dias (± 7; n = 3 - denominado 90 dias) e 251 dias (± 21; n = 6 - denominado termo) de gestação. Entretanto para as reações de PCR em tempo, as amostras foram agrupadas em dois grupos: primeiro e terceiro trimestre. Para a placenta TNCS, o grupo de primeiro terceiro foi composto por amostras com 75 dias de gestação (± 17,3; n = 4) e o de terceiro trimestre por amostras com 285 dias (termo; n = 4). Na placenta controle, os grupos foram formados com amostras de 73 (± 16,2; n = 4) e 240 (± 7,4; n = 4) dias de gestação, respectivamente.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética dos Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 9408110315).

4.2.3 Imunolocalização de proteínas MHC-I reconhecidas por anticorpos anti-QA-2 e anti-MHC bovino (IL-A88) na placenta bovina

As amostras de placentônios foram seccionadas com 5 µm de espessura e montadas em lâminas silanizadas, desparafinadas e reidratadas. A recuperação de antígeno foi realizadas com tampão citrato (1,83 mM de ácido cítrico monoidratado e 8,9 mM de citrato de sódio tribásico anidro, pH 6,0) em forno microondas por 4 vezes de cinco minutos. O bloqueio da peroxidade endógena foi com 3% de

peróxido de hidrogênio em água, por uma hora no escuro. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com 10% de soro de cabra em solução tampão de tris (TBS – 2,0 mM de Trizma base e 1,36 mM de cloreto de sódio, pH 7,5) por uma hora seguido de incubação com os anticorpos anti-Qa2 ou anti-IL-A88, ambos com diluição 1:50, em câmara úmida, por 16 horas, a 4° C. Os anticorpos primários foram detectados com kit Dako Advance^{tm} HRP, as reações reveladas com DAB e contra-coradas com hematoxilina. Os cortes controle foram incubados com anticorpo anti-IgG murina irrelevantes em lugar dos anticorpos primários. Entre cada passo, as lâminas foram lavadas, três vezes de cinco minutos, com TBS adicionado de 1% e soro de cabra. As reações foram visualizadas em microscópio Zeiss Axioplan 2 microscópio e fotodocumentadas com a câmera Axiocan HRc.

4.2.4 Detecção de moléculas do MHC-I com os anticorpos anti-Qa-2 e anti-IL-A88 na placenta bovina por western blotting

As proteínas foram extraídas com o TRIzol Reagent de acordo com recomendações do fabricante, e eluidos em uréia a 6%. Os homogenatos de proteínas foram quantificados pelo método de Bradford com o reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. As amostras foram agrupadas, em quantidade iguais, em grupos de acordo com idade (60 ou 90 dias de prenhez e termo) e origem da prenhez (controle ou clone), formando 6 amostras representativas de cada um grupos analisados. Em seguida, 20 ng de proteína total foram denaturadas a 100°C por 5 minutos e separadas em gel de poliacrilamida de 12% por eletroforese (100V, 120 min). As proteínas foram transferidas para membranas de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) utilizando o TransBlot System Turbo de acordo com recomendações do fabricante. A membrana foi bloqueada com solução tampão Tris (TBS-T; 10 mM Tris pH 7,6; 0,9% de cloreto de sódio; 0,3% de Tween -20) adicionada de 5% de albumina sérica bovina por 1 hora. Após isso, a membrana foi incubada com anticorpo anti-Qa-2 ou IL-A88 na diluição de 1:4000 e 1:2000, respectivamente, em TBS-T adicionado de 1% de BSA, overnight a 4º C. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada, por 1 hora, com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com HRP, na diluição de 1:3000 em TBS-T

com 1% de BSA. A reação foi revelada com Clarity™ Western ECL Substrate e visualizada no ChemiDoc System de acordo com recomendações do fabricante. As análises de intensidade de sinal e peso molecular das bandas, foram realizadas no programa Image Lab (versão 5.1) da Bio-Rad.

4.2.5 Detecção das isoformas clássicas e não clássicas do MHC bovino

O mRNA total das amostras foram extraídos usando o kit RNeasy Plus Mini, a digestão de DNA com DNAse I amplification grade e a transcrição reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; todos sob orientações do fabricante.

Quadro 2- Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Símbolo	Nome oficial	Gene ID	Sequência (5' – 3')	Tam
BOLA-NC1	MHC 1 non-classical 1		F: GGATACAAAAGGAAAACACACAGACTT R: GGCCTCGCTCTGGTTGTAGT	77
BOLA-NC2	MHC 1 non-classical 2		F: TGCGCGGCTACTACAACCA R: ACGTCGCAGCCGTACATCTC	67
BOLA-NC3	MHC 1 non-classical 3		F: CCTGCGCGGCTACTACAAC R: CACTTCGCAGCCAAACATCA	70
BOLA-NC4	MHC 1 non-classical 4		F: TTGCGAACGGGCTTGAAC R: ACCCACTGGAGGGTGTGAGA	74
JSP-1	MHC-class I JSP-1	407173	F: TAGGAGTTAGGGAGACTGGCCC R: AGCCTCGTCTCTGCTGGAAC	121
ACTB	Beta-actin	280979	F: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC R: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	108
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	281418	F: CATACAGGTCCTGGCATC R: CACGTGCTTGCCATCCAA	91
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	287022	F: GCATCCCACAGACTATTTCC R: GCAAAGACAATGACAGACCA	150

Fonte: Barreto (2015)

Para cada reação de qPCR, foram utilizados 7,5 µL de SyBr Green PCR master mix; 1,0 mM de cada primer (Quadro 2); 1,0 µL de cDNA diluído (63,0 µL de água ultra pura para 1,0 µL de cDNA), e água ultra pura para um total de 15,0 µL. Foi utilizado programa de ciclagem padrão do 7500 fast real-time PCR system (Invitrogen).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados já foram previamente padronizados em amostras bovinas, sendo eles as isoformas não clássicas do MHC-I bovino (O'GORMAN et al., 2010), a isoforma clássica do MHC bovino JSP-1 (MANSOURI-ATTIA et al., 2009) e os genes endógenos ACTB, PPIA e YWHAZ (MACABELLI et al., 2014).

Os dados foram analisados segundo o método de dCt de Livak et al (2001) e a análise estatística foi realizada pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo e animal) e erro padrão. Os gráficos foram feitos no programa SigmaPlot (versão 12.0).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Os anticorpos anti-QA-2 e IL-A88 reconhecem proteínas de MHC-I em padrões de expressão distintos no primeiro trimestre da gestação bovina

Tanto o anticorpo anti-Qa-2 como o anti-IL-A88 reconheceram proteínas somente no trofoblasto e no epitélio materno, enquanto que o mesênquima e estroma endometrial não apresentam reação positiva. Além disso, as células trofoblásticas gigantes binucleadas (TGCs) quando próximas ou fusionadas ao epitélio materno, não apresentaram marcação para ambos anticorpos utilizados. As proteínas reconhecidas pelo anti-Qa-2 foram mais presentes na interface materno fetal da zona arcada do placentônio, perdendo intensidade no parênquima, e tornando-se negativa no pedúnculo caruncular. Enquanto que o anti-IL-A88 teve marcação distribuída por todo o placentônio (Figura 24 a Figura 26).

