NATHIA NATHALY RIGOGLIO

Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos

São Paulo

2016

NATHIA NATHALY RIGOGLIO

Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos

VERSÃO CORRIGIDA

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Lawrence Charles Smith

De acordo. _____

Orientador(a)

São Paulo

2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3301
FMVZ

Rigoglio, Nathia Nathaly
Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos / Nathia Nathaly Rigoglio. -- 2016.
153 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Lawrence Charles Smith.

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Desenvolvimento do sistema nervoso central. 3. Gestação gemelar. 4 Transferência nuclear de células somáticas (TNCS). 5. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Controle Epigenético do gene imprited SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos", protocolado sob o nº 2573/2012, utilizando 12 (doze) mulas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Epigenetic control of SNRPN imprinted gene during the development and nuclear repromming in equids", protocol number 2573/2012, utilizing 12 (twelve) mules, under the responsibility Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 3 de março de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIGOGLIO, Nathia Nathaly

Título: Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos

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 titulo 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

À Deus, pois nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos nele.

Aos meus pais, Enrico Giuseppe Rigoglio e Idalina Gomes de Abreu Rigoglio. Através de muito esforço e sacrifício permitiram que eu chegasse até aqui e me tornasse a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste doutorado, e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) por ter possibilitado o estágio de intercâmbio.

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

A Université de Montréal (UdeM), que por meio das instalações do Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA) permitiu a realização do estágio de intercâmbio.

Ao Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, pela confiança depositada durante o desenvolvimento do projeto e pela orientação concedida durante esses anos.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pela co-orientação e por todo o auxílio, ensinamentos e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bruce Murphy, por todo o apoio para realização do estágio de intercâmbio.

A Jacinthe Therrien, pela ajuda na realização dos experimentos realizados na Université de Montreal.

Aos Professores Doutores Luciano Andrade Silva (FZEA-USP) e Júlio Cesar Ferraz Jacob, e seus alunos, por produzirem os embriões e fetos muares utilizados neste trabalho.

A toda equipe da FMVZ – USP, Jaqueline, Ronaldo, Rose que ajudaram no que foi necessário no Departamento.

Aos amigos Dayane Alcântara, Paula Fratini, Patrícia Romagnolli e Rodrigo da Silva Nunes Barreto pelo companheirismo tornando a caminhada mais fácil.

Deus dá as batalhas mais difíceis aos seus melhores soldados

RESUMO

RIGOGLIO, N. N. **Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em eqüídeos.** [Epigenetic control of the SNRPN imprinted gene during developmental and nuclear reprogramming in equids]. 2016. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A tranferência nuclear de células somáticas (TNCS) está sendo utilizada para produzir cavalos de elite. No entanto, durante este procedimento pode ocorrer a perfuração da zona pelúcida, levando, ocasionalmente, à secção da massa celular interna, e conseqüente derivação de gêmeos monozigóticos. Além de serem relatadas alterações no processo de *imprinting* genômico, que conduzem ao desenvolvimento de doenças. Com a descoberta da possibilidade de reprogramar as células somáticas a um estado de pluripotência (iPSCs), estas células passaram a ser muito utilizadas em pesquisas de neurociência. Contudo, também ocorrem modificações epigenéticas durante esta reprogramação celular. Portanto, nossas hipóteses são que os gêmeos eqüinos gerados pela TNCS podem levar às irregularidades no desenvolvimento do sistema nervoso. O padrão de metilação do SNRPN nas estruturas dos fetos muares clonados, e as células iPSCs são diferentes dos padrões encontrados nos muares analisados. A expressão dos genes SNRPN, Necdin e UBE3A são maiores no cérebro, enquanto a expressão do H19 é maior nas membranas extra-embrionárias. Em nosso estudo, obtivemos duas gestações gemelares equinas derivadas da TNCS, que foram interrompidas com 40 e 60 dias de gestação, e comparados com gestações eqüinas únicas de idade similar. Diferenças no comprimento entre os embriões gêmeos foram observadas aos 40 (2.0 e 2.2 cm – 10%) e aos 60 (6,5 e 8,5 cm – 24%) dias de gestação. Somente o plexo coróide do quarto ventrículo apresentou-se mais desenvolvido nos fetos com maior comprimento. Ao analisarmos fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais e compará-los com muares, nos períodos embrionário, fetal e adulto, não foi observada diferença no padrão de metilação do gene SNRPN. No entanto, na décima passagem das células iPSC o padrão de metilação alterou, em relação aos muares estudados e ao padrão observado nos fibroblastos. Ao analisarmos os fetos clonados nas diferentes idades gestacionais observou-se no

cérebro menor expressão dos gene H19 e UBE3A, e maior expressão do gene SNRPN. Contudo, a expressão do gene Necdin variou entre as estruturas estudadas. Em conclusão, apesar dos gêmeos eqüinos provenientes de TNCS diferirem quanto ao tamanho, morfologicamente são iguais. Dentre as estruturas cerebrais o plexo coróide se apresentou mais desenvolvido nos fetos de maior comprimento. Os fetos muares clonados não apresentaram diferença no padrão de metilação do gene SNRPN. No entanto, as iPSCs apresentaram alteração no padrão de metilação deste gene na décima passagem. Embora os genes SNRPN, Necdin e UBE3A sejam expressos no cérebro, o SNRPN apresentou-se prevalente nessa estrutura.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário. Desenvolvimento do sistema nervoso central. Gestação gemelar. Transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Células pluripotentes induzidas (iPSC).

ABSTRACT

RIGOGLIO, N. N. **Epigenetic control of the SNRPN imprinted gene during developmental and nuclear reprogramming in equids.** [Controle epigenético do gene imprinted SNRPN durante o desenvolvimento e reprogramação nuclear em equídeos]. 2016. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The nuclear transfer of somatic cells (SCNT) is being used to produce elite horses. However, during this procedure can occur drilling of the zona pellucida, leading occasionally to the section of the inner cell mass, and subsequent derivation of monozygotic twins. Besides being related changes in genomic imprinting process, leading to the development of diseases. With the discovery of the possibility to reprogram somatic cells to a pluripotent state (iPSCs), these cells have become widely used in neuroscience research. However, also occur epigenetic changes during this cellular reprogramming. Therefore, our hypothesis is that equine twins caused by equine ART could lead to developmental irregularities of the nervous system. The patterns of SNRPN methylation in the structures of cloned mule fetuses and in iPSCs are different from the patterns found in the analyzed mules. And the expression of SNRPN, Necdin and UBE3A genes are higher in the brain, while the higher expression of H19 gene occurs in the extraembryonic membranes. In our study we derived two equine twin SCNT pregnancies that were interrupted at 40 and 60 days of gestation and compared to singleton fetuses of similar age. Differences in lengths between twin embryos were observed at both 40 (2.0 and 2.2 cm – 10%) and 60 (6.5 and 8.5 cm – 24%) days of gestation. Only the choroid plexus in the fourth ventricle more developed in the twins with the greatest length. Analyzing mules cloned fetuses at different gestational ages, and compare them with mules at embryonic, fetal and adult period; there was no difference in the pattern of methylation in SNRPN gene. However, in the tenth passage of the iPSCs the methylation pattern was altered in relation to the studied mules and the pattern observed in fibroblasts. When the cloned fetuses at different gestational ages were analyzed, the brain presented lower expression of H19 and UBE3A genes, and higher expression of SNRPN gene. However, the expression of Necdin gene varied among the structures studied. In conclusion, despite the twin horses from SCNT

differ in size, they are morphologically identical. Among the brain structures the choroid plexus performed more developed in the fetuses of greater length. Cloned mules fetuses showed no difference in the pattern of methylation SNRPN gene. However, iPSCs have changes in the pattern of methylation of this gene in the tenth passage. Although SNRPN, Necdin and Ube3A genes are expressed in the brain, SNRPN is prevalent in this structure.

Keywords: Embryonic development. Central nervous system development. Twin pregnancy. Somatic cell nuclear transfer (SCNT). Induced pluripotent stem cell (iPSC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos padrões de expressão de genes não *imprinted versus* genes *imprinted*.....26
Figura 2 - Estabelecimento, manutenção e deleção dos *imprints* genômicos no desenvolvimento dos mamíferos.....27
Figura 3 - Regiões envolvidas nas doenças associadas a transcritos senso e anti-senso do gene SNURF/SNRPN. 31
Figura 4 - Desenvolvimento inicial do embrião eqüino. 39
Figura 5 - Membranas extra-embrionárias em conceptos eqüinos.....40
Figura 6 - Representação esquemática do locus bi-cistrônico SNURF/SNRPN no *E. caballus* e *E. asinus*. 55
Figura 7 - Perfis de metilação em tecidos adultos das duas éguas e do jumento. .56
Figura 8 - Comparação dos perfis de metilação das éguas e do jumento.....57
Figura 9 - Comparação dos perfis de metilação entre as mulas fêmeas e machos. 57
Figura 10 - Comparação dos perfis de metilação entre os embriões muares em diferentes idades gestacionais e do feto muar com 50 dias de gestação. 59
Figura 11 - Comparação dos perfis de metilação entre os tecidos extra-embrionários e embrionários de fetos muares com 40, 42 e 44 dias de gestação. 61
Figura 12 - Comparação dos perfis de metilação entre os fibroblastos da mula 04 e dos clones gerados a partir destes fibroblastos com 26 e 42 dias de gestação.....62
Figura 13 - Comparação dos perfis de metilação entre as diferentes colônias de iPSCs geradas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação na primeira e décima passagens. 63
Figura 14 - Expressão dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A nos embriões muares com diferentes idades gestacionais.....69
Figura 15 - Expressão dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A nas membranas extra-embrionárias e tecidos de feto muar com 50 dias de gestação. ...71
Figura 16 - Expressão do gene H19 nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais. 72

Figura 17 - Expressão do gene H19 nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle). 73
Figura 18 - Expressão do gene SNRPN nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais. 74
Figura 19 - Expressão do gene SNRPN nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle). 75
Figura 20 - Expressão do gene Necdin nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais. 76
Figura 21 - Expressão do gene Necdin nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle). 77
Figura 22 - Expressão do gene UBE3A nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais. 78
Figura 23 - Expressão do gene UBE3A nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle). 79
Figura 24 - Células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) derivadas de fibroblastos muares e diferenciação neuronal 89
Figura 25 - Desenvolvimento das membranas embrionárias em conceptos muares. 96
Figura 26 - Desenvolvimento de conceptos muares.....98
Figura 27 - Estruturas do sistema nervoso central em conceptos muares. 100
Figura 28 - Conceptos equinos clonados em gestação gemelar (40 dias). 114
Figura 29 - Microscopia do Sistema Nervoso Central dos fetos eqüinos clonados em gestação gemelar (40 dias). 115
Figura 30 - Estruturas da coluna vertebral do feto eqüino clonado em gestação gemelar (40 dias). 116
Figura 31 - Desenvolvimento fetal e do cérebro de fetos equinos clonados em gestação gemelar (60 dias). 118
Figura 32 - Estruturas do cérebro dos fetos equinos clonados em gestação gemelar (60 dias). 120

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Metilação das éguas e do jumento.....64
Tabela 2- Metilação das mulas adultas 64
Tabela 3- Metilação dos conceptos muares em diferentes idades gestacionais....65
Tabela 4- Metilação de embrião de clones muares em diferentes idades gestacionais 66
Tabela 5- Metilação de fibroblastos da mula 04 e dos clones com 26 e 42 dias de gestação.....67
Tabela 6- Metilação das células iPSCs geradas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação.....67
Tabela 7- Comparação das características morfológicas das membranas extra-embrionárias entre embriões eqüinos, asininos e muares 103
Tabela 8- Comparação das características morfológicas entre conceptos eqüinos e muares 105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) 52
Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores.....54
Quadro 3 - Meio de cultivo de células iPS.....87
Quadro 4 - Meio de indução Neuronal.....88
Quadro 5 - Meio de Diferenciação Neuronal 88

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
CGPs	Células Germinativas Primordiais
CpGs	Dinucleotídeos ricos em citosina e guanina
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ESCs	Células-tronco embrionárias
FIV	Fertilização *in vitro*
G	Guanina
IC	Centro de imprinting
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide
ICR	Região de controle do imprinting
iPSC	Células tronco pluripotente induzidas
PCR	Cadeia de reação da polimerase
PGE2	Prostaglandina 2
PGF2α	Prostaglandina F2α
SA	Síndrome de Angelman
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N
SPW	Síndrome de Prader-Willi
TE	Transferência de embrião
TRA	Tecnologia de Reprodução Assistida

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....20
1.1 REVISÃO DE LITERATURA 23
1.1.1 Epigenética..... 23
1.1.2 Imprinting Genômico 24
1.1.2.1 Novas Biotecnologias na Reprodução Animal 28
1.1.2.2 Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) 29
1.1.3 Genes *Imprinted* estudados..... 30
1.1.3.1 SNRPN 30
1.1.3.2 Necdin e Ube3A..... 31
1.1.3.3 H19 33
1.1.4 Aspectos Gerais Relacionadis à Biologia dos Equídeos 35
1.1.5 Características da Placenta no Desenvolvimento embrionário dos Equídeos..... 36
1.1.6 Gestação Gemelar em Éguas..... 42
1.1.7 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em Equídeos 44
1.1.7.1 Desenvolvimento do Cérebro..... 45
2 INTRODUÇÃO.....48
2.1 MATERIAL E MÉTODOS 50
2.1.1 Embriões e Tecidos..... 50
2.1.2 Extração do DNA e RNA..... 51
2.1.3 Tratamento Bissulfito 51
2.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... 52
2.1.5 Ligação e Transformação..... 53
2.1.6 Minipreparações (Minipreps) 53
2.1.7 Detecção da expressão gênica por qRT-PCR 54
2.2 RESULTADOS 55
2.2.1 Identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região diferencialmente metilada (DMR) 55
2.2.2 Caracterização das sequências DMR do gene SNRPN/SNURF em equídeos 56

2.2.3 Perfis de metilação do SNRPN em tecidos de eqüinos, jumento e mulas adultas 56
2.2.4 Perfis de metilação do SNRPN em tecido extra-embrionário e embrionário em conceptos muares em diferentes idades gestacionais 58
2.2.5 Perfis de metilação de conceptos muares clonados em diferentes idades gestacionais 60
2.2.6 Perfis de metilação dos fibroblastos da mula 04 e dos clones com 26 e 42 dias de gestação 62
2.2.7 Perfis de metilação das iPSCs reprogramadas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação 62
2.2.8 Análise quantitativa por PCR em tempo real dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A em embriões muares com diferentes idades gestacionais 68
2.2.9 Análise quantitativa por PCR em tempo real dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A em feto muar com 50 dias de gestação 70
2.2.10 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene H19 71
2.2.11 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene SNRPN 73
2.2.12 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene Necdin 75
2.2.13 Análise quantitativa por PCr em tempo real do gene UBE3A 77
2.3 DISCUSSÃO 79
2.4 CONCLUSÕES 82
3 INTRODUÇÃO 84
3.1 MATERIAL E MÉTODOS 85
3.1.1 Cultivo de fibroblastos de feto muar 85
3.1.2 Cultivo das células iPSCs 86
3.1.3 Diferenciação neuronal 87
3.2 RESULTADOS 88
3.3 DISCUSSÃO 89
3.4 CONCLUSÕES 91
4 INTRODUÇÃO 93
4.1 MATERIAL E METODOS 94

4.1.1 Produção, coleta e mensurações dos conceptos muares 94
4.2 RESULTADOS 95
4.2.1 Desenvolvimento das Membranas Extra-embrionárias de conceptos Muares 95
4.2.2 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e dos Conceptos Muares 96
4.2.2.1 Desenvolvimento do Cérebro de Conceptos Muares 99
4.3 DISCUSSÃO 100
4.4 CONCLUSÕES.....108
5 INTRODUÇÃO.....110
5.1 MATERIAL E MÉTODOS 112
5.1.1 Produção, coleta e mensurações dos fetos eqüinos clonados 112
5.1.2 Microscopia de luz 112
5.2 RESULTADOS 113
5.2.1 Desenvolvimento de fetos eqüinos clonados de gestação gemelar 113
5.3 DISCUSSÃO 121
5.4 CONCLUSÕES.....123
REFERÊNCIAS 124

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a equideocultura deu um salto qualitativo, havendo hoje, no mercado, animais de alto valor e geneticamente superiores. Isso foi possível, em grande parte, devido aos avanços na reprodução animal. Passou-se a estudar novos métodos para aumentar o número de potros produzidos. Uma das primeiras técnicas utilizadas foi a transferência de embriões (TE).

A partir do desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (CHOI et al., 2002a; LAZZARI et al., 2002), deu-se o início na produção de blastocisto *in vitro*, na maturação de oócitos e cultivo do blastocisto para transferência cervical, o que levou a um progresso na reprodução assistida desta espécie (COLLEONI et al., 2007). Outra técnica de reprodução assistida (TRA) que pode ser utilizada na reprodução de eqüídeos é a transferência nuclear de células somáticas (TNCS). O primeiro sucesso na clonagem em equídeos foi relatado em 2003 (WOODS et al., 2003).

No entanto, hoje em dia, questiona-se quanto à segurança no uso das TRA, pois há estudos relatando que a manipulação dos embriões, a maturação dos gametas *in vitro*, a fertilização *in vitro* (FIV), a ICSI, e a TNCS podem causar danos no processo de *imprinting* genômico levando a um *imprinting* anormal e, consequentemente, às suas doenças correlacionadas (DE RYCKE; LIEBAERS; VAN STEIRTEGHEM, 2002; THOMPSON et al., 2002; DeBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003).

Outro procedimento que está sendo relacionado ao imprinting genômico anormal é a indução à pluripotência, técnica que foi descrita por Takahashi e Yamanaka (2006). As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) obtidas a partir de células de diversos tecidos são capazes de serem diferenciadas por indução gênica, permitindo a geração de diversos tipos celulares e que podem gerar novos modelos *in vitro* de síndromes.

O *imprinting* é uma forma de hereditariedade não Mendeliana, na qual apenas um dos dois alelos parentais está expresso de maneira específica ao sexo. Assim, essa marcação epigenética diferencial de um dos alelos leva à expressão mono-alélica. Os genes *imprinted* têm uma grande importância no desenvolvimento normal do embrião, bem como na regulação do seu crescimento, na função placentária e nos

processos neuro-comportamentais (McGRATH; SOLTER, 1984; SURANI; BARTON; NORRIS, 1984).

A metilção do DNA é um mecanismo de regulação epigenética que atua na expressão gênica, sendo um importante marcador molecular com relação à expressão parental específica de genes que estão sujeitos ao *imprinting* genômico (REIK; WALTER, 2001). A metilação dos dinucleotídeos CpGs, que são sequências ricas em citosina (C) e guanina (G) no genoma, está diferencialmente estabelecida nos dois cromossomos parentais. Essas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) nos genes *imprinted*, normalmente apresentam-se metiladas em um dos alelos parentais e não metiladas no outro alelo. Para que a próxima geração herde essa marcação epigenética, as marcas precisam ser deletadas nas células germinativas primordiais (CGPs) (LEE et al., 2002; HAJKOVA et al., 2002) e re-estabelecidas durante a gametogênese de maneira específica ao sexo (WEAVER; SUSIARJO; BARTOLOMEI, 2009).

Além de ser um dos primeiros genes associados ao *imprinting* genômico, o SNRPN, é um dos genes mais estudados. Os genes *imprinted* são frequentemente encontrados em *clusters*. O gene SNRPN possui uma DMR bem definida, na qual não controla somente o *imprinting*, mas que também regula os demais genes do *cluster* (SHEMER et al., 1997). Dentre estes, encontra-se a Necdin e da UBE3A, que estão relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso central.

Nos humanos, o gene SNRPN é um gene *imprinted* que está localizado no cromossomo 15q11-q13, em uma região envolvida nas Síndromes de Prader-Willi (SPW) e Angelman (SA). Nos camundongos, o gene SNRPN está localizado no cromossomo 7C, e o padrão de metilação é estabelecido nos oócitos em crescimento quando estão na fase diplótena da meiose (LUCIFERO et al., 2006). Nos bovinos, foi descrito que o gene SNRPN é maternalmente *imprinted* nos embriões em período de pré-implantação, e que apresenta uma DMR bem caracterizada (LUCIFERO et al., 2006).

Os objetivos do nosso estudo foram caracterizar a seqüência das DMRs do gene imprinted SNURF/SNRPN nos equídeos, e identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) específicos nas éguas e no jumento. Analisar o padrão de metilação em éguas, jumento e mulas adultas; embriões muares; fetos muares clonados e células iPSCs. Analisar quantitativamente a expressão dos genes H19,

SNRPN, Necdin e UBE3A em fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais.

Além de reprogramar os fibroblastos de feto muar para gerar células iPSCs, e realizar diferenciação neuronal destas células; analisar o desenvolvimento de conceptos muares em diferentes idades gestacionais para verificar se houve taxa de crescimento e desenvolvimento superior ou inferior aos conceptos eqüinos, e avaliar o desenvolvimento de conceptos eqüinos clonados provenientes de gestação gemelar, comparando-os com conceptos eqüinos não clonados, e entre si, a fim de verificar se há deficiência no seu desenvolvimento.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Epigenética

A interação dos genes com o ambiente possibilitando a existência de diferentes fenótipos foi a definição utilizada por Conrad Waddington (1940) para explicar o termo epigenética. No entanto, Holliday e Pugh (1975) para explicar a hipótese de Waddington propuseram a ocorrência de modificações químicas no DNA. Contudo, uma nova definição foi sugerida após o descobrimento de que a inativação do cromossomo X em mamíferos e o imprinting genômico são regulados por mecanismos complexos e multifatoriais. Assim, o termo epigenética passou a ser descrita como mudanças hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem que haja uma mudança na sequência do DNA, incluindo a modificação da metilação no DNA e remodelação da cromatina (WOLFE, MATZKA, 1999; WOLFFE, GUSCHIN, 2000).

Os mecanismos epigenéticos são parâmetros genômicos flexíveis que podem mudar a função do genoma sob influência externa, e também proporcionam mecanismos que permitem a propagação estável do estado de atividade do gene de uma geração de células para a próxima geração. Molecularmente, os genes imprinted são controlados por marcadores epigenéticos da cromatina, que inclui a metilação do DNA e as modificações das proteínas histonas. Ambos podem silenciar um alelo parental, pois nas sequências do DNA onde estes elementos se encontram não ocorrem transcrição, resultando na expressão monoalélica (LEWIS et al., 2004).

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada, e corresponde à modificação covalente, pela conversão enzimática de diversos resíduos de citosina em 5-metilcitosina, que são herdáveis pelas células somáticas após a divisão celular. As 5-metilcitosinas representam cerca de 2 a 5% de todas as citosinas no genoma dos mamíferos e são encontrados principalmente nos dinucleotídeos CpG (MILLAR et al., 2003; LISTER et al., 2009; ROSILLA et al., 2009).

A metilação da citosina dos dinucleotídeos CpG é encontrada próxima aos elementos *cis* dentro dos promotores ou nos primeiros exons dos genes *housekeeping*, e muitas vezes, está relacionada com o estado da cromatina

comprimida e inibição da transcrição (ORPHANIDES, REINBERG, 2002). Portanto, nos mamíferos, a metilação do DNA é, principalmente, uma marca repressiva encontrada nas citosinas dos dinucleotídeos CpG. Ela também tem papel importante na manutenção da integridade do genoma pelo silenciamento de sequências repetitivas e *transposons* endógenos (BESTOR, 1998; HEDGES, DEININGER, 2007). No entanto, sua regulação é mais dinâmica do que se acreditava anteriormente (MAUNAKAC et al., 2010).

A modificação epigenética do fenótipo celular também é regida por alterações na estrutura da cromatina. A cromatina é formada por um complexo de nucleoproteínas que são capazes de compactar o DNA genômico linear através de uma série de nucleossomos. Cada nucleossomo apresenta 147 pares de base de DNA e estão enroladas em torno do octâmero de proteínas histonas. Cada octâmero é composto por duas cópias de cada uma das quatro histonas: H2A, H2B, H3 e H4.

Através de modificações covalentes das histonas ocorre a incorporação de variantes nas histonas dentro dos nucleossomos (SAHA et al., 2006). Dentre as modificações covalentes, tem-se a acetilação, a metilação, a fosforilação e a ubequitinação (MURRELL et al., 2005). A acetilação da histona, normalmente, está associada com a atividade transcricional devido à redução da afinidade das proteínas histonas no DNA, ocorrendo um relaxamento da compactação da cromatina. Contudo, a metilação das histonas pode resultar em diversas conseqüências transcricionais, pois depende do número de histonas e do resíduo de lisina modificados (KOUZARIDES, 2007). Cada resíduo de lisina pode ser mono-, di- ou tri-metilado, e isto faz com que haja um complexo enorme para o código de histona (JENUWEIN, ALLIS, 2001).

1.1.2 Imprinting Genômico

O desenvolvimento normal dos embriões de mamíferos requer a contribuição genética dos genomas materno e paterno, pois há distinções entre as características fenotípicas destes (BARTON; SURANI; NORRIS, 1984). No entanto, houve crescente evidência sugerindo que as contribuições relativas dos cromossomos homólogos materno e paterno são desiguais. O suporte para este conceito veio de

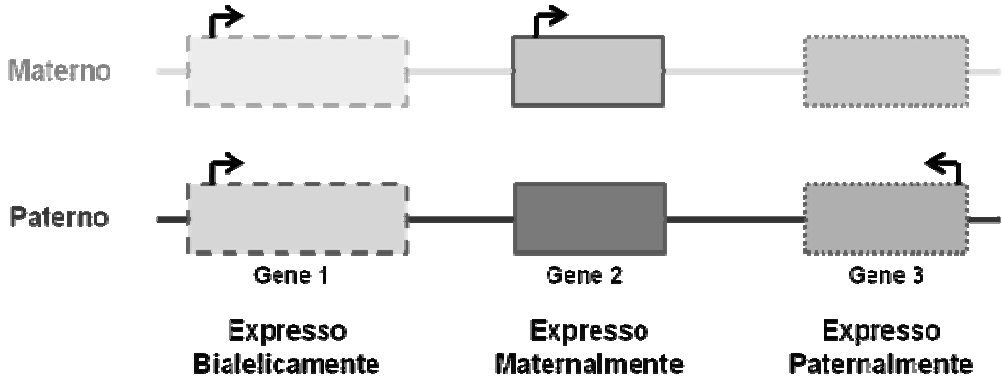
experimentos embriológicos em camundongos (BARTON et al, 1985), em que foram gerados embriões ginogenéticos contendo apenas o genoma materno, e androgenéticos contendo apenas o genoma paterno (SURANI; BARTON; NORRIS, 1984; BARTON; SURANI; NORRIS, 1984).

Além de verificar que era inviável o desenvolvimento normal destes embriões (McGRATH; SOLTER, 1984; SURANI; BARTON; NORRIS, 1984), os produtos androgenéticos apresentaram exclusivamente o desenvolvimento extra-embrionário, enquanto os ginogenéticos apresentaram uma placenta pouco desenvolvida, porém os embriões eram visíveis (BARTON; SURANI; NORRIS, 1984). Assim, provavelmente o genoma de origem materna é crítico para o desenvolvimento do embrião propriamente dito, e o genoma paterno é necessário para o desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários (PARK et al., 2011).

A não equivalência na expressão gênica é denominada *imprinting* genômico, e resulta na expressão monoalélica específica do gene dependendo da origem parental do alelo (WAGSCHAL; FEIL, 2006; BISCHOFF et al., 2009). Assim, a regulação na expressão desses genes, sem que haja uma mudança na sequência dos ácidos nucléicos é definida como modificação epigenética (SURANI, 1998; TILGHMAN, 1999). O *imprinting* é um mecanismo genético importante, uma vez que, alguns genes são silenciados ou expressos, dependendo exclusivamente de sua herança materna ou paterna (FEIL et al., 1994).

Consequentemente, alguns genes *imprinted* são expressos apenas no alelo materno, enquanto é silenciado no alelo paterno (maternalmente expressos/paternalmente *imprinted*) (Figura 1, gene 2). Outros genes *imprinted* são expressos no alelo paterno, e, silenciado no alelo materno (paternalmente expressos/maternalmente *imprinted*) (Figura 1, gene 3). Este padrão da expressão do gene anormal é resultado de marcas específicas estabelecidas nas regiões únicas dos genes durante a gametogênese (LI, SASAKI, 2011), que proporcionam os *imprints* nos genes de acordo com sua origem parental.

Figura 1 - Ilustração esquemática dos padrões de expressão de genes não *imprinted versus* genes *imprinted*

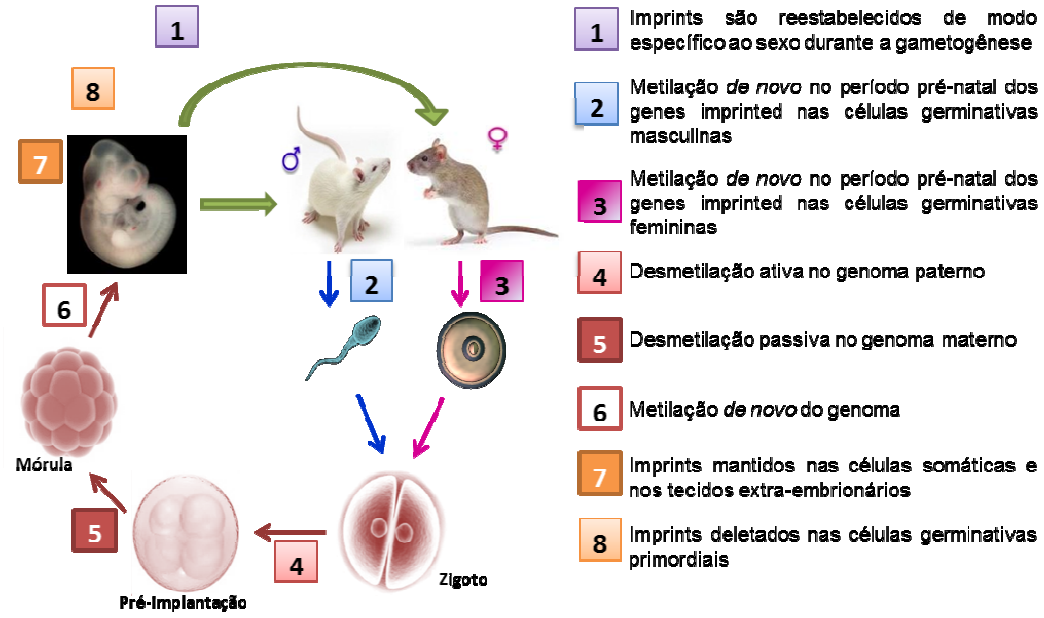


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Gene 1 não é *imprinted* e é expresso (seta dobrada) tanto no cromossomo materno (cinza claro) quanto no paterno (cinza escuro), ou seja, expresso bialelicamente. O gene 2 é expresso maternalmente, sendo transcrito dentro do mRNA a partir apenas de uma cópia do genoma materno, localizado no cromossomo materno, enquanto que o mesmo gene no cromossomo paterno está silenciado (expressão monoalélica). O inverso do gene 2 é verdadeiro para o gene 3, onde o gene é expresso paternalmente.

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil na posição do caborno 5 da citosina (NAKAO, 2001). Normalmente, a metilação do DNA é estabelecida de forma específica ao sexo na linhagem germinativa, e este padrão de metilação se mantém após a fertilização. Nas células somáticas a metilação é mantida durante toda a vida do organismo, porém na linhagem germinativa, primeiramente, precisa ser deletada (LEE et al., 2002; HAJKOVA et al., 2002) para depois ser re-estabelecida para garantir a herança dos *imprints* na próxima geração. A manutenção destes *imprints* deve sobreviver à segunda reprogramação epigenética que ocorre durante a pré-implantação do embrião em desenvolvimento (WEAVER; SUSIARJO; BARTOLOMEI, 2009) (Figura 2). A falha desses mecanismos de regulação leva à alteração na expressão gênica e resulta em anomalias do desenvolvimento e cânceres (FEINBERG; TYCKO, 2004; ARNAUD; FEIL, 2005).

Figura 2 - Estabelecimento, manutenção e deleção dos *imprints* genômicos no desenvolvimento dos mamíferos



Fonte: Rigoglio (2014)

Legenda: Na linhagem germinativa, as CGPs sofrem várias alterações na estrutura da cromatina e desmetilação do DNA durante a migração para o "cume" genital. Os *imprints* são então adquiridos de forma específica ao sexo, na linhagem germinativa, onde a metilação do DNA é destinada especificamente às ICRs paterna durante o desenvolvimento do espermatozoide pré-natal, e às ICRs materna na maturação do oócito pós-natal. Esses *imprints* são mantidos, apesar das mudanças globais na metilação do DNA após a fertilização: ocorre uma desmetilação ativa do genoma paterno no zigoto, e uma desmetilação passiva no embrião em período de pré-implantação. A metilação *de novo* do DNA no genoma começa no estágio de mórula, momento no qual os alelos não metilados precisam ser protegido. Esses imprints são mantidos nas células somáticas ao longo da vida do organismo, enquanto os imprints nos tecidos extra-embrionários parecem ser menos dependentes da manutenção da metilação do DNA. Na linhagem germinativa, os imprints são deletados para depois ser re-estabelecida para a próxima geração.

No locus *imprinted*, são encontradas as regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre os alelos materno e paterno, e estão associadas com a expressão específica do alelo parental. Em alguns locus *imprinted*, as DMRs são derivadas do gameta (DMRs da linhagem germinativa), onde a metilação do DNA no gameta é mantido ao longo do desenvolvimento de todas as linhagens somáticas. No entanto, existem DMRs secundárias, que são adquiridas durante o desenvolvimento e associadas com os *imprints* primários no gameta (CONSTANCIA et al., 1998). Embora as DMRs primárias sejam essenciais para o estabelecimento e manutenção do *imprinting* genômico (BOURC'HIS et al., 2001; HATA et al., 2002), não se sabe se as DMRs secundárias controlam diretamente a expressão do gene *imprinted* ou se existem apenas como conseqüência de um evento epigenético.

A metilação das citosinas nos dinucleotídeos CpG, que são seqüências ricas em citosina (C) e guanina (G), e denominadas ilhas CpG, é a modificação hereditária responsável pela atividade funcional de certos locus genômicos e pela estabilidade cromossômica (AZHIKINA; SVERDLOV, 2005). Estas ilhas, geralmente, não são metiladas, e estão associadas com os promotores de genes *housekeeping*. Contudo, também podem ser vistas nos promotores de genes *imprinted*, apresentando-se diferencialmente metiladas. Assim, o alelo repremido está metilado e o alelo ativo não está metilado.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são marcadores genéticos que contribuem para a variação fenotípica, devido à mudança de um único nucleotídeo no genoma. Por isso são utilizados para acompanhar os padrões de herança cromossômica de uma geração para a outra, e também servem como ferramentas para o estudo de fatores genéticos associados às doenças humanas (JOHNSON; TODD, 2000; RISCH, 2000).

Embora dispersos por todo o genoma, os genes *imprinted* são frequentemente encontrados em *clusters*, regulados através de um elemento de controle central, também conhecido como região de controle de *imprinting* (ICR). O estado epigenético de uma ICR e, em particular, o nível de metilação do DNA, tem se mostrado crucial para manter o estado dos genes *imprinted* em um *cluster* (LI; BEARD; JAENISCH, 1993). A deleção da ICR resulta na perda de múltiplos genes *imprinted* no *cluster*, enfatizando sua importância e sua influência regulatória sobre a região multigênica (FITZPATRICK; SOLOWAY; HIGGINS, 2002; LIN et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2006).

1.1.2.1 Novas Biotecnologias na Reprodução Animal

Inicialmente o progresso na reprodução assistida em equinos foi lenta devido à falta de um padrão de fertilização *in vitro* (FIV) que pudesse ser repetidamente bem sucedida. Mas o desenvolvimento de outros métodos que pudessem ser repetidos para a fecundação e produção de embriões teve início com a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (CHOI et al., 2002a; LAZZARI et al.,

2002). A partir desta técnica, iniciou-se a investigação para produção *in vitro* de blastocistos na espécie eqüina. Também foram desenvolvidos métodos de maturação do oócito e cultura do blastocisto para transferência cervical. Esses métodos passaram a ser utilizados para a produção de potros, possibilitando, então, um progresso notável na reprodução assistida nos eqüinos durante os últimos anos (COLLEONI et al., 2007).

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é a técnica utilizada para a clonagem de várias espécies animais, como por exemplo, bovinos, suínos, caprinos, camundongos, ratos, coelhos, felinos e equinos (RHIND et al., 2003). Relata-se a morte pré-natal de muitos animais gerados por esta técnica, a morte perinatal, além dos problemas fisiológicos dos que chegaram à fase adulta (WILMUT et al., 2002).

Há trabalhos sugerindo que o uso da tecnologia de reprodução assistida (TRA), como por exemplo, a FIV em bovinos, a ICSI e a TNCS em equinos, afetam o status de *imprinting* na pré-implantação dos embriões através de fatores ambientais, tais como, as condições da cultura e as manipulações. E, conseqüentemente, alterariam os padrões de expressão do mRNA, que levariam à distúrbios epigenéticos e maior risco na ocorrência de fenótipos aberrantes (DeRYCKE et al., 2002; NIEMANN et al., 2002; POWELL, 2003). E estes fatores podem influenciar nos padrões de metilação (LI et al., 2005), afetando a expressão dos genes imprinted nos embriões nos diferentes estágios do desenvolvimento (MANN et al., 2004).

1.1.2.2 Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)

As células-tronco pluripotentes podem se diferenciar em todos os tipos de células de um organismo e se auto-renovam, sem perder seu potencial de diferenciação (DO; SCHÖLER, 2004). Já as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) são geradas a partir da introdução de fatores transcricionais nas células somáticas. Takahashi e Yamanaka (2006), pela primeira vez, converteram fibroblastos embrionários e fibroblastos da ponta da cauda de camundongos em iPSCs através de um vetor retro-viral mediado por quatro fatores de reprogramação Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc. No entanto, as iPSs reprogramadas a partir de células diferenciadas

sofrem modificação epigenética durante a reprogramação, e podem adquirir um estado epigenético semelhante ao das ESCs.

1.1.3 Genes *Imprinted* estudados

1.1.3.1 SNRPN

A proteína que codifica o gene SNRPN é um polipeptídeo do complexo de ribonucleoproteína nuclear pequena. Esta proteína desempenha um papel no processamento de pré-mRNAs, possivelmente em eventos de *splicing* alternativo tecido-específico (SCHMAUSS; LERNER, 1990). O SNRPN é expresso somente no cromossomo paterno, enquanto que no alelo materno é silenciado (GLENN et al., 1993, 1996; NAKAO et al., 1994; REED e LEFF, 1994). Esta região está sob controle coordenado de um centro de *imprinting* (IC) na extremidade 5' do gene SNRPN (SUTCLIFFE et al., 1994; BUITING et al., 1995), que é expresso a partir do alelo paterno em todos os tecidos estudados até o momento.

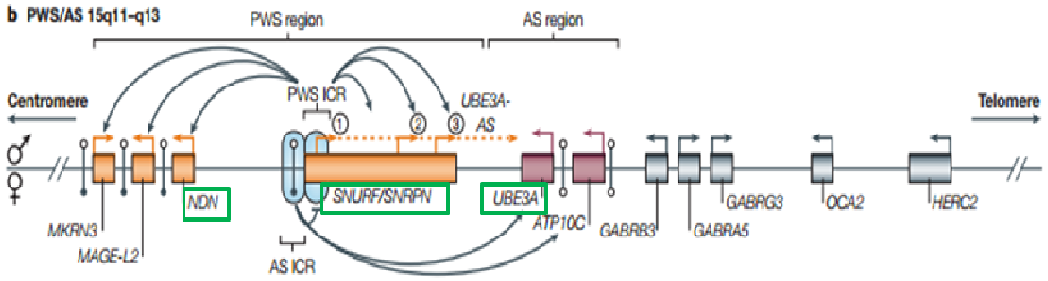
Em humanos, se localiza no cromossomo 15q11-13, uma região que está envolvida com as Síndromes de Prader-Willi (SPW) e de Angelman (SA). As crianças afetadas pela SPW têm hipotonia significativa, dificuldade de alimentação, e déficit de crescimento. Contudo no início da infância há apetite excessivo com desenvolvimento gradual da obesidade, baixa estatura e/ou diminuição da velocidade de crescimento, deficiência intelectual, e problemas comportamentais (BUTTLER, 1990; BUTTLER, LEE, WHITMAN, 2006). Disfunção hipotalâmica também tem sido manifestação dessa síndrome, incluindo hiperfagia, instabilidade da temperatura, limite alto da dor, distúrbios respiratórios do sono, e múltiplas anormalidades endócrinas (BUTTLER, LEE, WHITMAN, 2006; CASSIDY et al., 2012; AYCAN, BAS, 2014). Nos pacientes com SA os sintomas mais proeminentes incluem deficiências motoras, epilepsia, deficiência intelectual e ausência de fala (WILLIAMS, 2005), também são notados movimentos atáxicos, prognatismo, protrusão da língua, paroxismos de riso, padrões de sono anormais e hiperatividade (WILLIAMS et al., 2006).

Os indivíduos que apresentam essas síndromes foram os primeiros modelos para o estudo da expressão dos genes imprinted nos humanos. A região similar, no camundongo, está localizada no cromossomo 7C (NICHOLLS; KNEPPER, 2001). A expressão monoalélica paterna deste gene foi observada a partir da fase de 4 células nos camundongos (SZABÓ; MANN, 1995). Nos bovinos também foi identificada uma região correspondente à DMR do SNRPN nos humanos e camundongos (LUCIFERO et al., 2006). Este grupo também investigou os efeitos da produção *in vitro* e da TNCS sobre a metilação do DNA em embriões bovinos aos 17 dias de gestação, e verificaram que o perfil de metilação foi conservado entre as espécies.

1.1.3.2 Necdin e Ube3A

A região genômica, que abrange a UBE3A e a proteína SNRPN, contém grande número de genes *imprinted* que são expressos maternalmente ou paternalmente no cérebro humano (LALANDE; CALCIANO, 2007). Os camundongos possuem uma região cromossômica semelhante a esta, e os genes também são *imprinted* (NICHOLLS; KNEPPER, 2001; GREEG et al., 2010a; GREEG et al., 2010b) (Figura 3).

Figura 3 - Regiões envolvidas nas doenças associadas a transcritos senso e anti-senso do gene SNURF/SNRPN.



Fonte: ROBERTSON (2005)

Legenda: Regiões envolvidas nas doenças associadas a transcritos senso e anti-senso indicadas pelas setas acima e abaixo dos genes, respectivamente. O status de metilação do alelo paterno está indicado na parte superior do cromossomo, e o alelo materno na parte inferior. O locus das Síndromes de Prader-Willi (SPW) e Angelman (SA) possui a ICR com estrutura bipartida, na qual o componente mais centromérico atua como ICR da SA, e a região telomérica, que contém o promotor do SNRPN/SNURF, atua como ICR da SPW. Acredita-se que o transcrito do SNRPN/SNURF inibe a expressão da UBE3A no alelo paterno através de um mecanismo anti-senso. E a SA é decorrente da perda da UBE3A expressa maternalmente.

O gene Necdin é expresso, abundantemente, em células pós-mitóticas, tais como, neurônios e miócitos esqueléticos (AIZAWA et al., 1992; UETSUKI et al., 1996; KUWAJIMA et al., 2004). No entanto, é expresso, moderadamente nas células progenitoras e nas células-tronco neuronais embrionárias (HUANG et al, 2013; MINAMIDE et al., 2014). Além de promover a sobrevivência e diferenciação das células progenitoras e das células-tronco neuronais (AEBISCHER et al., 2011; HUANG et al, 2013; MINAMIDE et al., 2014). Assim, o Necdin pode ser considerado como centro de uma rede de interação proteína-proteína para o desenvolvimento neuronal (LAVI-ITZKOVITZ et. al., 2012).

No cérebro de camundongo, *in vivo*, o gene necdin é expresso em praticamente todos os neurônios, desde os períodos iniciais de neurogênese até a fase adulta (UETSUKI et al., 1996), além de estar envolvido na migração celular, no crescimento axonal, e nos processos de fasciculação (TENNESE, GEE, WEVRICK, 2008; MILLER, WEVRICK, MELLON, 2009; BUSH, WEVRICK, 2010), bem como na apoptose neuronal (ANDRIEAU et al., 2006; KURITA et al., 2006a; TENNESE, GEE, WEVRICK, 2008) o que sugere sua importância na diferenciação neuronal no cérebro. Relatou-se também uma função anti-apoptótica no desenvolvimento de neurônios sensoriais nos gânglios da raiz dorsal (TAKAZAKI, NISHIMURA, YOSHIKAWA, 2002; ANDRIEAU et al., 2006; KUWAKO et al., 2005)

Recentemente relatou-se que o gene necdin é deletado na SPW, sendo *imprinted* no alelo materno (JAY et al., 1997; MACDONALD, WEVRICK, 1997; SUTCLIFFE et al., 1997). Nos humanos este gene se localiza próximo ao gene imprinted ZNF127, dentro da região de deleção as SPW e não é expresso no cérebro de pessoas que acometidas por esta síndrome (NAKADA et al., 1998).

O necdin pertence à família do antígeno da expressão do gene associado ao melanoma tipo II (MAGE) que compartilha um domínio homólogo à MAGE (CHOMEZ et al., 2001), e que demonstrou estar ligado às proteínas RING para formar ligases de ubequitina E3 ativas (DOYLE ET al., 2010)

A Síndrome de Angelman (SA), também está relacionada com a perda da função da UBE3A no alelo materno. Nos neurônios, a UBE3A herdada pelo alelo materno é o único alelo ativo, pois o alelo paterno está silenciado pelo *imprinting* específico ao tipo celular. A expressão restrita do transcrito anti-senso do RNA (UBE3A-ATS) no alelo específico e nos neurônios é resultado deste *imprinting*, e acaba interferindo na

transcrição da UBE3A paterno através de um mecanismo de ação *cis* (BEAUDET, 2012; MENG, PERSON, BEAUDET, 2012; MENG et al., 2013).

Estudos recentes demonstraram que a UBE3A do alelo paterno pode ser reativado farmacologicamente (HUANG et al., 2012; MENG et al., 2015), tendo grande potencial clínico para o tratamento da SA. No entanto, essa ativação parece ser insuficiente para recuperar a maioria dos fenótipos neurocognitivos no modelo de SA em camundongos (MENG et al., 2015)

1.1.3.3 H19

Nos humanos a região cromossômica 11p15.5 contém dois conjuntos de genes *imprinted*, IGF2 e H19 (REIK; WALTER, 2001). A expressão monoalélica é regulada de forma independente por atuarem de maneira *cis* nas DMRs ou nos ICRs, correspondendo às sequências metiladas no alelo parental (BARTOLOMEI; FERGUSON-SMITH, 2011).

A DMR H19/IGF2 adquire metilação na linha germinativa paterna, e é caracteristicamente não metilado no alelo materno. O lócus IGF2 codifica o gene IGF2, que é um agente mitogênico autócrino/parácrino. E a transcrição do gene H19 produz um RNA não codificador, que é um precursor do microRNA chamado miR-675, o qual afeta negativamente a proliferação das células (KENIRY et al., 2012).

A hiper-metilação desta DMR resulta na super-expressão do gene IGF2, que está relacionado à Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (DEBAUN et al, 2003; WEKSBERG et al., 2003). Contudo, a hipo-metilação do alelo paterno está associada com a Síndrome de Silver-Russell (SSR), que é caracterizada por um crescimento lento, antes e após o nascimento (GICQUEL et al., 2005).

A SBW é um distúrbio de crescimento caracterizado por macrossomia, macroglossia, visceromegalia, tumores embrionários, onfalocele, hipoglicemia neonatal, vincos de ouvido, citomegalia adrenocortical e anormalidades renais. A morte precoce pode ocorrer a partir de complicações da prematuridade, hipoglicemia, cardiomiopatia, macroglossia, ou tumores (SHUMAN et al., 2016).

A SSR é clinicamente heterogênea caracterizada por intra-uterino e retardo de crescimento pós-natal com o crescimento craniano poupados, características dismórficas e assimetria corporal (SILVER et al., 1953; RUSSELL, 1954). Além de observarem baixa estatura, tamanho normal de cabeça para a idade, rosto triangular com testa proeminente e queixo pontudo, orelhas com implantação baixa e clinodactilia no quinto dedo. Silver et al. (1953) também observaram assimetria esquelética como uma característica da doença. Outros achados também foram incluídos: anormalidades genitais, hipoglicemia, sudorese excessiva, esclera azul, sindactilia dos dedos dos pés e dificuldades na alimentação grave (ESCOBAR et al., 1978; PRICE et al., 1999; ANDERSON et al., 2002).

Nos camundongos o gene H19 é expresso maternalmente e produz um RNA não transcrito que foi recentemente mostrado agindo como um regulador *trans* (GABORY et al., 2009) da rede de genes imprinted no controle do crescimento embrionário (VARRAULT et al., 2006). Ambos os genes imprinted dependem de uma região de controle do imprinting (ICR), que adquire a metilação do DNA durante o desenvolvimento das células germinativas masculinas e, portanto, diferencialmente metilados nos embriões.

A ICR do gene H19 está localizado no lócus Igf2/H19 no rato, e é metilado pelo complexo de DNA metiltransferase DNMT3A-DNMT3L na pro-espermatogônia. Este status é mantido no alelo paterno após a fertilização (TREMBLAY et al., 1997; KANEDA et al., 2004). Embora seja considerado indispensável para o fator de ligação CCCTC (CTCF) (SCHOENHERR et al., 2003; MATSUZAKI et al., 2010), e ligação Sox-Oct na manutenção da hipometilação materna na ICR do H19 durante os períodos após a implantação são bem estabelecidas (SAKAGUCHI et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2013), pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes que mantêm paterna hipermetilação H19 ICR durante os períodos de pré-implantação.

1.1.4 Aspectos Gerais Relacionadis à Biologia dos Equídeos

Os cavalos (*Equus caballus*, Linnaeus 1758), os jumentos (*Equus asinus*, Linné 1758) e as mulas (*E. mulus mulus*) são mamíferos ungulados de grande porte, pertencentes ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Mammalia*, Ordem *Perissodactyla*, Família *Equidae*, gênero *Equus* (WILSON; REEDER, 2005).

As diferentes espécies do gênero *Equus* podem cruzar entre si. Assim, as fêmeas são capazes de gestar, levar a termo e gerar potros xenogênicos. E, portanto, podem ocorrer cruzamentos intra-espécie (*E. caballus* X *E.caballus*; *E. asinus* X *E. asinus*), inter-espécie (*E. caballus* X *E. asinus*), e extra-espécie (*E. przewalskii* X *E. burchelli*) (ALLEN; SHORT, 1997).

A partir destes cruzamentos há produção de descendentes híbridos (ALLEN, 1992), que embora sejam viáveis, geralmente, são inférteis (ALLEN; SHORT, 1997; YANG et al., 2004). A mula (*E. caballus*/fêmea X *E. asinus*/macho), e seu cruzamento recíproco, o bardoto (*E. caballus*/macho X *E.asinus*/fêmea) são os híbridos mais comumente produzidos e utilizados comercialmente, uma vez que o cavalo e o jumento são as duas espécies que foram domesticados em números significativos (ALLEN; SHORT, 1997).

Essa considerável gama de potros híbridos que podem ser gerados somente é possível desde que a fêmea seja inseminada com sêmen fértil no momento correto do seu ciclo ovulatório (EWART, 1898; SHORT, 1975). A espécie eqüina é poliéstrica sazonal, e tem o início da estação de monta nas estações da primavera e verão (SOUZA, 2007; BRINSKO et al., 2011), e está associada ao aumento da luminosidade diária, da temperatura e da disponibilidade de alimento, assegurando que os filhotes nasçam em condições climáticas favoráveis e no momento apropriado do ano. Seu ciclo ovulatório tem duração média de 21 dias, consistindo de 14 dias de diestro (fase luteínica) e 7 dias de cio, período em que ela está sexualmente receptiva. E o período de gestação varia entre 330 e 345 dias (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Para aumentar o número de potros produzidos em um ano, a partir de uma égua doadora selecionada, uma das técnicas utilizadas é a transferência de embriões (TE). Esta técnica também permite a produção de potros de éguas subférteis ou atletas. Para obter taxas de prenhes aceitáveis após a TE, as fêmeas receptoras

devem ovular entre os dias 0 e 3 após a ovulação da fêmea doadora (CARNEVALE et al., 2000).

A TE entre espécies mostrou-se bem sucedida em éguas e jumentas (ALLEN, 1992). Ao longo da última década houve um progresso na reprodução assistida em eqüinos, onde métodos para a recuperação de oócitos das éguas geraram interesse clínico no uso de métodos de fertilização *in vitro*, sendo o mais eficiente a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (CHOI et al., 2002a; LAZZARI et al., 2002).

A partir do relato do nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al.,1997), primeiro clone produzido a partir de células de outro animal, a produção de clones por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e fetais têm sido empregada com sucesso em várias espécies como ovinos, bovinos, suínos, murinos, leporinos, roedores, muares, eqüideos, felinos e caninos (FULKA et al., 2004; LEE et al., 2005).

1.1.5 Características da Placenta no Desenvolvimento embrionário dos Equídeos

Há diferenças importantes quanto ao transporte dos ovócitos e dos embriões no oviduto eqüino quando comparado às outras espécies de mamíferos (ALLEN, 2000; 2001a). A retenção de ovócitos não fecundados ou de embriões não viáveis, por sete meses ou mais, e que podem ser degenerados, são considerados eventos exclusivos aos equinos. Contudo, se o ovócito é fecundado, resultará na formação de um embrião; que atravessará a junção útero-tubárica, e entrará no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (dia 6 – 6,5). Neste período, o ovócito apresenta-se em estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial (Figura 1B e C) (BETTERIDGE et al., 1982; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000; ALLEN, 2001a), e tem aproximadamente 0,2mm (BETTERIDGE et al., 1982; SHARP, 2000).

A permanência do embrião eqüino no oviduto até o 6° dia é considerada prolongada quando comparado ao embrião suíno (48 horas) e ruminante (72 horas) (BATTUT et al., 1997; ALLEN, 2000). As desvantagens deste fato na aplicação prática das biotecnologias da reprodução eqüina estão relacionadas com a produção

de gêmeos monozigotos, principalmente quando realizado no estágio de mórula (Figura 4A); e também no sucesso do congelamento de embriões, que diminui conforme o aumento no desenvolvimento, na idade e tamanho do embrião. Esta diminuição pode ser devido a uma combinação de danos na massa celular interna e à relativa impermeabilidade da cápsula blastocística eqüina aos crioprotetores (Figura 4D) (ALLEN, 2000; 2001a).

A blastocele é formada a partir do desenvolvimento das junções intercelulares da mórula, juntamente com o acúmulo de fluído dentro da cavidade central, sendo denominado de blastocisto inicial (GINTHER, 1992). O embrião nesta fase apresenta 2 grupos celulares: 1) trofoblasto, originado a partir das células da massa celular externa, que formará o córion, e essas células são importantes para a implantação do embrião na parede uterina; 2) embrioblasto, originado a partir da massa celular interna, e que originará o embrião propriamente dito (Figura 4C) (SHARP, 2000).

O desenvolvimento inicial do concepto eqüino é caracterizado pela formação da cápsula blastocística (CB) presente até o 23° dia após a ovulação (BETTERIDGE, 1989; ORIOL et al., 1993a; 1993b) (Figura 4D). Especula-se que a CB seja semelhante à zona pelúcida, uma vez que a substituiria após sua perda (GINTHER, 1992), além de fazer com que o concepto apresente formato esférico, e evitando o alongamento do trofoblasto entre o 10° e 16° dia após a ovulação (GAIVÃO; STOUT, 2012).

A CB, por ser resistente e elástica, funciona como uma proteção física do embrião, permitindo que este migre de uma extremidade a outra do lúmen uterino (SHARP, 2000; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007), entre o 6° e o 17° dia após a ovulação (GINTHER, 1983a, 1985a). Além disso, atua contra o estresse mecânico das contrações miometriais (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005), e na defesa biológica contra ataques virais e bacterianos, ou ataque imunológico materno. Devido ao seu posicionamento sugere-se que a cápsula, na interface materno-fetal, tenha importante função na comunicação entre a mãe e o feto durante o início da gestação (STEWART; LENNARDS; ALLEN, 1995; CHU et al., 1997).

A movimentação do embrião se deve às fortes contrações peristálticas do miométrio (GINTHER, 1983a; 1985a), e pela liberação de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e E_2 (PGE_2). A PGE_2 está presente no estágio de mórula, no dia 5 após a ovulação (STOUT; ALLEN, 2001), e também garante a liberação direta no

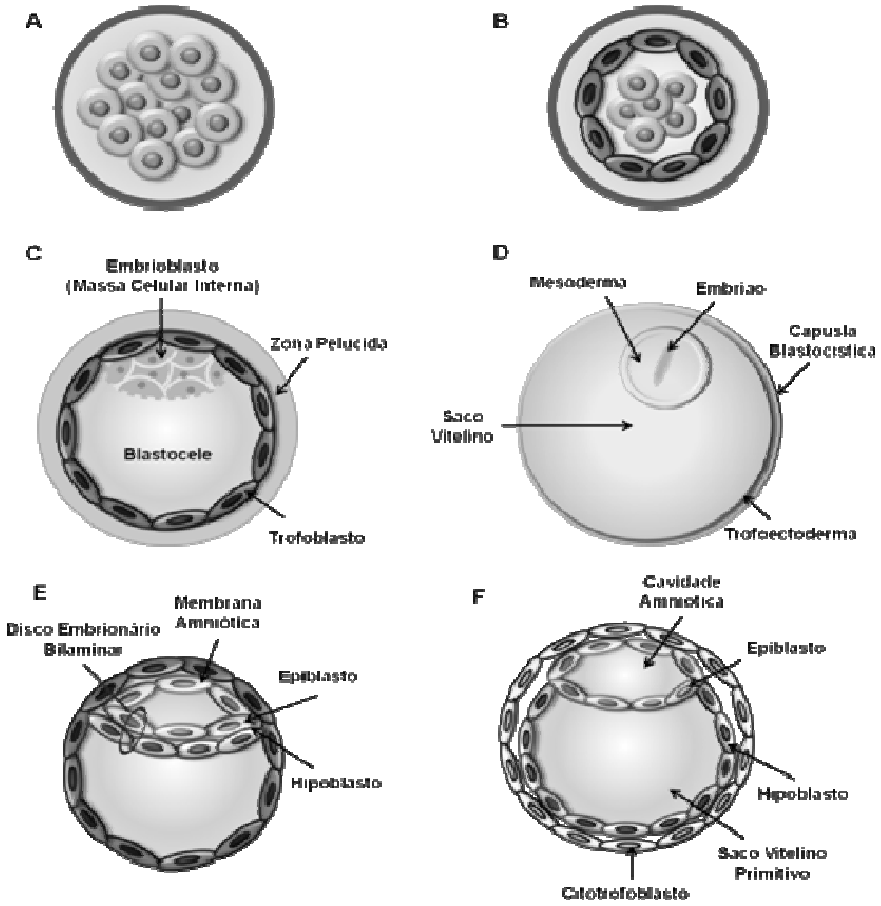
endométrio do sinal de reconhecimento materno da gestação em todas as partes do útero (ALLEN, 2001a).

A movimentação do embrião cessa abruptamente nos dias 16-17 após a ovulação quando ocorre um aumento do diâmetro do concepto, que previne fisicamente a sua passagem através do lúmen uterino (GINTHER, 1983b). O local em que ocorrerá a fixação do embrião, e posteriormente a placentação, está associado à flacidez e a perda do ácido siálico das glicoproteínas capsulares (CHU et al., 1997; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007). Assim, a cápsula começa a se desintegrar entre os dias 20 e 21, permitindo o rápido desenvolvimento das células trofoblásticas (ALLEN, 2001a).

Conforme há progressão da implantação do blastocisto, o embrioblasto sofre mudanças que resultam na formação da camada bilaminar, denominado disco embrionário. O disco embrionário é formado por duas camadas: 1) epiblasto, composto por células espessas e colunares; 2) hipoblasto, composto por células delgadas e cubóides (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010) (Figura 4D).

No embrioblasto surgirá a cavidade amniótica, cujo assoalho é formado pelo epiblasto. As células do hipoblasto migrarão para formar a membrana exocelômica que reveste a superfície interna do citotrofoblasto. Essas células se modificarão para formar o saco vitelino primitivo (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010) (Figura 4E e F).

Figura 4 - Desenvolvimento inicial do embrião eqüino.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Representação de conceptos eqüinos entre 5 e 16 dias após a ovulação. A) Desenvolvimento da mórula inicial no embrião com 5 dias. B) Desenvolvimento da mórula tardia no sexto dia. C) Desenvolvimento do blastocisto inicial aos 6,5 dias, com a formação da blastocele, do trofoblasto, do embrioblasto, e presença da zona pelúcida. D) A cápsula ainda está presente aos 16 dias de gestação, o saco vitelino está totalmente expandido e o embrião é visível. E) Surgimento do epiblasto e hipoblasto que formam o disco embrionário bilaminar, e da membrana amniótica no embrião com 11 dias. F) Formação da cavidade amniótica e do saco vitelino primitivo, e presença do citotrofoblasto no embrião com 14 dias.

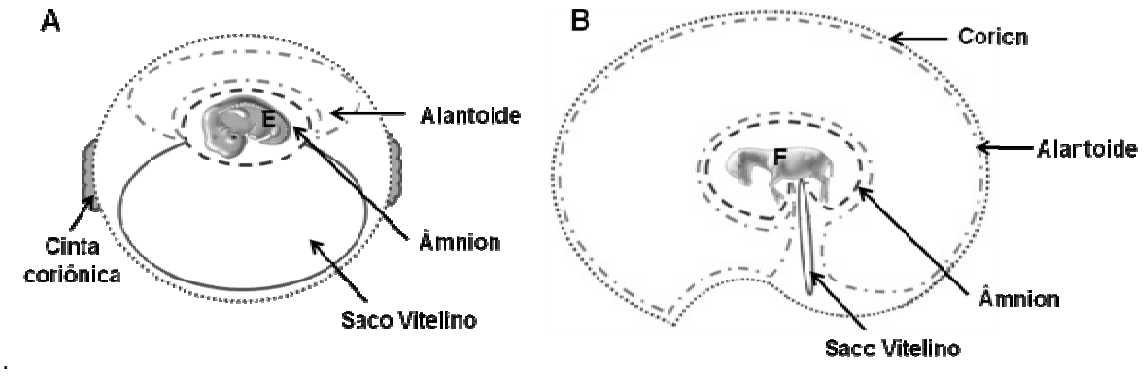
O saco vitelino tem um papel importante no suprimento nutricional inicial do embrião, e é predominante nas três ou quatro primeiras semanas de gestação (SHARP, 2000). No exame ultra-sonográfico é possível visualizar, entre os dias 10 e 21, alteração no tamanho da vesícula embrionária no estágio de saco vitelino (GINTHER, 1992).

O saco vitelino é formado pelo endoderma proveniente da massa celular interna, que se expande esfericamente, situando-se embaixo da camada externa do trofoectoderma. Assim, no 10° ou 11° dia, é observada a onfalopleura bilaminar (GINTHER, 1992; HAFEZ, HAFEZ, 2004) Por volta do 14° dia, o mesoderma se

desenvolve a partir do disco embrionário, e fica interposto entre as camadas do endoderma e do ectoderma, formando assim a onfalopleura trilaminar. Esta estrutura trilaminar se desenvolve esfericamente a partir da região da massa celular interna em direção ao pólo oposto do desenvolvimento embrionário. A borda distal da onfalopleura trilaminar é demarcada pelo seio terminal (*sinus terminalis*) (ALLEN; WILSHER, 2009).

Este seio terminal se move em direção ao pólo oposto do desenvolvimento embrionário, e continua a se desenvolver entre o endoderma e o ectoderma, marcando a posição de fixação do cordão umbilical (GINTHER, 1992). O saco vitelino retrocede, enquanto o alantóide progride, e sua visualização ocorre por volta do dia 21. E durante as 3 ou 4 primeiras semanas de gestação nos eqüinos, a placentação é descrita como coriovitelina (Figura 5A). Com o desenvolvimento e expansão do alantóide na 4ª e 5ª semana de gestação, a placenta passa a ser descrita como corioalantóica (ALLEN; WILSHER, 2009) (Figura 5B) devido à predominância do saco alantóico que consiste de endoderma, mesoderma e ectoderma (SHARP, 2000).

Figura 5 - Membranas extra-embrionárias em conceptos eqüinos.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Representação das membranas embrionárias de conceptos eqüinos com 20 dias e 35 dias de gestação, respectivamente.

Com o desenvolvimento do embrião, o trofoblasto se funde com a membrana interna das células do mesoderma para formar o córion. Este envolve, totalmente e externamente, o embrião e as demais membranas embrionárias (alantóide, amnion e saco vitelino). O alantóide se desenvolve a partir do intestino posterior do embrião. E

é formado sob o embrião e se expande em direção ao pólo oposto do desenvolvimento embrionário, entre a somatopleura e a esplancnopleura (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Com isso, ocorre o desenvolvimento de um exoceloma na área onde o alantóide expande e o saco vitelino retrocede (SHARP, 2000). Esse processo ocorre entre o 22° e o 25° dia de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Entre os dias 25 e 36 de gestação ocorre diferenciação de uma sub-população de células trofoblásticas com capacidade invasiva, que formará uma faixa avascular, denominada cinta coriônica (ADAMS; ANTAZAK, 2001; WOODING et al., 2001; de MESTRE et al., 2008). As células da cinta coriônica são altamente proliferativas, e passam a invadir o endométrio materno entre o 35° e o 38° dia de gestação (SHARP, 2000; WOODING et al., 2001; ALLEN et al., 2002), fazendo com que ocorra a fagocitose das células epiteliais materna.

Com 33 dias de gestação a estrutura da cinta coriônica se alonga e formam estruturas vilosas (DE MESTRE et al., 2008). Aos 37 dias, ocorre a fixação dessa estrutura, consistindo de uma ligação entre as interdigitações das células coriônicas alongadas e o epitélio endometrial. Em seguida, as células da cinta coriônica continuam migrando, e atravessam a membrana das células epiteliais materna até chegar ao estroma, onde estão as glândulas uterinas. Nesse local, irão se diferenciar e hipertrofiar até formarem os cálices endometriais (SHARP, 2000).

A função dos cálices endometriais é a produção da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), que é secretada entre os dias 33 e 120 de gestação (WOODING et al., 2001; ALLEN et al., 2002; DE MESTRE et al., 2008). A secreção de eCG coincide com a formação de vários corpos lúteos acessórios, porém não é claro que este evento seja essencial para a manutenção da gestação eqüina (SHARP, 2000). Sugere-se também que a secreção da eCG esteja relacionada com a resposta imune materna à interdigitação das vilosidades coriônicas conforme a formação da placenta corioalantóica por volta dos 60 dias de gestação (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1974).

Outra estrutura que envolve o embrião é o âmnion, que se desenvolve a partir do ectoderma extra-embrionário e do mesoderma avascular. Sua função é proteger o embrião da desidratação e de choques mecânicos, uma vez que o embrião flutua no líquido amniótico. Este líquido é produto das secreções das paredes ou folhetos amnióticos, além da saliva, secreção nasal do feto, e, temporariamente, da urina (GINTHER, 1992).

Entre os dias 24 e 25, o alantóide já está bem vascularizado, e grande, se o compararmos com o embrião. No 25° dia, o embrião tem, aproximadamente, 5mm de comprimento. O embrião cresce cerca de 1mm/dia, podendo atingir 12mm no 30° dia de gestação, e 17mm, no 35° dia. Contudo, a viabilidade fetal, pode ser observada no 26° dia de gestação, quando iniciam os batimentos cardíacos e a passagem do sangue no sistema circulatório (GINTHER, 1992).

No 40° dia de gestação, o feto, juntamente com o âmnion, está em uma posição oposta ao alantóide; e o saco vitelino desaparece, cuja função é substituída pela placenta. Conseqüentemente ao crescimento do feto, ocorre o encontro das membranas, que separavam o saco vitelino e o alantóide, no pólo dorsal da vesícula, resultando na formação do cordão umbilical, que se anexa no lado dorsal do útero, promovendo a ligação entre os envoltórios fetais e o feto (GINTHER, 1992).

1.1.6 Gestação Gemelar em Éguas

A gestação de gêmeos em éguas, normalmente, é atribuída à ovulação assíncrona, ovulações duplas ou à segunda ovulação que ocorrem durante o início do diestro (GINTHER; DOUGLAS; WOODS, 1982). E a gestação gemelar também foi estudada pela indução de ovulações múltiplas (GINTHER; DOUGLAS; WOODS, 1982; WOODS; GINTHER, 1982; WOODS; SCRABA; GINTHER, 1982).

A gestação gemelar pode resultar em aborto no final de gestação ou no nascimento de potros prematuros com alta taxa de mortalidade neonatal. Apenas 1% das éguas produz potros gêmeos vivos (JEFFCOTT; WHITWELL, 1973), além dos fetos poderem apresentar falhas no seu desenvolvimento. A presença de um feto comprometido ou morto pode complicar o curso clínico da gestação, elevando o risco de um resultado desfavorável a ambos (SMITH et al., 2003). Este tipo de gestação está relacionado com a maior incidência de distocia, fetos com desenvolvimento anormal, morte fetal, abortos espontâneos e partos prematuros quando comparados às gestações únicas.

O crescimento e desenvolvimento normal do concepto são devido à nutrição adequada durante a gestação que ocorre através da ligação entre a fêmea e o feto

por meio da placenta (RAGGIO et al., 2008; AVANTE et al., 2009; SIDDIQUI; EWAN, 2007). Na gestação gemelar ocorrerá competição entre as placentas para entrarem em contato com o endométrio materno, resultando na insuficiência placentária para a nutrição dos dois conceptos. E acarretando na absorção espontânea de uma ou das duas vesículas embrionárias, ou óbito do feto em desvantagem durante a segunda metade da gestação (GINTHER, 1986; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Assim, a identificação da gestação gemelar precoce ajuda na diminuição do resultado desfavorável durante o período gestacional, pois quando detectada tardiamente resultará no nascimento de um único potro vivo caso um dos gêmeos seja eliminado no começo da gestação (SCHNOBRICH et al., 2013). O uso rotineiro da ultrasonografia transretal em haras e centrais de reprodução tem auxiliado na baixa incidência de abortos associados com gestação gemelar (SMITH et al., 2003), uma vez que é possível escanear o corpo e os cornos uterinos e identificar as vesículas embrionárias (GINTHER, 1984c).

Embora a gestação possa ser detectada no nono dia após a ovulação por meio desta técnica, a primeira verificação é, geralmente, realizada entre o 14º e 16º dias após a ovulação (LÖFSTEDT; NEWCOMBE, 1997). A presença de duas vesículas embrionárias pode ser facilmente detectada pela ultrasonografia, e, caso elas ainda não estejam fixadas, uma dessas vesículas pode ser eliminada (McKINNON, 2007).

A partir do 16º dia de gestação ocorre a fixação da vesícula embrionária devido à restrição do alongamento do concepto na base de um dos cornos. Com isso, as vesículas podem fixar-se na base de um corno uterino (fixação unilateral) ou em ambas (fixação bilateral). Após o 70º dia de gestação, o diagnóstico transretal e o acompanhamento da gestação gemelar são difíceis devido ao aumento do volume de fluido alantoideano e da descida do útero gravídico para o abdômen (GINTHER; GRIFFIN, 1994).

Após a confirmação da gestação gemelar são utilizados alguns procedimentos para tornar a gestação única. No início da gestação, até o 15º dia após a ovulação, ocorrerá indução do aborto através da redução manual pelo rompimento de uma das vesículas embrionárias (PASCOE, 1983; PASCOE et al., 1987; MOREL; NEWCOMBE; LAUBER, 2012), ou através do uso de prostaglandina (PGF2α) (GINTHER, 1985b; CHU et al., 1997), que resultará na perda de ambos conceptos, especialmente se forem detectados antes do 30° dia de gestação.

A espécie eqüina apresenta um mecanismo de redução embrionária próprio muito eficiente, de modo que não é realizada tentativa de redução no período pós-fixação de gêmeos unilaterais (GINTHER, 1984c, 1989). A gestação é monitorada e, se não ocorrer redução até o 30º dia de gestação, ambos conceptos serão reduzidos antes do estabelecimento dos cálices endometriais (36º dia de gestação) através da redução manual ou pelo uso de prostaglandinas (GINTHER, 1985b; CHU et al., 1997). Nas gestações gemelares com fixação bilateral, não ocorrerá a redução natural a um concepto único (GINHTER, 1984c). E a técnica de traumatismo por meio da manipulação com a sonda é utilizada para a redução gemelar entre o 60º e o 100º dia de gestação pode ser realizada quando um dos fetos está menor do que o outro (RANTANEN; KINCAID, 1988).

1.1.7 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em Equídeos

Durante a embriogênese, o evento fundamental que formará o sistema nervoso central é denominado neurulação. Este fenômeno pode ser dividido em fase primária e secundária. Na neurulação primária ocorre o espessamento dorsal do ectoderma anterior, e esta região é denominada placa neural; e também há regressão da linha primitiva (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; COLAS; SCHOENWOLF, 2001).

A placa neural sofre uma remodelagem e passa a apresentar uma estrutura mais alongada, em que apresenta a região anterior mais larga e região posterior mais estreita. Conseqüente ao desenvolvimento há formação de elevações laterais à região do sulco neural e que são denominadas pregas neurais. As elevações destas estruturas continuam até que elas fiquem justapostas à linha média e se fundam para formar o tubo neural. E assim, a neurulação dará origem ao cérebro e à maior parte da medula espinhal (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; COLAS; SCHOENWOLF, 2001).

A neurulação estará completa quando os neuroporos, anterior e posterior, estiverem fechados. Com isso, o sistema nervoso central estará representado por uma estrutura tubular fechada com uma porção posterior estreita que formará a medula espinhal; e por uma porção cefálica mais larga que dará origem ao encéfalo

(SCHOENWOLF; SMITH, 1990; COLAS; SCHOENWOLF, 2001; ARAYA et al., 2015).

1.1.7.1 Desenvolvimento do Cérebro

Após a fusão das pregas neurais e o fechamento do neuroporo anterior, o cérebro se desenvolve nos dois terços anteriores do tubo neural. Conseqüentemente, serão formadas as três vesículas cerebrais primárias: 1) prosencéfalo situado na porção rostral do tubo neural; 2) mesencéfalo e 3) rombencéfalo, estes dois últimos estão situados na porção posterior (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010).

Durante o desenvolvimento do embrião, as vesículas cerebrais primárias se dividirão nas vesículas secundárias. Assim, o prosencéfalo se dividirá em telencéfalo e diencéfalo. O telencéfalo formará os hemisférios cerebrais e os bulbos olfatórios, enquanto que o diencéfalo dará origem ao epitálamo, tálamo, metatálamo, hipotálamo, glândula pineal, neuro-hipófise e os cálices ópticos. A cavidade que se desenvolve no interior do diencéfalo é denominada terceiro ventrículo; e as cavidades no telencéfalo são denominadas ventrículos laterais (MONIE, 1976; HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010).

O mesencéfalo permanece como uma estrutura relativamente simples. A sua porção dorsal ao aqueduto se torna o teto e forma os corpos quadrigêmeos; e sua porção ventral ao aqueduto as placas basais formam o segmento que contém os núcleos eferentes dos nervos oculomotor e troclear. No teto do mesencéfalo ocorre a formação de protuberâncias longitudinais, que são separadas por um sulco transversal que divide cada uma em colículos rostrais e caudais. Os colículos caudais são simples em sua estrutura e possuem funções auditivas. E os colículos rostrais apresentam uma arquitetura de estratificação mais complexa e participam do sistema visual (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010

Já o rombencéfalo se dividirá nas porções rostral e posterior para formar, respectivamente, o metencéfalo e o mielencéfalo. O metencéfalo dará origem, na porção ventral, à ponte e ao corpo trapezóide; e ao cerebelo na porção dorsal. E o

mielencéfalo formará a medula oblonga, que é a parte posterior do tronco encefálico, e se conecta à medula espinhal (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010).

Com o crescimento diferencial das cinco vesículas secundárias ocorre o aparecimento das flexuras. O mesencéfalo se dobra ventralmente para formar a flexura cefálica. Uma segunda dobra ventral, a flexura cervical está entre o encéfalo posterior e a medula espinhal. E no rombencéfalo, há um dobramento dorsal que formará a flexura pontina (HYTTEL; SINOWATZ; VYLSTED, 2010).

Uma camada única de células ependimárias coberta por células mesenquimais está presente na placa do teto do mielencéfalo, e elas formarão a pia-máter. A proliferação do mesênquima vascular produzirá invaginações no quarto ventrículo, formando o plexo coróide que é o responsável pela produção do fluido cerebroespinhal (DZIEGIELEWSKA; HABGOOD; SAUNDERS, 2001).

Capítulo 1

CONTROLE EPIGENÉTICO DO GENE IMPRINTED SNRPN E EXPRESSÃO DOS GENES IMPRINTED H19, NECDIN E UBE3A EM EQUÍDEOS

2 INTRODUÇÃO

O *imprinting* é uma forma de hereditariedade não Mendeliana, na qual apenas um dos alelos parentais está expresso de maneira específica ao sexo. Assim, essa marcação epigenética diferencial, tanto pela metilação do DNA quanto pela modificação das proteínas histonas, de um dos alelos leva à expressão mono-alélica dos genes denominados genes *imprinted*. Estes genes têm uma grande importância no desenvolvimento normal do embrião, bem como na regulação do seu crescimento, na função placentária e nos processos neuro-comportamentais (McGRATH; SOLTER, 1984; SURANI; BARTON; NORRIS, 1984).