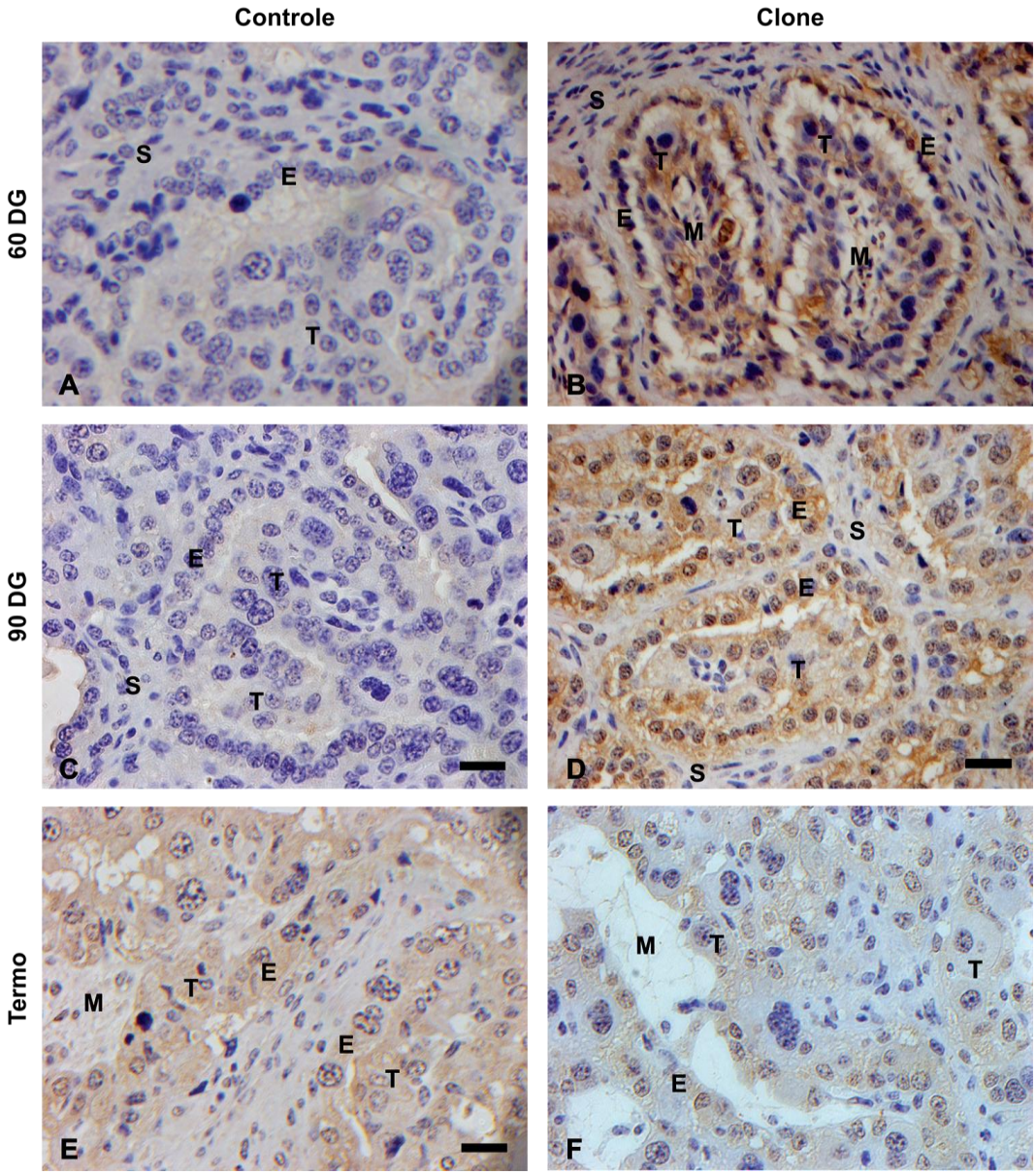
Na interface materno fetal o anti-Qa-2 apresentou-se mais difuso no citoplasma das células; enquanto que as proteínas reconhecidas pelo IL-A88 demonstrou ser mais próximo a membrana plasmática (Figura 24 a Figura 26).

Aos 60 e 90 dias de gestação a placenta controle não foi observada marcação

para Qa-2 em nenhum dos tecidos do placentônio (Figura 24 A e C). Enquanto que na placenta TNCS, pôde-se observar alta expressão de Qa-2 restrita ao trofoblasto e epitélio materno (Figura 24 B,D e Figura 25). Entretanto a termo, em ambos grupos, a expressão de Qa-2 manteve-se restrita ao trofoblasto e epitélio materno, porém com maior intensidade na placenta controle (Figura 24 E) do que na placenta TNCS (Figura 24 F).

A marcação para o anti-IL-A88, na placenta controle, aos 60 dias de gestação, é restrita ao trofoblasto e ao epitélio materno (Figura 26 A); enquanto que na placenta TNCS, a marcação para anti-IL-A88 é quase ausente (Figura 26 B). Aos 90 dias, a marcação para anti-IL-A88 continuou restrito ao trofoblasto e epitélio materno, porém com pouca intensidade tanto na placenta controle (Figura 26 C), como na placenta TNCS (Figura 26 D). A termo, a placenta controle (Figura 26 E). apresentou menor intensidade de marcação para anti-IL-A88 que a placenta TNCS (Figura 26 F).

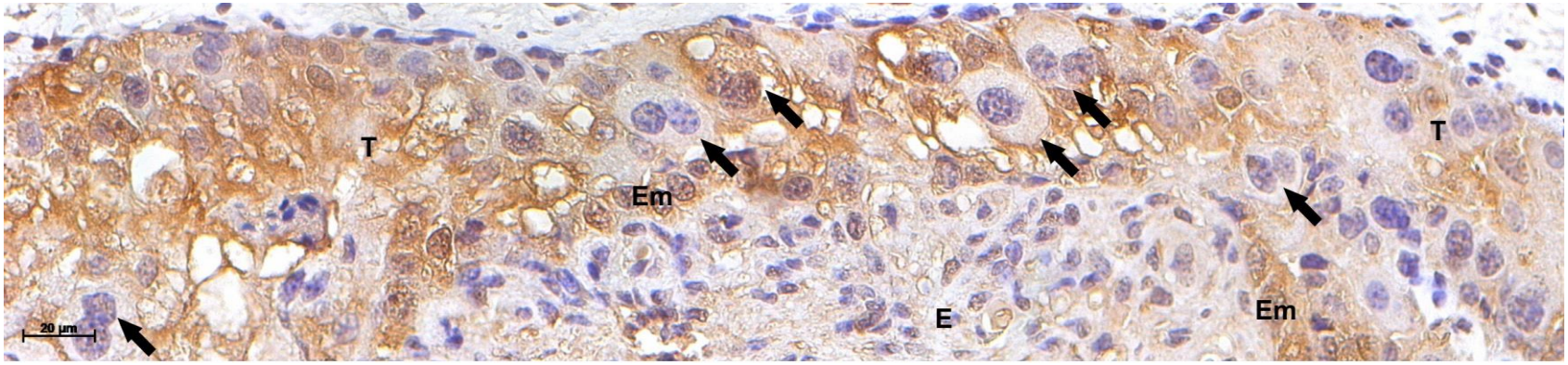
Figura 24 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção do peptídeo Qa-2 murino



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A** e **C**, placentônio controle com 60 e 90 dias de gestação, respectivamente. Observar a ausência de Qa-2 em todos os tecidos. Em **E**, placentônio controle a termo. Observar o aumento de expressão no trofoblasto e no epitélio materno. Em **B**, placentônio clone com 60 dias de gestação. Presença de Qa-2 no trofoblasto e epitélio materno. Em **D**, placentônio clone com 90 dias de gestação. Aumento na presença de Qa-2 no trofoblasto e epitélio materno. Em **E**, placentônio controle a termo. Observar expressão de Qa-2 no no trofoblasto e epitélio materno. Em **F**, placentônio clone a termo. Presença de Qa-2 no trofoblasto e epitélio materno, porém com menor intensidade que o placentônio controle na mesma fase. Marrom = produto da reação imunohistoquímica; Azul = contra-coloração com a hematoxilina. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