A metilção do DNA é o mecanismo de regulação epigenética que atua na expressão gênica, sendo um importante marcador molecular (REIK; WALTER, 2001). Para que a próxima geração herde essa marcação epigenética, as marcas precisam ser deletadas nas células germinativas primordiais (CGPs) (LEE et al., 2002; HAJKOVA et al., 2002) e re-estabelecidas durante a gametogênese de maneira específica ao sexo (WEAVER; SUSIARJO; BARTOLOMEI, 2009).

Devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer houve o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008). O desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou melhor aproveitamento dos animais, sendo a transferência de embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade (ARRUDA et al., 2001).

Mas foi a partir do desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), (CHOI et al., 2002; LAZZARI et al., 2002), que se iniciou a produção de blastocisto *in vitro*, a maturação de oócitos e cultivo do blastocisto para transferência cervical, levando a um progresso na reprodução assistida desta espécie (COLLEONI et al., 2007).

No entanto, hoje em dia, questiona-se quanto à segurança no uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA), pois há estudos relatando que a manipulação dos embriões, a maturação dos gametas *in vitro*, a fertilização *in vitro* (FIV) e a ICSI podem causar danos no processo de imprinting genômico levando a um *imprinting* anormal e, conseqüentemente, às suas doenças correlacionadas (DE RYCKE; LIEBAERS; VAN STEIRTEGHEM, 2002; THOMPSON et al., 2002; DeBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003). A alta taxa de anormalidades fetais e neonatais foi

correlacionada com a clonagem de animais usando a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (CIBELLI et al., 1998; RENARD ET al., 1999; HEYMAN et al., 2002)

Além de ser um dos primeiros genes associados ao *imprinting* genômico, o SNRPN, é um dos genes mais estudados. Nos humanos, o gene SNRPN é um gene imprinted que está localizado no cromossomo 15q11-q13, em uma região envolvida nas Síndromes de Prader-Willi (SPW) e Angelman (SA). Estas síndromes provocam dois distúrbios neurológicos clinicamente distintos e que são provenientes de uma perda da expressão deste gene (RODRIGUEZ-JATO et al., 2005). Nos camundongos, o gene SNRPN está localizado no cromossomo 7C, e o padrão de metilação é estabelecido nos oócitos em crescimento quando estão na fase diplótena da meiose (LUCIFERO et al., 2006). Nos bovinos, foi descrito que o gene SNRPN é maternalmente imprinted nos embriões em período de pré-implantação, e que apresenta uma DMR bem caracterizada (LUCIFERO et al., 2006).

Os objetivos do nosso estudo foram caracterizar a sequência das DMRs do gene *imprinted* SNURF/SNRPN nos equídeos, e identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) específicos nas éguas e no jumento. Analisar o padrão de metilação na mula utilizando células fibroblásticas adultas, células de feto clonado e células iPSCs. Analisar quantitativamente por PCR em tempo real a expressão dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A em embriões e feto muares, e em clones muares com diferentes idades gestacionais. Devido a relatos de anormalidades nos padrões de metilação no uso de técnicas de reprodução assistida, nossa hipótese é de que o padrão de metilação dos tecidos extra-embrionários e embrionários das mulas clonada, bem como das células iPSCs serão diferentes do padrão de metilação dos tecidos dos embriões e feto muares, e das mulas adultas.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Embriões e Tecidos

Para a análise do padrão de metilação a utilização de 8 embriões híbridos em diferentes idades gestacionais (de 20 a 50 dias), que foram obtidos através do cruzamento de *E. caballus* (fêmea) com *E. asinus* (macho), por meio de inseminação artificial (IA). Conforme os embriões atingiram a idade gestacional desejada, as fêmeas gestantes passaram por exame ultrassonográfico para verificação do posicionamento embrionário. Em seguida, foi realizado um processo de lavagem uterina transcervical, onde o órgão foi lavado infundindo-se 1 a 2 litros de solução Ringer Lactato aquecido a 37°C. Uma sonda foi acoplada formando um circuito de fluxo de recuperação constante, sendo que o fluido foi recuperado em recipientes grandes, possibilitando a coleta dos embriões (FLEURY et al., 2001).

Os embriões foram dissecados de suas membranas extra-embrionárias, e então as amostras foram acondicionados em tubos falcon de 50 ml contendo 5 ml solução de RNALater® (AM7024 – Life Technologies) cada um, e refrigerados a 4°C por 24 horas. Após esse período as amostras foram congeladas a -20°C, até o momento em que fosse realizada a extração do DNA e RNA.

A produção dos conceptos clonados foi realizada através da TNCS. Após a retirada do citoplasma do oócito maturados *in vitro* ou coletados após sua maturação *in vivo,* obteve-se um oócito enucleado. Este oócito enucleado foi fusionado com a célula somática selecionada através de pulso elétrico ou quebra da membrana e injeção direta desta no citoplasma do oócito. Este oócito recombinado e que contém o núcleo do doador genético foi ativado artificialmente. O núcleo transferido descondensa e o óocito começa o desenvolvimento embrionário. Neste estudo foram utilizados quatro conceptos clonados, sendo estes de gestação gemelares, com idades de 40 e 60 dias de gestação. Estes fetos foram coletados no “Centre de Recherche en Reproduction Animale” (CRRA) da Universidade de Montreal. Os conceptos foram dissecados de suas membranas extra-embrionárias e fotografados com máquina digital (Nikon Coolpix P510).

Biópsias de pele de duas éguas, de um jumento e de cinco mulas adultas, bem como tecidos extra-embrionários e embrionários de clone muares com 26, 40, 42 e 44 dias de gestação também foram utilizados para análise do padrão de metilação. Os fibroblastos da mula 04F e os fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação também foram analisados. E diversas colônias de células iPSCs provenientes de fibroblastos do embrião e feto de mula clonados também foram analisadas. Para a análise de quantificação da expressão gênica, dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A, foram utilizados clones muares com 40, 42, 44, 47, 49 e 52 dias de gestação, tendo como controle o feto muar com 50 dias de gestação.

2.1.2 Extração do DNA e RNA

Os tecidos das membranas extra-embrionárias (alantóide, âmnion e saco vitelino) e dos órgãos (cérebro, coração, fígado, gônada e músculo esquelético, ou o embrião inteiro) por serem sólidos foram “quebrados” mecanicamente, bem como lisados com Trizol para que houvesse a ruptura destes tecidos, e, em seguida, foram homogeneizados. A homogeneização do tecido é feita com um homogeneizador rotor-estator obtendo-se aspecto uniforme livre de quaisquer aglomerados visíveis. O DNA e o RNA foram extraídos dos tecidos utilizando o kit Illustra TriplePrep (GE – 28-9425-44) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração do RNA fez-se a transcrição reversa para a síntese de cDNA, para este procedimento foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems - 4368814), e seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante.

2.1.3 Tratamento Bissulfito

O tratamento bisulfito é baseado na reação do ânion bissulfito ($HSO3^-$) com a citosina. Este resultou na produção de um derivado sulfonado que é rapidamente deaminado. Durante a replicação, foi gerada a uracila ao invés da citosina, e esta produziu ligações de hidrogênio com a adenina. Ocorreu, então, a transição deste

para uma das cadeias filhas. Cada cadeia foi amplificada separadamente através do PCR e, em seguida, seqüenciada (Figura 6). Para tal procedimento foi utilizado o kit Epitect® Bisulfite Kit (Qiagen - 59104) e realizado de acordo com o protocolo sugerido pela empresa.

2.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A cadeia de reação da polimerase (PCR) é a técnica mais rápida para a amplificação do DNA *in vitro.* A determinação do padrão da metilação do DNA foi feita com a subclonagem dos produtos de PCR em vetores apropriados, e com a sequência das inserções dos clones individuais. Os primers para o gene SNRPN estão descritos no quadro 1. A solução da reação de 50µl foi: 1µl do DNA bissulfito (10ng/µl); 1µl do primer F; 1µl do primer R; 1,5µl de dNTPs; 1,5µl de $MgCl_2$; 5µl de tampão; 0,5µl de Platinum® Taq DNA Polymerase e 38,5µl de H_2O ultra pura, e foram realizadas em triplicata. Os primers para SNRPN equino foram desenhados com base na informação em sequências codificantes conservada do gene SNRPN de bovinos.

Quadro 1 - Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Gene	Sequências (5' – 3')	Tamanho do produto	Temperatura de alinhamento (°C)
SNRPN	F: GTGGGGTTAGTAAAGATTTGT R: CCTAAAACATCAAACAAACAAA	456pb	55°

Fonte: Rigoglio (2016)

O programa de PCR utilizado iniciou com a desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido do anelamento a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, estes passos são repetidos 50 vezes; e finalmente, o alongamento é feito a 72°C por 7 minutos, finalizando a reação a 10°C, podendo ser mantido nessa mesma temperatura.

O resultado foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose, e as bandas foram cortadas e extraídas com QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. n° 28706) de acordo com o protocolo fornecido pela empresa.

2.1.5 Ligação e Transformação

O passo seguinte consistiu na ligação do produto proveniente da extração realizada anteriormente. Este procedimento foi realizado com uma solução final de 10µl com a adição de 5µl do tampão de ligação à 3µl do DNA, 1µl do vetor, e 1µl da enzima, utilizando-se pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, cat. n°A1360). A solução final foi estocada a 4°C por 24 horas, para que ao fim deste período fosse realizada a sua transformação.

A incorporação do DNA pelas bactérias foi realizada através do procedimento de transformação, que foi efetuada pela adição da solução final da ligação à uma alíquota de 500µl de bactéria DH5X. Este conteúdo foi colocado no gelo por 2 minutos, em seguida sofreu o processo de choque térmico em uma placa aquecedora a 42°C por 45 segundos. Devido ao estresse térmico, a membrana celular da bactéria se torna permeável permitindo a entrada do DNA plasmidial. Após esse período, a alíquota voltou novamente para o gelo por mais 2 minutos. Adicionou-se, em seguinda, 250µl de meio LB (Lennox Broth Base, Invitrogen, cat. n°12780-052) e, então, foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após este período, 150 µl desta alíquota foi espalhada em placas de petri contendo agar (Lennox L Agar, Invitrogen, cat. n°22700-025) para que fossem formadas colônias com o fragmento de DNA desejado. As placas de petri foram colocadas em uma incubadora a 37°C por 16 a 18 horas.

2.1.6 Minipreparações (Minipreps)

Após o período de 16 a 18 horas, a fim de que as bactérias se multiplicassem, as colônias foram coletadas com palitos de dente autoclavados, e estes foram colocados em 16 tubos de cultura contendo 3ml de meio LB com ampicilina (100µg/µl). Em seguida esses tubos foram colocados em uma incubadora com rotação por mais 16 a 18 horas a 37°C, para que depois fosse realizado o isolamento do DNA plasmidial das bactérias. Este isolamento foi realizado com QIAprep®spin Miniprep Kit (Qiagen, cat. n°27106) e de acordo com o protocolo do

fornecedor. Em seguida, a concentração do conteúdo foi quantificada através do espectrofotômetro Nanodrop ND100 (Umassmed), e então realizado o plaqueamento com a devida diluição, para que posteriormente fosse realizado o seqüenciamento.

2.1.7 Detecção da expressão gênica por qRT-PCR

Para realizarmos a análise quantitativa por PCR em tempo real, preparou-se mix com 5µl de cDNA (1µg/µL); 1.5µl de primer UPL-F; 1,5µl de primer UPL-R; 0.3µl da probe; 12.5µl de mix probe (TaqMan); 4.2µl de água ultra pura. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos subsequentes de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 58°C, e 8 segundos a 72°C, substituído pelo programa de fusão que consiste em 0 segundo a 95°C, 30 segundos a 55°C, e 0 segundo a 95°C.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores

Símbolo	Nome oficial	Gene ID	Sequência (5'-3')	Tam
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	958822082	F: GAGATCCCGCCAACATCAAA R: AAGTGAGCCCCAGCCTTCTC	97pb
SDHA	Succinate dehydrogenase complex subunit A	953883109	F: GCACCTACTTCAGCTGCACG R: AACTCCAAGTCCTGGCAGGG	94pb
RPL32	Ribosomal Protein L32	953875592	F: GAAGCACATGCTGCCCAGT R: CACGATGGCTTTGCGGTTC	107pb
H19	Imprinted maternally expresssed transcript		F: GCAGTGATCGGTGCCTCT R: TGTCTTTCTGAGCACATCCTG	111pb
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	958708556	F: CTGAGACAGGCATTCTTA R: CTCCAAATCCAACGTCCGCAG	202pb
NDN	Necdin			
UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A			

Fonte: Rigoglio (2016)

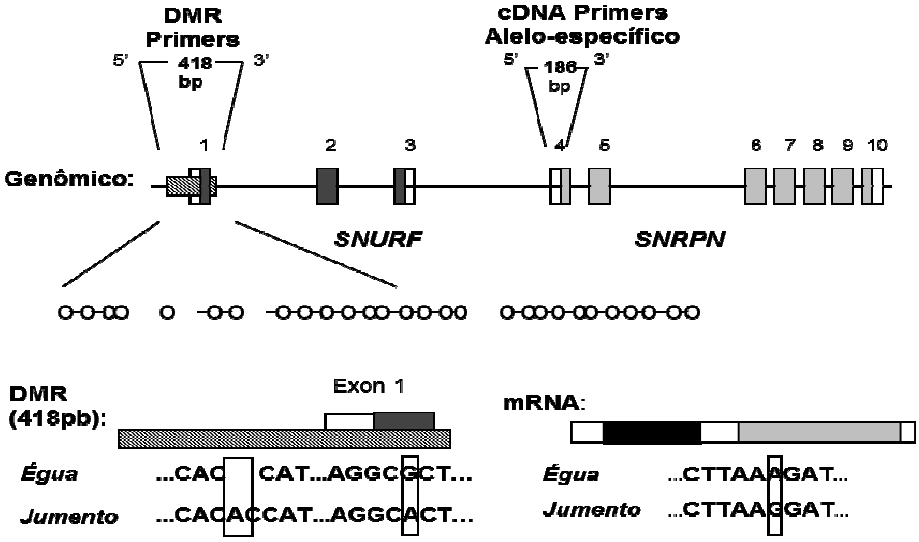
Os valores foram normalizados pela expressão dos genes *housekeeping*: GAPDH, SDHA, e RPL32. A análise de variância (one-way ANOVA) foi usada para analisar estatisticamente as diferenças entre as médias de cada grupo. Para estas análises foi utilizado o programa GraphPad Prisma 6.0.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região diferencialmente metilada (DMR)

O DNA dos indivíduos adultos das espécies *E. caballus* e *E. asinus* foram usados para identificar as DMRs do gene SNRPN. A partir destes resultados buscou-se pelos SNPs entre as espécies. Ao compararmos a seqüência publicada para o *E. caballus* (referência da seqüência NCBI: NC-009144.2; gene ID: 106780830), com nossa seqüência para o *E. asinus*, houve a inserção de dois nucleotídeos adenina (A) e citosina (C) na DMR. Também ocorreu a transição da guanina (G) para adenina (A) no exon 1, e de adenina (A) para guanina (G) no exon 4 do SNURF/SNRPN (Figura 6). No DNA genômico dos híbridos F1 (*E. mulus mulus*), houve uma sobreposição dos nucleotídeos G/A, confirmando seu uso para análise da expressão gênica alelo-específico.

Figura 6 - Representação esquemática do locus bi-cistrônico SNURF/SNRPN no *E. caballus* e *E. asinus*.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: **Genômico**: caixas numeradas representam os respectivos exons para SNURF (azul) e SNRPN (amarelo); a caixa cinza representa a DMR analisada. As posições dos primers e o tamanho do amplicon para a DMR e cDNA alelo-específico estão indicados acima das caixas. **DMR**: localização dos SNPs entre o genoma da égua e do jumento. **mRNA**: transição da adenina (A) no *E. caballus* para guanina (G) no *E. asinus*. Identificação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) alelo-específico no exon 4 do SNRPN.

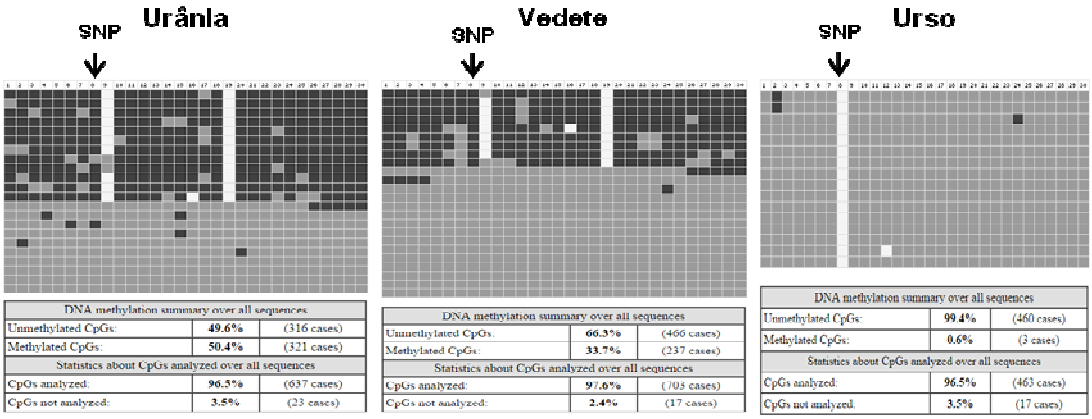
2.2.2 Caracterização das sequências DMR do gene SNRPN/SNURF em equídeos

Verificou-se que o gene SNRPN eqüino contém 10 exons. A metilação alelo-específica dos 32 sítios CpGs na região DMR foi examinada utilizando-se os SNPs observados nos produtos de PCR do DNA modificado pelo tratamento bisulfito. Foram identificados 2 SNPs na região DMR entre o alelo materno (égua) e o alelo paterno (jumento). Outro SNP foi identificado no exon 4, e este foi utilizado para avaliar o padrão de expressão do gene alelo-específico.

2.2.3 Perfis de metilação do SNRPN em tecidos de eqüinos, jumento e mulas adultas

Dentre as fêmeas, a égua 1 apresentou maior porcentagem de CpGs metiladas (50,4%), comparado à égua 2 (33,7%). Enquanto o jumento (macho) apresentou apenas 0,6% das CpGs metiladas (Figuras 7 e 8). Estes dados evidenciaram que o gene SNRPN é expresso paternalmente.

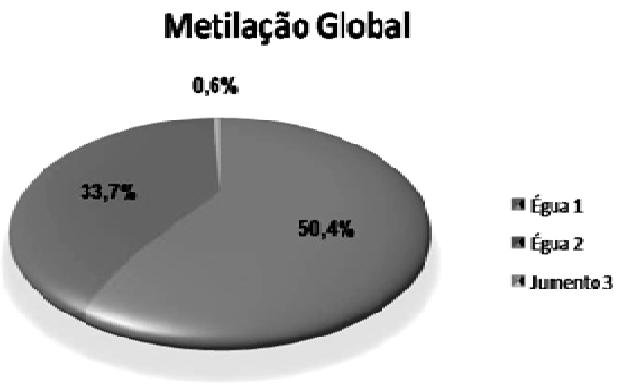
Figura 7 - Perfis de metilação em tecidos adultos das duas éguas e do jumento.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Amostras representativas da análise do seqüenciamento bissulfito de tecido de éguas adultas (Urânia e Vedete) e de jumento (Urso). Cada linha representa um clone individual que foi seqüenciado (Mini-preps). Os quadrados cinza escuro representa as ilhas CpG metiladas, enquanto os quadrados cinza claro representam as ilhas CpG não metiladas, e os brancos, com exceção do SNP, as CpGs que não foram analisadas pelo programa BISMA.

Figura 8 - Comparação dos perfis de metilação das éguas e do jumento.

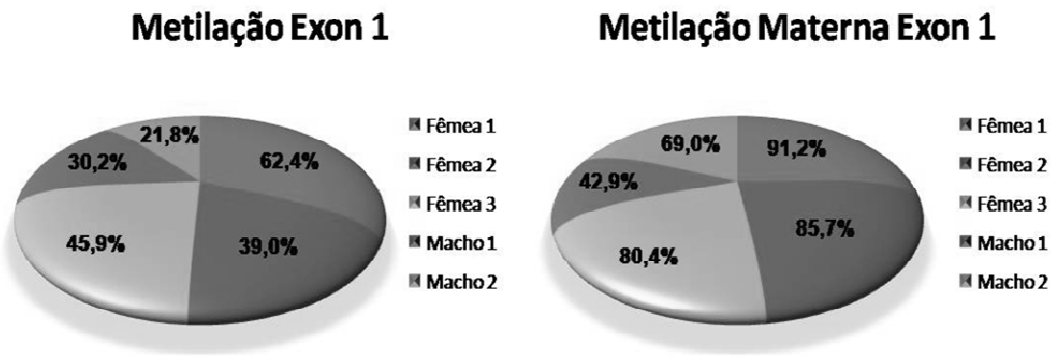


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação global entre as duas éguas e o jumento.

Obtiveram-se três animais híbridos do sexo feminino, e dois do sexo masculino, provenientes do cruzamento das éguas com o jumento mencionados acima. As fêmeas apresentaram maior porcentagem das CpGs metiladas tanto no exon 1, quanto no alelo materno. Sendo a fêmea 1, quem apresentou maior porcentagem, 61,2% e 91,25, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Comparação dos perfis de metilação entre as mulas fêmeas e machos.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação no exon 1, e no alelo materno, entre as fêmeas e os machos muares adultos.

2.2.4 Perfis de metilação do SNRPN em tecido extra-embrionário e embrionário em conceptos muares em diferentes idades gestacionais

Embriões híbridos com diferentes idades gestacionais foram gerados. No embrião com 21 dias foi observado a menor porcentagem de CpGs metiladas no exon 1 (46,7%), bem como no alelo materno (16,3%) no tecido extra-embrionário (Figura 10 A). No tecido embrionário deste embrião as porcentagens observadas também foram baixas, 49,1% e 21,5%, respectivamente (Figura 10 B).

Nos embriões com 20 e 25 dias, só foram analisados os tecidos extra-embrionários. O embrião com 20 dias apresentou 77,4% das CpGs metiladas no exon 1, e 92,3% no alelo materno. Um embrião com 25 dias apresentou, respectivamente, 70,8% e 89,5%, enquanto o outro apresentou 67,6% e 88,2% (Figura 10 A).

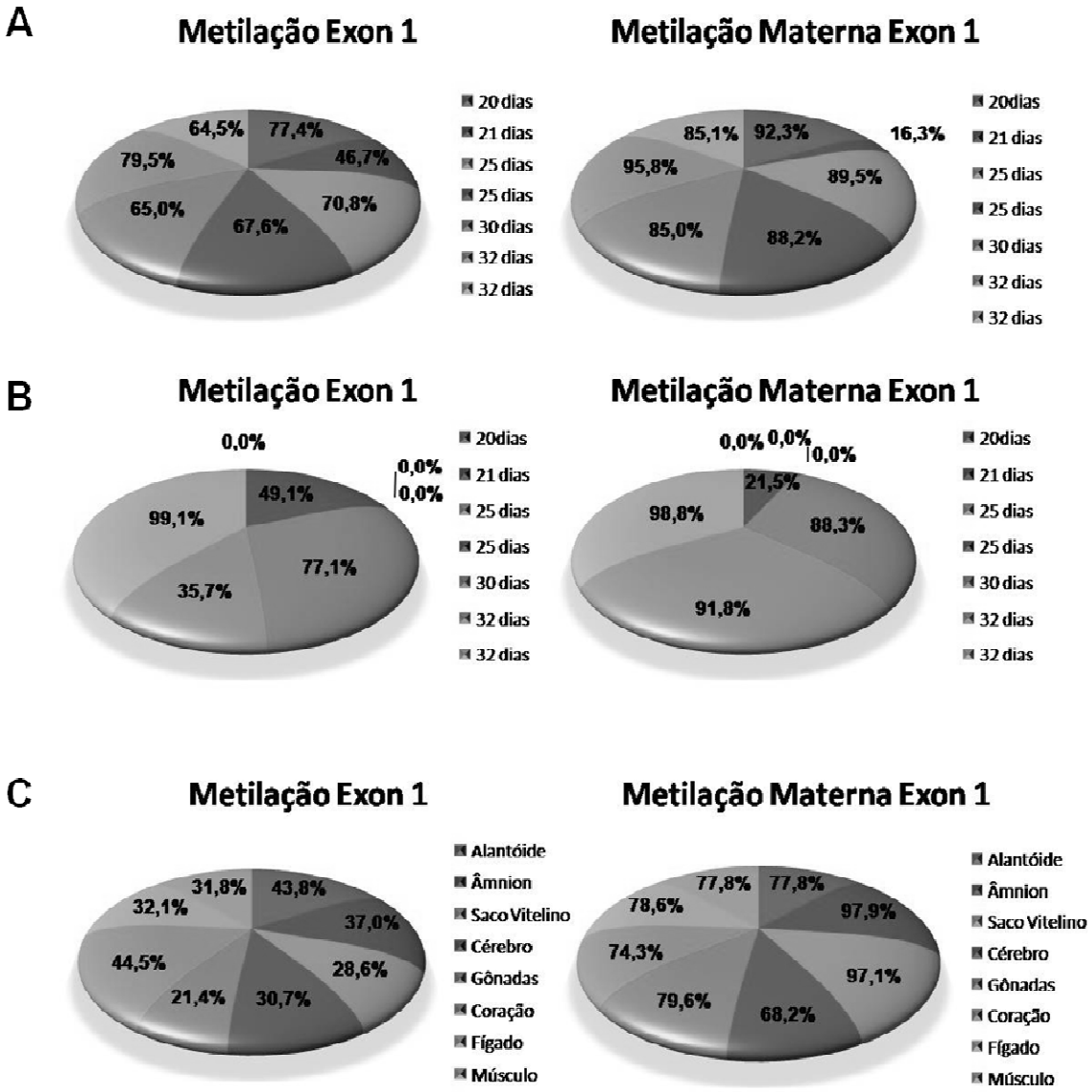
No tecido extra-embrionário do embrião com 30 dias de gestação foram observados 65% das CpGs metiladas no exon 1, tendo 85% das CpGs metiladas no alelo materno (Figura 10 A). Enquanto, no tecido embrionário observou-se 77,1% e 88,3%, respectivamente (Figura 10 B).

Dentre todas as idades gestacionais, o tecido extra-embrionário de um dos embriões com 32 dias de gestação obteve-se a maior porcentagem das CpGs metiladas no exon 1 (79,5%), bem como no alelo materno (95,8%) (Figura 10 A). No tecido embrionário desta mula observou-se baixa porcentagem das CpGs metiladas no exon 1 (35,7%), porém com alta taxa de metilação no alelo materno (91,8%). E no outro embrião com a mesma idade gestacional observou-se uma alta porcentagem das CpGs metiladas no exon 1 (99,1%), bem como no alelo materno (98,8%) (Figura 10 B).

No feto com 50 dias de gestação, foi possível analisarmos, os tecidos extra-embrionários (alantóide, âmnion e saco vitelino) separadamente, bem como os tecidos embrionários: cérebro, coração, fígado, gônadas e músculo. As maiores porcentagens das CpGs metiladas no exon 1 foram observadas no alantóide e no coração (43,8% e 44,5%, respectivamente). No entanto, as maiores porcentagens de CpGs metiladas do exon 1 no alelo materno foram observadas no âmnion e no saco vitelino (97,9% e 97,1%, respectivamente). E as menores porcentagens das

CpGs metiladas do exon 1 e no alelo materno foram observadas no cérebro (30,7% e 68,2%, respectivamente) (Figura 10 C)

Figura 10 - Comparação dos perfis de metilação entre os embriões muares em diferentes idades gestacionais e do feto muar com 50 dias de gestação.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação no exon 1, e no alelo materno, entre os tecidos extra-embrionários (A) e embrionários (B) em conceptos muares em diferentes idades gestacionais, bem como nos tecidos extra-embrionários e embrionários do feto muar com 50 dias de gestação (C).

2.2.5 Perfis de metilação de conceptos muares clonados em diferentes idades gestacionais

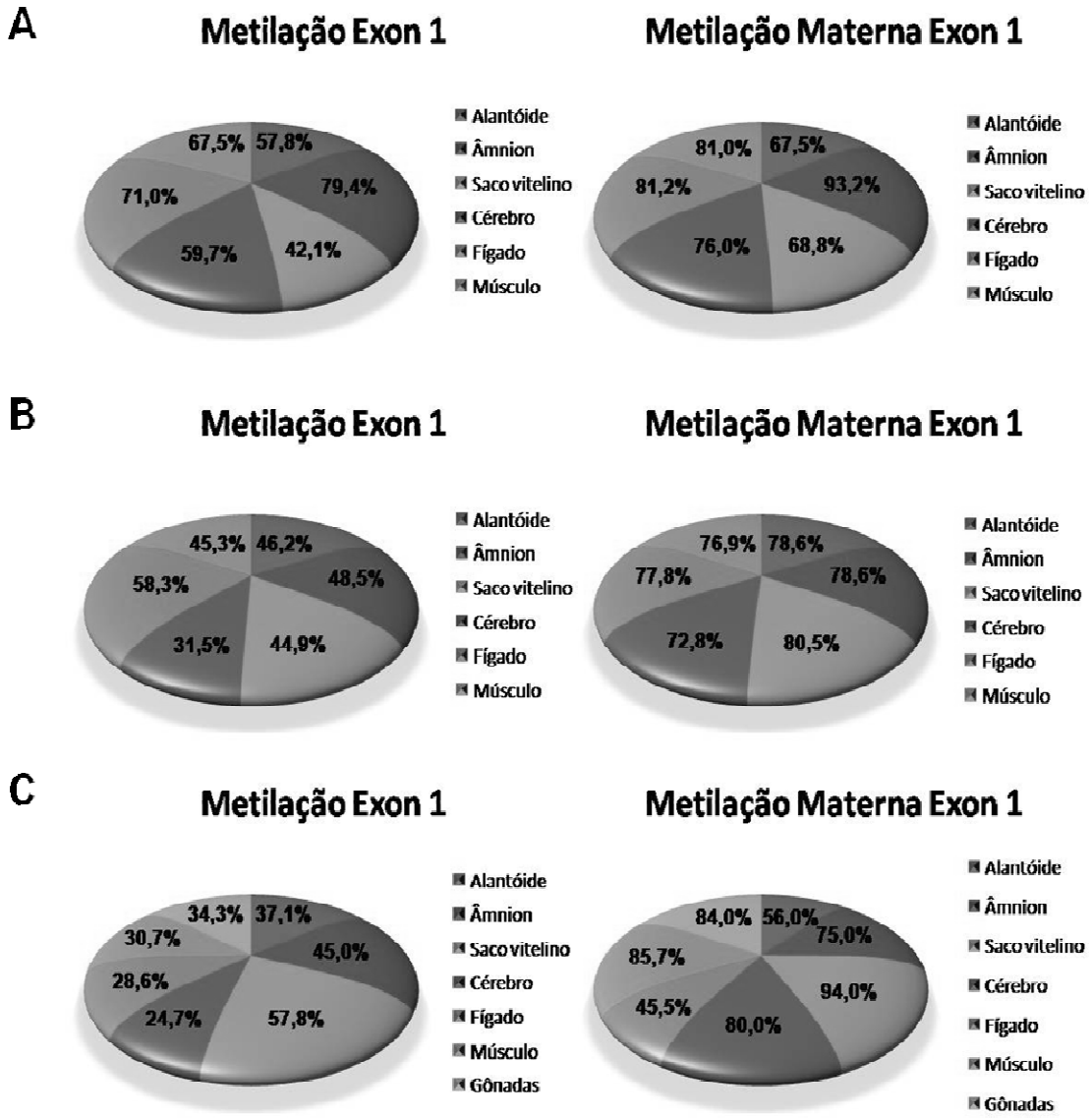
O embrião clonado em estágio inicial de gestação, 26 dias, apresentou baixa porcentagem de metilação nos tecidos extra-embrionários (16,8%), sendo 69% das CpGs metiladas no alelo materno (Tabela 6).

No feto clonado com 40 dias de gestação, dentre os tecidos extra-embrionários, o âmnion apresentou a maior porcentagem de CpGs metiladas no exo 1 (79,4%), bem como alta porcentagem de CpGs metiladas no alelo materno (93,2%). Dentre os tecidos embrionários, o fígado foi o qua apresentou maior porcentagem, 71% e 81,2%, respectivamente (Figura 11 A)

Aos 42 dias de gestação, o clone, apresentou menores porcentagens de metilação das CpGs, em relação ao feto clonado com 40 dias de gestação. Dentre os tecidos extra-embrionários, o âmnion continuou apresentando maior taxa de metilação das CpGs no exon 1 (48,5%), contudo no alelo materno do exon 1, o saco vitelino apresentou a maior porcentagem (80,5%). Dentre os tecidos embrionários, o fígado continuou apresentando a maior porcentagem de CpGs metiladas no exon 1 (58,3%), e no alelo materno (77,8%) (Figura 11 B).

No clone com 44 dias de gestação, dentre os tecidos extra-embrionários, o saco vitelino passou a apresentar a maior porcentagem das CpGs metiladas no exon 1 (57,8%), bem como no alelo materno (94%). Dentre os tecidos embrionários as gônadas passaram a apresentar maiores porcentagens de CpGs metiladas no exon 1 (34,3%), e no alelo materno (84%) (Figura 11 C). Contudo, pode-se observar uma redução na porcentagem de CpGs metiladas no exon 1 nos tecidos embrionários, quando comparado com os clones aos 40 e 42 dias de gestação (Figura)

Figura 11 - Comparação dos perfis de metilação entre os tecidos extra-embrionários e embrionários de fetos muares com 40, 42 e 44 dias de gestação.



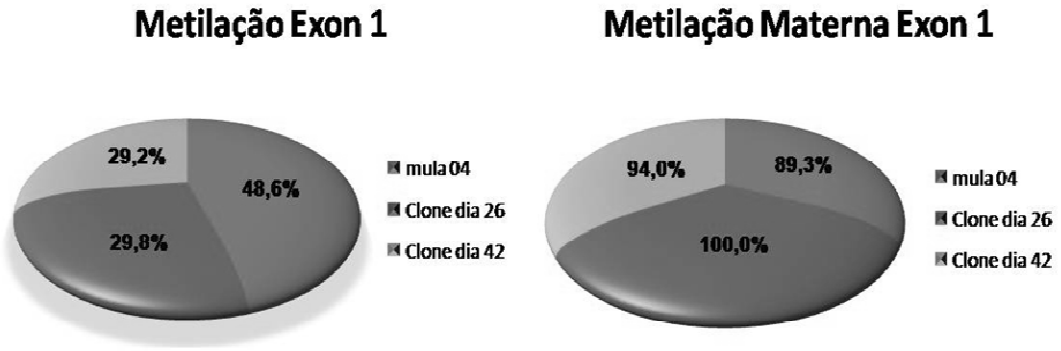
Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação no exon 1, e no alelo materno, entre os tecidos extra-embrionários e embrionários de fetos muares clonados com 40 (A), 42 (B) e 44 (C) dias de gestação.

2.2.6 Perfis de metilação dos fibroblastos da mula 04 e dos clones com 26 e 42 dias de gestação

Os clones com 26 e 42 dias foram gerados a partir dos fibroblastos da mula 04. Analisaram-se, então os fibroblastos da mula 04, a fim de compará-los com os fibroblastos dos clones. Notou-se diminuição da porcentagem das CpGs metiladas no exon 1. Nos fibroblastos da mula 04 essa porcentagem foi de 48,6%, e nos fibroblastos do clone com 26 dias passou para 29,8%, e, 29,2% nos fibroblastos do clone com 42 dias. Com relação à porcentagem de CpGs metiladas no alelo materno do exon 1, obervou-se que houve um aumento. Assim, os fibroblastos da mula 04 apresentaram a menor porcentagem (89,3%), e os fibroblastos do clone com 26 dias a maior (100%) (Figura 12)

Figura 12 - Comparação dos perfis de metilação entre os fibroblastos da mula 04 e dos clones gerados a partir destes fibroblastos com 26 e 42 dias de gestação.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação no exon 1, e no alelo materno, entre os fibroblastos da mula 04, e dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação.

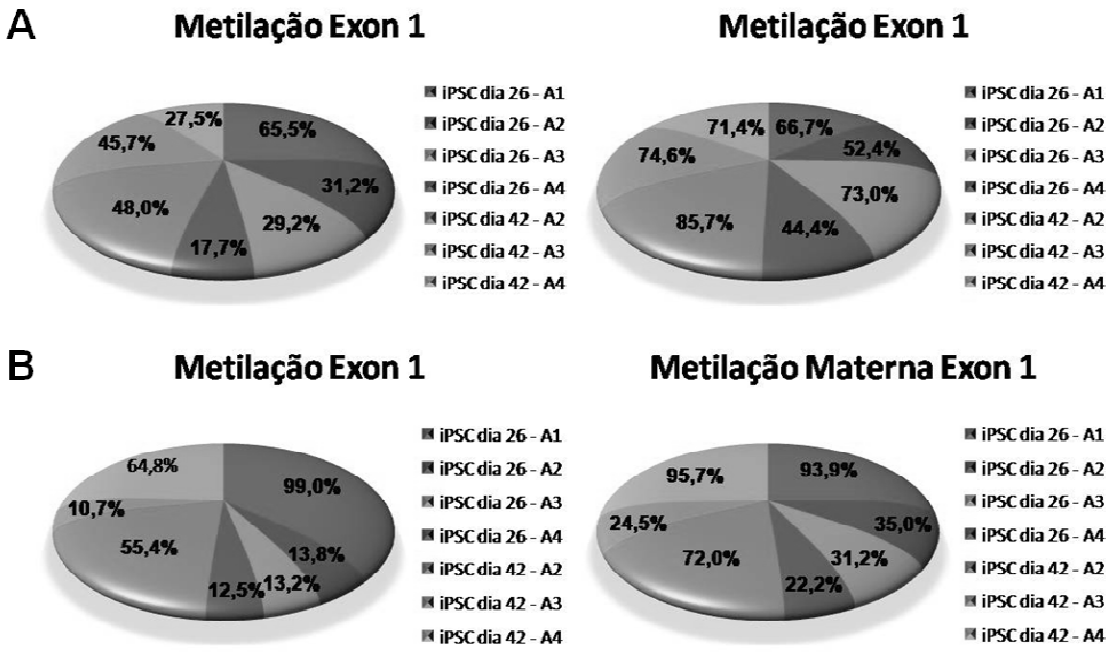
2.2.7 Perfis de metilação das iPSCs reprogramadas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação

Ao compararmos as colônias de iPSCs geradas a partir da reprogramação dos fibroblastos dos clones com 26 e com 42 dias de gestação, observou-se, na primeira passagem que a colônia A1 do clone com 26 dias apresentou a maior porcentagem

de CpGs metiladas no exon 1 (65,5%). Contudo, dentre as colônias deste clone, a colônia A3 foi a que apresentou maior porcentagem de CpGs metiladas no alelo materno do exon 1 (73%). Dentre as colônias do clone de 42 dias de gestação, a colônia A2, foi a que apresentou maior porcentagem em ambos 48% e 85,7%, respectivamente (Figura 13A)

Na décima passagem, a colônia A1 do clone com 26 dias de gestação, continuou a apresentar maior porcentagem de CpGs metiladas no exon 1 (99%), e com 93,9% das CpGs metiladas no alelo materno. E a colônia A4, teve a maior porcentagem de CpGs metiladas no exon 1 (64,8%), bem como no alelo materno (95,7%) (Figura 13B).