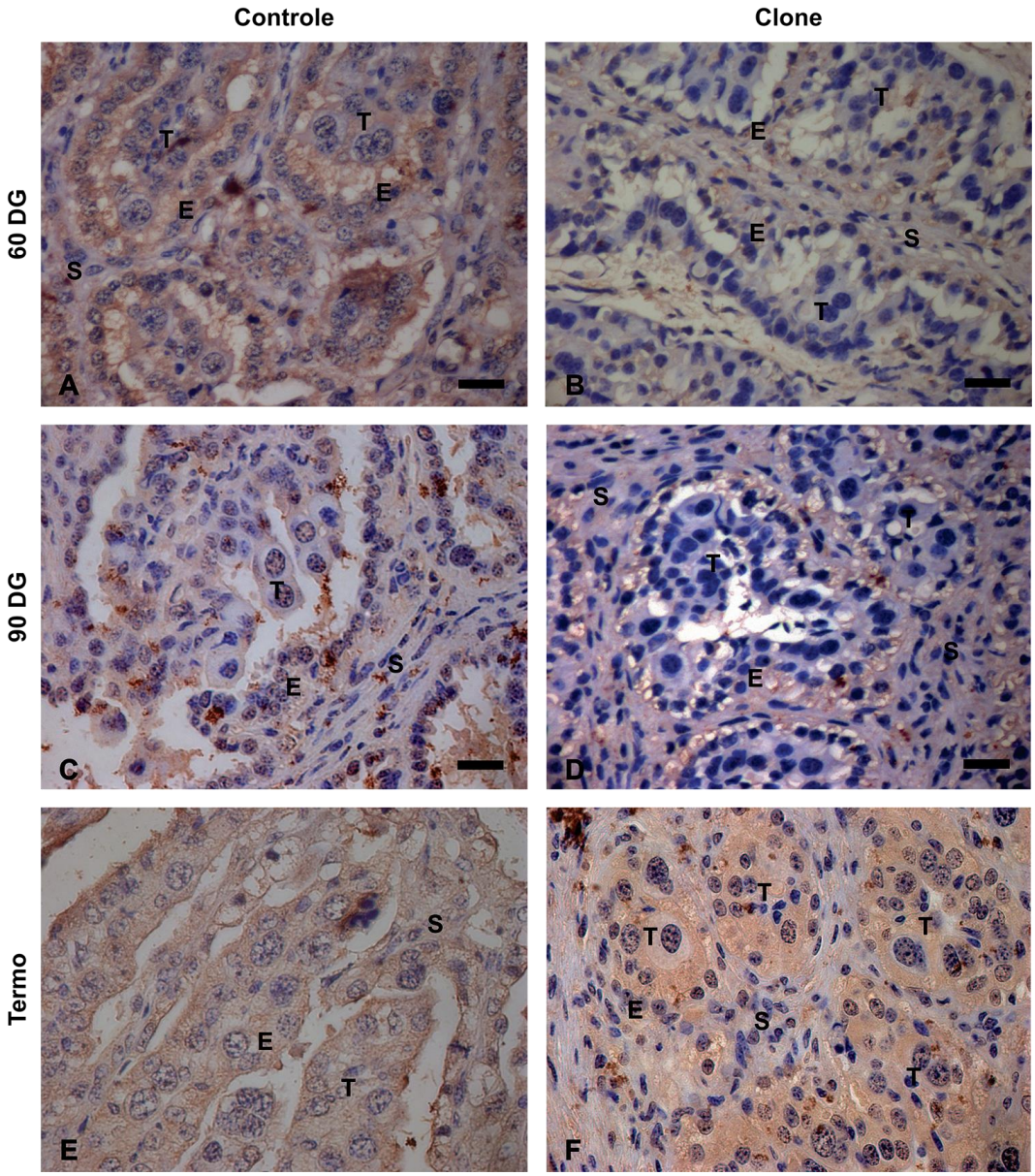
Figura 25 - Fotomicrografia da reação de imunohistoquímica para Qa2 em placentônio de gestação clone aos 90 dias.



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Observar o epitélio materno (Em), porém ao centro ocorre a desorganização do epitélio materno (Em) e várias células trofoblásticas gigantes em profundidades diferentes de invasão no trofoblasto (T). As células trofoblásticas gigantes em contato direto com o epitélio materno apresentam marcação negativa para Qa2. Marrom = produto da reação imunohistoquímica; Azul = contra-coloração com a hematoxilina. Barra = 20µm.

Figura 26 - Imunohistoquímica em placentônio bovino para detecção do peptídeo IL-A88



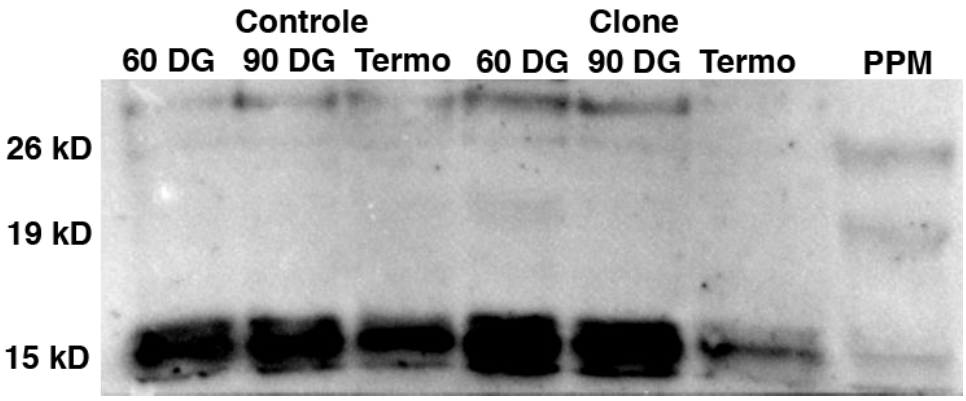
Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Em **A**, placentônio controle com 60 dias de gestação. Observar a baixa expressão de IL-A88 no epitélio materno (E) e no trofoblasto (T). Em **C**, placentônio controle com 90 dias de gestação. Diminuição da expressão de IL-A88. Em **E,** o IL-A88 é tenuamente expresso. Em **B** e **D**, placentônio clones com 60 e 90 dias de gestação, respectivamente. O IL-A88 é quase ausente durante essas fases. Em **F**, placentônio clone a termo. Ocorre aumento da expressão nos epitélios, exceto nas formações sinciciais. Marrom = produto da reação imunohistoquímica; Azul = contra-coloração com a hematoxilina. Estroma endometrial (S), epitélio materno (E), mesênquima fetal (M) e trofoblasto (T). Barra = 20 µm.

4.3.2 Duas isoformas de MHC-I são reconhecidas pelo anticorpo anti-Qa-2

As análises de western blotting revelaram a presença de duas bandas de proteínas reconhecidas pelo anti-Qa-2, sendo uma mais tênue de 29,2 kDa (± 0,27) e outra mais intensa de 15,34 kDa (± 0,13) na maioria dos grupos analisados (Figura 27). A placenta controle aos 60 dias de gestação apresentou uma banda de baixa intensidade para a isoforma de 29,2 kDa, e a placenta TNCS a termo não apresentou banda para essa mesma isoforma. Em geral, a expressão das isoformas identificadas pelo Qa-2 apresentou expressão em média 1,5 vezes maior na placenta TNCS em relação à placenta controle em todas as idades analisadas, exceto para as amostras a termo. Além disso, a placenta controle a termo apresentou uma banda de 29,2 kDa 2,7 vezes mais intensa em relação a placenta TNCS (Figura 27).

Figura 27 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção do peptídeo Qa-2

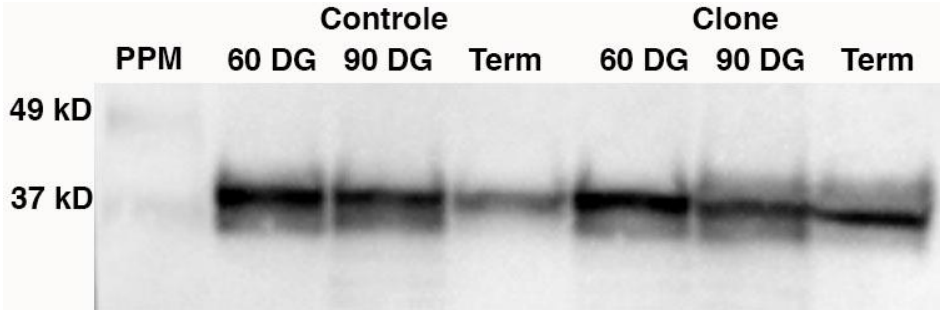


Fonte: Barreto (2015)
Legenda: Observar a presença de duas bandas para o anticorpo Qa-2, sendo uma com aproximadamente 29,2 kDa e outra com 15,34 kDa. Indicando que, em bovinos, esse anticorpo pode ter afinidade para mais de uma isoforma de MHC-I.

Entretanto na análise utilizando o anticorpo IL-A88, todas as amostras apresentaram uma banda única de 37,3 kDa (± 0,78) (Figura 28). Aos 60 e 90 dias de gestação a placenta controle apresentou ser mais intensa em relação a termo. Essa diminuição não ocorreu na placenta TNCS que apresentou intensidade constante da

banda de 37,3 kDa nas três idade analisadas.

Figura 28 - Western Blotting em placentônio bovino para detecção do peptídeo IL-A88



Fonte: Barreto (2015)
Legenda: Observar a presença de banda específica para o anticorpo IL-A88 com aproximadamente , 37,3 kDa. Note que tanto na prenhez controle como em clones, há uma grande presença de IL-A88 aos 60 dias de gestação. Com o avanço da prenhez há uma diminuição intensa da expressão nos controles, e mais tênue nos clones.