Figura 13 - Comparação dos perfis de metilação entre as diferentes colônias de iPSCs geradas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação na primeira e décima passagens.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Comparação da porcentagem de metilação no exon 1, e no alelo materno, entre diferentes colônias de células iPSCs geradas a partir dos clones com 26 e 42 dias de gestação na primeira (A) e na décima (B) passagens.

Os resultados dos perfis de metilação descritos acima estão resumidos nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 1- Metilação das éguas e do jumento

Parentais: Éguas - Jumento				
Éguas	Fibroblastos Adultos *In vivo*	SNPs 1-2-3	Mini-preps	Metilação Global
	Égua 1	G-0-G	23	12/22 metilado (50.4%)
	Égua 2	G-0-G	24	9/24 metilado (33.7%)
Jumento		T-AT-A	22	0/16 metilado (0.6%)

Fonte: Rigoglio (2016)

Tabela 2- Metilação das mulas adultas

Mulas Adultas (fibroblastos)						
	SNPs 1-2-3	**Mini-preps Pat:Mat**	**Metilação**		**Metilação Exon 1**	**Metilação Maternal Exon 1**
Fibroblastos Adultos In vivo			**% Paternal**	**% Maternal**		
Fêmea 1	T/G-AT/0-A/G	7:16	0%	100% (1P)	32.1%	91.2%
Fêmea 2	T/G-AT/0-A/G	10:16	10%	100%	38.08%	85.71%
Fêmea 3	T/G-AT/0-A/G	11:17	0%	94%	45.92%	80.85%
Macho 1	T/G-AT/0-A/G	17:9	0%	100%	30.16%	42.85%
Macho 2	T/G-AT/0-A/G	8:6	0%	100%	21.80%	60.04%

Tabela 3- Metilação dos conceptos muares em diferentes idades gestacionais

Embriões de mula						
	SNPs 1-2-3	Mini-prepe Pat:Mat	Metilação		Metilação Exon 1	Metilação Materna Exon 1
20 dias	T/G – AT/0 – A/G		% Paterno	% Materno		
Extra-embrionário		5:25	2.8%	90.6%	77.4%	92.3%
21 dias	T/G – AT/0 – A/G					
Extra-embrionário		5:10	2%	66,5%	46.7%	16.3%
Embrionário		8.8	1.25%	83.3%	49.1%	21.5%
25 dias - 1	T/G – AT/0 – A/G					
Extra-embrionário		6:18	2.8%	88.4%	70.8%	89.5%
25 dias - 2						
Extra-embrionário		7:23	0%	86.2%	67.62%	88.2%
30 dias	T/G AT/0 A/G					
Extra-embrionário		1:20	2,7%	87,1%	85%	85%
Embrionário		3:24			77.05%	86.28%
32 dias - 1	T/G – AT/0 – A/G					
Extra-embrionário		5:18	2.8%	87.3%	79.51%	95.77%
Embrionário		11:7	2.2%	91.4%	35.71%	91.83%
32 dias - 2						
Extra-embrionário		7:22	3.0%	88.3%	64.53%	85.06%
Embrionário		4:12	3.3%	96.9%	99.10%	98.8%
50 dias	T/G – AT/0 – A/G					
Alantóide	T/G – AT/0 – A/G	7:9	1.4%	77,8%	43.8%	77.8%
Âmnion		10:7	1%	86,2%	37%	97,9%
Saco Vitelino		10:5	1%	82%	28.6%	97,1%%
Cérebro		11 : 9	0.3%	64.6%	30.7%	68.2%%
Gonades		21 : 7	0.5%	77.1%	21.4%	79.6%
Coração		7 : 10	0.3%	73%	44.5%	74.3%
Fígado		12 : 8	2.3%	74.6%	32.1%	78.6%

Fonte: Rigoglio (2016)

Tabela 4- Metilação de embrião de clones muares em diferentes idades gestacionais

Mulas Clonadas (da mula 04)						
	SNPs 1-2-3	Mini-preps Pat:Mat	Metilação		Metilação Exon 1	Metilação Materna Exon 1
26 dias	T/G – AT/0 – A/G		% Paternal	% Maternal		
Extra-embrionário		22.6	0.9%	71.1%	16.8%	69%
40 dias	T/G – AT/0 – A/G					
Alantóide		3:17	1.1%	74.8%	57.82%	67.46%
Âmnion		4:23	2.6%	92%	79.36%	93.18%
Saco Vitelino		7:11	1%	75.2%	42.06%	68.83%
Cérebro		6:22	4%	77.5%	59.7%	75.97%
Fígado		4:27	2.6%	84.8%	70.97%	81.48%
Músculo		3:15	2.2%	84.9%	67.46%	80.95%
42 dias	T/G – AT/0 – A/G					
Alantóide		9:12	2.6%	73.6%	46.2%	78.6%
Âmnion		9:14	1.8%	83.1%	48.5%	78.6%
Saco Vitelino		18:11	2.2%	75.7%	44.9%	80.5%
Cérebro		14:10	1.4%	72.7%	31.5%	72.8%
Fígado		6:18	2.8%	78.7%	58.3%	77.8%
Músculo		10:13	3%	76.9%	45.3%	76.9%
44 dias	T/G – AT/0 – A/G					
Alantóide		7:13	1,9%	66.9%	37.1%	56%
Âmnion		11:16	1,2%	67.7%	45%	75%
Saco Vitelino		8:12	10%	79.7%	57.8%	94%
Cérebro	N/G – AT/0 – A/G	27:10	2.2%	79.7%	24.7%	80%
Gonadas	N/G – AT/0 – A/G	12:8	2.8%	84.3%	34.3%	84%
Fígado		11:8	1.2%	54.7%	28.6%	45.5%
Músculo		13:7	1.5%	84.3%	30.7%	85.7%

Fonte: Rigoglio (2016)

Tabela 5- Metilação de fibroblastos da mula 04 e dos clones com 26 e 42 dias de gestação

Fibroblastos					
	Mini-preps Pat:Mat	Metilação		Metilação Exon 1	Metilação Materna Exon 1
		% Paternal	% Maternal		
Clone 26 dias	18:6	0.4%	76.1%	29.8%	100%
Clone 42 dias	16:7	0.8%	90.5%	29.2%	94%
Mule 04	7:8	0.95%	79.6%	48.6%	89.3%

Fonte: Rigoglio (2016)

Tabela 6- Metilação das células iPSCs geradas a partir dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação

Células IPSCs						
		Mini-preps Pat:Mat	Metilação		Metilação Exon 1	Metilação Materna Exon 1
Fibroblastos do clone 26 dias	Passagem 1		% Paternal	% Maternal		
	iPSC dia 26-A1	12:12	1.1%	58.3%	65.5%	66.7%
	iPSC dia 26-A2	7:9	1.9%	53%	31.2%	52.4%
	iPSC dia26-A3	14:9	0.75%	27.8%	29.2%	73%
	iPSC dia26-A4	15:10	0.4%	37.7%	17.7%	44.3%
Fibroblastos do clone 42 dias	iPSC dia42-A2	5:6	1.3%	77.2%	48%	85.7%
	iPSC dia42-A3	6:9	0.5%	68.1%	45.7%	74.6%
	iPSC dia42-A4	9:5	1.5%	73.3%	27.5	71.4%
	Passagem 10					
Fibroblastos do clone 26 dias	iPSC dia26-A1	13:14	0.8%	89.5%	99%	93.9%
	IPSC dia26-A2	17:11	1%	27.9%	13.8%	35%
	IPSC dia26-A3	15:11	0.2%	21.8%	13.2%	31.2%
	iPSC dia26-A4	7:9	0%	11.9%	12.5%	22.2%
Fibroblastos do clone 42 dias	iPSC dia42-A2	8:6	0.4%	56.1%	55.4%	72%
	iPSC dia42-A3	9:7	0.7%	59.5%	10.7%	24.5%
	iPSC dia42-A4	5:10	0.95%	92.3%	64.8%	95.7%

Fonte: Rigoglio (2016)

2.2.8 Análise quantitativa por PCR em tempo real dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A em embriões muares com diferentes idades gestacionais

Tanto para os tecidos embrionários como para os extra-embrionários houve expressão diferencial dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A ao longo do período analisado. Entretanto quando comparados os níveis de expressão entre os tecidos embrionários e extra-embrionários não houve diferença significativa (Figura 14).

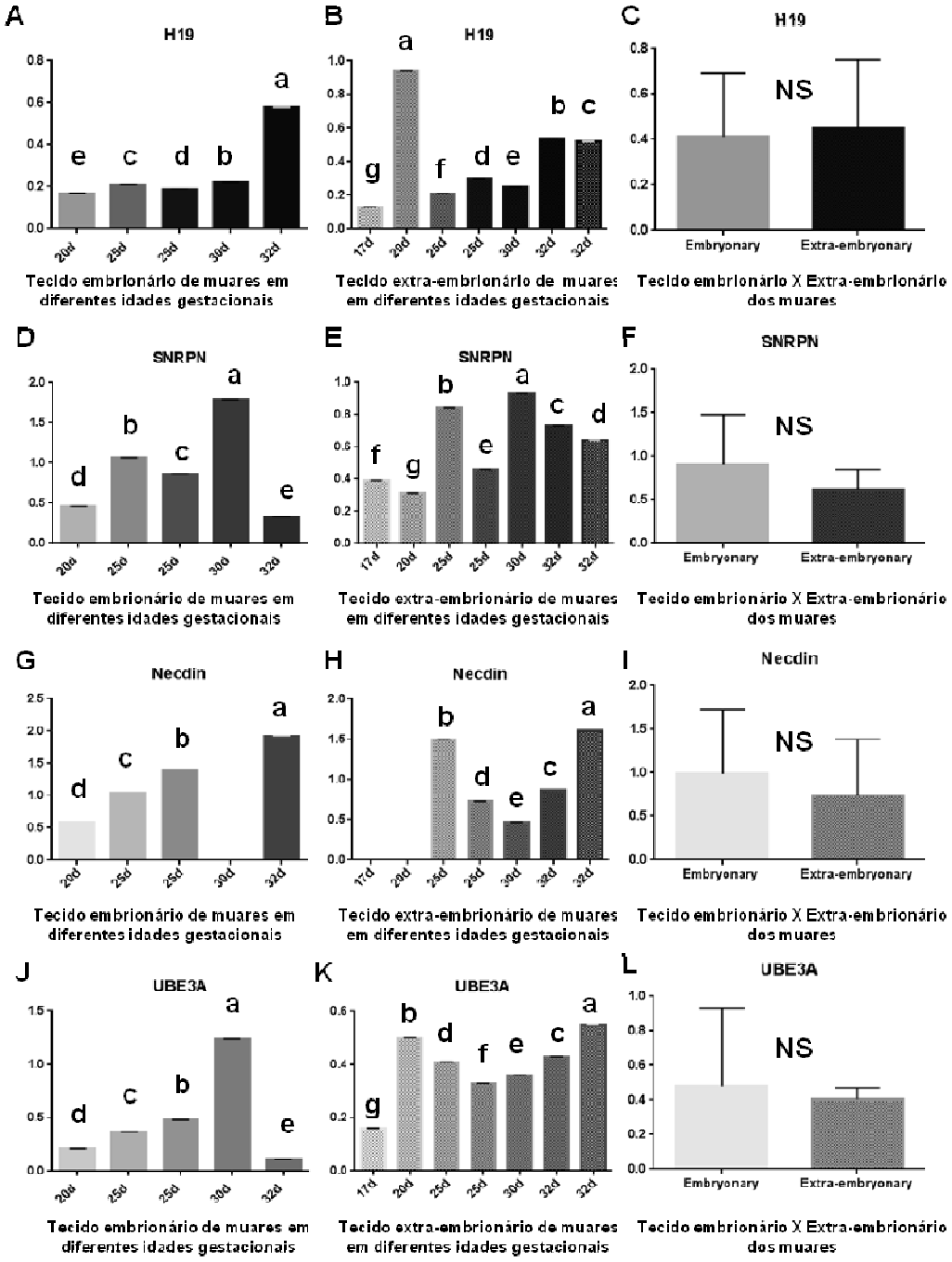
Para o H19, nos tecidos embrionários houve um aumento de aproximadamente três vezes no dia 32 em relação aos demais períodos analisados (Figura 14A). Entretanto nos tecidos extra-embrionários, ocorreu o pico máximo de expressão aos 20 dias de gestação, o que representou aproximadamente o dobro da expressão aos 32 dias (Figura 14B).

Os níveis de expressão do gene SNRPN oscilaram nos períodos analisados, portanto não houve um padrão de aumento ou diminuição de expressão ao decorrer do tempo gestacional, tanto para os tecidos embrionários (Figura 14D) e extra-embrionários (Figura 14E).

A expressão de Necdin foi crescente ao longo dos períodos analisados para os tecidos embrionários (Figura 14G), entretanto para os tecidos extra-embrionários houve um decréscimo de expressão até o dia 30 de gestação, voltando a aumentar ao dia 32 (Figura 14H).

Para o gene UBE3A, nos tecidos embrionários houve aumento de expressão até o dia 30, porém ao dia 32 houve um decréscimo de quase 10 vezes na expressão do gene (Figura 14J). Para os tecidos extra-embrionários, houve uma regulação positiva de aproximadamente 2,5 vezes no dia 20 em relação ao dia 17 de gestação; porém os níveis diminuíram até o dia 25, com nova regulação positiva até o dia 32 (Figura 14K).

Figura 14 - Expressão dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A nos embriões muares com diferentes idades gestacionais.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão dos genes H19 (A-C), SNRPN (D-F), Necdin (G-I) e UBE3A (J-L) nos tecidos embrionários e extra-embrionários de muares em diferentes idades gestacionais.

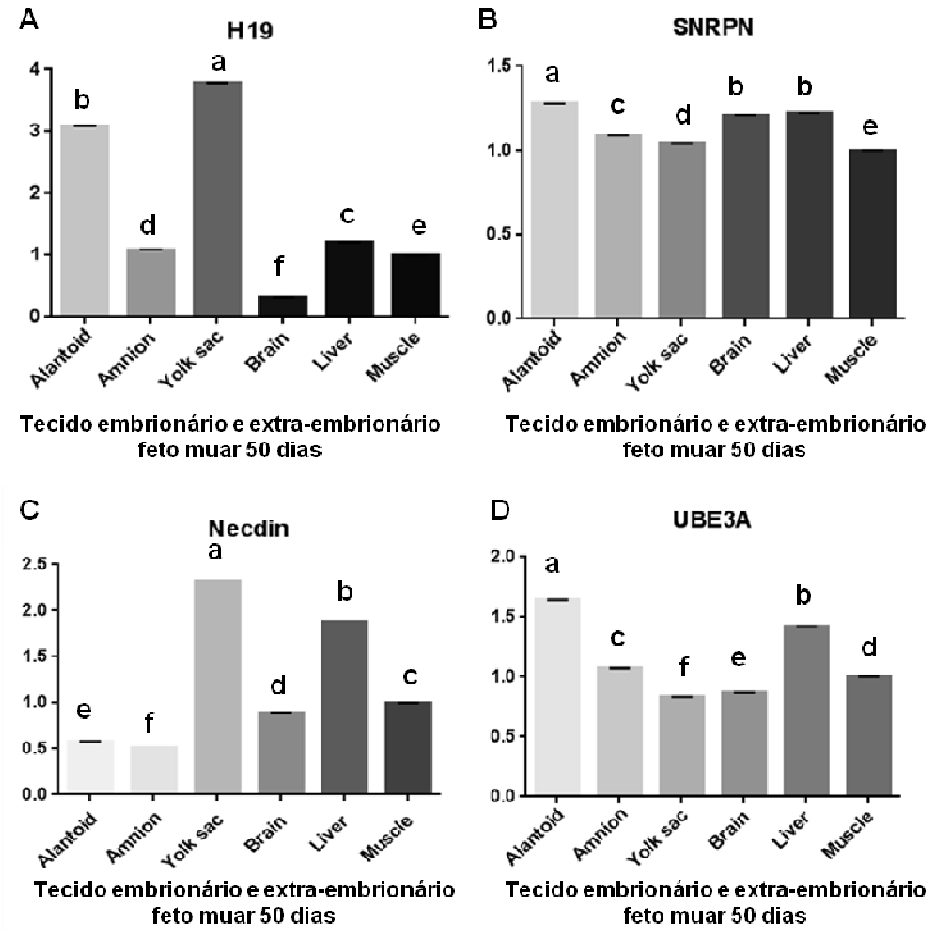
2.2.9 Análise quantitativa por PCR em tempo real dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A em feto muar com 50 dias de gestação

Aos 50 dias de gestação, devido o maior desenvolvimento do feto e das membranas fetais, foi possível realizar a análise expressão genética separadamente em cada estrutura (Figura 15).

Para o gene H19 houve diferentes níveis de expressão para cada estrutura estuda, sendo que o saco vitelino apresentou a maior expressão e o cérebro a menor (Figura 15A). Para o SNRPN, apenas o cérebro e o fígado apresentaram níveis de expressão similares, não havendo grandes diferenças de expressão entre as estruturas estudadas; sendo que o alantóide apresentou a maior expressão e o músculo esquelético a menor (Figura 15B).

Para Necdin, os níveis de expressão variaram muito entre si, sendo que saco vitelino mostrou a maior expressão e o âmnion a menor (Figura 15C). E para o gene UBE3A, também não ocorreu grande variação na expressão entre as estruturas, sendo a maior no alantóide, e a menor no saco vitelino (Figura 15D)

Figura 15 - Expressão dos genes H19, SNRPN, Necdin e UBE3A nas membranas extra-embrionárias e tecidos de feto muar com 50 dias de gestação.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão dos genes H19 (A), SNRPN (B), Necdin (C) e UBE3A (D) nos tecidos embrionários e extra-embrionários de feto muar com 50 dias de gestação.

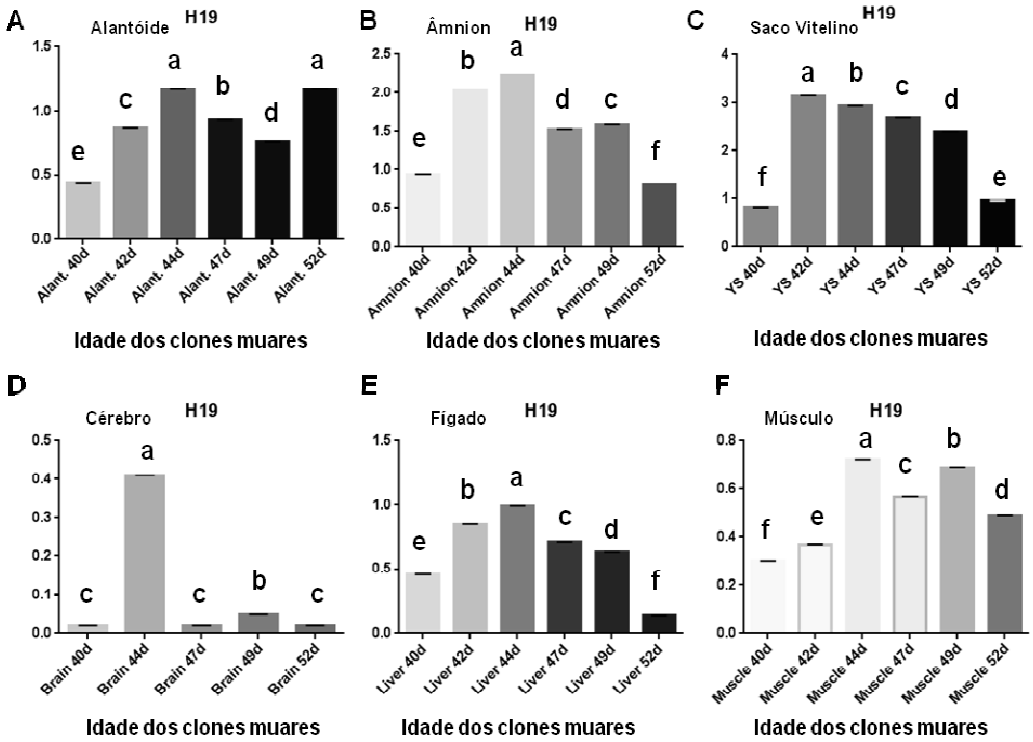
2.2.10 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene H19

Foi possível detectar a expressão diferencial do H19 em todas as estruturas extra-embrionárias (alantóide, âmnio e saco vitelino) e embrionárias (cérebro, fígado e músculo), e em todas as idades analisadas (40, 42, 47, 49 e 52 dias de gestação) para os embriões e fetos produzidos por clonagem por transferência nuclear de célula somática. De modo geral, pode se observar os maiores níveis de expressão no dia 44 de gestação, exceto para o saco vitelino.

Para o alantóide, houve uma oscilação no padrão de expressão, tendo como picos máximos de expressão aos dias 44 e 52 de gestação (Figura 16A). No âmnio, houve uma regulação positiva até o dia 44 atingindo o menor nível de expressão aos 52 dias de gestação (Figura 16B). O saco vitelino teve a maior expressão aos 42 dias, tendo um descrescimo moderado de expressão até o dia 49, e com menor expressão aos 52 dias (Figura 16C).

Para os tecidos embrionários, no cérebro, foi possível observar a maior expressão no dia 44, sendo aproximadamente dez vezes mais expresso que nas demais idades gestacionais (Figura 16D). No fígado, houve uma regulação positiva até o dia 44 e decrescendo a expressão até o dia 52 de gestação (Figura 16E). No músculo esquelético não houve um padrão de expressão, sendo o dia 44 de gestação com maior expressão e o dia 40 com a menor (Figura 16F).

Figura 16 - Expressão do gene H19 nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais.

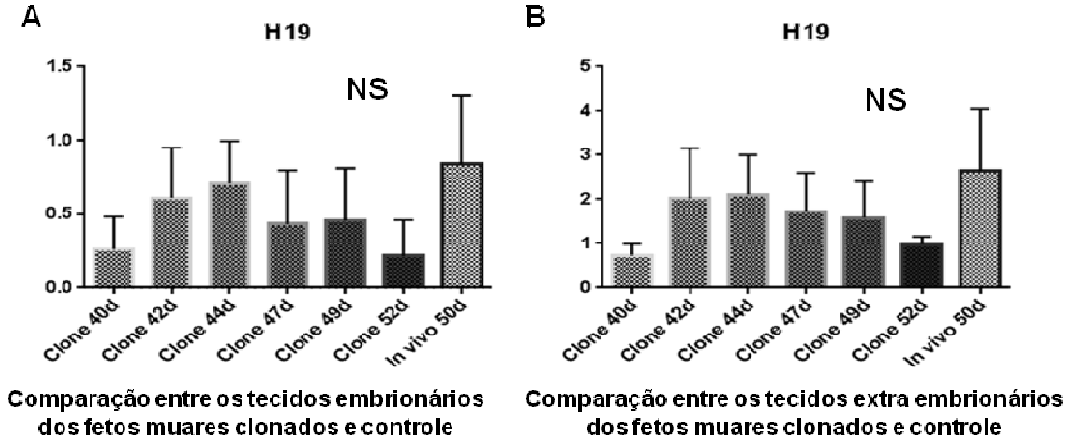


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão gênica do gene H19 nos tecidos extra-embrionários: alantóide (A), âmnion (B), e saco vitelino (C); e nos tecidos embrionários: cérebro (D), fígado (E) e músculo (F), em fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais.

Quando agrupados os três tecidos embrionários de cada idade gestacional dos aniamis clonados e comparado os tecidos embrionários dos animais controle, não foi possível observar diferenças significativas (Figura 17A). O mesmo ocorreu quando comparados os tecidos extra-embrioários (Figura 17B).

Figura 17 - Expressão do gene H19 nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle).



Fonte: Rigoglio (2016)

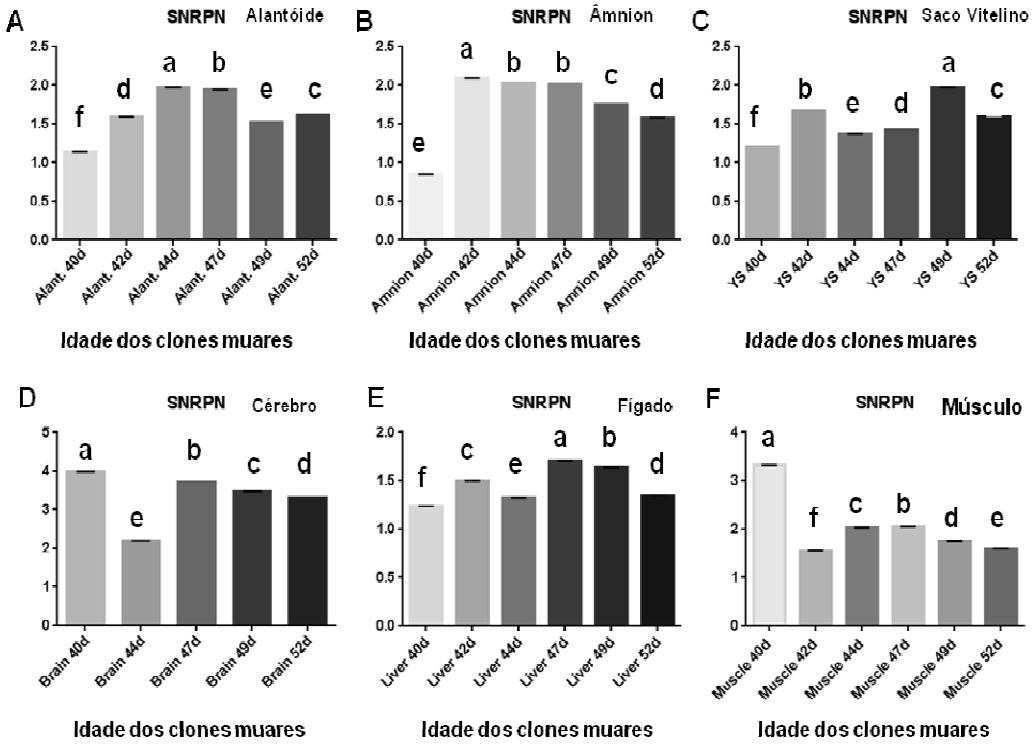
Legenda: Expressão do gene H19 ao agruparmos os três valores obtidos nos tecidos embrionários e extra-embrionários, e compará-los com o animal controle. Não houve diferença significativa na expressão do gene nos tecidos embrionários dos fetos muares clonados e o controle (A e B).

2.2.11 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene SNRPN

Dentre todos os tecidos, o cérebro foi o que apresentou maior expressão do gene SNRPN, seguido do músculo esquélico (Figura 18). Ao contrário do que ocorreu na expressão do gene H19, não foi observada curva de tendência para aumento e diminuição na expressão do gene SNRPN, pois houve variações no padrão de expressão deste gene nas estruturas e idades analisadas. Assim, no alantóide a maior expressão ocorreu no clone com 44 dias de gestação (Figura 18A). Em contra partida, no âmnion e no saco vitelino, a maior expressão do gene ocorreu nos clones com 42 e 49 dias de gestação, respectivamente (Figura 18B e C). No entanto, no âmnion, não houve diferença significativa entre os clones com 44 e 47 dias de gestação (Figura 18B). No cérebro e no músculo a maior expressão ocorreu no

clone com 40 dias de gestação (Figura 18D); e no fígado aos 47 dias de gestação (Figura 18F).

Figura 18 - Expressão do gene SNRPN nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais.

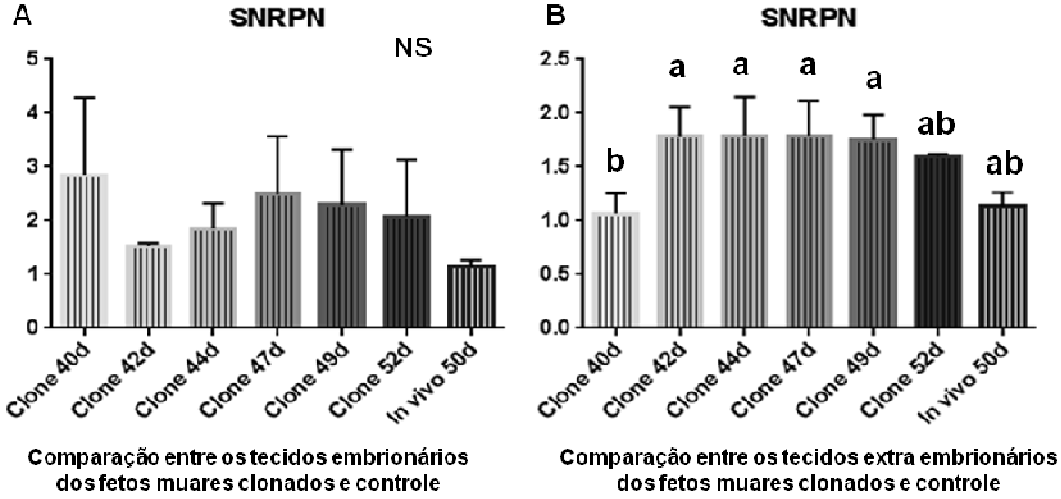


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão gênica do gene SNRPN nos tecidos extra-embrionários: alantóide (A), âmnion (B), e saco vitelino (C); e nos tecidos embrionários: cérebro (D), fígado (E) e músculo (F), em fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais.

Ao agruparmos os três valores obtidos na expressão do gene SNRPN nos tecidos embrionários e extra-embrionários, observou-se maior expressão nos tecidos embrionários. E ao comparar os tecidos embrionários dos clones nas diferentes idades gestacionais com o animal controle não houve diferença significativa (Figura 19A). Nos tecidos extra-embrionários, houve diferença significativa entre os clones com 40 e 42 dias de gestação. Contudo, não houve diferença significativa entre o clone com 52 dias de gestação e o animal controle (Figura 19B).

Figura 19 - Expressão do gene SNRPN nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle).



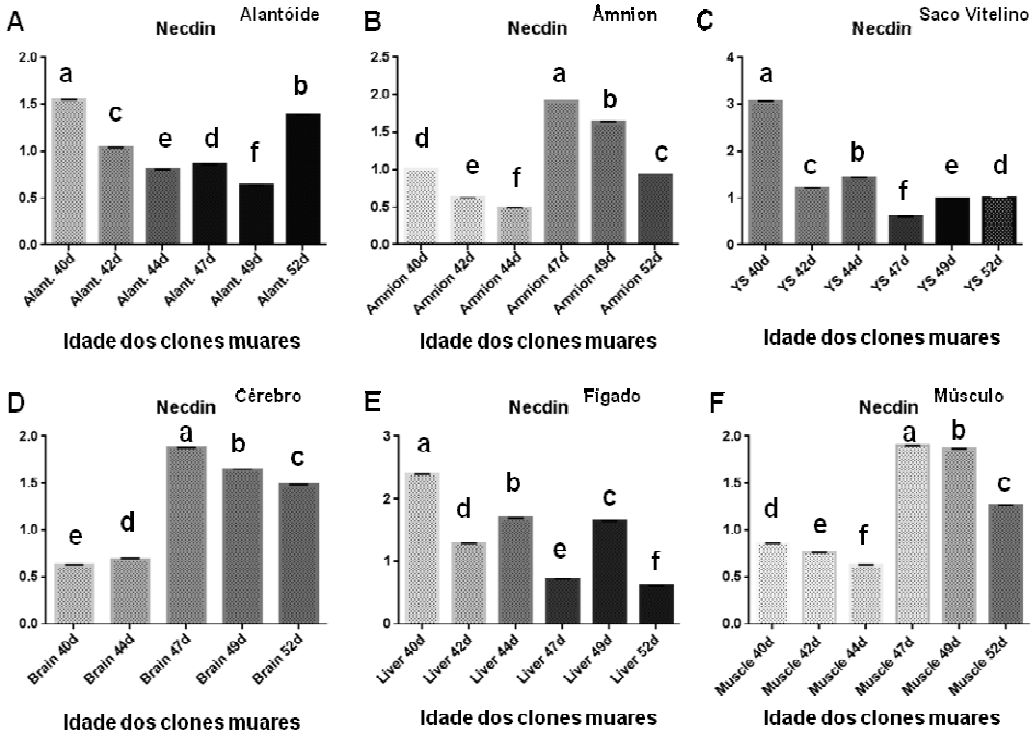
Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão do gene SNRPN ao agruparmos os três valores obtidos nos tecidos embrionários e extra-embrionários, e compará-los com o animal controle. Não houve diferença significativa na expressão do gene nos tecidos embrionários dos fetos muares clonados e o controle (A). E as letras minúsculas representam significância entre os tecidos extra-embrionários dos clones muares e o feto controle (B).

2.2.12 Análise quantitativa por PCR em tempo real do gene Necdin

A expressão do gene Necdin, assim como o gene SNRPN, não apresentou um padrão de expressão durante o desensolvimento dos embriões e fetos muares clonados, tanto para os tecidos extra-embrionários, como para os embrionários (Figura 20). Entretanto foi possível observar que o maior nível de expressão para Necdin no alantóide (Figura 20A), saco vitelínico (Figura 20C) e fígado (Figura 20E) ocorreu aos 40 dias de gestação. Enquanto que para o âmnio (Figura 37B), cérebro (Figura 20D) e músculo esquelético (Figura 20F) ocorreu aos 47 dias de gestação.

Figura 20 - Expressão do gene Necdin nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais.

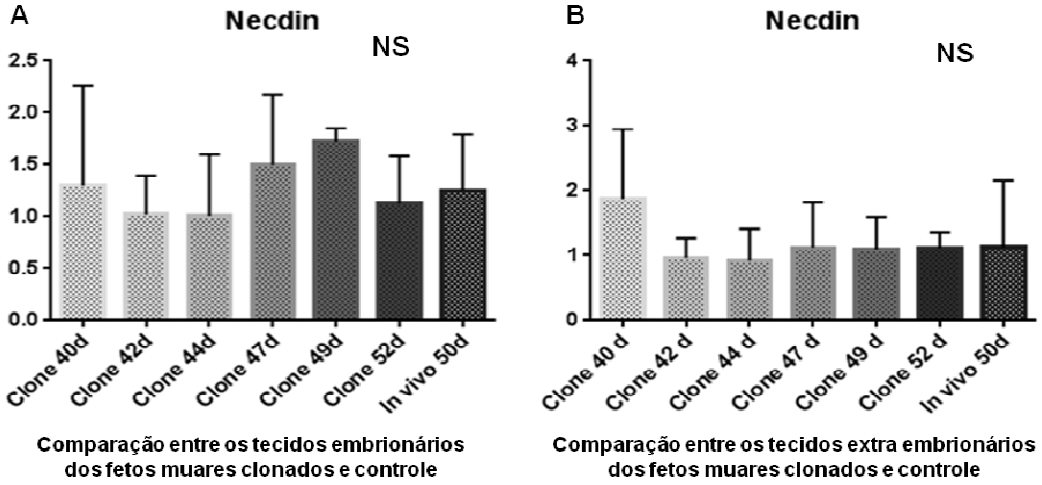


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão gênica do gene Necdin nos tecidos extra-embrionários: alantóide (A), âmnion (B), e saco vitelino (C); e nos tecidos embrionários: cérebro (D), fígado (E) e músculo (F), em fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais.

Em semelhança ao gene H19, quando agrupados as três estruturas embrionários de cada idade gestacional dos animais clonados e comparado os tecidos embrionários dos animais controle, não foi possível observar diferenças significativas (Figura 21A), assim como para as estruturas entra-embrionárias (Figura 21B).

Figura 21 - Expressão do gene Necdin nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle).



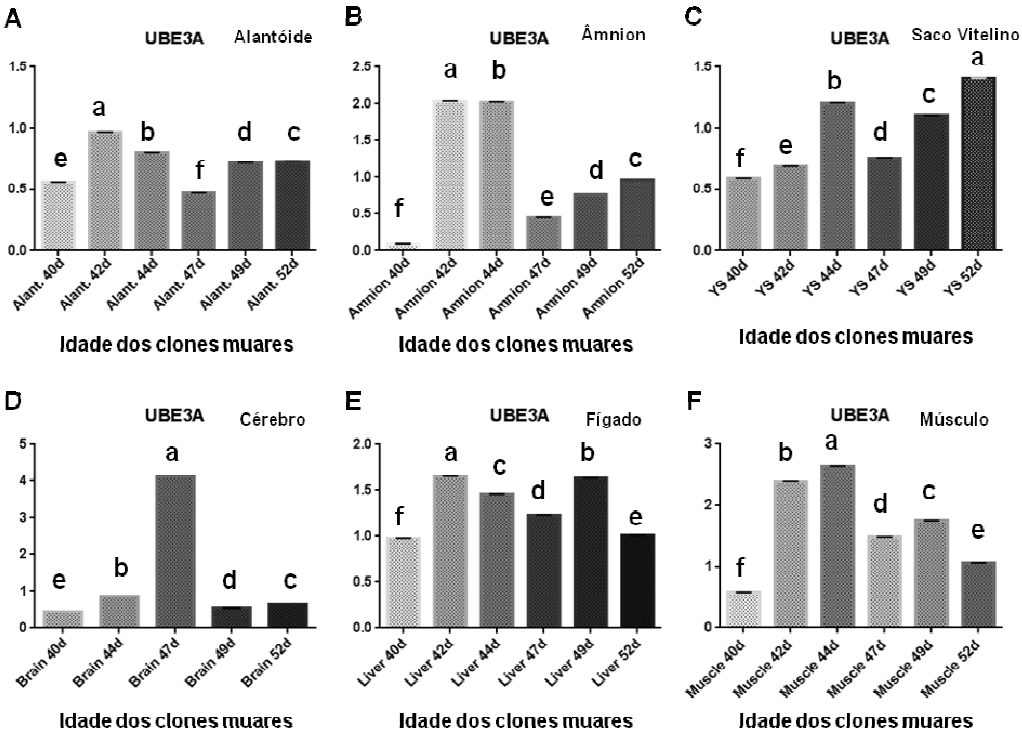
Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão do gene Necdin ao agruparmos os três valores obtidos nos tecidos embrionários e extra-embrionários, e compará-los com o animal controle, não havendo diferença significativa (A e B).

2.2.13 Análise quantitativa por PCr em tempo real do gene UBE3A

Foi possível observar a expressão do gene UBE3A em todas as estruturas e idades analisadas, porém não foi possível observar um padrão temporal ou tecidual de expressão (Figura 22). Pode-se observar que para o alantóide (Figura 22A), Amnio (Figura 22B) e fígado (Figura 22E) o maior nível de expressão foi atingido aos 42 dias de gestação. Os menores níveis de expressão foram observados aos 40 dias de gestação para o âmnio (Figura 22B), saco vitelino (Figura 22C), fígado (Figura 22E) e músculo esquelético (Figura 22F). Para o cérebro, aos 47 dias de gestação, pode-se observar uma expressão aproxidamente quatro vezes maior que as outras idades analisadas (Figura 22D).

Figura 22 - Expressão do gene UBE3A nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares em diferentes idades gestacionais.

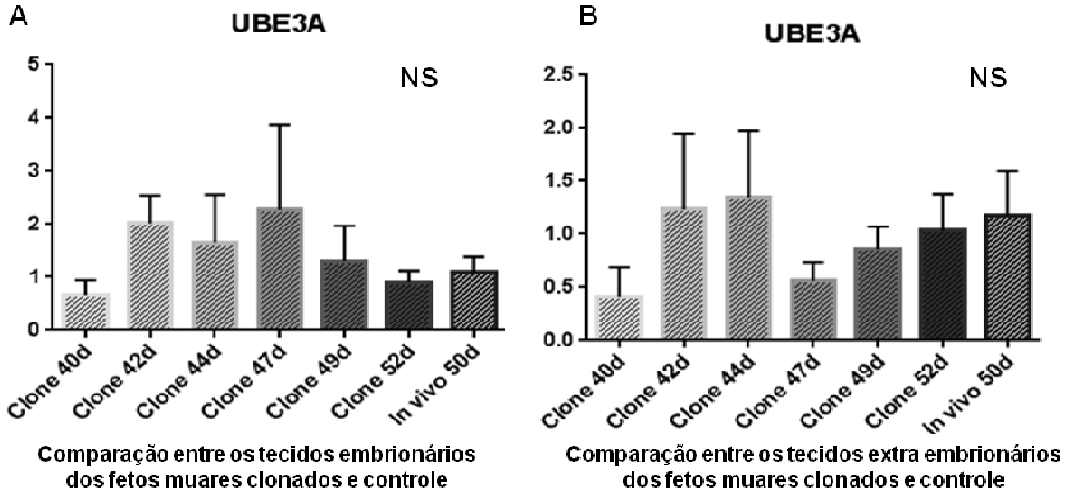


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão gênica do gene UBE3A nos tecidos extra-embrionários: alantóide (A), âmnion (B), e saco vitelino (C); e nos tecidos embrionários: cérebro (D), fígado (E) e músculo (F), em fetos muares clonados em diferentes idades gestacionais.

Assim como para os genes H19 e Necdin, quando agrupados as três estruturas embrionários de cada idade gestacional dos animais clonados e comparado os tecidos embrionários dos animais controle, não foi possível observar diferenças significativas (Figura 23A), assim como para as estruturas entra-embrionárias (Figura 23B).

Figura 23 - Expressão do gene UBE3A nos tecidos extra-embrionários e embrionários de clones muares, em diferentes idades gestacionais, e do feto muar com 50 dias de gestação (controle).



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Expressão do gene UBE3A ao agruparmos os três valores obtidos nos tecidos embrionários e extra-embrionários, e compará-los com o animal controle, não havendo diferença significativa (A e B).

2.3 DISCUSSÃO

Nos mamíferos, um pequeno número de genes, denominados imprinted, são marcados de acordo com sua origem parental, e a sua expressão ocorre em apenas um dos alelos (BARTOLOMEI; FERGUSON-SMITH, 2011). Cerca de 150 genes imprinted já foram identificados até o momento (WILLIAMSON et al., 2013). A maioria destes genes demonstraram estar envolvidos no desenvolvimento do embrião, da placenta e do cérebro (TILGHMAN, 1999; DELAVAL; FEIL, 2004; ALLEGRUCCI et al., 2005). Em comparação com a maioria dos outros tecidos, o cérebro apresenta mais genes com padrão imprinted de expressão (PRICKETT; OAKEY, 2012), o que contribui para que ocorram várias doenças do neurodesenvolvimento (MANN et al., 2004; LIM; FERGUSON-SMITH, 2010).

O *imprinting* de genes múltiplos, que se apresentam em cluster, normalmente é controlado por um elemento do DNA denominado região de controle do *imprinting* (ICR). As ICRs mostram as modificações epigenéticas de origem parental específica que são criadas na linhagem germinativa. Uma das características do ICR é a profunda diferença na metilação do DNA nas cópias derivadas dos alelos materno e

paterno, assim, enquanto uma se apresenta altamente metilada, a outra não está metilada (TOMIZAWA et al., 2011; SMALLWOOD; KELSEY, 2012). A maioria das ICRs são metilados no alelo materno, com apenas quatro ICRs paternalmente metilados (H19/Igf2, Dlk1/Dio3, Rasgrf1, Zdbf2). O gene SNRPN, em nosso estudo, se apresentou não metilado no alelo paterno, e metilado no alelo materno.

Nos humanos, o lócus do cluster do gene SNRPN, está associado com os seguintes distúrbios neurogenéticos:Síndrome de Prader-Willi (SPW) e síndrome de Angelman (SA). A SA é causada pela perda da expressão da UBE3A no alelo materno. O gene UBE3A é imprinted somente no cérebro, enquanto nos demais tecidos é expressa bialelicamente (ROBERTSON, 2005). Estudos em modelos humanos e em camundongos sugerem que o gene Necdin também contribui para estes distúrbios (GERARD et al., 1999; RIEUSSET et al., 2013).

Os três genes relacionados ao desenvolvimento dos sistema nervoso central analisados nesse estudo, SNRPN, Necdin e UBE3A, foram expressos de forma variada nos tecidos extra-embrionários e embrionários de embriões muares e fetos muares clonados nas diferentes idades gestacionais, bem como no feto muar com 50 dias de gestação. O SNRPN foi o gene que apresentou maior expressão, enquanto a UBE3A foi a que apresentou menor expressão no cérebro. No entanto, o Necdin apresentou expressão semelhante entre os tecidos analisados.

Há uma variedade de mecanismos pelos quais a ICR mantêm a regulação alélica do cluster, e estes foram revisados por alguns trabalhos (WAN; BARTOLOMEI, 2008; FERGUSON-SMITH, 2011). Estudos demonstraram que a exclusão da ICR resulta na perda do imprinting dos gene múltiplos em cluster, enfatizando, assim, sua importância e sua influência sobre a região multigênica (FITZPATRICK et al., 2002; LIN et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2006).

Nas espécies domésticas, os estudos, geralmente, confirmaram que o mecanismo de imprinting genômico é conservado, embora sejam observadas diferenças quando se comparam os dados existentes com o camundongo e o humano (YOUNG; SCHNIEKE; McCREATH, 2003; YOUNG; BEAUJEAN, 2004; KHATIB, 2005). Ao analisar a sequência comparativa dos genes imprinted mais conhecidos, sugeriu-se uma regulação espécie-específica, mesmo nas espécies mais estreitamente relacionadas, como os bovinos e os ovinos (DINDOT et al., 2004; CURCHOE et al., 2005). Nestas espécies o imprinting defeituoso está relacionado às perdas

embrionárias precoces, à síndrome da prole grande (LOS) e mortes perinatais (DE SOUSA et al., 2001; YOUNG et al., 2001; YANG et al., 2005).

O gene SNRPN, além de ser um dos primeiros genes imprinted a ser estudado, por acreditar que estaria submetido ao imprinting genômico, também despertou interesse pela presença de uma DMR bem definida, na qual não controla somente o imprinting, como também regula os demais genes do cluster (SHEMER et al., 1997). Lucifero et al. (2006) e Suzuki et al. (2009) estudaram o imprinting do gene SNRPN em bovinos, onde observou-se uma conservação evolucionária entre as espécies citadas anteriormente.

A região de IC do gene SNRPN, em humanos, possui 23 sítios CpGs que são metilados no cromossomo materno e não metilados no cromossomo paterno (ZESCHNIGK et al., 1997). Nos bovinos, este gene apresenta 39 sítios CpGs dentro da região promotora, exon 1 e ínttron 1. Vários desses sítios CpGs se apresentaram conservados entre bovinos, humanos e camundongos (LUCIFERO et al., 2006). Já nos equídeos este mesmo gene apresentou 30 sítios CpGs dentro da região promotora e do exon 1. Inicialmente, descreveu-se o gene com 8 exons (SCHMAUSS et al., 1992), mas outros 2 exons upstream foram descritos subsequentemente (SUTCLIFFE et al., 1994; GLENN et al., 1996).

Ao analisarmos as sequências genômicas do *E. caballus* e *E. asinus*, e compará-los foi identificado, dois SNPs na DMR, e um na região do exon 4. Através da geração da prole F1 híbrida, *E. mulus mulus*, foi possível rastrear a herança dos alelos parentais a partir da identificação dos mesmos SNPs dentro da sequência genômica.

As marcas epigenéticas examinadas em embriões clonados gerados pela TNCS, em diferentes espécies de mamíferos, demonstraram anormalidade em vários trabalhos (BOURC'HIS et al., 2001; DEAN et al., 2001; OHAGNE et al., 2001). E a maioria destes embriões também diferiu entre si quanto ao padrão epigenético que possuíam, indicando que a reprogramação epigenética durante a clonagem é um processo aleatório e estocástico cujo resultado é impossível de prever (DEAN; SANTOS; REIK, 2003; JOUNEAU; RENARD, 2003; KANG; LEE; HAN, 2003; HOCHEDLINGER et al., 2004). As mulas clonadas aqui estudadas apresentaram variações nas porcentagens de metilação, tanto paterna quanto materna, bem como na metilação do exon 1, e na metilação materna do exon 1.No entanto, o padrão de metilação foi semelhante nas diferentes idades gestacionais.

Originalmente, as iPSs foram descritas como sendo semelhantes às ESCs, mas evidências demonstraram algumas mudanças epigenéticas (HANNA et al., 2010). A reprogramação direta das células somáticas para iPSs é um sistema favorável para estudar as características epigenéticas que são pré-requisito para a pluripotência. Vários estudos têm investigado o status epigenético das células-tronco de humanos e de camundongos, bem como das células derivadas de adultos (NOER et al., 2006; BOQUEST; NOER; COLLAS, 2006; BOQUEST et al., 2007; GO; TAKENAKA; OHGUSHI, 2008).

Entre as colônias de iPSs geradas a partir de fibroblastos de clones com 26 e 42 dias de gestação, observou-se uma grande variação na porcentagem da metilação paterna e materna, bem como na metilação do exon 1 e metilação materna do exon 1. Na décima passagem destas células foram observadas as maiores variações.

Camundongos quiméricos gerados a partir de iPSs mostraram anormalidades semelhantes às observadas em camundongos clonados gerados por SCNT, como por exemplo, alta letalidade embrionária e vida mais curta (OGURA et al., 2002; AOI et al., 2008; GURDON; MELTON, 2008).

2.4 CONCLUSÕES

Em nosso trabalho verificamos que o gene SNRPN é expresso paternalmente. O padrão de metilação não modificou entre os embriões muares, as mulas clonadas nas diferentes idades gestacionais, os fibroblastos da mula 04F e os fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação. As iPSs provenientes dos fibroblastos dos clones com 26 e 42 dias de gestação apresentaram a menor porcentagem de metilação.

A expressão dos genes *imprinted* SNRPN, Necdin e UBE3A, foram expressos de forma variada nos tecidos extra-embrionários e embrionários de embriões muares e fetos muares clonados nas diferentes idades gestacionais, bem como no feto muar com 50 dias de gestação. O SNRPN foi o gene que apresentou maior expressão, enquanto a UBE3A foi a que apresentou menor expressão no cérebro. No entanto, o Necdin apresentou expressão semelhante entre os tecidos analisados.

Capítulo 2

CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DERIVADAS DE FIBROBLASTOS MUARES E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

3 INTRODUÇÃO

Em 2006, descobriu-se que as células somáticas podem ser reprogramadas a um estado de pluripotência semelhante às células-tronco embrionárias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), através da expressão dos fatores de transcrição, tais como Oct4, Sox2, Klf4, cMyc, Nanog, Lin28, Nr5a2 e Rarg (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2009; WANG et al., 2011; BAYART; COHEN-HAGUENAUER, 2013; ZHOU; ZENG, 2013). Os produtos deste processo de reprogramação são referidos como células pluripotentes induzidas (iPSC).

Inicialmente, estes fatores de reprogramação eram introduzidos nas células somáticas através de vetores retrovirais (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; WERNING et al., 2007; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; AOI et al., 2008; SOMMER et al., 2009; WINKLER et al., 2010). Porém esse método de reprogramação leva à incorporação das estruturas dos vetores e dos transgenes no genoma, resultando em mutação por inserção (FENG; JIA; ZHAO, 2013). Por isso, iPSCs livres de transgenes foram almejadas para futuras terapias celulares. E resolveu-se o problema da integração no genoma, devido os avanços nessa tecnologia, através da introdução exógena dos fatores de reprogramação, que são utilizados como plasmídeos epissomais (YU et al., 2009).

Durante a reprogramação das iPSCs, a remodelação do epigenoma pode facilitar a conversão para um tipo celular específico através da formação de células mais permissivas a mudanças epigenéticas, como Nanog e Lin28. Isto implica que os componentes que alteram a epigenética das células, podem melhorar a eficiência de reprogramação ou substituir a utilização de determinados fatores de transcrição (SHI et al., 2008).

As células iPSCs possuem habilidade em se diferenciar, in vitro, nas várias linhagens celulares, incluindo neurônios (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN,1981; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Por este motivo, as pesquisas em neurociência, focaram na análise das mudanças que ocorrem nos subtipos celulares específicos do cérebro. Estes estudos resultaram no conhecimento sobre as alterações que ocorrem no sistema nervoso central (SNC) decorrente de alguns distúrbios neurológicos (REDDINGTON; ROSSER; DUNNET, 2014; WANG et al., 2014), e também para entender sua potencial aplicação na medicina regenerativa

(KITAZAWA; SHIMIZU, 2011). O objetivo desse estudo foi reprogramar os fibroblastos de feto muar para gerar células iPSCs, e realizar diferenciação neuronal destas células.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Cultivo de fibroblastos de feto muar

Os fibroblastos, coletados anteriormente, e que estavam armazenados em criotubos e mantidos a -80°C foram descongelados em banho-maria por 2 minutos. Após o descongelamento, o conteúdo foi colocado em tubo falcon de 15 ml, e foram acrescentados 3 ml de meio regular (DMEM +10% de SFB). Em seguida, o tubo falcon foi colocado na centrífuga à 10000rpm por 5 minutos, para formação do pellet. Descartou-se o sobrenadante, e o pellet foi homogeneizado com 1 ml do meio regular que foi, então, colocado em garrafa para cultivo celular pequena, e acrescentado mais 4 ml do meio comum. A garrafa permaneceu na estufa até a obtenção de 90% de confluência.

Após atingir a confluência, as células foram tripsinizadas com 3 ml de Tryple (TrypLE^{TM} Express enzime – 12604013, Massachuttes, USA). Em seguida, a garrafa foi colocada na estufa (37°C) por 5 minutos. Observou-se no microscópio se as células estavam soltas na garrafa, para que fosse acrescentado 3 ml de meio regular (DMEM +10% de SFB) para inativação do TrypLE^{TM}. Esse conteúdo foi colocado em tubo falcon de 15 ml, e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Ressuspendeu-se o pellet com 1 ml de meio regular para serem utilizadas posteriormente na produção de células iPS.

3.1.2 Cultivo das células iPSCs

Inicialmente foi preparado uma placa de 6 poços com fibroblastos de embrião de camundongo (MEFs). Os fibroblastos de muar, que foram cultivados por 5 dias e que estavam na terceira passagem, foram contados e obtendo-se o número de fibroblastos igual a $3x10^5$. Deste valor obtido, $5x10^4$ fibroblastos são colocados em um eppendorf de 1,5 ml. Este eppendorf foi centrifugado a 1000rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 1,5 ml de PBS, e centrifugado novamente (1000rpm por 3 minutos). O sobrenadante foi novamente descartado, e o pellet ressuspendido em 60µl de Buffer R (Neon® Kit - MPK1025), e adicionou-se o mix de plasmídeos. Os plasmídeos MKOs, rtTA, GFP e PBase, foram misturados em proporções iguais com volume total de 6µg.

Colocou-se 3 ml do buffer E (Neon® Kit - MPK1025) no curvete e este foi encaixado no eletroporador (Neon® Transfection System – ThermoFisher). A ponteira de 10µl foi encaixada na pipeta que faz parte do kit do aparelho, e a suspensão celular foi puxada de maneira a não formar bolhas dentro da ponteira. Colocou-se a ponteira dentro do curvete, e o programa 14 do aparelho foi selecionado. Após a eletroporação, o conteúdo da pipeta foi colocado imediatamente em um poço que continha o meio para célula iPSC (meio iPSC). Repetiu-se esse procedimento para os outros 4 poços, e o último conteve células que não passaram pela eletroporação, pois serviram como controle negativo. Ao final dos procedimentos a placa foi colocada na estufa.

A partir do 20°dia foram observadas formação de colônias. As colônias que apresentaram bom crescimento e boa morfologia foram circundadas cuidadosamente, a fim de não pegar fibroblastos, e cada uma foi colocada em diferentes poços na placa de 4 poços, previamente preparada com MEFs. No dia seguinte, caso a colônia estivesse aderida na placa, era cortada em 4 a 6 pedaços. As células foram deixadas para nova adesão placa, e o corte manual foi repetido até que as colônias crescessem.

3.1.3 Diferenciação neuronal

As colônias de iPS confluentes foram cultivadas em suspensão, por 4 dias em placas de cultura não aderentes, com meio contendo DMEM High Glucose (Invitrogen 11960-044) suplementado com 2mM de GlutaMax™ (Invitrogen #35050), 0.1mM Betamercaptoethanol (Sigma #M7522), 50U/ml Penicilina/Streptomicina (Invitrogen #15070) e 5% de soro fetal bovino (HyClone). Após 5 dias os corpos embrióides (EBs) foram colocados em placas de cultura não aderentes com meio de indução neuronal. Após 2 dias em suspensão, as células foram coletadas e colocadas em placas de cultura com 6 poços contendo meio de indução neuronal, até as células aderirem à superfície da placa. Após 7 dias, as células foram coletadas, peletizadas e ressuspendidas em meio de diferenciação neuronal. Após 48 horas, as células foram cultivadas, por até 8 semanas, em placas recobertas com matrigel (BD #356234) no meio de diferenciação neuronal suplementado.

Quadro 3 - Meio de cultivo de células iPS

Produto	Empresa/Catálogo
DMEM High Glucose	Invitrogen 11960-044
2mM GlutaMax™	Invitrogem #35050
0.1mM Betamercaptoetanol	Sigma M7522
0.1mM Aminoácidos não essenciais	Invitrogen #11140
1mM de Piruvato de Sódio	Invitrogen #11360-070
50U/ml Penicilina/Streptovidina	Invitrogen #15070
15% Soro fetal bovino	HyClone
1000U/ml Fator inibidor de leucemia	Millipore #ESGRO
10ng/ml bFGF	Peprotech #100-18B
5ug/ml Insulina	Sigma I0516
1.5µg/ml Doxiciclina	Sigma #D9891
3µM Inibidor GSK	StemGent #CHIR99021
0.5M Inibidor MEK	StemGent #PD325901
2.5µM Inibidor ALK/TGF	StemGent #A83-01
1µM Tiazovivina	StemGent #Thiazovivin

Quadro 4 - Meio de indução Neuronal

Produto	Empresa/Catálogo
DMEM/F12	Invitrogen 10565018
1X Aminoácidos não essenciais	Invitrogen #11140
1X Suplemento N2	Invitrogen 17502048
2µg/ml Heparina	Sigma-Aldrich

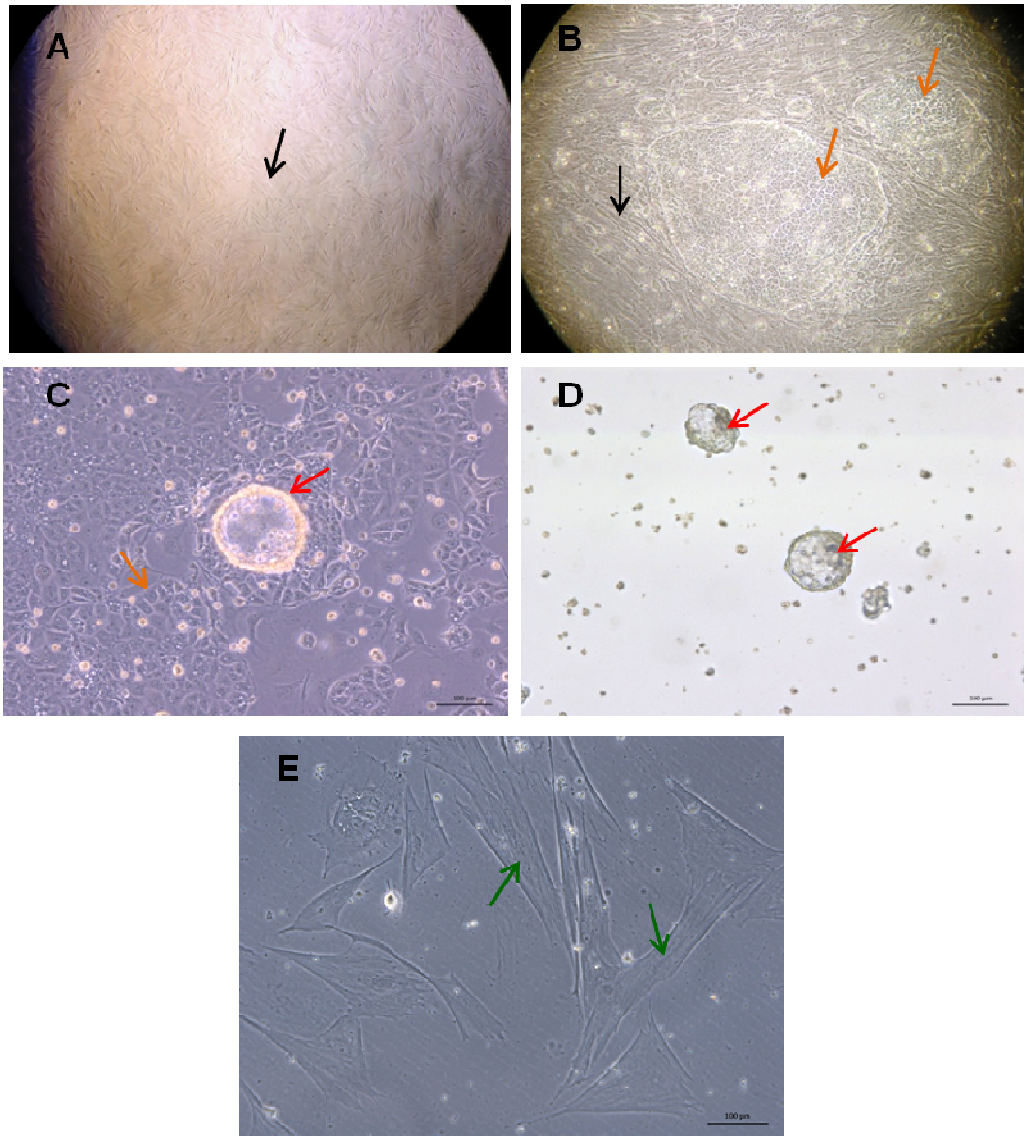
Quadro 5 - Meio de Diferenciação Neuronal

Produto	Empresa/Catálogo
Meio Neurobasal	Invitrogen 21103049
1X Aminoácidos não essenciais	Invitrogen #11140
1X Suplemento B27	Invitrogen 17504044
1µm Dibutiril-cAMP	Enzo Life Science BML-CN125-0030
200µM Ácido Ascórbico	Sigma-Aldrich
Suplementação	
10ng/ml BDNF	Peprotech 450-02
10ng/ml GDNF	Peprotech 450-10

3.2 RESULTADOS

Observou-se confluência de 90% dos fibroblastos muares 5 dias após o início do cultivo destas células (Figura 24 A). A formação das colônias de iPSC apresentaram forma arredondada com bordas bem definidas, e as células se apresentavam heterogêneas, com citoplasma e núcleos grandes (Figuras 24 B e C). Os corpos embrióides apresentaram formato esférico e grande quantidade de células (Figura 24D). As células da glia formadas a partir da diferenciação das células iPSC apresentaram formato alongado e fusiforme, mas sem a presença de axônio (Figura 24 E).

Figura 24 - Células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) derivadas de fibroblastos muares e diferenciação neuronal



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: A) Expansão de fibroblastos de feto muar. B) Formação de colônias de células iPS (seta laranja) rodeada por fibroblastos (seta preta). C) Cultura de células iPS (seta laranja) com formação de corpo embrióide (seta vermelha). D) Cultura de corpos embrióide (setas vermelhas). E) Diferenciação das células iPS em células da glia (setas verdes).

3.3 DISCUSSÃO

A descoberta do método de reprogramação de células somáticas em iPSs transformou o campo da biologia de células-tronco e a medicina regenerativa (ANOKYE-DANSO et al., 2011). O estado pluripotente é induzido em células

somáticas de mamífero usando uma combinação de expressão ectópica de factores de transcrição (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As células iPSCs podem ser estabelecidas pela infecção das células somáticas com vectores de expressão retrovirais que se integram no genoma em múltiplas cópias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; WERNIG et al., 2007). No entanto, prefere-se iPSCs livre de transgenes para pesquisa e aplicações terapêuticas, pois evita-se a reação dos fatores de reprogramação que podem interferir com as vias de diferenciação e auxiliar a tumorigênese (OKITA et al., 2007; THOMSON et al., 2011). Alguns métodos de estabelecimento de iPSCs livres da integração de transgenes foram descritos (BAYARD; COHEN-HAGUENAUER, 2013; ZHOU; ZHENG, 2013). Dentre estes, as células iPSC podem ser caracterizadas pela expressão de marcadores de pluripotência típicos, tais como Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc (MKOS) (ZHOU et al., 2009). Em nosso estudo preconizamos a utilização dos plasmídeos MKOs, rtTA, GFP e PBase, e que se mostrou eficiente para obtenção de células iPS de maneira semelhante às que foram derivadas por Nagy et al. (2011).

Os fatores de trancrição apresentam diversas funções. O Oct4 mantém a pluripotência e auto-renovação das células- tronco embrionárias (ESCs) (LOH et al., 2006). A redução na expressão do Oct4 leva à diferenciação do trofoectoderma, enquanto a maior expressão potencializa a diferenciação da endoderme e mesoderme (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000). Além disso, o Oct4 cria um heterodímero com o Sox2 nas ESCs, de modo que o Sox2 se ligue à cromatina vizinha nos sítios de ligação do Oct4 (CHAMBERS; TOMLINSON, 2009). O Sox2 pode manter ou preservar o potencial de desenvolvimento de células-tronco, e é importante para a manutenção epiblasto (AVILION et al., 2003). O Klf4 é um membro da família do fator tipo Kruppel. Este desempenha papel importante na regulação de diversos processos celulares, incluindo diferenciação, desenvolvimento, proliferação, apoptose e manutenção da homeostase dos tecidos normais (SHI; AI, 2013). A c-Myc é uma proteína, que é produto do proto-oncogene c-Myc, e é parte dos processos de crescimento celular, proliferação celular, apoptose celular e metabolismo (BOXER; DANG, 2001).

Contudo, para que as iPSCs sejam aplicadas no diagnóstico e na medicina regenerativa são necessários métodos adequados para que as células iPSs se diferenciem em tipos celulares diferentes (BADYLAK; NEREM, 2010). As iPSCs assim como as outras células tronco pluripotentes, possuem a capacidade de se

diferenciarem nas três camadas germinativas (TAKAHASHI et al., 2007). *In vivo*, ocorrerá a formação de teratoma, enquanto que *in vitro* há formação de corpos embrióides (LIU et al., 2010).

O potencial das iPSCs em se diferenciarem *in vitro* em células precursoras neuronais e neurônios tem sido relatada (YUAN et al., 2013). Nos corpos embrióides, a baixa concentração de ácido retinóico (AR), presente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, promove a expressão de nestina e Sox2 que são marcadores de progenitores neuronais. No entanto, a alta concentração de ácido ribonucléico (ARN), faz com que a expressão de Nestina seja baixa, enquanto que a de β-tubulina III é alta, típico de neurônios pós-mitóticos (OKADA et al., 2004). O ácido ascórbico (AA) também tem papel importante na diferenciação neuronal. Também promove o aumento na expressão dos genes envolvidos na neurogênese, maturação neuronal, neurotransmissão (SHIN et al., 2004; REBEC; PIERCE, 1994). Em nosso estudo não foi possível analisarmos a expressão dos genes SNRPN, Nestin e UBE3A devido a baixa quantidade de células neuronais obtidas após o procedimento de diferenciação.

3.4 CONCLUSÕES

Reportamos o sucesso na derivação de células iPSCs a partir de fibroblastos de feto muar. Ao serem submetidas à meio de cultivo apropriado formaram-se os corpos embrióides, que ao longo do procedimento de diferenciação, se diferenciaram em células neuronais. No entanto, não foi possível confirmar a expressão dos genes relacionados ao sistema nervoso central devido à baixa quantidade de células obtidas. Contudo, após estudos mais aprofundados poderá ser um modelo para estudos moleculares e biológicos nas diferentes espécies do gênero *Equus.*

Capítulo 3

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL DE CONCEPTOS MUARES

4 INTRODUÇÃO

Os híbridos, em plantas e animais, são formados por hibridação de diferentes estirpes, variedades, ou espécies. O efeito da hibridação sobre um organismo é variável, pois traços particulares podem ser determinados por um dos pais, intermediário entre os traços parentais, inferior às características de um dos pais ou superior a ambos. A superioridade da descendência híbrida sobre seus pais é denominada heterose ou vigor híbrido. Neste fenómeno os heterozigotos têm maior aptidão em uma população do que os homozigotos. A heterose, geralmente refere-se a níveis superiores de biomassa, estatura, taxa de crescimento e/ou fertilidade na descendência híbrida em relação aos pais (HOCHHOLDINGER; HOECKER, 2007; BIRCHLER et al, 2010; CHEN, 2010).

Estudos de animais híbridos fornecem boa maneira de avaliar o papel dos genes no desenvolvimento de atributos físicos e comportamentais (GOODWIN, 2007). Vários estudos indicaram que a variação epigenética contribui para os mecanismos moleculares de características complexas, incluindo vigor híbrido (SHINDO et al, 2006; NI et al, 2009; HE et al ., 2010).

A epigenética pesquisa modificações e padrões de herança que não envolvem mudanças na sequência de DNA, mas que afectam a atividade do genoma e expressão gênica (SIMMONS, 2008; SKINNER et al, 2010; GUERRERO, SKINNER, 2012). Uma vez que foi demonstrado que o vigor híbrido é importante na criação de animais domésticos, e que a epigenética tem um papel crítico no vigor híbrido (GROSZMANN et al., 2013), a herança epigenética será importante no desenvolvimento de melhores raças de animais domésticos.

As mulas, que são híbridos gerados pelo cruzamento da égua com um jumento, ou pelo seu cruzamento recíproco, demonstraram vigor híbrido em suas características físicas. As mulas tendem a ser mais forte e ter melhor resistência do que o cavalo, juntamente com o temperamento firme do burro. As mulas também apresentam musculatura mais densa musculatura, estatura maior, e são capazes de transportar mais peso do que um cavalo do mesmo tamanho. Além de apresentarem menos problemas nas pernas do que os cavalos, mas não correm tão rápido quanto os cavalos, sendo provavelmente um traço herdado do burro (TRAVIS, 1990).

Neste estudo objetivamos analisar o desenvolvimento de conceptos muares em diferentes idades gestacionais para verificar se houve taxa de crescimento e desenvolvimento superior ou inferior aos conceptos eqüinos. Enfatizamos o desenvolvimento do sistema nervoso central.

4.1 MATERIAL E METODOS

4.1.1 Produção, coleta e mensurações dos conceptos muares

Para este estudo foram utilizados sete conceptos muares, com idade gestacional entre 17 e 63 dias. Estes conceptos foram coletados na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) e na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ - Seropédica).

A idade gestacional dos conceptos foi determinada a partir do dia em que as éguas foram inseminadas artificialmente, e comprovada pela visualização da vesícula embrionária através do exame ultrassonográfico. Conforme os conceptos muares atingiram a idade gestacional desejada, as fêmeas gestantes passaram por novo exame ultrassonográfico para verificação do posicionamento embrionário. Em seguida, foi realizado o processo de lavagem uterina transcervical, no qual o órgão foi lavado infundindo-se 1 a 2 litros de solução Ringer Lactato aquecido a 37°C. Uma sonda foi acoplada formando um circuito de fluxo de recuperação constante, sendo que este fluido foi recuperado em recipientes grandes, possibilitando a coleta dos conceptos (FLEURY et al., 2001).

Estes conceptos foram, então, fotografados com suas membranas extra-embrionárias, e, posteriormente, as membranas foram dissecadas, permitindo que os fetos fossem avaliados macroscopicamente, ou com auxílio de um estereomicroscópio (Stemi DV4, Zeiss, USA). As fotografias foram feitas com máquina digital (Nikon Coolpix P510).

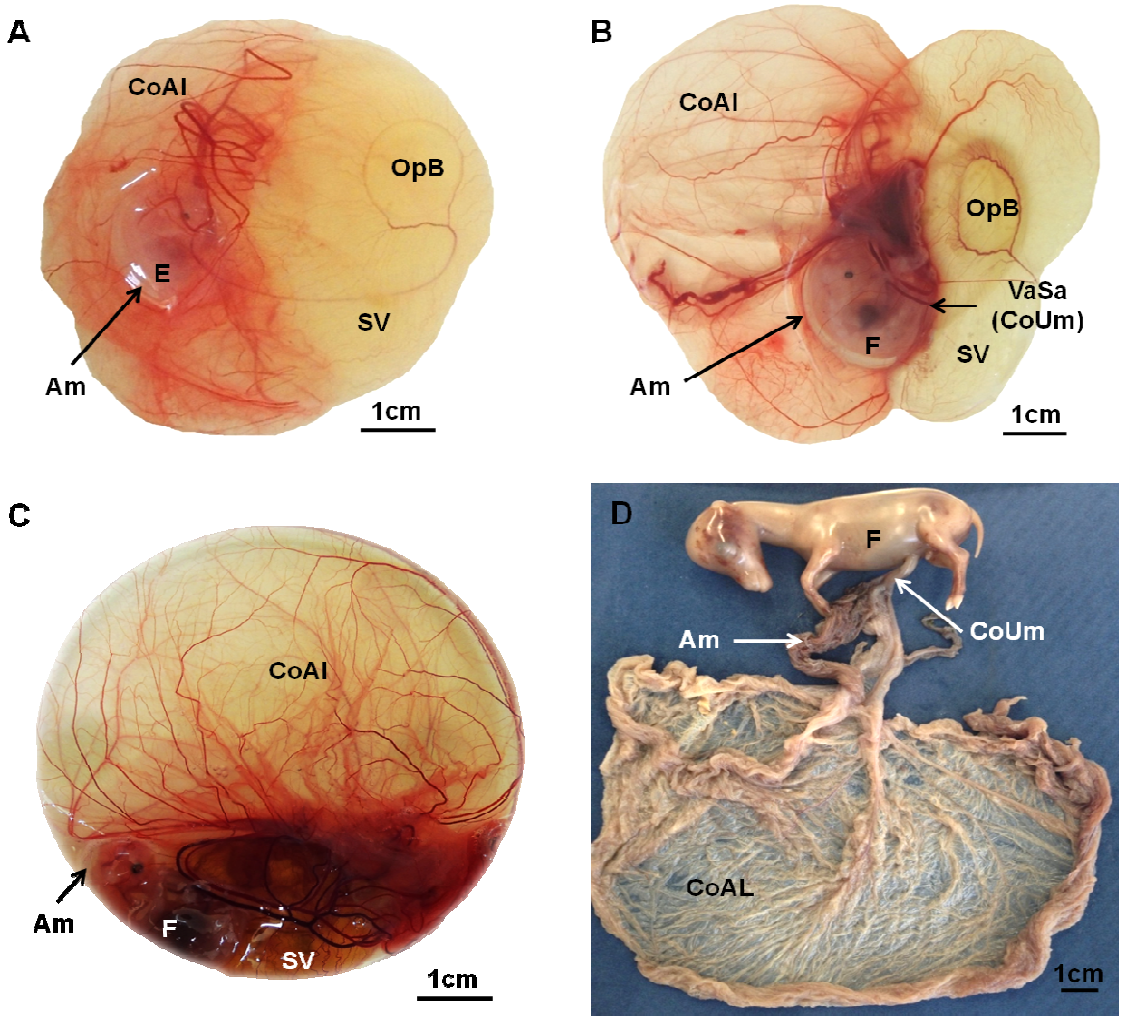
4.2 RESULTADOS

4.2.1 Desenvolvimento das Membranas Extra-embrionárias de conceptos Muares

Aos 33 dias de gestação, enquanto o saco vitelino se apresentou bem evidente, com diâmetro grande e pequena quantidade de vasos sanguíneos; o corio-alantóide apresentou diâmetro menor e grande quantidade de vasos sanguíneos (Figura 25A). No 40º dia de gestação, foi observada regressão do saco vitelino e o crescimento do corio-alantóide (Figura 25B). No feto com 51 dias de gestação, embora o saco vitelino continuasse seu processo de regressão, suas características macroscópicas permaneceram semelhantes às do feto com 40 dias. O corio-alantóide continuou sua expansão e apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos (Figura 25C). Aos 63 dias de gestação, não foi possível a visualização do saco vitelino, e o corio-alantóide apresentou a maior extensão entre os conceptos estudados (Figura 25D).

Nos dias 33 e 40 de gestação foi observada a persistência da onfalo-pleura bilaminar (Figura 25A e B). No entanto, nos 51º e 63º dias esta estrutura não estava mais presente (Figuras 25C e D). No 40º dia, vasos sanguíneos estão bem evidentes e com localização adequada para a formação do cordão umbilical (Figura 25B), que estava bem estruturado no 63° dia de gestação (Figura 5D). O desenvolvimento do amnion acompanhou o crescimento fetal, pois esta membrana envolve completamente o feto (Figuras 25A-D).

Figura 25 - Desenvolvimento das membranas embrionárias em conceptos muares.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Conceptos muares com 33 (A), 40 (B), 51 (C) e 63 (D) dias de gestação. Nota-se o crescimento da membrana corioalantóica (CoAl) e a regressão do saco vitelino (SV), a presença da onfalo pleura bilaminar (OpB) e do amnion (Am). Também foram observados os vasos sanguíneos que formarão o cordão umbilical (VaSa - CoUm).