4.3.3 As moléculas de MHC-I expressas no primeiro trimestre da gestação bovina são em maioria não clássicas

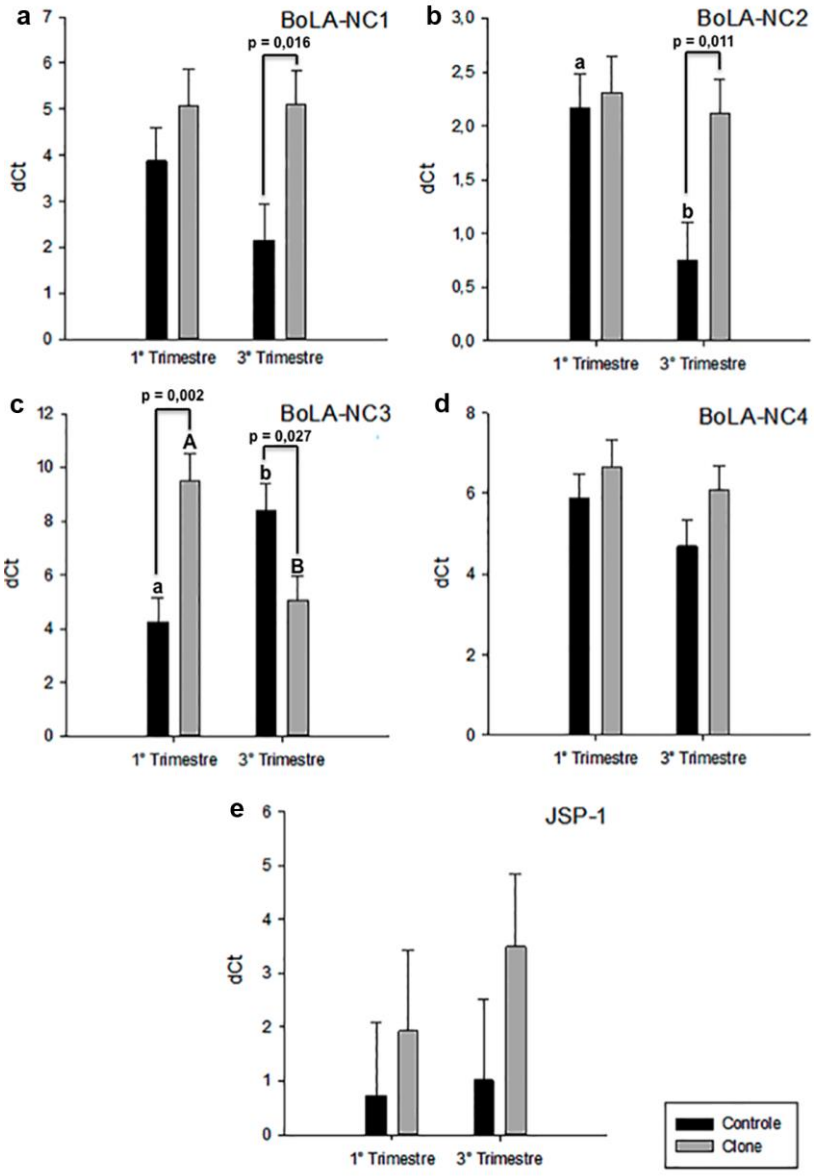
Realizou-se também a análise quantitativa da expressão gênica dos quatro alelos não clássicos do complexo antigênico leucocitário bovino (BoLA-NC1, BoLA-NC2, BoLA-NC3 e BoLA-NC4) e de um alelo clássico, o JSP-1, por PCR quantitativo.

A expressão de BoLA-NC1, foi semelhante no início da gestação tanto na placenta controle como na placenta TNCS. No final da gestação, o BoLA-NC1 apresentou maior expressão em placenta TNCS em relação à placenta controle ($P = 0,016$). Quanto ao BoLA-NC2, no início da gestação não houve diferenças entre a placenta TNCS e a placenta controle. No terceiro trimestre, a placenta controle teve uma menor expressão de BoLA-NC2 quando comparada à placenta TNCS ($P < 0,01$). A placenta controle, no primeiro trimestre, teve uma maior expressão em relação ao terceiro trimestre ($P < 0,01$). Na placenta TNCS os níveis de expressão de BoLA-NC2 manteve-se altos e constantes ao longo da gestação.

A expressão de BoLA-NC3 apresentou interação entre tipo e idade de gestação ($P < 0,01$). Houve um aumento de expressão na placenta controle com o avanço da gestação ($P < 0,01$), enquanto que na placenta TNCS a expressão de BoLA-NC3 diminuiu próximo ao parto ($P < 0,01$). No primeiro trimestre, a placenta controle

apresentou menor expressão de BoLA-NC3 quando comparados à placenta TNCS. Enquanto que houve um aumento de expressão de BoLA-NC3 na placenta TNCS em relação à placenta controle (P < 0,01). A expressão de BoLA-NC4 e de JSP-1 não mostrou foi alterada nem pela idade ou pelo tipo de gestação (Figura 29).

Figura 29 - Expressão dos genes BoLA-NC1, BoLA-NC2, BoLA-NC3, BoLA-NC4 e JSP-1 em placentônios bovinos



Fonte: Barreto (2015)

Legenda: Expressão gênica do BoLA-NC1 (A), BoLA-NC2 (B), BoLA-NC3 (C), BoLA-NC4 (D) e JSP-1 (E) apresentados em valores de dCt pela idade gestacional (primeiro e terceiro trimestres). Letras minúsculas representam significância (p ≤ 0,05) entre os placentônios controle. Letras maiúsculas representam significância (p ≤ 0,05) entre os placentônios clone. Barras contínuas representam significância (p ≤ 0,05) entre os grupos dentro de um mesmo período gestacional.

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo a expressão de moléculas do MHC-1 bovino foi avaliada por reações de imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-Qa-2 (MHC não clássico murino (FAIR et al., 2004)) e anti-IL-A88 (MHC não clássico bovino (TOYE et al., 1990)) na placenta controle e na de embriões produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) aos 60 e 90 dias de gestação e a termo.

Tanto o anti-Qa-2 como o anti-IL-A88 detectaram isoformas de MHC-I em toda a área do placentônio bovino, tanto na placenta controle como na TNCS, com variações de intensidade de marcação dependendo da idade gestacional estudada. Entretanto, em bovinos, a literatura é controversa em relação a expressão de MHC-I no trofoblasto, uma vez que a maioria dos trabalhados se baseiam na marcação de MHC-I utilizando os clones IL-A19 ou IL-A88, ambos específicos para MHC-I bovino. Porém a maioria dos autores relatam a expressão de MHC-I apenas no trofoblasto da região interplacentomal (LOW et al., 1990; DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000; HILL, 2002) ou no trofoblasto da zona arcada do placentônio (DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000). Enquanto que outro trabalho não detectou nenhuma isoforma de MHC-I nem no trofoblasto da região interplacentomal nem do placentônio (CHAVATTE-PALMER et al., 2007).

Ellis et al (1998), detectou, por hibridização “in situ” a expressão de mRNA de MHC-I em todo o placentônio, com maior intensidade nas células trofoblásticas gigantes (TGCs, do inglês “Trophoblastic Giant Cells”) do que no trofoblasto mononuclear. No entanto, por imunohistoquímica, a proteína foi detectada apenas nas TGCs (ELLIS et al., 1998). O que sugere que todas as células placentárias expressam MHC-I, mas apenas as TGCs expressam proteína suficiente para a detecção por imunohistoquímica com a metodologia utilizada.

Este trabalho relata pela primeira vez a detecção de MHC-I em todas as células epiteliais que compõem a placenta bovina. Esses resultados foram possíveis pelo uso de uma tecnologia mais moderna de marcação do anticorpo secundário com polímero livre de biotina (chamado de anticorpo de segunda geração), sendo este mais sensível e específico que os conjugados com biotina (ROCHA et al., 2009)

que foram utilizados nos trabalhos anteriormente citados.

Para ambos anticorpos, observou-se que quanto mais próximo ao epitélio materno, menor a expressão de MHC-I nas TGCs. Além disso aquelas TGCs em formação sincicial apresentam pouca ou nenhuma expressão, podendo explicar a heterogeneidade de expressão de MHC-I nas TGCs (ELLIS et al., 1998; BAINBRIDGE; SARGENT; ELLIS, 2001), possivelmente pelo fato dessas células estarem em momentos diferentes do processo de migração, e portanto com diferentes níveis e “invisibilidade” para o sistema imune materno.