4.2.2 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e dos Conceptos Muares

Os embriões apresentaram pele translúcida até o 33º dia de gestação, e a partir do 45º dia sua textura passou a ser opaca com o início da vascularização da derme (Figuras 26A-C). Vesículas ópticas rudimentares foram observadas na região cefálica, no 25° dia de gestação (Figura 26B). Após se tornarem pigmentadas, no 33º dia, persistem posteriormente (Figura 26C-E).

As vesículas cerebrais primárias (prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo) e os arcos branquiais estão presentes no embrião com 17 dias de gestação. Estas vesículas se dividem e a partir do 35º até o 45º dia de gestação passam a ser denominadas vesículas cerebrais secundárias (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mieloencéfalo) (Figura 26B-D). Enquanto isso, os arcos branquiais originarão diversas estruturas embrionárias.

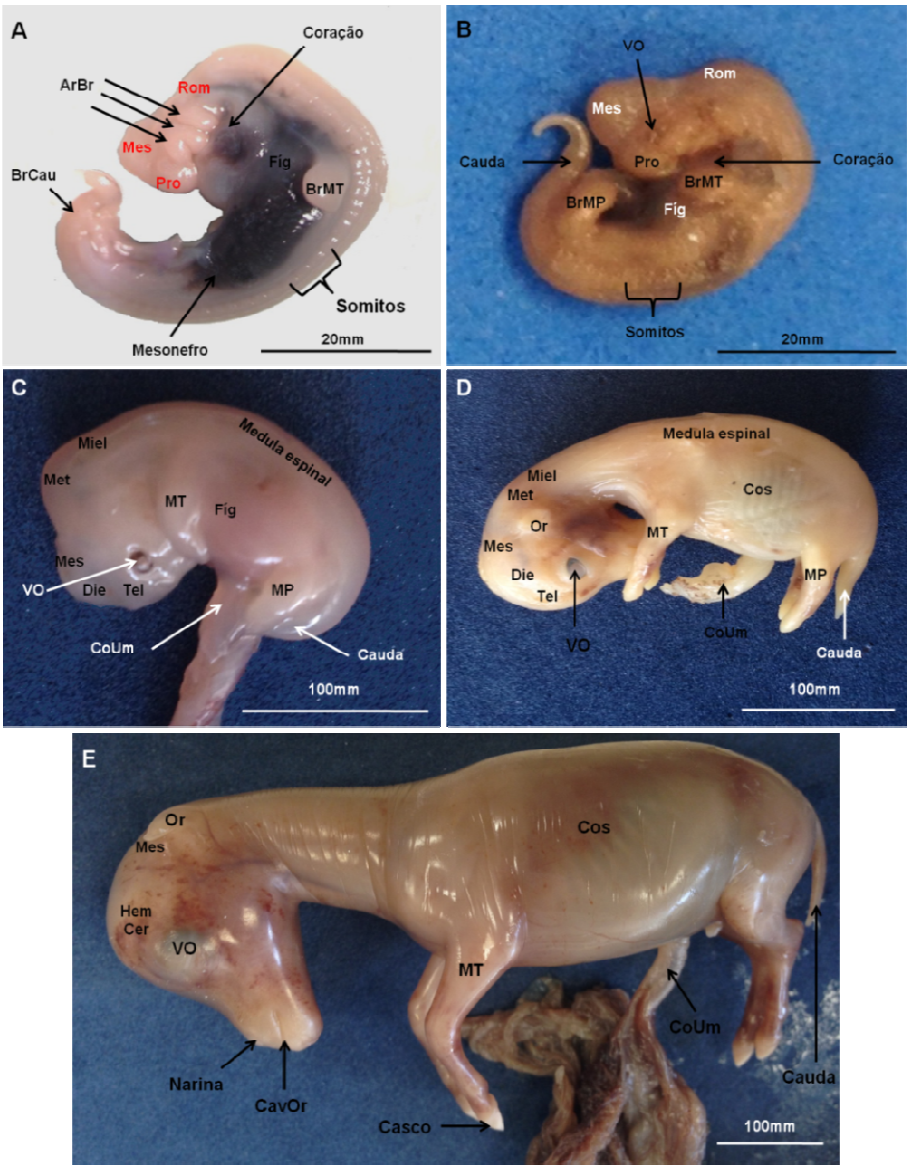
No 17° dia de gestação também foram visualizados os brotos dos membros torácicos, bem como o broto da cauda (Figura 26A). O aparecimento dos brotos pélvicos e a persistência dos brotos torácicos ocorreram no 25° e no 33°, respectivamente (Figura 26B e C).

O mesonefro foi observado no 17º dia de gestação, este passará por transformações, formará o metanefro, e posteriormente, as gônadas e os rins. Nesta idade gestacional, também foi observada a formação dos somitos que originaram a medula espinhal no 33º dia (Figura 26C). A proeminência cardíaca e o fígado também foram visualizados entre 17º e o 33º dia de gestação (Figura 26A-C). O posicionamento do cordão umbilical está bem estabelecido no 33º dia de gestação (Figura 26C).

No 45º dia de gestação, além das estruturas acima, a protuberância auricular foi observada e as orelhas externas começaram a se formar. Também ocorreu a protrusão do pescoço e da narina. O fígado tem redução relativa ao tamanho do concepto, pois ocorre o aumento da região abdominal, as costelas estão proeminentes, e a cauda evidente (Figura 26D).

No 63° dia de gestação, as estruturas descritas anteriormente continuam se desenvolvendo. Na cavidade oral observou-se a presença dos lábios inferior e superior. A vesícula óptica está completamente recoberta pela pálpebra. O telencéfalo se expandiu e formaram-se os hemisférios cerebrais. Na região do mesencéfalo, o aqueduto foi formado. A protuberância auricular passa a formar o pavilhão auricular. As costelas continuam proeminentes; os membros torácicos e pélvicos estão bem formados, com cascos evidentes; e o cordão umbilical bem caracterizado. Além da presença do tubérculo genital diferenciado (Figura 26E).

Figura 26 - Desenvolvimento de conceptos muares.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Conceptos muares.com 17 (A), 25 (B), 33 (C), 45 (D) e 63 (E) dias de gestação. Nota-se a evolução do desenvolvimento das vesículas cerebrais primárias [Prosencéfalo (Pros), Mesencéfalo (Mes), Rombencéfalo (Rom)] em vesículas cerebrais secundárias [Telencéfalo (Tel), Diencéfalo (Die), Mesencéfalo (Mes), Metencéfalo (Met) e Mielencéfalo (Miel)]. Também foi observado a evolução dos brotos dos membros torácico (BrMT), pélvico (BrMP) e da cauda (BrCau), em membros torácicos (MT), membros pélvicos (MP) e cauda, respectivamente. Os arcos branquiais (ArBr) foram observados aos 17 dias. A medula espinhal e o cordão umbilical (CoUm) foram observados, primeiramente, no embrião com 33 dias. No feto com 45 dias foi observada a formação da orelha externa (Or) e das costelas (Cos). E no feto com 63 dias, é possível detectar as narinas, a cavidade oral (CavOr) e os cascos.

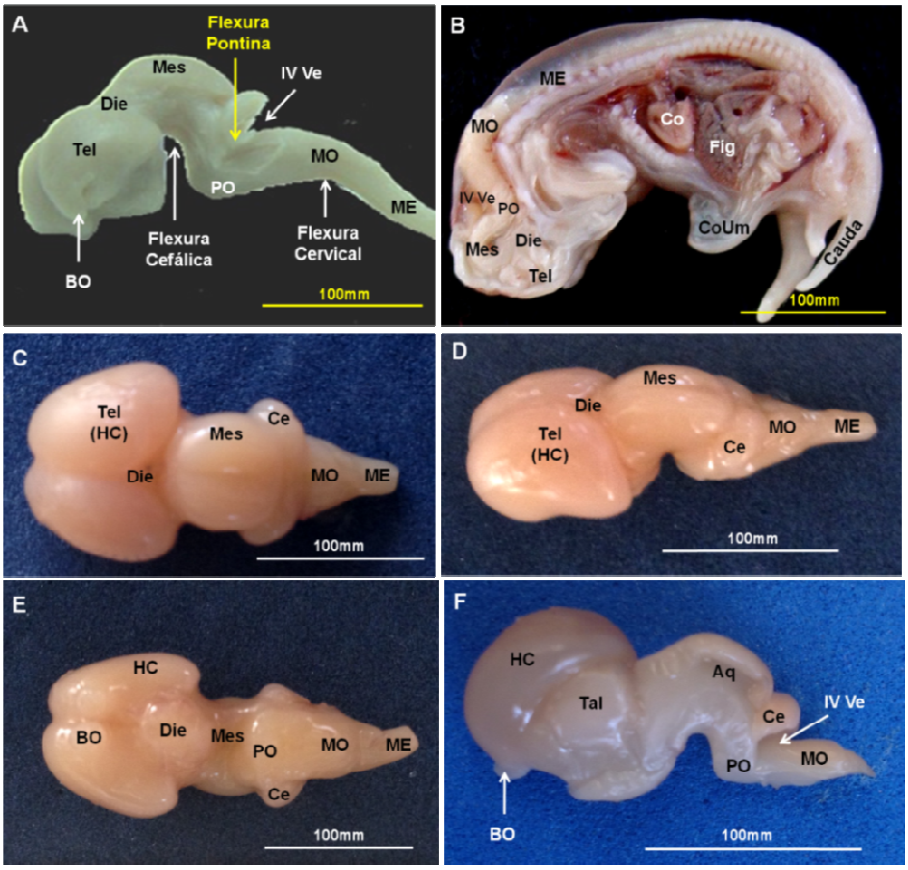
4.2.2.1 Desenvolvimento do Cérebro de Conceptos Muares

Aos 45 dias de gestação o prosencéfalo está localizado na porção mais rostral do crânio e é constituído pelo telencéfalo e o diencéfalo. O telencéfalo é formado por uma parte central e duas metades laterais arredondadas denominadas hemisférios cerebrais. Conforme o desenvolvimento embrionário as 3 flexuras são formadas: flexura cefálica na região entre o prosencéfalo e o mesencéfalo; flexura cervical, situada entre o encéfalo primitivo e a medula primitiva e é determinada pela flexão ventral da cabeça do feto na região onde será formado o pescoço; e flexura pontina, com disposição contrária às duas primeiras, e que faz a união do metencéfalo com o mielencéfalo (Figura 27A).

O sistema ventricular é formado pelos ventrículos laterais, terceiro ventrículo e quarto ventrículo. Os ventrículos laterais são as cavidades dos hemisférios cerebrais que se comunicam com o terceiro ventrículo através dos forames interventriculares direito e esquerdo. O terceiro ventrículo é a cavidade do diencéfalo, e o quarto ventrículo é uma dilatação do canal ependimário que constitui a cavidade do rombencéfalo. Aos 45 dias de gestação estas estruturas estão bem desenvolvidas (Figura 27B).

No feto com 63 dias de gestação notou-se o desenvolvimento dos hemisférios cerebrais no telencéfalo, porém com ausência de sulcos e giros (lisencéfalo e girencéfalo). O bulbo olfatório é uma evaginação do telencéfalo e está bem proeminente nesta idade gestacional. No diencéfalo, foi possível distinguir o tálamo. No mesencéfalo há uma cavidade denominada aqueduto por onde o líquido cefalorraquidiano flui para o quarto ventrículo. O cerebelo, que deriva da parte dorsal do metencéfalo, está evidente e situado dorsalmente à ponte e à medula oblonga. A medula oblonga apresenta formato de cone e sua extremidade é contínua com a medula espinhal (Figura 27C-F).

Figura 27 - Estruturas do sistema nervoso central em conceptos muares.



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Cérebro de fetos muares com 45 (A e B) e 63 (C-F) dias de gestação. Nota-se a presença das vesículas cerebrais secundárias [Telencéfalo (Tel), Diencéfalo (Die), Mesencéfalo (Mes), Metencéfalo (Met) e Mielencéfalo (Miel)], da medula oblonga (MO), da medula espinhal (ME), da ponte (PO), e do quarto ventrículo (IV Ve). Em A, observou-se as flexuras cefálica, pontina e cervical. Em B, observou-se o coração, o fígado (Fíg) e o cordão umbilical (CoUm). Nas figuras de C a F é possível observar o cerebelo (Ce), o bulbo olfatário (BO), o aqueduto (Aq) e o tálamo (Tal).

4.3 DISCUSSÃO

A detecção da vesícula embrionária (VE) de muares ocorreu no 8° dia (PAOLUCCI et al., 2012), enquanto que nos eqüinos ocorreu no 9° dia (LEITH, GINTHER, 1984; GINTHER, 1995), e, entre o 10° e 11° dia, nos asininos (BESSENT, GINTHER, 1988; GASTAL et al., 1993; MEIRA et al., 1998). O diâmetro da VE, na sua primeira detecção, foi maior nos muares (4.6 ± 1.1mm, PAOLUCCI et

al., 2012) que nas éguas (3.3 ± 0.3mm; GINTHER, 1995), e menor em relação às jumentas (6.3 ± 2.3mm, MEIRA et al, 1998; 6.5 ± 1.9mm, CRISCI et al., 2014).

As VE de muares se fixam posteriormente (dia 17.1 ± 1.1; PAOLUCCI et al., 2012) às dos embriões eqüinos (dia 15.9 ± 0.3; GINTHER, 1995), pôneis (14.7 ± 0.2; BESSENT; GINTHER, 1988) e asininos (15.5 ± 1.4, MEIRA et al, 1998; 16, GASTAL et al., 1993). Contudo, também foi observada nos asininos, a fixação da VE no dia 18.5 ± 1.4 (CRISCI et al., 2014), e nos equinos em período mais precoce (dia 13) ou tardio (dia 18) (GINTHER, 1983a, 1983b; GINTHER, 1984a, 1984b; LEITH, GINTHER, 1984).

Durante a fase de mobilidade intrauterina, o crescimento das VE de muares é maior (4.04 ± 1.3mm/dia; PAOLUCCI et al., 2012) em relação aos equinos (3.4mm/dia; BESSENT, GINTHER, 1988) e asininos (3.2mm/dia; MEIRA et al., 1998). Durante a fase de platô o crescimento da VE de muares é relativamente mais baixo (0.4 ± 0.1mm/dia, PAOLUCCI et al., 2012), em relação ao embrião asinino (0.5mm/dia, MEIRA et al., 1998), que ocorre entre os dias 19.3 e 28.7 (MEIRA et al., 1998). O crescimento entre o 29° e 46° dias (1.6mm/dia, MEIRA et al., 1998), e entre o 29° e 50° dias (1.8mm/dia; BESSENT, GINTHER, 1988; MEIRA et al., 1998) é constante. E padrões de crescimento semelhantes a estes foram observados nas éguas (PALMER; DRIANCOURT, 1980; GINTHER, 1983a).

A VE em asininos possui formato esférico até o 15° dia, passa para formato oval entre os dias 16 e 18, e finalmente adquire formato irregular até o 28°dia (MEIRA et al., 1998). Outro estudo em jumentas demonstro formato irregular da VE entre os dias 17 e 31 (GASTAL et al., 1993); e relatado nas éguas entre o 18° e o 27° dia (GINTHER, 1983a). A mudança no formato da VE de muares não difere ao relatado para embriões eqüinos e asininos (BESSENT, GINTHER, 1988; GASTAL et al., 1993; MEIRA et al., 1998).

A detecção dos embriões muares e asininos ocorreu nos dias 19.9 ± 1.9 (CRISCI et al., 2014) e no dia 20.7 (MEIRA et al., 1998), respectivamente. E a média de crescimento embrionário (2.4 ± 1.4mm, CRISCI et al., 2012) foi similar aos dados reportados para eqüinos (GINHTER, 1995) e asininos (MEIRA et al., 1998). Contudo, o crescimento do embrião propriamente dito nos muares foi menor que o relatado para eqüinos e asininos (0.9 ± 0.4mm/dia; MEIRA et al., 1998). Em nosso estudo, no exame ultrassonográfico realizado no 17° dias de gestação, foi detectada a VE, porém a detecção do embrião só foi possível após a recuperação da VE com o

auxílio de um estereomicroscópio. No 25° dia de gestação, o embrião foi detectado no exame ultrassonográfico e macroscopicamente.

O batimento cardíaco detectado nos embriões muares no dia 24.4 ± 2.4, é semelhante ao encontrado em eqüinos (CURRAN, GINTHER, 1995; GINHTER, 1983a; GINHTER, 1995), e asininos [(23.5° dia; MEIRA et al., 1998); GASTAL et al., 1993]. Aos 25 dias de gestação também foi possível detectar o batimento cardíaco dos embriões muares do nosso estudo.

Não foi relatada diferença significativa no tempo de formação do saco alantóide (dia 28.3 ± 1.4 – completo; PAOLUCCI et al., 2012) quando comparado aos embriões eqüinos (25 a 28, GINTHER, 1995) e asininos [(dia 24.4 ± 1.7 – início; dia 36.8 ± 1.6 – completo, MEIRA et al., 1998) (dia 27.3 ± 1, CRISCI et al., 2014)]. O deslocamento do embrião da região ventral para o pólo dorsal está associado com o crescimento do saco alantóide e regressão do saco vitelino (GINTHER, 1983a; GINTHER, 1995). Em nosso estudo não foi observada a formação inicial do saco alantóide, pois conseguimos obter membranas extra-embrionárias preservadas a partir do 33° dia de gestação, período em que foi observado o corio-alandóide. Os dados citados acima estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7- Comparação das características morfológicas das membranas extra-embrionárias entre embriões eqüinos, asininos e muares

	EQUINO		JUMENTO		MULA	
	Dias de gestação	Crescimento (mm)	Dias de gestação	Crescimento (mm)	Dias de gestação	Crescimento (mm)
Detecção da VE	9	3.3 ± 0.3	11.8 ±1.3 11.0 ± 0.9	6.5 ± 1.9 6.3 ± 2.3	9.5 ± 1.5	4.6 ± 1.1
Fixação da VE	15.9 ± 0.3		18.5 ± 1.4 15.5 ± 1.4		17.1 ± 1.1	2.5 ± 0.2
Perda do formato esférico	17-18		18.8 ± 1.1 18.4 ± 1.2		16.2 ± 1.3	
Detecção do embrião	18-21		22 ± 1.1 20.7 ± 1.2		19.9 ± 1.9	2.4 ± 1.4
Detecção do batimento cardíaco	22-24		25 ± 1.1 23.5 ± 1.3		24 ± 2.4	
Detecção do Saco alantóide	25-28		27.3 ± 1 24.4 ± 1.7		23.3 ± 1.9 28.3 ± 1.4	
Detecção do Cordão umbilical	Similar		46.5 ± 0.8 37.9 ± 1.7		34.4 ± 3.4	

Fonte: Modificado de Ginther (1995), dados referentes aos equinos; Meira et al. (1998), referente aos jumentos e em vermelho; Paolucci et al. (2012), referente aos muares; e Crisci et al. (2014) referente aos jumentos.

No 35° dia de gestação em eqüinos, o corio-alantóide ocupa 2/3 do volume do concepto, e a cinta coriônica é uma banda pálida e fina (1 a 1,5cm) acima da região equatorial. Um pequeno círculo da onfalopleura bilaminar persiste, e será o ponto de fixação do cordão umbilical (ALLEN, WILSHER, 2009). Em nosso estudo, o corio-alantóide e a presença da onfalopleura bilaminar são semelhantes às descritas nos eqüinos. No entanto, não foi observada a presença da cinta coriônica no 33° dia de gestação do embrião muar.

Ao contrário do que ocorre no feto eqüino, no feto muar, o saco vitelino ainda é bem desenvolvido no 40°dia de gestação. O saco vitelino no feto eqüino é residual e está completamente circundado pelo alantóide. Além de ser incorporado à parede do cordão umbilical (ALLEN, WILSHER, 2009). No entanto, os vasos sanguíneos do feto muar que irão compor o cordão umbilical já estão no seu ponto de fixação nesta idade gestacional.

Aos 60 dias de gestação o feto equino possui aparência de cavalo, e na interface placentária são visualizados vasos sanguíneos por toda a superfície do corio-alantóide (ALLEN, WILSHER, 2009). Duas veias e duas artérias emergem do cordão umbilical, sendo que um par vasculariza a porção não gravídica do corio-alantóide e as partes, média e posterior, do corpo do feto; e o outro par, vasculariza a porção gravídica do corio-alantóide e a parte anterior do feto (WHITWELL; JEFFCOTT, 1975). O corio-alantóide bem vascularizado também foi observado no feto muar com 63 dias de gestação. E as duas veias e as duas artérias do cordão umbilical, bem como sua divisão na vascularização, foram bem visualizadas no feto muar com 40 dias de gestação.

No que diz respeito à morfogênese eqüina, os estudos se concentraram no desenvolvimento inicial das membranas embrionárias (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1998; ALLEN, 2001a; WILLMAN et al., 2011), e em imagens bidimensionais (BETTERIDGE et al., 1982; GINTHER, 1998; ACKER et al., 2001; ALLEN, 2001a; FRANCIOLLI et al., 2011; WILLMAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014a; RODRIGUES et al., 2014b). No entanto, tem-se empregado técnicas de imagem em três dimensões (3D) para estudar o desenvolvimento embrionário (DHENAIN, RUFFINS, JACOBS, 2001; TYSKA, FRASER, JACOBS, 2005; DRIEHUYS et al., 2008; JENNER et al., 2014).

A série de mudanças características da embriogênese é semelhante entre os mamíferos (KNOSPE, 2002; BEAUDOIN, BARBET, BARGY, 2003), embora ocorram diferenças espécie-específica como o observado na Tabela 8.

Tabela 8- Comparação das características morfológicas entre conceptos eqüinos e muares

		EQUINE	MULE
CHARACTERISTICS		Days of gestation	Days of gestation
Pele translúcida		-	17
Formato do embrião em letra C		28	25
Arcos Branquiais		22	17
Vesículas Ópticas		25	25
Cálices ópticos		21-26 28	-
Início da formação dos brotos dos membros		25 22	17
Cauda		25 28	17
Mesonefro		19-25	17
Metanefro		36-38	-
Vesículas cerebrais primárias		20-40	25
Vesículas cerebrais secundárias		A partir dos 40	33
Pigmento da retina		38 32	33
Formação da pálpebra		38 37, 45 - completo	45 – completo
Formação das narinas		38	45
Coração	2 câmaras	21	17
	Compartimentalizado	28	25
	Posicionamento definitivo	30-45	25-45
Fígado	Desenvolvimento inicial		17
	Projeção na cavidade abdominal	38	33
Somitos		25	17
Corpos vertebrais		38	45
Coluna vertebral		-	63

Fonte: Rigoglio (2016)

No início do desenvolvimento embrionário, a principal característica da pele é ser translúcida e fina, possibilitando a visualização dos órgãos internos. Essa aparência translúcida foi observada a partir do 20° dia nos embriões eqüinos (FRANCIOLLI et

al., 2011), e nos pôneis (MARRABLE; FLOOD, 1975). Em nosso estudo essa característica foi observada no 17° dia de gestação, e passou a ser opaca a partir do 45° dia de gestação.

Conforme ocorre o aparecimento das flexuras cefálica e cervical, o embrião adquire o formato da letra C. A flexura cervical foi descrita no 28° dia de gestação do embrião eqüino (JENNER et al., 2014). Contudo, em nosso estudo esta característica foi observada aos 25 dias de gestação.

Na região cervical observou-se a formação dos arcos branquiais no 17° dia de gestação do embrião muar. No entanto, Jenner et al. (2014) descreveu a presença destes no 22° dia de gestação do embrião equino, e entre os dias 26 e 32 no embrião humano. E também foi descrito no embrião eqüino no 38° dia de gestação [embora possa ter ocorrido erro na legenda da figura (FRANCIOLLI et al., 2011)].

As vesículas ópticas rudimentares desenvolvidas na porção anterior do encéfalo primitivo, e a retina não pigmentada, foram observadas aos 25 dias de gestação nos embriões muares e nos eqüinos (FRANCIOLLI et al., 2011). A invaginação da vesícula óptica ocorre para formar o cálice óptico (MONIE, 1976). Este evento foi observado no embrião eqüino, entre o 21° e o 26° dia de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011), e também foi descrito nos eqüinos no 28° dia de gestação (JENNER et al., 2014). Contudo, não foi possível observar essa característica nos embriões muares do nosso estudo.

O início do brotamento dos membros torácicos nos antímeros direito e esquerdo foi observado no 25° dia de gestação do embrião eqüino (FRANCIOLLI et al., 2011). Nos embriões eqüinos, os brotos do membro pélvico foram descritos no 30° dia de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011), e estão indiferenciados conforme descrito por Ewart (1897). No entanto, Jenner et al. (2014) descreveram o desenvolvimento inicial dos brotos dos membros no 22° dia de gestação do embrião eqüino. Contudo, em nosso estudo os brotos dos membros torácicos foram observados aos 17 dias de gestação, e os brotos pélvicos no 25°dia de gestação.

A cauda apresentou-se alongada, com formato cilíndrico e com espessura similar ao corpo no embrião muar no 17° dia de gestação. Embora não tenha sido descrito por Franciolli et al. (2011), pode-se observar que o embrião eqüino também apresenta essas características no 25° dia de gestação. Em outro estudo, o embrião eqüino, teve a cauda descrita como definida no 28° dia de gestação (JENNER et al., 2014).

No embrião eqüino, o mesonefro foi identificado entre o 19° e o 25° dia de gestação, e ocorre a transição para metanefro entre o 36° e o 38° dias de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011). Enquanto que no embrião muar o mesonefro foi observado no 17° dia de gestação.

Nos embriões de pôneis e de eqüinos, com idade igual ou superior a 20 dias de gestação, respectivamente, as vesículas primárias do cérebro estão presentes (MARRANABLE, FLOOD, 1975; FRANCIONLLI et al., 2011), bem como em outros mamíferos (HYTTEL, SINOWATZ, VYLSTEDM, 2010). No embrião muar o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo foram observados no 25° dia de gestação. As três vesículas cerebrais foram descritas como proeminentes entre os dias 20 e 40 de gestação do embrião eqüino (FRANCIOLLI et al., 2011). Nos embriões de pôneis estas vesículas continuaram a se desenvolver até o 39° dia de gestação (MARRANABLE, FLOOD, 1975). No entanto, em nosso estudo, o embrião muar com 33 dias de gestação, apresentou as vesículas cerebrais diferenciadas em telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo.

No 33° dia de gestação, o embrião muar apresentou pigmentação na retina, porém não foi observada a formação da pálpebra. Contudo, a pigmentação da retina foi observada no 32° dia de gestação do embrião eqüino (JENNER et al., 2014). E o início da formação das pálpebras no 37° dia de gestação do embrião eqüino (JENNER et al., 2014). A formação completa do olho, incluindo a formação da pálpebra e pigmentação da retina foi observada no 38° dia de gestação do embrião eqüino (FRANCIOLLI et al., 2011). Dados semelhantes foram relatados anteriormente no 36° dia de gestação (EVANS, SACK, 1973).

Entre os dias 38 e 40 de gestação foi descrita a formação dos dígitos, das narinas e formação completa dos olhos (EVANS, SACK, 1973). No embrião eqüino, a formação das narinas e desenvolvimento inicial do ouvido também foi observada no 38° dia, semelhantemente ao que foi descrito previamente (EWART, 1897). E no embrião muar, a formação das narinas e a formação completa das pálpebras estavam evidentes no 45° dia de gestação.

O coração no embrião eqüino apresenta duas câmaras (átrio e ventrículo) no 21° dia de gestação; no 28° dia apresenta compartimentos parciais, e entre o 30° e 45° dias além de possuir dois átrios e dois ventrículos, este assume sua posição na cavidade torácica (RODRIGUES et al., 2014a). No embrião muar, a proeminência cardíaca foi observada no 17° dia de gestação, continua se projetando na cavidade

torácica entre o 25° e 45° dia, e a partir deste estágio apresenta característica semelhante à do embrião eqüino.

O desenvolvimento do fígado é semelhante ao do coração, uma vez que se inicia como uma proeminência na cavidade abdominal no 17° dia de gestação do embrião muar. Continua seu crescimento ao ser projetado na cavidade abdominal, e ocupa grande porção desta a partir do 33° dia de gestação. No embrião eqüino, uma imagem clara do fígado foi observada aos 37 (MARRABLE, FLOOD, 1975) e 38 (FRANCIOLLI et al., 2011) dias de gestação.

Os somitos, que inicialmente são formados por tecido cartilaginoso, dão origem aos corpos vertebrais e, posteriormente, serão substituídos por tecido ósseo para formar a coluna vertebral (HYTTEL, SINOWATZ, VYLSTEDM, 2010). No embrião eqüino, os somitos foram visualizados no 25° dia de gestação (FRANCIOLLI et al., 2011), enquanto que no embrião muar, estes foram identificados no 17° dia de gestação. Os corpos vertebrais foram observados no 38° dia de gestação do embrião eqüino (FRANCIOLLI et al., 2011), e no 45° dia de gestação do embrião muar. E a coluna vertebral já está formada no 63° dia de gestação de muar.

4.4 CONCLUSÕES

As características morfológicas das membranas extra-embrionárias ao longo do desenvolvimento do concepto muar foram semelhantes às descritas nas outras espécies do gênero *Equus*. No entanto, a cinta coriônica não estava presente, e o saco vitelino se apresentou desenvolvido, assim como o cordão umbilical no 40° dia de gestação, nos conceptos muares. Muitas características morfológicas foram observadas primeiramente nos conceptos muares quando comparados aos conceptos eqüinos. O desenvolvimento precoce dos conceptos muares pode estar relacionados ao seu vigor híbrido

Capítulo 4

DESENVOLVIMENTO DE FETOS EQUINOS CLONADOS DE GESTAÇÃO GEMELAR

5 INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Agricultura (MAPA, 2012), o Brasil possui cerca de 5,8 milhões de cavalos, está classificado como o maior rebanho na América Latina e o terceiro mundialmente, perdendo somente para a China (8,2 milhões) e México (6,2 milhões) (CNA, 2003). Somados aos muares (mulas) e asininos (jumentos) são 8 milhões de cabeças, movimentando R$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos (MAPA, 2012).

Devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer houve o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008). O desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou melhor aproveitamento dos animais, sendo a transferência de embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade (ARRUDA et al., 2001).

Contudo, técnicas como a superovulação, congelamento de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2009; SMITS et al., 2012; ZANIBONI et al., 2012), transferência de oócitos (HINRICHS, 2010), transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e congelamento de oócitos, são biotécnicas emergentes.

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é um instrumento importante na multiplicação de animais com genótipo único e para preservação de espécies ameaçadas de extinção. Essa técnica representa uma das mais extraordinárias conquistas da pesquisa na área de biotecnologia do desenvolvimento (WILMUT et al, 1997). Entretanto, apesar de possível, a taxa de sucesso na clonagem de animais superiores é, na maioria das vezes, inferior a 1% (SOLTER, 2000).

Em eqüideos, o primeiro sucesso na clonagem foi relatado em 2003 após o nascimento de três muares a partir de células somáticas originadas de um feto com 45 dias de idade e transferidas a ovócitos maturados in vivo (WOODS et al., 2003). No mesmo ano, na Itália, foi reportado o nascimento de uma potra clonada a partir de célula de um animal adulto transferida a um ovócito maturado *in vitro*. Neste caso a doadora de células somáticas também foi a receptora do embrião clonado, abrindo novas perspectivas para o estudo das inter-relações materno-fetais (GALLI et al, 2003).

A clonagem em eqüídeos é extremamente difícil, pois os ovócitos não maturam satisfatoriamente *in vitro*, diminuindo significativamente a disponibilidade de citoplastos receptores de qualidade. Além disso, aparentemente as células eqüinas apresentam baixas concentrações de cálcio intracelular, o que seria responsável por um baixo desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados (WOODS et al., 2003).

Contudo, a TNCS continua baixa devido aos processos complexos que envolvem a combinação dos fatores biológicos e da técnica, que não estão completamente compreendidos (SOLTER, 2000), pois resulta em diversos problemas de desenvolvimento embrionário (BORDIGNON et al., 2003), com alta taxa de mortalidade perinatal e aborto (WILMUT et al., 1997; HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002). No entanto, não está claro se estas falhas ocorrem devido à reprogramação dos núcleos somáticos ou se é intrínseco ao próprio processo de clonagem (HAN et al., 2003).

Acredita-se que o uso da TNCS, promove o aumento na taxa de gêmeos monozigóticos devido à divisão da massa celular interna após a transferência, pois a manipulação da zona pelúcida pode originar um orifício pelo qual as células podem herniar para, então, criar uma segunda massa celular interna ou constituir um novo embrião (ROBERTS et al., 2015). Embora partos gemelares possam ocorrer na reprodução de equídeos, estes não são freqüentes. E o período de gestação pode diminuir na gestação gemelar, sendo influenciado pelo tamanho dos conceptos e das respectivas placentas (MACPHERSON; REIMER, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de conceptos eqüinos clonados provenientes de gestação gemelar, comparando-os com conceptos eqüinos não clonados, e entre si, a fim de verificar se há deficiência no seu desenvolvimento.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Produção, coleta e mensurações dos fetos eqüinos clonados

A produção dos conceptos clonados foi realizada através da TNCS. Após a retirada do citoplasma do oócito maturados *in vitro* ou coletados após sua maturação *in vivo,* obteve-se um oócito enucleado. Este oócito enucleado foi fusionado com a célula somática selecionada através de pulso elétrico ou quebra da membrana e injeção direta desta no citoplasma do oócito. Este oócito recombinado e que contém o núcleo do doador genético foi ativado artificialmente. O núcleo transferido descondensa e o óocito começa o desenvolvimento embrionário. Neste estudo foram utilizados quatro conceptos clonados, sendo estes de gestação gemelares, que foram interrompidas aos 40 e 60 dias de gestação. Estes fetos foram coletados no “Centre de Recherche en Reproduction Animale” (CRRA) da Universidade de Montreal. Os conceptos foram dissecados de suas membranas extra-embrionárias e fotografados com máquina digital (Nikon Coolpix P510)

5.1.2 Microscopia de luz

Os fetos clonados com 40 dias de gestação foram inteiramente fixados em paraformaldeído 4% por um período de 24 horas. Enquanto que os fetos com 60 dias de gestação tiveram seus encéfalos dissecados, e os encéfalos foram, então, fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Em seguida, os fetos e os encéfalos foram lavados, sob agitação, em solução salina tamponada (PBS), três vezes por 20 minutos cada. Após as lavagens o material foi acondicionado em cassetes histológicos, colocados em álcool 70% e enviados para o Setor de Histopatologia da Universidade de Montreal (UdeM), para continuação do processamento de acordo com métodos preconizados pela instituição (UdeM). Assim, recebemos as lâminas histológicas coradas com HE e estas foram fotografadas em microscópio com câmera digital (Nikon Eclipse 80I).

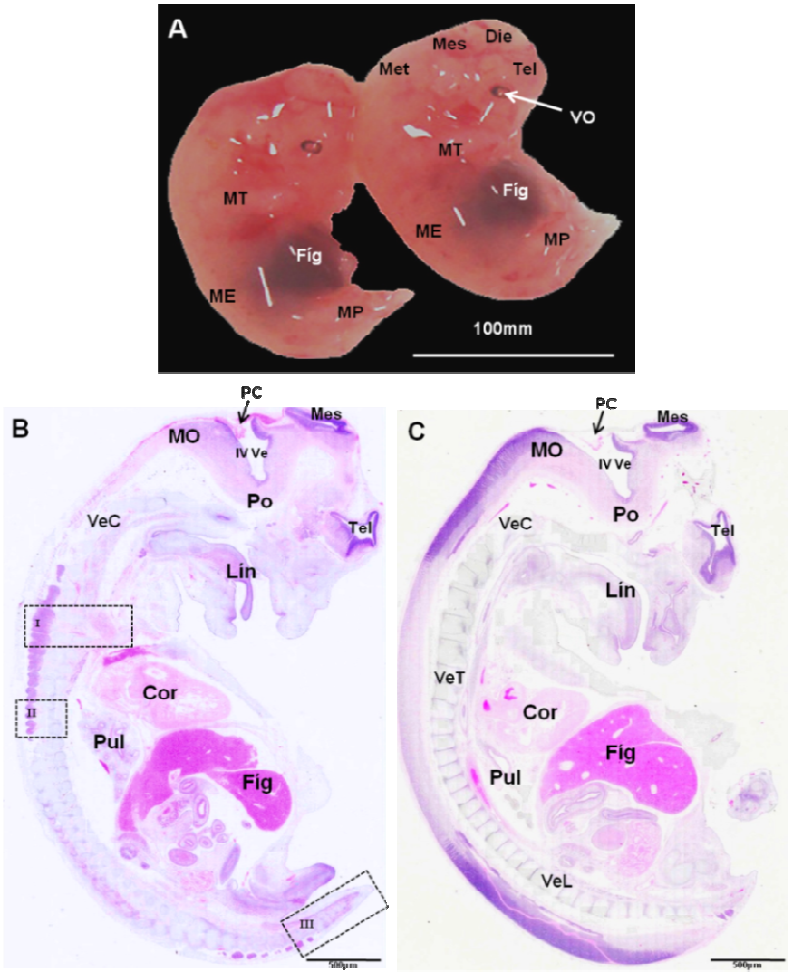
5.2 RESULTADOS

5.2.1 Desenvolvimento de fetos eqüinos clonados de gestação gemelar

Macroscopicamente, os fetos eqüinos clonados com 40 dias de gestação apresentaram pequena diferença (10%) em relação ao seu comprimento. O feto menor apresentou 2,0 cm de comprimento, e o maior 2,2cm. Ambos apresentaram as mesmas estruturas: vesículas embrionárias secundárias: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo e metencéfalo, bem como a medula espinhal, os membros torácicos e pélvicos, e a vesícula óptica já pigmentada (Figura 28A).

Microscopicamente, foram observadas no feto maior estruturas da coluna vertebral que não foram visualizadas no feto menor. Contudo, isto pode ter ocorrido devido à utilização de cortes histológicos em diferentes profundidades (Figura 28B e C). As demais estruturas do SNC apresentaram o mesmo aspecto nos dois fetos, com exceção do plexo coróide. O telencéfalo, o mesencéfalo, a ponte, a medula oblonga, as vértebras cervicais, as vértebras torácicas, as vértebras lombares e as vértebras caudais também foram observados. Outros órgãos também puderam ser identificados, tais como, o coração, o pulmão, o fígado e a língua (Figuras 28B e C).

Figura 28 - Conceptos equinos clonados em gestação gemelar (40 dias).

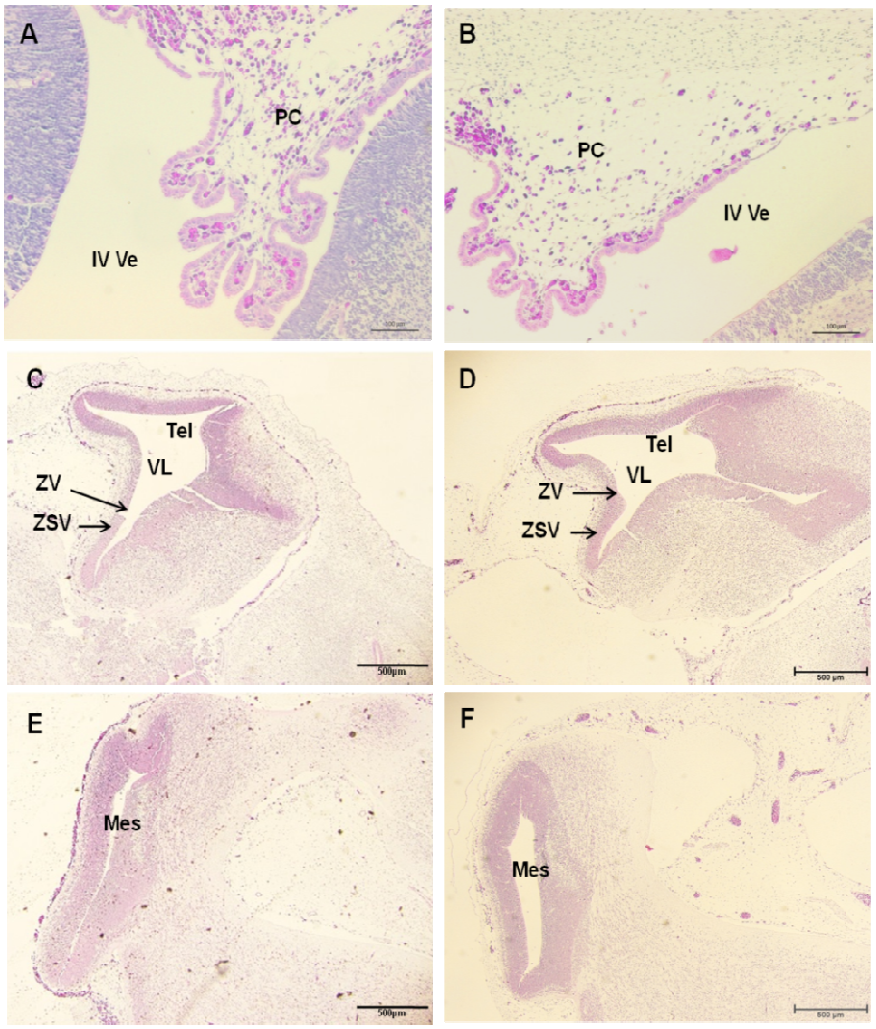


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Feto maior (A) Notar a presença das vesículas cerebrais secundárias: telencéfalo (Tel), Diencéfalo (Die), Mesencéfalo (Mes), metencéfalo (Met), bem como da medula espinhal (ME). A vesícula óptica (VO) encontra-se pigmentada. Devido a pele translúcida foi possível observar o fígado (Fíg). E os membros torácicos (MT) e pélvicos (MP) já estão mais desenvolvidos. B e C) Na microscopia de luz foram observadas as estruturas das vesículas cerebrais: telencéfalo (Tel) e mesencéfalo (Mês). Na porção do metencéfalo observou-se o plexo coróide (PC) no quarto ventrículo (IV Ve), e a ponte (Po). E na porção do mielencéfalo, observou-se a medula oblonga (MO). Quanto à formação da coluna vertebral, observou-se as vértebras cervicais (VeC), as vértebras torácicas (VeT), e as vértebras lombares (VeL).Também foram identificados alguns órgãos, tais como, língua (Lín), coração (Cor), pulmão (Pul) e fígado (Fíg). C) Os retângulos I, II e II representam porções da coluna vertebral que serão detalhadas na Figura 30.

A principal diferença microscópica, no desenvolvimento do SNC dos fetos com 40 dias de gestação, está no tamanho do plexo coróide no quarto ventrículo. O plexo coróide se encontra mais desenvolvido no feto maior, quando comparado ao feto menor (Figura 29A e B). A parede do ventrículo lateral do telencéfalo apresentou as mesmas camadas teciduais, denominadas zonas ventriculares e subventricular, em ambos os fetos (Figura 29C e D). E o mesencéfalo não apresentou diferença entre eles (Figura 29E e F).

Figura 29 - Microscopia do Sistema Nervoso Central dos fetos eqüinos clonados em gestação gemelar (40 dias).

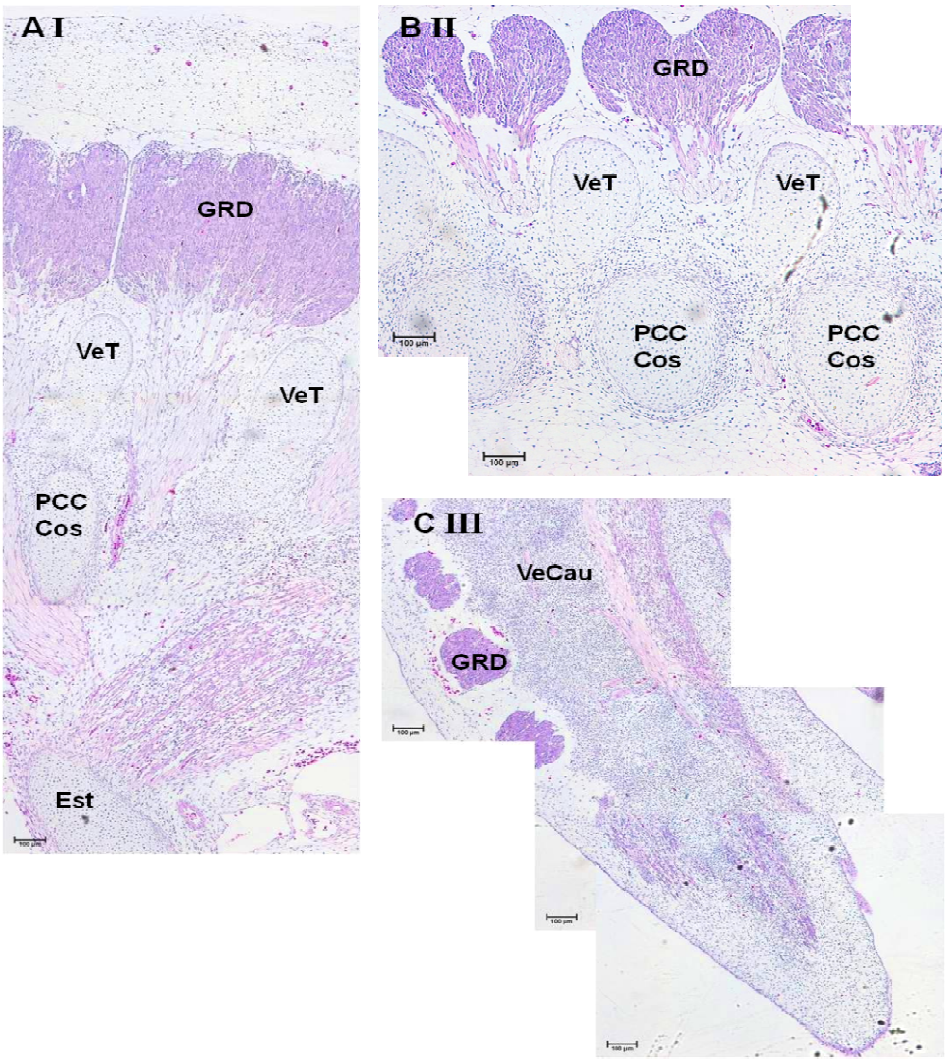


Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: Feto maior na coluna da esquerda (A, C e E), e feto menor na coluna da direita (B,D e F). A e B) Notar a diferença no desenvolvimento do plexo coróide (PC) no quarto ventrículo (IV Ve). C e D) Ambos apresentaram as zonas ventricular (ZV) e subventricular (ZSV) na parede do ventrículo lateral (VL) do telencéfalo (Tel). E e F) Observar a semelhança do mesencéfalo (Mes) nos fetos.

No detalhamento histológico das porções destacadas pelos retângulos na figura 8B, foi possível observar o gânglio da raiz dorsal das vértebras torácicas craniais e caudais, bem como das vértebras caudais. Os primórdios de cartilagem da cabeça das costelas próximos às vértebras torácicas craniais e caudais também foram observados. E na região das vértebras torácicas craniais, notou-se o desenvolvimento do esterno (Figuras 30A-C).

Figura 30 - Estruturas da coluna vertebral do feto eqüino clonado em gestação gemelar (40 dias).



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: AI) Porção das vértebras torácicas (VeT) craniais, demonstrando a presença do gânglio da raiz dorsal (GRD), do primórdio da cartilagem da cabeça das costelas (PCCCos), e do esterno (Est). BII) Porção das vértebras torácicas (VeT) caudais, demonstrando a presença do gânglio da raiz dorsal (GRD) e dos primórdios da cartilagem da cabeça das costelas (PCCCos). CIII) Porção das vértebras caudais (VeCau), demonstrando a presença do gânglio da raiz dorsal (GRD).

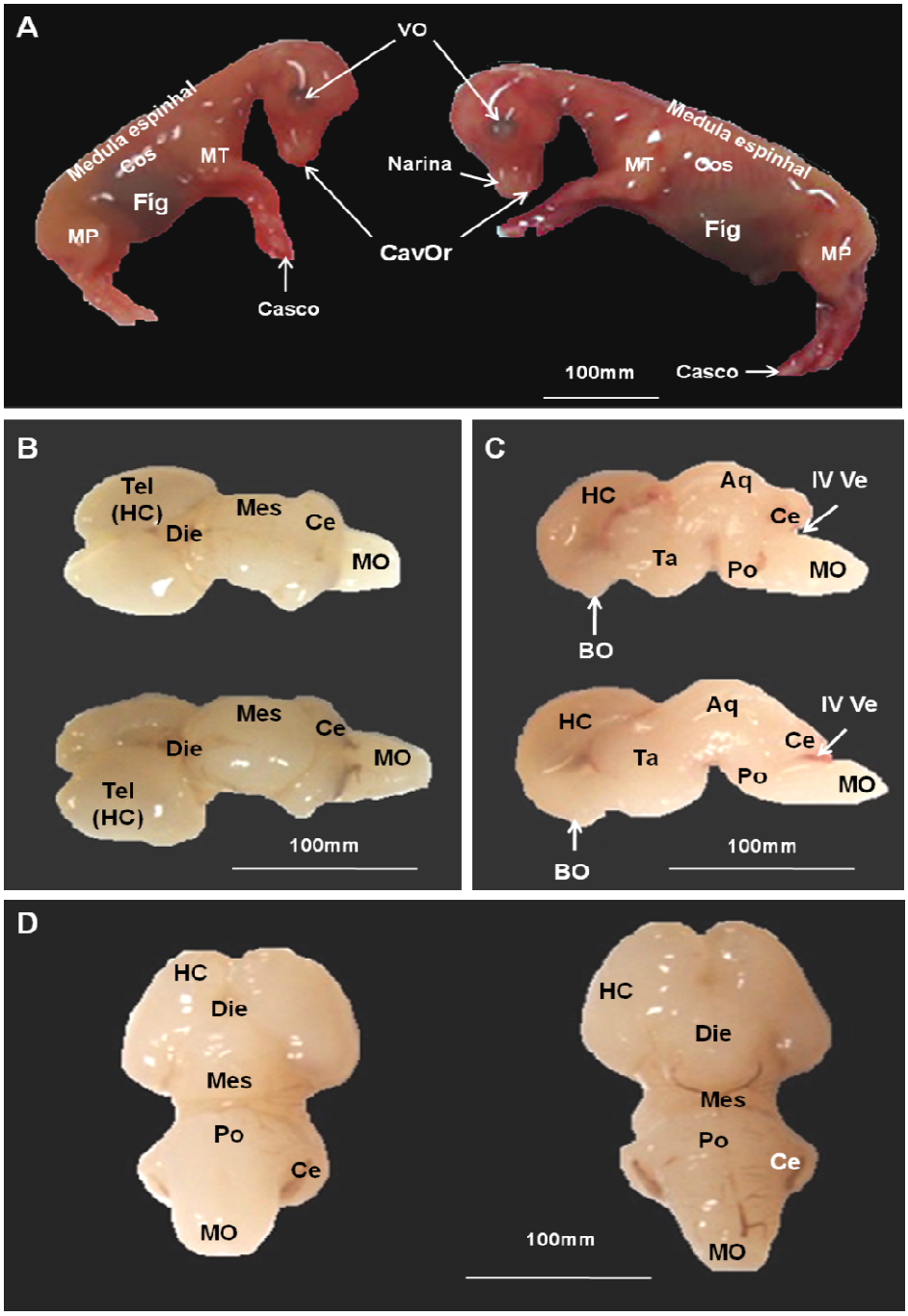
Embora os fetos equinos clonados gêmeos com 60 dias de gestação tenham apresentado diferença de tamanho (36%), o menor com 7cm e o maior com 9,5cm, notou-se, macroscopicamente, a presença das mesmas estruturas corpóreas. A cavidade oral e as narinas estão bem desenvolvidas; as vesículas ópticas estão pigmentadas, e as costelas estão bem visíveis. Nesta idade gestacional ainda foi observado o fígado devido a pele translúcida. Os membros torácicos e pélvicos estão bem desenvolvidos e apresentam formação do casco. (Figura 31A).

Os fetos apresentaram menor diferença entre tamanho dos cérebros (24%), sendo que o de menor tamanho apresentiou 2,1cm e o de maior tamanha 2,6cm. Contudo, os cérebros continuam com características lisencefálicas e girencefálicas, pois ainda não possuem sulcos e circunvoluções. E as estruturas cerebrais são as mesmas para ambos. Na vista dorsal, foram observadas as vesículas cerebrais secundárias: telencéfalo (hemisfério cerebral); diencéfalo; mesencéfalo; metencéfalo (cerebelo); mielencéfalo (medula oblonga) (Figura 31B).

No corte longitudinal, na porção do telencéfalo, foi observado o bulbo olfatório e o hemisfério cerebral. Na porção do diencéfalo, o tálamo estava visível. O aqueduto estava presente na porção do mesencéfalo. A ponte, o cerebelo e o quarto ventrículo estavam na porção do metencéfalo, enquanto que a medula oblonga estava visível na porção do mielencéfalo (Figura 31C).

Na vista dorsal, as vesículas cerebrais continuam sendo observadas telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Enquanto que no metencéfalo observou-se o cerebelo e a ponte; e a medula oblonga no mielencéfalo (Figura 31D).

Figura 31 - Desenvolvimento fetal e do cérebro de fetos equinos clonados em gestação gemelar (60 dias).



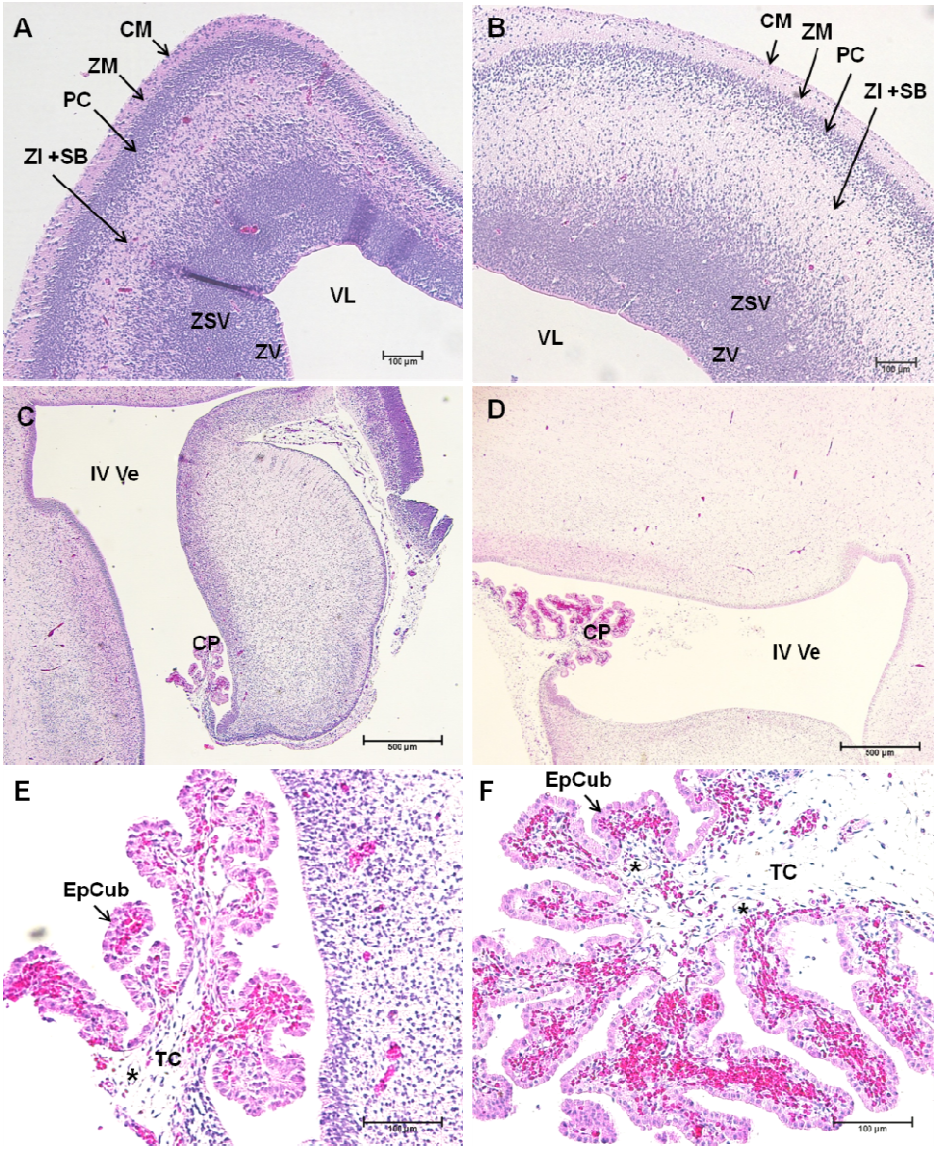
Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: A) Notar a diferença no tamanho dos fetos equinos clonados gêmeos. Ambos apresentaram a vesícula óptica (VO) pigmentada. Os membros torácicos (MT) e pélvicos (MP) já estão bem desenvolvidos e com a presença do casco. As costelas (Cos) já estão bem perceptíveis e o fígado (Fíg) ainda está visível, bem como há formação da cavidade oral (CavOr) e das narinas. B) Vista dorsal dos cérebros dos fetos equinos clonados. Notar a presença do telencéfalo (Tel), também denominado de hemisfério cerebral (HC), do diencéfalo (Die), do mesencéfalo (Mes), do cerebelo (Ce) e da medula oblonga (MO). C) Corte longitudinal do cérebro dos fetos equinos clonados. Notar a presença do bulbo olfatório (BO), do hemisfério cerebral (HC), do tálamo (Ta), do aqueduto (Aq), da ponte (Po), do cerebelo (Ce), do quarto ventrículo (IV Ve) e da medula oblonga (MO). D) Vista dorsal do cérebro dos fetos equinos clonados. Notar a presença do hemisfério cerebral (HC), do diencéfalo (Die), do mesencéfalo (Mes), da ponte (Po), do cerebelo (Ce) e da medula oblonga (MO).

Com o crescimento dos fetos e com o desenvolvimento do SNC, as estruturas da parede do ventrículo lateral tornaram-se mais complexas. A zona ventricular é a região de proliferação das células nervosas. Subseqüente a esta, tem-se a zona subventricular, que possui característica neurogênica, possibilitando a auto-renovação no cérebro de indivíduos adultos. A zona intermediária está localizada entre a zona subventricular e a placa cortical. A existência da substância branca nessa área ocorre devido à migração de neurônios que foram formados na zona ventricular, e está presente apenas durante a corticogênese, portanto, nos indivíduos adultos formará a substância branca. A zona marginal antecede o córtex motor, que é a camada mais exterior (Figura 32A e B)

Da mesma maneira que os outros dois fetos clonados com 40 dias de gestação, os fetos com 60 dias também apresentaram diferença no desenvolvimento do plexo coróide. Ou seja, o plexo coróide é mais desenvolvido no concepto maior. Contudo, as estruturas que compõem o plexo coróide são semelhantes em ambos: tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e epitélio cuboidal. (Figura 32C-F)

Figura 32 - Estruturas do cérebro dos fetos equinos clonados em gestação gemelar (60 dias).



Fonte: Rigoglio (2016)

Legenda: A e B) Parede do ventrículo lateral (VL) apresentando o córtex motor (CM), a zona marginal (ZM), a placa cortical (PC), a zona intermediária (ZI) com presença da substância branca (SB), a zona subventricular (ZSV) e a zona ventricular (ZV). C e D) Presença do plexo coróide (PC) no quarto ventrículo (IV Ve). E e F) O plexo coróide possui epitélio cuboidal (EpCu), e apresenta tecido conjuntivo (TC) e vasos sanguíneos (asteriscos).

5.3 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, as técnicas de reprodução assistida (TRA) progrediram da inseminação artificial (IA) para a transferência de oócitos (TO), injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), e transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (COUTINHO da SILVA, 2008).

Embora ao longo dos anos o nascimento de outros potros clonados a partir da TNCS (LAGUTINA et al., 2005; HINRICHS et al., 2006; HINRICHS et al., 2007; GAMBINI et al., 2012) tenham demonstrado e confirmado a reprodutibilidade, bem como o estabelecimento desta técnica em eqüinos (HINRICHS et al., 2006), o uso desta técnica ainda é difícil nesta espécie. Particularmente devido à baixa disponibilidade de citoplasma adequado para a transferência nuclear.

Contudo, atualmente, passou a apresentar potencial clinico devido à eficiência crescente da clonagem nesta espécie. A taxa de prenhes é menor e a morte embrionária é maior nos embriões clonados que foram capazes de começar a clivagem e se desenvolver até o estágio de blastocisto, em relação à gestação normal (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008).

Uma série de anomalias foi encontrada nas diversas espécies clonadas, no entanto, em nosso estudo não foram observadas anomalias. As principais anomalias encontradas são: disfunção das fibras mitóticas (SIMERLY et al., 2003), anormalidade cromossômica (BOOTH et al., 2003), bem como baixo número de células na massa celular interna. Também foram observadas disfunção respiratória, deficiência imunológica, anormalidades cardíacas e vasculares, “falhas” renais, congestão hepática e fibrose (HILL et al., 1999; RENARD et al., 1999; CHAVATTE PALMER et al., 2002; CIBELLI et al., 2002).

As anormalidades mais comuns dos potros clonados são: síndrome da má regulação neonatal, umbigo remanescente alargado, e deformidades angulares no membro torácico, que são similares aos problemas descritos nos bovinos clonados. Em contraste, a síndrome da prole grande e anormalidades macroscópicas das membranas fetais que são descritas nos bovinos clonados não foram relatados nos potros clonados (JOHNSON, HINRICHS, 2015).

A maioria das perdas gestacionais ocorre no início da gestação, antes do 50° dia. Assim têm-se menos problemas no número e no manejo das receptoras, que podem

ser re-utilizadas. O desenvolvimento à termo da gestação de clones equinos é baixo como nas outras espécies. Além disso, o potro e a sobrevivência deste são normais, e não foram relatados problemas semelhantes aos bovinos, como por exemplo, hidropsia, hiperplasia da placenta e síndrome da prole grande (GALLI et al., 2013). A maioria dos potros é normal ou precisam de uma menor assistência ao nascer (JOHNSON et al., 2010), o que pode fazer dessa espécie um modelo interessante para entendermos os mecanismos da clonagem nas demais espécies.

Em dois fetos gerados a partir da TNCS, que foram abortados com 180 dias de gestação, foi observada uma estrutura cística no cordão umbilical, parecida com uma dilatação do úraco, e este estava preenchido com líquido alantóico. Outros dois fetos a termo com 344 e 329 dias nasceram. No entanto, o primeiro faleceu após 40 horas do seu nascimento devido a uma intensa diarréia e conseqüente septicemia. Mas não foram observadas anormalidades morfológicas na necropsia. E o outro feto se desenvolveu sem problemas (LAGUTINA et al., 2005)

Outro aspecto que deve ser entendido é que o potro clonado não será uma cópia exata do cavalo original. Baseado em gêmeos espontâneos e a baixa produção de gêmeos idênticos, é sabido que o ambiente intra-uterino afeta no tamanho do potro ao nascimento, e também no tamanho do indivíduo adulto e o fenótipo, pois o animal clonado freqüentemente não tem o mesmo “revestimento” que o animal doador (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008).

Relatou-se a produção de gêmeos monozigóticos em eqüinos a partir da transferência do embrião recuperado *in vivo* (MANCIL et al., 2011; SPER et al., 2012). No entanto, houve apenas uma breve notificação de gêmeos monozigóticos resultantes da transferência de um único blastocisto eqüino produzido por ICSI. Neste relato, os fetos foram abortados no 76° dia de gestação, e a análise do DNA confirmou que eram gêmeos monozigóticos (LI; MORRIS; ALLEN, 2001).

Mais recentemente, relatou-se a produção de gêmeos monozigóticos a partir da transferência de um embrião produzido *in vitro* obtido através da ICSI. Contudo os fetos morreram aos 49 dias de gestação cuja causa foi desconhecida (ROBERTS et al., 2015). No entanto, postulou-se que a morte espontânea de ambos os fetos após os 45 dias de gestação ocorra devido ao aporte sanguíneo comprometido, sendo resultado da insuficiência corio-alantóica e a inadequação da placenta em suportar o crescimento contínuo dos fetos (GINTHER, 1998).

5.4 CONCLUSÕES

Embora os fetos das gestações gemelares apresentem uma pequena diferença de comprimento aos 40 dias de gestação, esta diferença passou a ser maior aos 60 dias de getação. No entanto, isto não influenciou na morfologia dos fetos. O desenvolvimento do sistema nervoso central foi semelhantes ao dos fetos eqüinos, com exceção do plexo coróide ser mais desenvolvidos nos fetos com maior comprimento.

REFERÊNCIAS

ACKER, D.; CURRAN, S.; BERSU, E.T.; GINHTER, O. J. Morphologic stages of the equine embryo proper on days 17 to 40 after ovulation. **American Journal of Veterinary Research,** v. 62, n. 9, p. 1358-1364, 2001.

ADAMS, A. P.; ANTCZAK, D. F. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 753-763, 2001.

AEBISCHER, J.; STURNY, R.; ANDRIEU, D.; RIEUSSET, A.; SCHALLER, F.; GEIB, S.;RAOUL, C.; MUSCATELLI, F. Necdin protects embryonic motoneurons from programmed cell death. **PLoS One** 6: e23764, 2011.

AIZAWA, T.; MARUYAMA, K.; KONDO, H.; YOSHIKAWA, K. Expression of necdin, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 68, n. 2, p. 265–274, 1992.

ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, C.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 137–49, 2005.

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 121, n. 4, p. 513-527, 2001a.

ALLEN, W. R. Inter- and extraspecies pregnancies in equids. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F. **Embryonic development and manipulation in animal production**. London: Portland Press, 1992. p. 103–123.

ALLEN, W. R. The Physiology of early pregnancy in the mare. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 46., , 2000. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP** : , 2000. p. 338-354.

ALLEN, W. R.; SHORT, R. V. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. **The Journal of Heredity**, v. 88, n. 5, p. 384-392, 1997.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implatation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005-1015, 2009.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; STEWART, F.; OUSEY, J.; FOWDEN, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse: endocrinology of pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 2, p. 237-246, 2002.

ANDERSON, J.; VISKOCHI, D.; O'GORMAN, M.; GONZALES, C. Gastrointestinal complications of Russell-Silver syndrome: a pilot study. **American Journal of medical Genetics**, v. 113, n. 1, p. 15-19, 2002.

ANDRIEU, D.; MEZIANE, H.; MARLY, F.; ANGELATS, C.; FERNANDEZ, P. A.; MUSCATELLI, F. Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. **BMC Developmental Biology**, v. 6, p. 56, 2006.

ANOKYE-DANSO, F.; TRIVEDI, C. M.; JUHR, D.; GUPTA, M.; CUI, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; GRUBER, P. J.; EPSTEIN, J. A.; MORRISEY, E. E.. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 4, p. 376-388, 2011.

AOI, T.,YAE, K., NAKAGAWA, M., ICHISAKA, T., OKITA, K., TAKAHASHI, K.; CHIBA, T.; YAMANAKA, S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. **Science**, v. 321, n. 5889, p. 699–702, 2008.

ARAR, S.; CHAN, K. H.; QUINN, B. A.; WAELCHLI, R. O.; HAYES, M. A.; BETTERIDGED, K. J.; MONTEIROA, M. A. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 8, p. 1110–1115, 2007.

ARAYA, C.; WARD, L. C.; GIRDLER, G. C.; MIRANDA, M. Coordinating cell and tissue behavior during zebrafish neural tube morphogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 245, n. 3, p. 197-208, 2015.

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

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI, E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 233-239, 2001.

ASTON, K. I.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D. T. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. **Reproduction**, v. 136, n. 4, p. 377–386, 2008.

AVANTE, M. L.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; PEREIRA, D. M.; DIAS, L. G. G. G. Anexos fetais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.

AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function. **Genes and Development**, v. 17, n. 1, p. 126-140, 2003.

AYCAN, Z.; BAS, V. N. Prader-Willi syndrome and growth hormony deficiency. **Journal of Clinical Research in pediatric endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 62-67, 2014.

AZHIKINA, T. L.; SVERDLOV, E. D. Study of tissue-specific CpG methylation of DNA in extended genomic loci. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 5, p. 596-603, 2005.

BADYLAK, S. F.; NEREM, R. M. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3285-3286, 2010.

BANKS, W. J. Histologia Veterinária Aplicada. São Paulo: Guanabara, 1992. p.467-468.

BARTOLOMEI, M. S.; FERGUSON-SMITH, A. C. Mammalian genomic imprinting.

Cold Spring Harb Perspect in Biology. v. 3, n. 7, p. a002592, 2011.

BARTON, S. C.; SURANI, M. A. H.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, v. 311, n. 5984, p. 374-376, 1984.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to non surgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 25, p. 60–62, 1997.

BAYART, E.;COHEN-HAGUENAUER, O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. **Current Gene Therapy**, v. 13, n. 2, p. 73–92, 2013.

BEAUDET, A. L. Angelman syndrome: drugs to awaken a paternal gene. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 150-152, 2012.

BEAUDOIN, S.; BARBET, P.; BARGY, F. Development stages in rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 18, n. 6, p. 422-427, 2003.

BESSENT, C.; GINTHER, O. J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. **Theriogenology**, v. 29, n. 4, p. 913-920, 1988.

BESTOR, T. H. The host defence function of genomic methylation patterns. **Novartis Found Symp**, v. 214, p.187–195; 1998.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 2, p. 691-702, 2000.

BETTERIDGE, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 8, p. 92–100, 1989.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v. 135, n. 1, p. 191-209, 1982.
BIRCHLER, J. A.; YAO, H.; CHUDALAYANDI, S.; VAIMAN, D.; VEITIA, R. A. Heterosis. **Plant Cell**, v. 22, p. 2105–2112, 2010.

BISCHOFF, S. T.; TSAI, S.; HARDISON, N.; MOTSINGER-REIF, A. A.; FREKING, B. A.; NONNEMAN, D.; ROHRER, G.; PIEDRAHITA, J. A. Characterization of Conserved and Nonconserved Imprinted Genes in Swine. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 906–920, 2009.

BOOTH, P. J.; VIUFF, D.; TAN, S.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. **Biology of. Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 922–928, 2003.

BOQUEST, A. C.; NOER, A.; COLLAS, P. Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue. **Stem Cell Reviews**, v. 2, n. 4, p.319–329, 2006.

BOQUEST, A. C.; NOER, A.; SORENSEN, A. L.; VEKTERUD, K.; COLLAS, P. CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 852–861, 2007.

BOXER, L. M.; DANG, C. V. Translocations involving c-Myc and c-Myc function. **Oncogene**, v. 20, n. 40, p. 5595-5610, 2001.

BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, v. 11, n. 19, p. 1542–1546, 2001.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D.L. Reproductive anatomy of the mare. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C. **Manual of equine reproduction**. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011. p. 1-9.

BUITING, K.; SAITOH, S.; GROSS, S.; DITTRICH, B.; SCHWARTZ, S.; NICHOLLS, R. D.; HORSTHEMKE, B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi

syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. **Nature Genetics**, v. 9, n, 4, p. 395-400, 1995.

BUSH, J. R.; WEVRICK, R. Loss of Necdin impairs myosin activation and delays cell polarization. **Genesis**, v. 48, n. 9, p. 540–553, 2010.

BUTTLER, M. G.; LEE, P. D. K.; WHITMAN, B. Y. Management of Prader-Willi Syndrome. Springer, New York
BUTTLER, M. G. Prader-Willi syndrome: current understanding of course and diagnosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 5, n. 4, p. 517-524, 1990.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERVALL, D. K.; McCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embrionic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965–979, 2000.

CASSIDY, S. B.; SCHWATZ, S.; MILLERM J.L.; DRISCOLL, D. J. Prader-Willi syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 14, n. 1, p. 10-26, 2012.

CHAMBERS, I.; TOMLINSON, S. R. The transcriptional foundation of pluripotency. **Development**, v. 136, n. 14, p. 2311-2322, 2009.

CHAVATTE PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.;MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1596-163, 2002.

CHEN, X. Small RNAs - Secrets and surprises of the genome. **Plant Journal**, v. 61, p. 941–958, 2010.

CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 455-465, 2002a

CHOI, Y.; LOVE, C. C.; CHUNG, Y. G.; VARNER, D. D.; WESTHUSIN, M. E.; BURGHARDT, R. C.; HINRICHS, K. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-Driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 561-567, 2002b.

CHOMEZ, P.; De BACKER, O.; BERTRAND, M.; De PLAEN, E,.; BOON, T.; LUCAS, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. **Cancer Research**, v. 61, n. 14, p. 5544-5551, 2001.

CHU, J. W. K.; SHAROM, F. J.; ORIOL, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLEAVER, B. D.; SHARP, D. C. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin-

induced pregnancy. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 3, p. 286-295, 1997.

CIBELLI, J. B.; CAMPBELL, K. H.; SEIDEL, G. E.; WEST, M. D.; LANZA, R. P. The health profile of cloned animals. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 13-14, 2002.

COCHRAN, R.; MEINTJES, M.; REGGIO, B.; HYLAN, D.; PINTO, C.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R. A. Live foals produced from sperm injected oocytes derived from pregnant mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 18, n. 11, p. 736-740, 1998.

COLAS, J. F.; SCHOENWLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

COLLEONI, S.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; DUCHI, R.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. **Proc Am Assoc Equine Pract**, v.53, n., p.554-559, 2007.

Conferação Nacional da Agricultura (CNA). **CNA cria comissão para tratar agronegócio do cavalo.** 2003. Disponível em: http://www.cna.org.br/Agropecuária Agora/Agora03/ag297.htm Acesso em: fevereiro. 2016.

CONSTANCIA, M.; PICKARD, B.; KELSEY, G.; REIK, W. Imprinting mechanisms. **Genome Research**, v. 8, n. 9, p. 881-900, 1998.

COUTINHO DA SILVA, M. A. When should a mare go for assisted reproduction? **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 441-444, 2008.

CRISCI, A.; ROTA, A.; PANZANI, D.; SGORBINI, M.; OUSEY, J. C.; CAMILLO, F. Clinical, ultrasonographic, and endocrinological studies on donkey pregnancy. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 275-283, 2014.

CURCHOE, C.; ZHANG, S.; BIN, Y.; ZHANG, X.; YANG, L.; FENG, D.; O'NEILL, M.; TIAN, X. C. Promoter-specific expression of the imprinted IGF2 gene in cattle (Bos taurus). **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1275-1281, 2005.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. M-mode ultrasonic assessment of equine fetal heart rate. **Theriogenology**, v. 44, n. 5, p. 609–617, 1995.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 93–100, 2003.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian

development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001

DEBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 156-160, 2003.

DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 14, n. 2, p. 188–195, 2004.

DE MESTRE, A. M.; BACON, S. J.; COSTA, C. C.; LEADBEATER, J. C.; NORONHA, L. E.; STEWART, F.; ANTCZAK, D. F. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. **Placenta**, v. 29, n. 2, 158-169, 2008.

DE RYCKE, M.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies—risk analysis and epigenetic inheritance. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2487–2494, 2002.

DE SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, v. 65, v. 1, p. 23–30, 2001.

DHENAIN, M.; RUFFINS, S. W.; JACOBS, R. E. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. **Developmental Biology**, v. 232, n. 2, p. 458-470, 2001.

DINDOT, S. V.; KENT, K. C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J. A. Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, n. 12, p. 966-974, 2004.

DO, J. T.; SCHOLER, H. R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 6, p. 941–949, 2004.

DOYLE, J. M.; GAO, J.; WANG, J.; YANG, M.; POTTS, P. R. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. **Molecular Cell**, v. 39, n. 6, p. 963–974, 2010.

DRIEHUYS, B.; NOULS, J.; BADEA, A.; BUCHOLZ, E.; GHAGHADA, K.; PETIET, A.; HEDLUND, L. W. Small animal imaging with magnetic resonance microscopy. **ILAR Journal**, v. 49, n. 1, p. 35-53, 2008.

DZIEGIELEWSKA, K. M.; EK, J.; HABGOOD, M. D.; SAUNDERS, N. R. Development of the choroid plexus. **Microscopy Research and Technique**, v. 52, n. 1, p. 5-20, 2001

ESCOBAR, V. GLEISER, S.; WEAVER, D. D. Phenotypic and genetic analysis of the Silver-Russell syndrome. **Clinical Genetics**, v. 13, n. 3, p. 278-288, 1978.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomie Histologie Embryologie**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

EWART, J. C. **A critical period in the development of the horse**. London: Adam and Charles Black, 1897.

FEIL, R.; WALTER, J.; ALLEN, N. D.; REIK, W. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes. **Development**, v. 120, n. 10, p. 2933-2943, 1994.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-53, 2004.

FERGUSON-SMITH, A. C. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. **Nature Reviews. Genetics**, v. 12, n.8, p. 565–575, 2011.

FIELDING, D. Reproductive characteristics of the jenny donkey – Equus asinus: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 3, p. 161-166, 1988.

FITZPATRICK, G. V.; SOLOWAY, P. D.; HIGGINS, M. J. Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deleion of KvDMR1. **Nature Genetics**, v. 32, n. 3, p. 426–431, 2002.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Factors affecting the embryo recovery and pregnancy rates after trans-cervical transfer in equine of Mangalarga breed. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FRANCIOLLI, A. L. R.; CORDEIRO, B. M.; DA FONSECA, E. T.; RODRIGUES, M. N.; SARMENTO, C. A.; AMBRÓSIO, C. E.; DE CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A.; SILVA, L. A. Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 819-832, 2011.

FULKA, J.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. Trends Biotechnol., v. 22, p. 279-283, 2004.