Em relação à idade gestacional, o MHC-1 começa a ser expresso na placenta, Low et al. (1990) e Davies et al. (2000) relatam a expressão de MHC-I após os cinco meses de gestação e tem um pico próximo ao parto; assim como Ellis et al. (1998) que mostra alta expressão de MHC-I na região interplacentomal próximo ao parto. Entretanto na gestações TNCS essa expressão é precoce e começa a partir do dia 34 de gestação (HILL, 2002). Sabe-se que o trofoblasto tem expressão gênica de isoformas clássicas e não clássicas (DAVIES et al., 2004, 2006), no entanto nada se sabe sobre os padrões de expressão proteica das isoformas clássicas e não-clássicas. Em humanos há expressão de HLA-G (isoforma não clássica humana) desde a sexta semana gestacional, diminuindo a expressão até o parto (ZHU et al., 2012), e o HLA-G é expresso em todas as células trofoblásticas, sendo elas invasivas ou não (BOUTEILLER; BLASCHITZ, 1999). Em nossos resultados, na placenta controle houve marcação menos intensa para anti-Qa-2 durante o primeiro terço gestacional, aumentando próximo ao parto, podendo sugerir que esse anticorpo tem um padrão de marcação mais semelhante às isoformas clássicas do MHC-I. Especula-se que seja necessária a expressão de MHC-I clássico para a expulsão das membranas fetais em bovinos (JOOSTEN; SANDERS; HENSEN, 1991; BENEDICTUS et al., 2012). Assim como previamente publicado por Davies et al (2000), a placenta TNCS quando comparada à placenta controle apresentou uma marcação precoce e intensa para anti-Qa-2 que diminuiu próximo ao parto, o que aumentaria o risco de rejeição dos tecidos fetais pelo sistema imune materno.

Entretanto o padrão de marcação de MHC-I para o anticorpo IL-A88 foi mais intenso durante o primeiro terço gestacional na placenta controle, sugerindo que esse anticorpo reconhece de forma mais eficiente isoformas não clássicas ou monomórficas (TOYE et al., 1990). Ainda, na placenta TNCS houve menor

intensidade de marcação no primeiro trimestre, aumentando próximo ao parto. Em humanos, os níveis proteicos e de mRNA de HLA-G são diminuídos em 2 e 5 vezes, respectivamente, em gestações com preeclampsia, devido ao estado de hipóxia causado por essa patologia (ZHU et al., 2012). Portanto a diminuição da marcação para IL-A88 na placenta TNCS, possivelmente tem relação com o estado de hipóxia característico nessa fase da gestação TNCS (MEIRELLES et al., 2010).

4.5 CONCLUSÕES

Há expressão de MHC-I no trofoblasto do placentônio bovino desde aos 60 dias de gestação até próximo ao parto, com variações de intensidade dependendo da isoforma detectada. A placenta controle e a TNCS apresentam padrões diferentes na expressão de MHC-I.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura atual é extremamente focada em alterações epigenéticas relacionadas a um único ou grupo de genes, ou é estudada de maneira global apenas até o desenvolvimento a blastocisto, sendo escassa mesmo para placenta humana ou murina.

O primeiro objetivo deste trabalho foi analisar as alterações na cromatina na placenta bovina, tanto por meio das modificações no DNA (metilação, hidroximetilação e as enzimas envolvidas no processo – DNMT1, TET1 e TET2). Para tanto usamos a placenta controle e a TNCS como modelo de estudo da reprogramação epigenética.

A diminuição dos níveis globais de metilação no trofoblasto bovino durante o primeiro trimestre gestacional reportados aqui, sugerem que menores níveis de metilação de DNA são importantes mediadores da comunicação materno-fetal. Além disso, a ausência de metilação e alto nível global de hidroximetilação, na maioria das células trofoblásticas gigantes, pode levar a ativação de elementos repetitivos e retrovirais, sendo estes importantes para a formação, regulação e função dessas células. Na placenta a termo, os semelhantes níveis globais de metilação e hidroximetilação entre os tipos gestacionais estudados, sugerem uma melhor reprogramação nuclear na gestação TNCS até o parto.

A análise das modificações bivalentes (H3K4me3 e H3K27me3) ou clássicas (H3K9ac, H3K9me2 e H3K9me3) demonstrou que algumas marcações epigenéticas persistem ao longo do desenvolvimento fetal em bovinos.

A bivalência da H3K4me3 e H3K27me3 parece estar relacionada com expressão de genes relacionados com a estruturação inicial da placenta e os níveis de H3K27me3 diminuem com o avanço da gestação bovina controle, e permanecem baixos durante toda gestação TNCS. Na placenta TNCS, aos 60 dias, há um estado mais intenso de hipóxia que leva diminuição da acetilação de histonas, portanto os baixos níveis de H3K9ac nesta fase salienta um estado de repressão gênica e menor desenvolvimento placentário. Apesar dos níveis globais de H3K9me2 e H3K9me3 não diferirem entre as idades e tipos gestacionais estudados, eles são baixos na células trofoblásticas gigantes, podem estar relacionados com alta atividade transcricional dessas células durante toda a gestação. Assim como para as

modificações no DNA, as modificações nas histonas não diferiam entre a placenta controle e a TNCS, possivelmente pelo fato de que gestações TNCS quando chegam a termo possuem uma reprogramação genética mais próxima à gestação controle.

A confirmação da hipótese que há uma desregulação epigenética global na placenta TNCS, coincidem com altas taxas de perdas gestacionais nesse período ou o retardado do desenvolvimento placentário. Além disso é também conhecida a expressão precoce de MHC-I na placenta TNCS, associada a maior presença de infiltrados inflamatórios e a característica alogênica da gestação TNCS. Portanto como terceiro objetivo, foi observada a expressão de isoformas clássicas e não clássicas de MHC-I em nível transcricional, além da verificação da expressão proteica com dois anticorpos anti-MHC-I distintos (Qa-2 e IL-A88). Foi possível a identificação de MHC-I no trofoblasto do placentônio bovino desde aos 60 dias de gestação até próximo ao parto, com variações de intensidade dependendo da isoforma detectada, além de que a placenta controle e a TNCS apresentam padrões diferentes na expressão de MHC-I.

De modo geral, o menores níveis de metilação do DNA encontrados na placenta TNCS aos 60 dias de gestação, indica ser um mecanismo compensatório para ativar a expressão gênica, visto que a bivalência H3K4me3/H3K27me3 parece não estar presente para a estruturação inicial da placenta. Assim como a H3K9ac está diminuída mantendo levando a um estado repressivo da expressão gênica. Ainda na placenta TNCS aos 60 dias, há uma alta expressão de MHC-I, levando a resposta imune do sistema materno contra os tecidos fetais. Portanto vários eventos são presente e parecem contribuir para instabilidade da gestação inicial em clones, coincidindo com a alta taxa de perdas gestacionais nessa fase.

REFERENCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ARNOLD, D. R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 279–90, 2006.

ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (Bos indicus) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760–72, 2010.

BAINBRIDGE, D. R. J.; SARGENT, I. L.; ELLIS, S. A. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 907–913, 2001.

BARRETO, R. D. S. N.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; VISINTIN, J. A.; DA SILVA, S. M.; BURIOLI, K. C.; FONSECA, R.; BERTAN, C.; ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização da fusão caruncular em gestações naturais e de conceptos bovinos clonados [Characterization of the caruncular fusion in gestations of natural and cloned bovine conceptuses]. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 779–787, 2009.

BENEDICTUS, L.; THOMAS, A. J.; JORRITSMA, R.; DAVIES, C. J.; KOETS, A. P. Two-way calf to dam major histocompatibility class I compatibility increases risk for retained placenta in cattle. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 3, p. 224–30, 2012.

BJÖRKMAN, N. H. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal Of Ultrastructure Research**, v. 24, n. 3, p. 249–58, ago. 1968. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5750758>. Acesso em: 23 abr. 2015.

BLACK, S. G.; ARNAUD, F.; PALMARINI, M.; SPENCER, T. E. Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 255–64, 2010.

BOUTEILLER, P. Le; BLASCHITZ, A. The functionality of HLA-G is emerging. **Immunological Reviews**, v. 167, n. 7, p. 233–244, 1999.

BRANCO, M. R.; FICZ, G.; REIK, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 1, p. 7–13, 2012.

BULMER, J. N.; JOHNSON, P. M. Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunobiological relevance. **Placenta**, v. 6, n. 2, p. 127–140, 1985.

BURTON, G. J.; JONES, C. J. P. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. **Taiwanese Journal Of Obstetrics & Gynecology**, v. 48, n. 1, p. 28–37, 2009.

CAUMARTIN, J.; FAVIER, B.; DAOUYA, M.; GUILLARD, C.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E. D.; LEMAOULT, J. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 5, p. 1423–33, 2007.

CHAVATTE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M.; ROÏZ, J.; HEYMAN, Y.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; CONSTANT, F.; HUE, I.; ELLIS, S. a. Placental expression of major histocompatibility complex class I in bovine somatic clones. **Cloning And Stem Cells**, v. 9, n. 3, p. 346–56, 2007.

CHUONG, E. B.; RUMI, M. a K.; SOARES, M. J.; BAKER, J. C. Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta. **Nature Genetics**, v. 45, n. 3, p. 325–9, 2013.

DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11-12, p. 831–836, 2011.

DAHL, J. A.; REINER, A. H.; KLUNGLAND, A.; WAKAYAMA, T.; COLLAS, P. Histone H3 lysine 27 methylation asymmetry on developmentally-regulated promoters distinguish the first two lineages in mouse preimplantation embryos. **PloS One**, v. 5, n. 2, p. e9150, 2010.

DAVIES, C. J.; ELDRIDGE, J. A.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Evidence for expression of both classical and non-classical major histocompatibility complex class I genes in bovine trophoblast cells. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 55, n. 3, p. 188–200, 2006.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Temporal and Regional Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I Expression at the Bovine Uterine / Placental Interface. **Placenta**, v. 21, n. 2-3, p. 194–202, 2000.

DAVIES, C. J.; HILL, J. R.; EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; FISHER, P. J.; ELDRIDGE, J. a; SCHLAFER, D. H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Scienceeproduction Science**, v. 82-83, p. 267–80, 2004.

DONALDSON, W. L.; ZHANG, C. H.; ORIOL, J. G.; ANTCZAK, D. F. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. **Development**, v. 110, n. 1, p. 63–71, 1990.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCRACKEN, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 2, p. 113–23, 2003.

ELLIS, S. .; SARGENT, I. .; CHARLESTON, B.; BAINBRIDGE, D. R. . Regulation of MHC class I gene expression is at transcriptional and post-transcriptional level in bovine placenta. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 2, p. 103–115, 1998.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. What can comparative studies of placental structure tell us?--A review. **Placenta**, v. 25 Suppl A, p. S3–9, 2004.

ERFURTH, F. E.; POPOVIC, R.; GREMBECKA, J.; CIERPICKI, T.; THEISLER, C.; XIA, Z.-B.; STUART, T.; DIAZ, M. O.; BUSHWELLER, J. H.; ZELEZNIK-LE, N. J. MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 105, n. 21, p. 7517–22, 2008.

ESNAULT, C.; PRIET, S.; RIBET, D.; VERNOCHET, C.; BRULS, T.; LAVIALLE, C.; WEISSENBACH, J.; HEIDMANN, T. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 105, n. 45, p. 17532–7, 2008.

FAIR, T.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MURPHY, M.; RIZOS, D.; MARTIN, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Search for the bovine homolog of the murine ped gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. **Biology Of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 488–94, 2004.

FICZ, G.; BRANCO, M. R.; SEISENBERGER, S.; SANTOS, F.; KRUEGER, F.; HORE, T. a; MARQUES, C. J.; ANDREWS, S.; REIK, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 398–402, 2011.

FUJII, T.; MORIYASU, S.; HIRAYAMA, H.; HASHIZUME, T.; SAWAI, K. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 5, p. 617–25, 2010.

FUKE, C.; SHIMABUKURO, M.; PETRONIS, A.; SUGIMOTO, J.; ODA, T.; MIURA, K.; MIYAZAKI, T.; OGURA, C.; OKAZAKI, Y.; JINNO, Y. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. **Annals Of Human Genetics**, v. 68, n. Pt 3, p. 196–204, 2004.

GENG-SHENG, C.; YU, G.; KUN, W.; FANG-RONG, D.; NING, L. Repressive but not activating epigenetic modifications are aberrant on the inactive X chromosome in live cloned cattle. **Development Growth And Differentiation**, v. 51, p. 585–594, 2009.

GOGOLIN-EWENS, K. J.; LEE, C. S.; MERCER, W. R.; BRANDON, M. R. Site-directed differences in the immune response to the fetus. **Immunology**, v. 66, n. 2, p. 312–7, 1989.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 74, p. 481–514, 2005.

GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B. O.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation in development and human disease. **Mutation Research**, v. 647, n. 1-2, p. 30–8, 2008.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; JOHNSON, M. L.; BOROWICZ, P. P.; MINTEN, M.; BILSKI, J. J.; WROBLEWSKI, R.; VELIMIROVICH, M.; COUPE, L. R.; REDMER, D. a.; REYNOLDS, L. P. Placental

development during early pregnancy in sheep: Cell proliferation, global methylation, and angiogenesis in the fetal placenta. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 529–540, 2011.

GREEN, J. A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. **Biology Of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1624–31, 2000.

GREENSTEIN, J. S.; MURRAY, R. W.; FOLEY, R. C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, v. 132, n. 3, p. 321–341, 1958.

GUILLEMOT, F.; NAGY, A.; AUERBACH, A.; ROSSANT, J.; JOYNER, A. L. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. **Nature**, v. 371, n. 6495, p. 333–6, 1994.

HAFFNER, M. C.; CHAUX, A.; MEEKER, A. K.; ESOPI, D. M.; GERBER, J.; PELLAKURU, L. G.; TOUBAJI, A.; ARGANI, P.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; NELSON, W. G.; NETTO, G. J.; DE MARZO, A. M.; YEGNASUBRAMANIAN, S. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. **Oncotarget**, v. 2, n. 8, p. 627–37, 2011.

HEEMSKERK, B.; LANKESTER, A. C.; VAN VREESWIJK, T.; BEERSMA, M. F. C.; CLAAS, E. C. J.; VELTROP-DUITS, L. A.; KROES, A. C. M.; VOSSEN, J. M. J. J.; SCHILHAM, M. W.; VAN TOL, M. J. D. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 191, n. 4, p. 520–30, 2005.

HELIGE, C.; AHAMMER, H.; HAMMER, A.; HUPPERTZ, B.; FRANK, H.-G.; DOHR, G. Trophoblastic invasion in vitro and in vivo: similarities and differences. **Human Reproduction**, v. 23, n. 10, p. 2282–91, 2008.

HEMBERGER, M. Genetic-epigenetic intersection in trophoblast differentiation. v. 5, n. 1, p. 24–29, 2010.

HEYMAN, Y.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P.; DE, B.; JOSAS, J.; TECHNIQUES, S.; ANIMALE, P.; BERNARD, C. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle loned embryos. **Biology Of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 6–13, 2002.

HIENDLEDER, S.; MUND, C.; REICHENBACH, H.-D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; ZAKHARTCHENKO, V.; LYKO, F.; WOLF, E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. **Biology Of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 217–23, 2004.

HILL, J. R. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. **Differentiation**, v. 69, n. 4-5, p. 174–178, 2002.

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**, v. 63, n. 6, p. 1787–94, 2000.

HILL, J. R.; SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J.; AL, H. E. T. Abnormal Expression of Trophoblast Major Histocompatibility Complex Class I Antigens in Cloned Bovine Pregnancies Is Associated with a Pronounced Endometrial Lymphocytic Response 1. **Biology Of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 55–63, 2002.

HOME, P.; RAY, S.; DUTTA, D.; BRONSHTEYN, I.; LARSON, M.; PAUL, S. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 284, n. 42, p. 28729–37, 2009.

HUNT, J.; MANNING, L.; MITCHELL, D.; SELANDERS, J.; WOOD, G. Localization and characterization of macrophages in murine uterus. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 38, n. 2, p. 255–265, 1985.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; BURNETT, T. G. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 11, n. 2, p. 127–37, 2000.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; MCINTIRE, R. H.; OBER, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 681–93, 2005.

HVIID, T. V. F. HLA-G in Human Reproduction: Aspects of Genetics, Function and Pregnancy Complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209–32, 2006.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D. E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. **Journal Of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1376–84, 2003.

JONES, P. a. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–92, 2012.

JOOSTEN, I.; SANDERS, M. F.; HENSEN, E. J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. **Animal Genetics**, v. 22, n. 6, p. 455–63, 1991.