GAIVÃO M., STOUT T. Equine conceptus development – A Mini Review. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v. 5, p.64-72, 2012

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranking from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p. 39-55, 2007.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Equine assisted reproduction and embryo technologies. **Animal Reproduction**., v.10, n.3, p.334-343, 2013

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v. 424, n.6949, p. 635, 2003.

GAMBINI, A.; JARAZO, J.; OLIVERA, R.; SALAMONE, D. F. Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 15, p. 1-9, 2012.

GARCIA, A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Monitoring follicular development in cattle by real-time ultrasonography: a review. **The Veterinarian Record**, v. 145, n. 12, p. 334-340, 1999.

GASTAL, E. L.; SANTOS, G. F.; HENRY, M.; PIEDADE, H. M. Embryonic and foetal development in donkeys. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 10-13, 1993.

GERARD, M.; HERNANDEZ, L.; WEVRICK, R.; STEWART, C. L. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. Nature Genetics, v. 23, n. 2, p. 199–202, 1999.
GICQUEL, C. Epimodulation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1003-1007, 2005.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v.17, p. 41–47, 1985a.

GINTHER, O. J. Embryo. In: Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses. 2nd. ed. Cross plains, WI: Equiservices, 1995. p. 123-155.

GINTHER, O. J. Embryonic loss in mares: nature of loss after experimental induction by ovariectomy or prostaglandin F2α. **Theriogenology**, v.24, n. 1, p.87-98, 1985b.

GINHTER, O. J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. **Milne lecture:** equine pregnancy, v. 44, p. 73-104, 1998.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, v. 4, p. 613-623, 1983a.

GINTHER, O. J. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. **Theriogenology**, v. 21, n. 4, p. 633-644, 1984a.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v.19, n. 4, p. 603-611, 1983b.

GINTHER, O. J. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 83-95, 1984b.

GINTHER, O. J. Post-fixation embryo reduction in unilateral and bilateral twins in mares. **Theriogenology**, v.22, n. 2, p. 213-223, 1984c.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare:** basic and applied aspects**.** 2nd. ed. Madison: Equiservices, 1992. 642 p.

GINTHER, O. J. Twin embryos in mares: II. Post fixation embryo reduction. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, p. 171–174, 1989.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Equiservices Cross Plains, Wisconsin: Equiservices Cross Plains, 1986. 378p.

GINTHER, O. J.; DOUGLAS, R. H.; WOODS, G. L. A biological mechanism for the elimination of excess embryos in mares. **Theriogenology**, v. 18, n. 4, p. 475-485, 1982.

GINTHER, O. J; GRIFFIN, P. G. Natural outcome and ultrasonic identification of equine fetal twins. **Theriogenology**, v.41, n. 5, p. 1193-1199, 1994.

GINTHER, O. J.; SCRABA, S. T.; BERGFELT, D. R. Reproductive seasonality of the jenney. **Theriogenology**, v. 27, n. 4, p. 587-592, 1987.

GLENN, C. C.; PORTER, K. A.; JONG, M. T.; NICHOLLS, R. D.; DRISCOLL, D. J. Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 12, p. 2001-2005, 1993.

GLENN, C. C.; SAITOH, S.; JONG, M. T.; FILBRANDT, M. M.; SURTI, U.; DRISCOLL, D. L.; NICHOLLS, R. D. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 2, p. 335-346, 1996.

GO, M. J.; TAKENAKA, C.; OHGUSHI, H. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 5, p. 1147–1154, 2008.

GREGG, C.; ZHANG, J.; BUTLER, J. E.; HAIG, D.; DULAC, C. Sex-specific parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. **Science**, v. 329, n. 5992, p. 682–685, 2010a.

GREGG C.; ZHANG, J.; WEISSBOURD, B.; LUO, S.; SCHROTH, G.P. HAIG, D.; DULAC, C. High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. **Science**. v. 329, n. 5992, p.643–648, 2010b.

GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1811–1815, 2008.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** 7th. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HAJKOVA, P.; ERHARDT, S.; LANE, N.; HAAF, T.; EL-MAARRI, O.; REIK, W.; WALTER, J.; SURANI, M. A. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. **Mechanisms of Development**, v. 117, n. 1-2, p. 15–23, 2002.

HANNA, J.; CHENG, A. W.; SAHA, K.; KIM, J.; LENGNER, C. J.; SOLDNER, F.; CASSADY, J. P.; MUFFAT, J.; CAREY, B. W.; JAENISCH, R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America, v. 107, n. 20, p. 9222-9227, 2010.

HAN, Y. M.; KANG, Y. K.; KOO, D. B.; LEE, K. K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 33-44, 2003.

HATA, K.; OKANO, M.; LEI, H.; LI, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. **Development**, v. 129, n. 8, p. 1983-1993, 2002.

HE, G., et al. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. **Plant Cell**, v. 22, p. 17–33, 2010.

HEDGES, D. J.; DEININGER, P. L. Inviting instability: transpo- sable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. **Mutat Res,** v. 616, p. 46–59, 2007.

HEYMAN, Y.; ZHOU, Q.; LEBOURHIS, D.; CHAVATTE-PALMER, P.; RENARD, J. P.; VIGNON, X. Novel approaches and hurdles to somatic cloning in cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 4, n. 1, p. 47-55, 2002.

HILL, J.; WINGER, Q.; JONES, K.; KELLER, D.; KING, W. A.; WESTHUSIN, M. The effect of donor cell serum starvation and oocyte activation compounds on the development of somatic cell cloned embryos. **Cloning**, v. 1, n. 4, p. 201-208, 1999.

HINRICHS, K. In vitro production of equine embryo: state of art. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, supl. 2, p. 3-8, 2010.

HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 535-541, 2005.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; CHUNG, Y. G.; VARNER, D. D. Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. **Reproduction**, v. 131, n. 6, p. 1063- 1072, 2006.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; VARNER, D. D.; HARTMAN, D. L. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. **Reproduction**, v.134, n. 2, p. 319-325, 2007

HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M.; KYBA, M.; DALEY, G. Q.; BLELLOCH, R.; JAENISCH, R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. The Hematology Journal, S3, S114–S117, 2004.

HOCHHOLDINGER, F.; HOECKER, N. Towards the molecular basis of heterosis. **Trends Plant Science**, v. 12, p. 427–432, 2007.

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

HUANG, H. S.; ALLEN, J. A.; MABB, A. M.; KING, I. F.; MIRIYALA, J.; TAYLOR-BLAKE, B.; SCIAKY, N.; DUTTON, J. W. JR.; LEE, H. M.; CHEN, X.;JIN, J.; BRIDGES, A. S.; ZYLKA, M. J.; ROTH, B. L.; PHILPOT, B. D. Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 185-189, 2012.

HUANG, Z.; FUJIWARA, K.; MINAMIDE, R.; HASEGAWA, K.; YOSHIKAWA, K. Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 25, p. 10362–10373, 2013.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VYLSTED, M. Essentials of domestic animal embryology. Saunders: Elsevier, 2010.

JAY, P.; ROUGEULLE, C.; MASSACRIER, A.; MONCLA, A.; MATTEI, M. G.; MALZAC, P.; ROËCKEL, N.; TAVIAUX, S.; CAU, P.; BERTA, P.; LALANDE, M.; MUSCATELLI, F. The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 357-361, 1997.

JEFFCOTT, L. B.; WHITWELL, K. E. Twinning as a cause of fetal and neonatal loss in the Thoroughbred. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, n. 1, p. 91-105, 1973.

JENNER, F.; NÄRVÄINEN, J.; DE RUIJTER-VILLANI, M.; STOUT, T. A.; VAN WEEREN, P. R.; BRAMA, P. Magnetic resonance microscopy atlas of equine embryonic development. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 2, p. 210-215, 2014.

JOHNSON, G. C.; TODD, J. A. Strategies in complex disease mapping. **Current Opinion in Genetics and Devolpment**, v. 10, n. 3, p. 330-334, 2000.

JOHNSON, A. K.; CLARK-PRICE, S. C.; CHOI, Y. H.; HARTMAN, D. L.; HINRICHS, K. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 236, n. 9, p. 983-990, 2010.

JOHNSON, A. K.; HINRICHS, K. Neonatal care and management of foals derived by somatic cell nuclear transfer. **Methods in Molecular Biology**, v. 1330, p. 189-201, 2015.

JOUNEAU, A.; RENARD, J. P. Reprogramming in nuclear transfer. **Current Opinions in Genetics and Development**, v. 13, n. 5, p. 486–491, 2003.

KHATIB, H. The COPG2, DCN, and SDHD genes are biallelically expressed in cattle. **Mammaliam Genome**, v. 16, n. 7, p. 545–552, 2005.

KANG, Y. K.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Reprogramming DNA methylation in the preimplantation stage: peeping with Dolly's eyes. **Current Opinion in Cellular Biology**, v. 15, n. 3, p. 290–295, 2003.

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

KENIRY, A. The H19 line RNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. **Nat Cell Biol**, v. 14, p. 659, 665, 2012.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2002.

KURITA, M.; KUWAJIMA, T.; NISHIMURA, I.; YOSHIKAWA, K. Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 46, 12003-12013, 2006a.

KURITA, M.; KUWAJIMA, T.; NISHIMURA, I.; YOSHIKAWA, K. Necdin downregulates cdc2 expression to attenuate neuronal apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 46, p. 12003– 12013, 2006b.

KUWAJIMA, T.; TANIURA, H.; NISHIMURA, I.; YOSHIKAWA, K. Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40484–40493, 2004.

KUWAKO, K.; HOSOKAWA, A.; NISHIMURA, I.; UETSUKI, T.; YAMADA, M.; NADA, S.;OKADA, M.; YOSHIKAWA, K. Disruption of the paternal necdin gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 30, p. 7090-7099, 2005.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; PONDERATO, N.; TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 559-567, 2005

LALANDE, M.; CALCIANO, M. A. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, n. 7–8, p. 947–960, 2007

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; FERNANDES, C. B.; DEVITO, L. G.; DERUSSI, A. A. P.; BLANCO, I. D. P.; ALVARENGA, M. A. New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. **Animal. Reproduction**, v. 5, n. 3/4, p. 67-82, 2008

LANGE-CONSIGLIO, C. A.; DELL'AQUILA, M. E.; FIANDANESE, N.; AMBRUOSI, B.; CHO, Y. S.; BOSI, G.; ARRIGHI, S.; LACALANDRA, G. M.; CREMONESI, F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 113-123, 2009

LAVI-ITZKOVITZ, A.; TCHERPAKOV, M.; LEVY, Z.; ITZKOVITZ, S.; MUSCATELLI, F.; FAINZILBER, M. Functional consequences of necdin nucleocytoplasmic localization. **PLoS One**, v. 7, n. 3, e33786, 2012.

LAZZARI, G.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; BARBACINI, S; GALLI, C. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. **Theriogenology,** v. 58, n. 2, p. 709–712, 2002.

LEE, J.; INOUE, K.; ONO, R.; OGONUKI, N.; KOHDA, T.; KANEKO-ISHINO, T.; OGURA, A.; ISHINO, F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. **Development**, v. 129, n. 8, p. 1807–1817, 2002.

LEE, S.; WALKER, C. L.; KARTEN, B.; KUNY, S. L.; TENNESE, A. A.; O'NEILL, M. A.; WEVRICK, R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein necdin in axonal outgrowth. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 5, p. 627–637, 2005.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characteristics of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, p. 401-408, 1984.

LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v. 366, n. 6453, p. 362-365, 1993.

LI, X.; MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction**, v. 121, n. 6, p. 925-932, 2001.

LI, T.; VU, T. H.; ULANER, G. A.; LITTMAN, E.; LING, J. Q.; CHEN, H. L.; HU, J. F.; BEHR, B.; GIUDICE, L.; HOFFMAN, A. R. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 9; p. 631-640, 2005.

LIM, A. L.; FERGUSON-SMITH, A. C. Genomic imprinting effects in a compromised in utero environment: implications for a healthy pregnancy. Seminars in Cell and Developmental Biology, v. 21, n. 2, p. 201–208, 2010.

LIN, S. P.; YOUNGSON, N.; TAKADA, S.; SEITZ, H.; REIK, W.; PAULSEN, M.; CAVAILLE, J.; FERGUNSON-SMITH, A. C. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. **Nature Genetics**, v. 35, n. 1, p. 97–102, 2003.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315–322, 2009.

LIU, H.; YE, Z.; KIM, Y.; SHARKIS, S.; JANG, Y. Y. Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1810-1819, 2010.

LÖFSTEDT, R. M.; NEWCOMBE, J. R. Pregnancy diagnosis and subsequent examinations in the mare: when and why. **Equine Veterinary Education**, v. 9, n. 6, p. 293-294, 1997.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.; STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 38, n.4, p. 431-440, 2006.

LUCIFERO, D.; SUZUKI, J.; BORDIGNON, V.; MARTEL, J.; VIGNEAULT, C.; THERRIEN, J.; FILLION, F.; SMITH, L. C.; TRASLER, J.M. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. **Biology of Reproduction**, v.75, n. 4, p. 531-538, 2006.

MABB, A. M.; JUDSON, M. C.; ZYLKA, M. J.; PHILPOT, B. D. Angelman syndrome: insights into genomic imprinting and neurodevelopmental phenotypes. **Trends Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 293-303, 2011.

MACDONALD, H. R.; WEVRICK, R. The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 11, 1873-1878, 1997.

MACPHERSON, M. L.; REIMER, J. M. Twin reduction in the mare: current options. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.233-244, 2000.

MANCIL, S. S.; BLODGETT, G.; ARNOTT, R. J.; ALVARENGA, M.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K. Description and genetic analysis of three sets of monozygotic twins resulting from transfers of single embryos to recipient mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 8, p. 1040-1043, 2011.

MANN, M. R.; LEE, S. S.; DOHERTY, A. S.; VERONA, R.I.; NOLEN, L. D.; SCHULTZ, R. M.; BARTOLOMEI, M. S. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. **Development**, v. 131, n. 15, p. 3727–3735, 2004.

MARIZ, T. M. A.; ANJOS, A. G.; FLOR, J. M.; FLOR, L. M. A. M.; LIMA, C. B.; GIVISIEZ, P. E. N. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Marchador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 39-43, 2008.

MARRABLE, A. W.; FLOOD, P. F. Embryological studies on the Dartmoor pony during the first third of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility** Supplement, v. 23, p. 499-502, 1975.

MATSUZAKI, H.; OKAMURA, E.; MATSUZAKI, H.; FUKAMIZU, A.; TANIMOTO, K. CTCF binding is not the epigenetic mark that establishes post-fertilization methylation imprinting in the transgenic H19 ICR. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 1190-1198, 2010.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 179–183, 1984.

McKINNON, A.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON, A. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplamic sperm injection (ICSI) of single frozen/thawed spermatozoa into in vitro matured mare oocytes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 7., 1998, PRETORIA. **PROCEEDINGD OF THE ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP**. Pretoria: University of Pretoria, 1998.

McKINNON, A. O. Twin reduction techniques. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; McKINNON, A. O. Current therapy in equine reproduction. St. Louis: Saunders, 2007. p.357-373.

MENG, L.; PERSON, R. E.; BEAUDET, A. L. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 13, p. 3001-3012, 2012.

MENG, L.; PERSON, R. E.; HUANG, W.; ZHU, P. J.; COSTA-MATTIOLI, M.; BEAUDET, A. L. Truncation of Ube3a-ATS unsilences paternal Ube3a and ameliorates behavioral defects in the Angelman syndrome mouse model. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 12, e1004039, 2013.

MENG, L.; WARD, A. J.; CHUN, S.; BENNETT, C. F.; BEAUDET, A. L.; RIGO, F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. **Nature**. v. 518, n. 7539, p. 409-412, 2015.

MEIRA, C.; FERREIRA, J. C.; PAPA, F. O.; HENRY, M. Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1475-1482, 1998.

MILLAR, D.; HOLLIDAY, R.; GRIGG, G. Five not four: history and significance of the fifth base. In: Beck S, Olek A (eds). The Epigenome, Molecular Hide and Seek.Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA: Weinheim, pp 3–20, 2003.

MILLER, N. L.; WEVRICK, R.; MELLON, P. L. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. **Humuan Molecular Genetics**, v. 18, n. 2, p. 248–260, 2009.

MINAMIDE, R.; FUJIWARA, K.; HASEGAWA, K.; YOSHIKAWA, K. Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex. **PLoS One**, v. 9, e84460, 2014.

MONIE, I. W. Comparative development of the nervous, respiratory and cardiovascular systems. **Environmental Health Perspectives**, v. 18, p. 55-60, 1976.

MOREL, M. C. G.; NEWCOMBE, J. R.; LAUBER, M. Manual reduction of multiple embryos in the mare: The effect on subsequent pregnancy outcome. **The Veterinary Journal**, v.192, n.3, p.322-325, 2012.

NAGY, K.; SUNG, H. K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHA-MOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblast. **Stem cell reviews**, v. 7, n. 3, p. 693-702, 2011.

NAKADA, Y.; TANIURA, H.; UETSUKI, T.; INAZAWA, J.; YOSHIKAWA, K. The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region. **Gene**, v. 213, n. 1-2, p. 65-72, 1998.

NAKAO, M.; SUTCLIFFE, J. S.; DURTSCHI, B.; MUTIRANGURA, A.; LEDBETTER, D. H.; BEAUDET, A. L. Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 2, p. 309-315, 1994.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v. 278, n.1-2, p. 25-31, 2001.

NI, Z.; KIM, E. D.; HA, M.; LACKEY, E.; LIU, J.; ZHANG, Y.; SUN, Q.; CHEN, Z. J. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. **Nature**, v. 457, p. 327–331, 2009.

NICHOLLS, R. D.; KNEPPER, J. L. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, p. 153-175, 2001.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, v. 4, n. 1, p. 29-38, 2002.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v.24, n. 4, p. 372-376, 2000.

NOER, A.; SORENSEN, A. L.; BOQUEST, A. C.; COLLAS, P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 8, p. 3543–3556, 2006.

OGURA, A.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; LEE, J.; KOHDA, Y.; ISHINO, F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. **Cloning Stem Cells**, v. 4, n. 4, p. 397–405, 2002.

OHAGNE, J.; WAKAYAMA, T.; KOGO, Y.; SENDA, S.; HATTORI, N.; TANAKA, S.; YANAGIMACHI, R.; SHIOTA, K. DNA methylation variation in cloned mice. **Genesis**, v. 30, n. 2, p. 45-50, 2001.

OKADA, Y.; SHIMAZAKI, T.; SOBUE, G.; OKANO, H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v. 275, n. 1, p. 124-142, 2004.

OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 313-317, 2007.

ORIOL, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLARKE, A. J.; SHAROM, F. J. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 3, p. 255–265, 1993a.

ORPHANIDES, G.; REINBERG, D. A unified theory of gene expression. **Cell**, v. 108, p. 439–451, 2002.

PAGLIARDINI, S.; RENT, J.; WEVRICK, R.; GREER, J. J. Developmental abnormalities of neuronal structure and function in prenatal mice lacking the prader-willi syndrome gene necdin. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 1, p. 175-191, 2005.

PAGLIARDINI, S.; RENT, J.; WEVRICK, R.; GREER, J. J. Neurodevelopmental abnormalities in the brainstem of prenatal mice lacking the Prader-Willi syndrome gene Necdin. **Advances in Expimental Medicine and Biology**, v. 605, p. 139–143, 2008.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasound echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, n. 3, p. 203-216, 1980.

PANZANI, D, ROMANO C, ROTA A, CRISCI A, CAMILLO F, Nascita di puledri di asino dopo trasferimento di embrioni vitrificati. CONGRESSO NAZIONALE S.I.R.A. (Società Italiana Riproduzione Animale), 9., 2011. ATTI VALENZANO: SIRA, 2011

PAOLUCCI, M.; MARCONI, B.; BORGAMI, S.; STRADAIOLI, G.; DEGL'INNOCENTI, S.; MONACI, M. Ultrasonic assessment of mule conceptus during early pregnancy in trotter mares**. Reproduction of Domestic Animals**, v. 41, p. 360, 2006.

PAOLUCCI, M.; PALOMBI, C.; SYLLA, L.; STRADAIOLI, G.; MONACI, M. Ultrasonographic features of the mule embryo, fetus and fetal-placental unit. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 240-252, 2012.

PARK, C. H.; UH, K. J.; MULLIGAN, B.; JEUNG, E. B.; HYUN, S. H.; SHIN, T.; KA, H.; LEE, C. K. Analysis of imprinted gene expression in normal fertilized and uniparental preimplantation porcine embryos. **PlosOne**, v.6, n. 7, e22216, 2011.

PASCOE, R. R. Methods for the treatment of twin pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 1, p. 40-42, 1983.

PASCOE, D. R.; PASCOE, R. R.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; KINDAHL, H. Management of twin conceptuses by manual embryonic reduction: comparison of two techniques and three hormone treatments. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, v. 11, p.1594- 1599, 1987.

POWELL, K. Fertility treatments: Seeds of doubt. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 656-659, 2003.

PRICE, J. M.; STANHOPE, R.; GARRET, C.; PREECE, M. A.;TREMBATH, R. C.The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. **Journal of Medical Genetics**, v. 36, n. 11, p. 837-842, 1999.

PRICKETT, A. R.; OAKEY, R. J. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 8, p. 621–630, 2012.

QUINN, B. A.; HAYES, M. A.; WAELCHLI, R. O.; KENNEDY, M. W.; BETTERIDGE, K. J. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 161-170, 2007.

RAGGIO, I.; LEFEBVRE, R. C.; POITRAS, P.; VAILLANCOURT, D.; GOFF, A. K. Twin pregnancy experimental model for transvaginal ultrasound-guided twin reduction in mares. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 1093-1098, 2008.

RANTANEN, N.; KINCAID, B. Ultrasound guided fetal cardiac puncture: a method of twin reduction in the mare. **Proc. Ann. Conv. Assoc. Am. Equine Pract**., San Diego, 173–179, 1988.

REBEC, G. V.; PIERCE, R. C. A vitamin as neuromodulator: Ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. Progress in Neurobiology, v. 43, n. 6, p. 537-565, 1994.

REED, M. L.; LEFF, S. E. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. **Nature Genetics**, v. 6, n. 2, p. 163-167, 1994.
RENARD, J. P.; CHASTANT, S.;CHESNÉ, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet**, v. 353, n. 9163, p. 1489-1491, 1999.

RHIND, S. M.; TAYLOR, J. E.; de SOUSA, P. A.; KING, T. J.; McGARRY, M.; WILMUT, I. Human cloning: can it be made safe? **Nature Reviews. Genetics**, v. 4, n. 11, p. 855–864, 2003.

RIEUSSET, A.; SCHALLER, F.; UNMEHOPA, U.; MATARAZZO, V.; WATRIN, F.; LINKE, M.; GEORGES, B.; BISCHOF, J.; DIJKSTRA, F.; BLOEMSMA, M.; CORBY, S.; MICHEL, F. J.; WEVRICK, R.; ZECHNER, U.; SWAAB, D.; DUDLEY, K.; BEZIN L.; MUSCATELLI, F. Stochastic loss of silencing of the imprinted Ndn/NDN allele, in a mouse model and humans with prader-willisyndrome, has functional consequences. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, e1003752, 2013.

ROBERTS, C. J. Termination of twin gestation by blastocyst crush in the broodmare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 32, p. 447-449, 1982.

ROBERTS, M. A.; LONDON, K.;CAMPOS-CHILLÓN, L. F.; ALTERMATT, J. L. Presumed monozygotic twins develop following transfer of an in vitro-produced equine embryo. **Journal of Equine Science**, v. 26, n. 3, p. 89-94, 2015.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 597-610, 2005.

RODRIGUES, R. F.; RODRIGUES, M. N. ; FRANCIOLLI, A. L. R. ; CARVALHO, R. C.; RIGOGLIO, N. N.; JACOB, J. C. F.; GASTAL, E. L.; MIGLINO, M. A. Embryonic and fetal development of the cardiorespiratory apparatus in horses (Equus Caballus) from 21 to 105 Days of Gestation. **Journal of Cytology and Histology**, v. 5, n. 4, 2014a.

RODRIGUES, M. N.; CARVALHO, R. C.; FRANCIOLLI, A. L.; RODRIGUES, R. F.; RIGOGLIO, N. N.; JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; MIGLINO, M. A. Prenatal development of the digestive system in the horse. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 7, p.1218-1227, 2014b.

ROSSELLA, F.; POLLEDRI, E.; BOLLATI, V.; BACCARELLI, A.; FUSTINONI, S. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, p. 2637–2646, 2009.

ROUGEULLE, C.; CARDOSO, C.; FONTÉS, M.; COLLEAUX, L.; LALANDE, M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. **Nature Genetics**, v. 19, n. 1, p. 15-16, 1998.

SAKAGUCHI, R.; OKAMURA, E.; MATSUZAKI, H.; FUKAMIZU, A.; TANIMOTO, K. Sox-Oct motifs contribute to maintenance of the unmethylated H19 ICRin YAC transgenic mice. **Human Mol Genetics**, v. 22, p. 4627-4637, 2013.

RUSSELL, A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionaly short arms, and the other anomalies (5examples). **Proceedings of Royal Society of Medicine**, v. 47, n. 12, p. 1040-1044, 1954.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, D. H. Studies on the equine placenta: I. Development of the microcotyledons. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 441–445, 1974.

SCHMAUSS, C.; BRINES, M. L.; LERNER, M. R. The gene encoding the small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N is expressed at high levels in neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8521-8529, 1992.

SCHMAUSS, C.; LERNER, M. R. The closely related small nuclear ribonucleoprotein polypeptides N and B/B' are distinguishable by antibodies as well as by differences in their mRNAs and gene structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 18, p. 10733-10739, 1990.

SCHOENHERR, C. J.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, J. M. CTFC maintains differential methylation at Igf2/H19 locus. **Nature Genetics**, v. 33, p. 66-69, 2003.

SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. **Development**, v.109, p. 243-270, 1990.

SCHNOBRICH, M. R.; RIDDLE, W. T.; STROMBERG, A. J.; LEBLANC, M. M. Factors affecting live foal rates of Thoroughbred mares that undergo manual twin elimination. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 6, p. 676-680, 2013.

SEIDEL JR, G. E. Production of genetically identical sets of mammals: cloning?. The **Journal of Experimental Zoology**, v. 228, n. 2, p. 347-354, 1983.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 679-689, 2000.

SHI, Y.; AI, W. Function of Klf4 in stem cell biology. In Pluripotent Stem Cells; Bhartiya, D., Lenka, N., Eds.; InTech: Winchester, UK, 2013.

SHIN, D. M.; AHN, J. I.; LEE, K. H.; LEE, Y. S. Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells. **Neuroreport**, v. 15, n. 12, p. 1959-1963, 2004.

SHINDO, C.; LISTER, C.; CREVILLEN, P.; NORDBORG, M.; DEAN, C. Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in Arabidopsis vernalization response. **Genes Development**, v. 20, p. 3079–3083, 2006.

SHORT, R. V. The contribution of the mule to scientific thought. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 23, p. 359-364, 1975.

SHUMAN, C.; BECKWITH, J. B.; SMITH, A. C.; WEKSBERG, R. Beckwith-Wiedemann syndrome. **GeneReviews** www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1394.

SIDDIQUI, F.; MCEWAN, A. Twins. **Obstetrics, gynaecology & reproductive medicine**, v. 17, n. 10, p. 289-295, 2007.

SILVA, D. F. A. P. Placenta. 1971. 101 f. (Monografia em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971

SILVER, H. K.; KIYASU, W.; GEORGE, J.;DEAMER, W. C. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. **Pediatrics**, v. 12, n. 4, p. 368-376, 1953.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.;NAVARA, C.;PAYNE, C.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; CHONG, K. Y.; TAKAHASHI, D.; CHACE, C.; COMPTON, D.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 297, 2003.

SKIDMORE ,J. A.; BILLAH, M.; ALLEN, W. R. The ovarian follicular wave pattern and induction of ovulation in the mated and non-mated one-humped camel (*Camelus dromedaries*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 2, p. 185-192, 1996.

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 33-42, 2012.

SMITH, K. C.; BLUNDEN, A. S.; WHITWELL, K. E.; DUNN, K. A.; WALES, A. D. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 496-501, 2003.

SMITS, K.; GOVAERE, J.; HOOGEWIJS, M.; PIEPERS, S.; VAN SOOM, A. A pilot comparison of laser-assisted vs piezo drill ICSI for the in vitro production of horse embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, e1-3, 2012.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 199–207, 2000.

SOMMER, C. A.; STADTFELD, M.; MURPHY, G. J.; HOCHEDLINGER, K.; KOTTON, D. N.; MOSTOSLAVSKY, G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 543–549, 2009.

SOUZA, F. A. Taxa de concepção de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação. 2007. 86f. Tese mestrado em recuperação animal. Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SPER, R. B.; WHITACRE, M. D.; BAILEY, C. S.; SCHRAMME, A. J.; ORELLANA, D. G.; AST, C. K.; VASGAARD, J. M. Successful reduction of a monozygotic equine twin pregnancy via transabdominal ultrasound-guided cardiac puncture. **Equine Veterinary Education**, v. 24, n. 2, p. 55–59, 2012.

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; SHIDELER, R. K. Use of ultrasongraphy in reproductive management of mares. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 55-70, 1988.

SQUIRES, E.; WILSON, J.; KATO, H.; BLASZCZYK, A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 306, 1996.

STEWART, F.; LENNARD, S. N.; ALLEN, W. R. Transforming growth factor beta 1 expression in the endometrium of the mare during placentation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 2, p. 131-140, 1995.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Journals of Reproduction and Fertility**, 121, 2, 771-775, 2001.

STOUT, T.A.E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W.R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3, p. 269-281, 2005.

SURANI, M. A.; BARTON, S. C.; NORRIS, M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, v. 308, n. 5959, p. 548–550, 1984.

SUTCLIFFE, J. S.; NAKAO, M.; CHRISTIAN, S.; ORSTAVIK, K. H.; TOMMERUP, N.; LEDBETTER, D. H.; BEAUDET, A. L. Deletions of a differentially methylated CpG

island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. **Nature Genetics**, v. 8, n. 1, p. 52-58, 1994.

SUTCLIFFE, J. S.; HAN, M.; CHRISTIAN, S. L.; LEDBETTER, D. H. Neuronally-expressed necdin gene: an imprinted candidate gene in Prader-Willi syndrome. **Lancet**, v. 350, n. 9090, p. 1520-1521, 1997.

SZABÓ, P. E.; MANN, J. R. Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: implications for imprinting mechanisms. **Genes and Development**, v. 9, n. 24, p. 3097-3108, 1995.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKAZAKI, R.; NISHIMURA, I.; YOSHIKAWA, K. Necdin is required for terminal differentiation and survival of primary dorsal root ganglion neurons. **Experimental Cell Research**, v. 277, n.2, p. 220–232, 2002.

TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. **Nature Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3081-3089, 2007.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

TAYLOR, M. J.; SHORT, R. V. Development of germ cells in the ovary of the mule and hinny. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, n. 3, p. 441-445, 1973.

TENNESE, A. A.; GEE, C. B.; WEVRICK, R. Loss of the Prader-Willi syndrome protein necdin causes defective migration, axonal outgrowth, and survival of embryonic sympathetic neurons. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 7, p. 1935–1943, 2008.

THOMSON, M.; LIU, S. J.; ZOU, L. N.; SMITH, Z.; MEISSNER, A.; RAMANATHAN, S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 875-889, 2011.

THORVALDSEN, J. L.; DURAN, K. L.; BARTOLOMEI, M. S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. **Genes and Development**, v. 12, n. 23, p. 3693–3702, 1998.

TILGHMAN, S. M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 185-193, 1999.

TOMIZAWA, S.; KOBAYASHI, H.; WATANABE, T.; ANDREWS, S.; HATA, K.; KELSEY, G.; SASAKI, H. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. **Development**, v. 138, n. 5, p. 811-820, 2011.

TREMBLAY, K. D.; DURAN, K. L.; BARTOLOMEI, M. S. A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylaltion throughout development. **Mol Cell Biol**, v. 17, p. 4322-4329, 1997.

TYSZKA, J. M.; FRASER, S.E.; JACOBS, R. E. Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 2005.

UETSUKI, T.; TAKAGI, K.; SUGIURA, H.; YOSHIKAWA, K. Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 918–924, 1996.

VANDEPLASSCHE, G. M.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. **Theriogenology**, v. 16, n. 2, p. 239-249, 1981.

VANDERWALL, D. K.; CUNIQUES. In: Brrent equine embryo transfer techniques. In: Ball, BA. (ed), Recent Advances in equine theriogenology. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).

WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenetic Genome and Research**, v. 113, n. 1-4, p. 90–98, 2006.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with Cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369–374, 1998.

WAN, L. B.; BARTOLOMEI, M. S. Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. **Advances in Genetics**, v. 61, p. 207–223, 2008.

WANG, W.; YANG, J.; LIU, H.; LU, D.; CHEN, X.; ZENONOS, Z.; CAMPOS, L. S.; RAD, R.; GUO, G.; ZHANG, S.; BRADLEY, A.; LIU, P. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 45, p. 18283–18288, 2007.

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; NIKOLAKOPOULOS, E. Association of uterine oedema with follicle wave around the onset of the breeding season in pony mares. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 334-340, 2003.

WEAVER, J. R.; SUSIARJO, M.; BARTOLOMEI, M. S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. **Mammalian Genome**, v. 20, n. 9-10, p. 532-543, 2009.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 318-324, 2007.

WEKSBERG, R.; SMITH, A. C.; SQUIRE, J.; SADOWSKI, P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrate a role for epigenetic control of normal development. **Human Molecular Genetics**, R61-R68, 12, Spec N° 1, 2003.

WHITWELL, K. E.; JEFFCOTT, L. B. Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. **Research in Veterinary Science**, v. 19, n. 1, p. 44-55, 1975.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 63–65, 1986.

WILLMAN, C.; BUDIK, S.; WALTER, I.; AURICH, C. Influence of treatment of early pregnant mares with the progestin altrenogest on embryonic development and gene expression in the endometrium and conceptus. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 61-73, 2011.

WILLIAMS, C. A. Neurological aspects of the Angelman syndrome. **Brain & Development**, v. 27, n. 2, p. 88-94, 2005

WILLIAMS, C. A.;BEAUDET, A. L.; CLAYTON-SMITH, J.; KNOLL, J. H.; KYLLERMAN, M.; LAAN, L. A.; MAGENIS, R. E.; MONCLA, A.; SCHINZEL, A. A.; SUMMERS, J. A.; WAGSTAFF, J. Angelman Syndrome 2005: update consensus for diagnostic criteria. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140, n. 5, p. 413-418.

WILLIAMSON, C. M.; BLAKE, A.; THOMAS, S.; BEECHEY, C. V.; HANCOCK, J.; CATTANACHA, B. M.; PETERS, J. (2013). Mouse Imprinting Data and References. MRC Harwell: Oxfordshire, UK.

WILLIAMSON, C. M.; TURNER, M. D.; BALL, S. T.; NOTTINGHAM, W. T.; GLENISTER, P.; FRAY, M.; TYMOWSKA-LALANNE, Z.; PLAGGE, A.; POWLES-GLOVER, N.; KELSEY, G.; MACONOCHIE, M.; PETERS, J. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. **Nature Genetics**, v. 38, n. 3, p. 350–355, 2006.

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

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; de SOUSA, P. A.; DINNYES, A.; KING, T. J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D. N.; YOUNG, L. E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v. 419, n. 6907, p. 583–586, 2002.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammal species of the World**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. v. 2, P. 142.

WINKLER, T.; CANTILENA, A.; METAIS, J. Y.; XU, X.; NGUYEN, A. D.; BORATE, B.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J. E.; WOLFSBERG, T. G.; THOMSON, J. A.; DUNBAR, C. E. No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 4, p. 687–694, 2010.

WODSEDALEK, J. E. Causes of sterility in the mule. **Biological Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 1-56, 1916.

WOLFFE, A.; MATZKE, M. Epigenetics: Regulation through repression. **Science**, v. 286, p.481-486, 1999.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. A Structural and Immunological Study of Chorionic Gonadotrophin Production by Equine Trophoblast Girdle and Cup Cells. **Placenta**, v. 22, n. 3-4, p. 749-767, 2001.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiple fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 32, p. 415-421, 1982.

WOODS, G. L.; SCRABA, S. T.; GINTHER, O. J. Prospects for induction of multiple ovulations and collection of multiple embryos in the mare. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 61-72, 1982.

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K.; LI, G. P.; ASTON, K. I.; BUNCH, T. D.; MEERDO, L. N.; PATE, B. J. A mule cloned from fetal cells by Nuclear Transfer. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1063, 2003.

WUTZ, A.; SMRZKA, O. W.; SCHWEIFER, N.; SCHELLANDER, K.; WAGNER, E. F.; BARLOW, D. P. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 745–749, 1997.

YANG, T.; ADAMSON, T. E.; RESNICK, J. L.; LEFF, S.; WEVRICK, R.; FRANCKE, U.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; BRANNAN, C. I. A mouse model for Prader–Willi syndrome imprintingcentre mutations. **Nature Genetics**, v. 19, n. 1, p. 25–31, 1998.

YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J. P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X. C. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 431-438, 2005.

YANG, F.; FU, B.; O'BRIEN, P. C.; NIE, W.; RYDER, O. A.; FERGUSON-SMITH, M. A. Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. **Chromosome Research**, v. 12, n. 1, p.65-76, 2004.

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

YOUNG, L .E.; FERNANDES, K.; McEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153-154, 2001.

YOUNG, L .E.; SCHNIEKE, A. E.; McCREATH, K. J.; WIECKOWSKI, S.; KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A. J.; WILMUT, I.; LOI, P.; FEIL, R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 12, p. 1433–1442, 2003.

YU, J., HU, K., SMUGA-OTTO, K., TIAN, S., STEWART, R., SLUKVIN, I., THOMSON, J. A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 797–801, 2009.

YUAN, T.; LIAO, W.; FENG, N. H.; LOU, Y. L.; NIU, X.; ZHANG, A. J.; WANG, Y.; DENG, Z. F. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 3, p. 73, 2013.

ZANIBONI, A.; MERLO, B.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; LAVITRANO, M.; FORNI, M.; MARI, G.; BACCI, M. L. Expression of fluorescent reporter protein in equine embryos produced through intracytoplasmic sperm injection mediated gene transfer (ICSI-MGT). **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 1-2, p. 53-61, 2012.

ZESCHNIGK, M.; LICH, C.; BUITING, K.; DOERFLER, W.; HORSTHEMKE, B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. **European Journal of Human Genetics**, v. 5, n. 2, p. 94-98, 1997.

ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J.Y.; ZHU, S.; HAN, D.W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H. R.; DUAN, L.; DING, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 381-384, 2009.

ZHOU, Y. Y.; ZENG, F. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 284–287, 2013.

ZIMMERMAN, D. L.; BODDY, C. S.; SCHOENHERR, C. S. Oct4/Sox2 binding sites contribute to maintaining hypomethylation of the maternal igf2/h19 imprinting control region. **PLoSONE**, v. 8, e81962, 2013.