KAJI, K.; NICHOLS, J.; HENDRICH, B. Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. **Development**, v. 134, n. 6, p. 1123–32, 2007.

KIM, M. S.; KWON, H. J.; LEE, Y. M.; BAEK, J. H.; JANG, J. E.; LEE, S. W.; MOON, E. J.; KIM, H. S.; LEE, S. K.; CHUNG, H. Y.; KIM, C. W.; KIM, K. W. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 437–43, 2001.

KOSHI, K.; SUZUKI, Y.; NAKAYA, Y.; IMAI, K.; HOSOE, M.; TAKAHASHI, T.; KIZAKI, K.; MIYAZAWA, T.; HASHIZUME, K. Bovine trophoblastic cell differentiation and binucleation involves enhanced endogenous retrovirus element expression. **Reproductive Biology And Endocrinology**, v. 10, p. 41, 2012.

KOUKOURA, O.; SIFAKIS, S.; SPANDIDOS, D. a. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 4, p. 883–9, 2012.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science**, v. 324, n. 2009, p. 929–930, 2009.

KUO, M. H.; BROWNELL, J. E.; SOBEL, R. E.; RANALLI, T. A.; COOK, R. G.; EDMONDSON, D. G.; ROTH, S. Y.; ALLIS, C. D. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. **Nature**, v. 383, n. 6597, p. 269–72, set. 1996.

KYDD, J. H.; BUTCHER, G. W.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R. Expression of major histocompatibility complex (MHC) class 1 molecules on early trophoblast. **Journal Of Reproduction And Fertility. Supplement**, v. 44, p. 463–77, 1991.

LEEB, M.; WUTZ, A. Establishment of epigenetic patterns in development. **Chromosoma**, v. 121, n. 3, p. 251–62, 2012.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental And Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122–134, 1994.

LEWIS, A.; MITSUYA, K.; UMLAUF, D.; SMITH, P.; DEAN, W.; WALTER, J.; HIGGINS, M.; FEIL, R.; REIK, W. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. **Nature Genetics**, v. 36, n. 12, p. 1291–1295, 2004.

LEWIS, J.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin structure. **FEBS Letters**, v. 285, n. 2, p. 155–159, jul. 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)80795-5>. Acesso em: 27 jul. 2013.

LI, C.; HOUSER, B. L.; NICOTRA, M. L.; STROMINGER, J. L. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 106, n. 14, p. 5767–72, 2009.

LI, J.; WANG, W.; LIU, C.; WANG, W.; LI, W.; SHU, Q.; CHEN, Z.-J.; SUN, K. Critical role of histone acetylation by p300 in human placental 11β-HSD2 expression. **The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism**, v. 98, n. 7, p. E1189–97, 2013.

LIU, J.; LI, Y.; LIAO, Y.; MAI, S.; ZHANG, Z.; LIU, Z.; JIANG, L.; ZENG, Y.; ZHOU, F.; XIE, D. High expression of H3K27me3 is an independent predictor of worse outcome in patients with urothelial carcinoma of bladder treated with radical cystectomy. **BioMed Research International**, v. 2013, p.

390482, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOHMANN, F.; LOUREIRO, J.; SU, H.; FANG, Q.; LEI, H.; LEWIS, T.; YANG, Y.; LABOW, M.; LI, E.; CHEN, T.; KADAM, S. KMT1E mediated H3K9 methylation is required for the maintenance of embryonic stem cells by repressing trophectoderm differentiation. **Stem Cells**, v. 28, n. 2, p. 201–12, 2010.

LOW, B. G.; HANSEN, P. J.; DROST, M.; GOGOLIN-EWENS, K. J. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. **Journal Of Reproduction And Fertility**, v. 90, n. 1, p. 235–43, 1990.

MACABELLI, C. H.; FERREIRA, R. M.; GIMENES, L. U.; DE CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; SANGALLI, J. R.; SMITH, L. C.; BARUSELLI, P. S.; MEIRELLES, F. V.; CHIARATTI, M. R. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e93287, 2014.

MALONE, C. D.; HANNON, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 656–68, 2009.

MALTEPE, E.; BAKARDJIEV, A. I.; FISHER, S. J. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 1016–25, 2010.

MALTEPE, E.; KRAMPITZ, G. W.; OKAZAKI, K. M.; RED-HORSE, K.; MAK, W.; SIMON, M. C.; FISHER, S. J. Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. **Development**, v. 132, n. 15, p. 3393–403, 2005.

MANSOURI-ATTIA, N.; SANDRA, O.; AUBERT, J.; DEGRELLE, S.; EVERTS, R. E.; GIRAUD-DELVILLE, C.; HEYMAN, Y.; GALIO, L.; HUE, I.; YANG, X.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J.-P. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 106, n. 14, p. 5687–92, 2009.

MARGUERON, R.; TROJER, P.; REINBERG, D. The key to development: interpreting the histone code? **Current Opinion In Genetics Development**, v. 15, n. 2, p. 163–176, 2005.

MEIRELLES, F. V; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V; KOMNINOU, E. R.; SANGALLI, J. R.; NETO, P. F.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (Bos indicus). **Reproduction, Fertility, And Development**, v. 22, n. 1, p. 88–97, 2010.

MIGLINO, M. a; PEREIRA, F. T. V; VISINTIN, J. a; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V; RUMPF, R.; AMBRÓSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, a F.; LEISER, R.; CARTER, a M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604–17, 2007.

MOAREFI, A. H.; CHÉDIN, F. ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation. **Journal Of Molecular Biology**, v. 409, n. 5, p. 758–72, 2011.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 8, p. 584–94, ago. 2006.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–63, 2002.

MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, L. Z.; SARAIVA, N. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; GARCIA, J. M. Chromatin modifying agents in the in vitro production of bovine embryos. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2010.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswisk: Rutgers University Press, 1987.

MURPHY, K. **Janeway's immunobiology**. 8th. ed. [s.l.] Garland Science, 2011.

NELISSEN, E. C. M.; VAN MONTFOORT, A. P. a; DUMOULIN, J. C. M.; EVERS, J. L. H. Epigenetics

and the placenta. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 3, p. 397–417, 2011.

NESTOR, C. E.; OTTAVIANO, R.; REDDINGTON, J.; SPROUL, D.; REINHARDT, D.; DUNICAN, D.; KATZ, E.; DIXON, J. M.; HARRISON, D. J.; MEEHAN, R. R. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome Research**, v. 22, n. 3, p. 467–77, 2012.

NG, R. K.; DEAN, W.; DAWSON, C.; LUCIFERO, D.; MADEJA, Z.; REIK, W.; HEMBERGER, M. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 11, p. 1280–90, 2008.

NIU, Y.; ZHAO, X.; WU, Y.-S.; LI, M.-M.; WANG, X.-J.; YANG, Y.-G. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2013.

NOVAKOVIC, B.; RAKYAN, V.; NG, H. K.; MANUELPILLAI, U.; DEWI, C.; WONG, N. C.; MORLEY, R.; DOWN, T.; BECK, S.; CRAIG, J. M.; SAFFERY, R. Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first-trimester cytotrophoblasts. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 9, p. 547–54, 2008.

O'CALLAGHAN, C. A.; BELL, J. I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Immunological Reviews**, v. 163, p. 129–38, jun. 1998.

O'GORMAN, G. M.; AL NAIB, A.; NAIB, A. Al; ELLIS, S. a; MAMO, S.; O'DOHERTY, A. M.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Regulation of a bovine nonclassical major histocompatibility complex class I gene promoter. **Biology Of Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 296–306, 2010.

PAN, G.; TIAN, S.; NIE, J.; YANG, C.; RUOTTI, V.; WEI, H.; JONSDOTTIR, G. A.; STEWART, R.; THOMSON, J. A. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 3, p. 299–312, 2007.

PASTOR, W. A.; PAPE, U. J.; HUANG, Y.; HENDERSON, H. R.; LISTER, R.; KO, M.; MCLOUGHLIN, E. M.; BRUDNO, Y.; MAHAPATRA, S.; KAPRANOV, P.; TAHILIANI, M.; DALEY, G. Q.; LIU, X. S.; ECKER, J. R.; MILOS, P. M.; AGARWAL, S.; RAO, A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 394–7, 2011.

PATEL, O. V; YAMADA, O.; KIZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; TAKAHASHI, S.; IZAIKE, Y.; SCHULER, L. a; TAKEZAWA, T.; HASHIZUME, K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancies. **Biology Of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1114–20, 2004.

PEREIRA, F. T. V.; OLIVEIRA, L. J.; BARRETO, R. D. S. N.; MESS, A.; PERECIN, F.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; MIGLINO, M. A.; PIMENTEL, J. R.; NETO, P. F.; MEIRELLES, F. V. Fetal-Maternal Interactions in the Synepitheliochorial Placenta Using the eGFP Cloned Cattle Model. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e64399, 2013.

PETERS, A. H.; O'CARROLL, D.; SCHERTHAN, H.; MECHTLER, K.; SAUER, S.; SCHÖFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K.; PAGANI, M.; LACHNER, M.; KOHLMAIER, A.; OPRAVIL, S.; DOYLE, M.; SIBILIA, M.; JENUWEIN, T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 323–37, 2001.

PETERSON, C. L.; LANIEL, M. Histones and histone modifications. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. R546–551, 2004.

PIYATHILAKE, C. J.; BELL, W. C.; JONES, J.; HENAO, O. L.; HEIMBURGER, D. C. Patterns of global DNA and histone methylation appear to be similar in normal , dysplastic and neoplastic oral epithelium of humans. **Disease Markers**, v. 21, n. 3, p. 147–151, 2005.

POGRIBNY, I. P.; BELAND, F. A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 14, p. 2249–61, 2009.

QIAO, Y.; WANG, R.; YANG, X.; TANG, K.; JING, N. Dual Roles of Histone H3 Lysine 9 Acetylation in Human Embryonic Stem Cell Pluripotency and Neural Differentiation. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 2508–2520, 2015.

REMMELE, W.; STEGNER, H. E. Vorschlag zur einheitlichen definition eines Immunreaktiven Score (IRS) fur den immunhistochemischen Ostrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical . **Der Pathologe**, v. 8, n. 3, p. 138–40, 1987.

RICI, R. E. G.; FACCIOTTI, P. R.; AMBRÓSIO, C. E.; MARIA, D. A.; KFOURY, J. R.; BERTOLINI, M.; MIGLINO, M. A. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 29–38, 2009.

RILEY, P.; ANSON-CARTWRIGHT, L.; CROSS, J. C. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 271–5, 1998.

ROCHA, R. M.; MILLER, K.; SOARES, F.; VASSALLO, J.; SHENKA, N.; GOBBI, H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast cancer. **Applied Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 112–117, 2009.

RUGG-GUNN, P. J. Epigenetic features of the mouse trophoblast. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 1, p. 21–30, 2012.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Current Biology**, v. 13, n. 13, p. 1116–21, 2003.

SERMAN, L.; VLAHOVIĆ, M.; SIJAN, M.; BULIĆ-JAKUS, F.; SERMAN, A.; SINCIĆ, N.; MATIJEVIĆ, R.; JURIĆ-LEKIĆ, G.; KATUSIĆ, A. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. **Placenta**, v. 28, n. 8-9, p. 803–11, 2007.

SHOCK, L. S.; THAKKAR, P. V; PETERSON, E. J.; MORAN, R. G.; TAYLOR, S. M. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 108, n. 9, p. 3630–5, 2011.

SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Reviews. Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204–20, 2013.

SOUSA, P. A. De; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of Gestational Deficiencies in Cloned Sheep Fetuses and Placenta. **Biology Of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 23–30, 2001.

STEINBORN, A.; VARKONYI, T.; SCHARF, A.; BAHLMANN, F.; KLEE, A.; SOHN, C. Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 4, p. 277–86, 2007.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. January, p. 41–45, 2000.

SUGIMOTO, J.; SCHUST, D. J. Review: human endogenous retroviruses and the placenta. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 11, p. 1023–33, 2009.

TACHIBANA, M.; SUGIMOTO, K.; NOZAKI, M.; UEDA, J.; OHTA, T.; OHKI, M.; FUKUDA, M.; TAKEDA, N.; NIIDA, H.; KATO, H.; SHINKAI, Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. **Genes & Development**, v. 16, n. 14, p. 1779–91, jul. 2002.

TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930–5, 2009.

TEKLENBURG, G.; WEIMAR, C. H. E.; FAUSER, B. C. J. M.; MACKLON, N.; GEIJSEN, N.; HEIJNEN, C. J.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; KUIJK, E. W. Cell lineage specific distribution of H3K27 trimethylation accumulation in an in vitro model for human implantation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–7, 2012.

TIAN, X. C. Genomic Imprinting in Farm Animals. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 2, p. 23–40, 2014.

TILBURGS, T.; SCHERJON, S. A.; VAN DER MAST, B. J.; HAASNOOT, G. W.; VERSTEEG-V D VOORT-MAARSCHALK, M.; ROELEN, D. L.; VAN ROOD, J. J.; CLAAS, F. H. J. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 82, n. 2, p. 148–57, 2009.

TOYE, P. G.; MACHUGH, N. D.; BENSAID, A. M.; ALBERTI, S.; TEALE, A. J.; MORRISON, W. I. Transfection into mouse L cells of genes encoding two serologically and functionally distinct bovine class I MHC molecules from a MHC-homozygous animal: evidence for a second class I locus in cattle. **Immunology**, v. 70, n. 1, p. 20–6, 1990.

VLAHOVIĆ, M.; BULIĆ-JAKUS, F.; JURIĆ-LEKIĆ, G.; FUCIĆ, A.; MARIĆ, S.; SERMAN, D. Changes in the placenta and in the rat embryo caused by the demethylating agent 5-azacytidine. **The International Journal Of Developmental Biology**, v. 43, n. 8, p. 843–6, 1999.

WABY, J. S.; CHIRAKKAL, H.; YU, C.; GRIFFITHS, G. J.; BENSON, R. S. P.; BINGLE, C. D.; CORFE, B. M. Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 275, 2010.

WADDINGTON, C. H. **Organisers & genes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1940.

WAGSCHAL, A.; SUTHERLAND, H. G.; WOODFINE, K.; HENCKEL, A.; CHEBLI, K.; SCHULZ, R.; OAKEY, R. J.; BICKMORE, W. a; FEIL, R. G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. **Molecular And Cellular Biology**, v. 28, n. 3, p. 1104–1113, 2008.

WELLS, D. N. Animal cloning : problems and prospects Current efficiency of somatic cell nuclear transfer. **Revue Scientifique Et Technique (International Office Of Epizootics)**, v. 24, n. 1, p. 251–264, 2005.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; PEDERSEN, M. T.; JOHANSEN, J. V; CLOOS, P. A. C.; RAPPSILBER, J.; HELIN, K. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 343–8, 2011.

WOODING, F. B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, n. 2, p. 101–13, 1992.

WU, H.; D'ALESSIO, A. C.; ITO, S.; WANG, Z.; CUI, K.; ZHAO, K.; SUN, Y. E.; ZHANG, Y. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Genes & Development**, v. 25, n. 7, p. 679–84, 2011.

WU, H.; D'ALESSIO, A. C.; ITO, S.; XIA, K.; WANG, Z.; CUI, K.; ZHAO, K.; SUN, Y. E.; ZHANG, Y. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 389–393, 2013.

WU, H.; ZHANG, Y. Tet1 and 5-hydroxymethylation: A genome-wide view in mouse embryonic stem cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2428–2436, 2011.

XU, Y.; WU, F.; TAN, L.; KONG, L.; XIONG, L.; DENG, J.; BARBERA, A. J.; ZHENG, L.; ZHANG, H.; HUANG, S.; MIN, J.; NICHOLSON, T.; CHEN, T.; XU, G.; SHI, Y.; ZHANG, K.; SHI, Y. G. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. **Molecular Cell**, v. 42, n. 4, p. 451–64, 2011.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. a; RENARD, J.-P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295–302, 2007.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews Of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–63, 1998.

YUAN, P.; HAN, J.; GUO, G.; ORLOV, Y. L.; HUSS, M.; LOH, Y.-H.; YAW, L.-P.; ROBSON, P.; LIM, B.; NG, H.-H. Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. **Genes & Development**, v. 23, n. 21, p. 2507–20, 2009.

ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation : beyond histones. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 1, p. 14–27, 2012.

ZHOU, B. O.; ZHOU, J.-Q. Recent transcription-induced histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation inhibits gene reactivation. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34770–6, 2011.

ZHU, X.; HAN, T.; YIN, G.; WANG, X.; YAO, Y. Expression of Human Leukocyte Antigen-G during Normal Placentation and in Preeclamptic Pregnancies. **Hypertension In Pregnancy**, v. 31, n. 252-260, 2012.