

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES XIST E  
IGF2 EM OVÓCITOS DE VACAS NELORE (*Bos*  
*taurus indicus*) EM DIFERENTES FASES DA  
OVOGÊNESE**

**Anelise dos Santos Mendonça**  
Bióloga

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES XIST E  
IGF2 EM OVÓCITOS DE VACAS NELORE (*Bos  
taurus indicus*) EM DIFERENTES FASES DA  
OVOGÊNESE**

**Anelise dos Santos Mendonça**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária – UFU, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Veterinárias (Produção Animal)**

Uberlândia – Minas Gerais – Brasil  
Fevereiro de 2013

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M539p Mendonça, Anelise dos Santos, 1987-  
2013 Padrão de metilação dos genes XIST e IGF2 em ovócitos de vacas  
nelore (*Bos taurus indicus*) em diferentes fases da ovogênese / Anelise  
dos Santos Mendonça. -- 2013.  
98 f. : il.

Orientador: Maurício Machaim Franco.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Melhoramento genético - Teses.  
3. Bovino - Reprodução - Teses. I. Franco, Mauricio Machaim. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.

---

CDU: 619

*“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*

*Cora Coralina*

*Porque amor não se pede, apenas se sente...  
Porque um abraço pode valer por mil palavras...  
Porque laços genéticos podem ditar mais que as aparências...  
Porque aprendemos juntos que os passarinhos sempre aprendem a voar para seguirem seus próprios destinos, traçarem seus objetivos, viverem seus próprios desafios, superarem sozinhos suas dificuldades... Mas podem sempre voltar para o aconchego do ninho.  
Para vocês, meus queridos pais OMILTON e ANA ABADIA, e minha irmã JULIANA, meu porto seguro, meus exemplos de caráter e de determinação... com muito amor, carinho e gratidão,  
DÉDICO...*

## AGRADECIMENTOS

Obrigada, meu bom Deus, por me dar coragem e força para trilhar esse caminho. Obrigada por nunca me desamparar e me carregar no colo nos momentos em que eu mais precisei de Ti.

Obrigada meus queridos pais, Ana Abadia e Omilton, por acreditarem em mim, por se doarem, por fazerem vossos os meus sonhos. Obrigada pela dedicação e amor incondicional. Obrigada Juliana, por ser irmã, amiga e confidente e por compartilhar comigo momentos tão especiais. Obrigada por entenderem minha ausência, mas tenho certeza que nunca nos afastamos, porque estávamos presentes nos pensamentos, nas orações e nos corações.

Obrigada, Maurício, pela confiança, paciência e oportunidade. Pelos exemplos humano e profissional. Obrigada por me contagiar com sua paixão e entusiasmo pela pesquisa e pelo aprender. *A arte mais importante do professor é a de despertar a alegria pelo trabalho e pelo conhecimento.* Obrigada por ser mais que um orientador, mas também um professor dedicado, um pai exigente, um bom conselheiro e amigo.

Obrigada, Dra. Margot, pelas conversas, preocupação e incentivo. Por ser muitas vezes orientadora e amiga.

Obrigada meus amigos queridos... que de uma forma mais ou menos presentes, em Brasília ou Uberlândia, estiveram ao meu lado nessa caminhada. Por muitas vezes foram os responsáveis por gostosas risadas, por momentos de descontração e por acalmar o coração da ansiedade, da tristeza, da saudade... Estarão sempre em minha memória e em meu coração.

Obrigada à cada um que estendeu a mão para ajudar na execução dos experimentos: estagiários, colegas de laboratório, pesquisadores e amigos. Todos fazem parte dessa conquista.

Obrigada à todos os funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que contribuíram com esse trabalho: pesquisadores ou técnicos, trabalhando nos laboratórios, na limpeza ou na linha de abate dos frigoríficos, cada um teve sua importância para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Obrigada àqueles que me emprestaram um pouquinho de seu tempo e de seu coração para um desabafo, uma conversa ou uma risada... O tempo juntos pode ter sido curto, mas suficiente para que cada momento valesse a pena. Porque *ser feliz significa ter momentos felizes...* Serão para sempre inesquecíveis!

Obrigada aos professores por terem aceitado participar como colaboradores desse trabalho ao comporem a banca examinadora do mesmo, tanto membros titulares quanto suplentes.

Obrigada à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por toda a estrutura necessária para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Obrigada à Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de realização do Mestrado. Em especial à Célia, secretária do Programa, que mesmo à distância sempre se prontificou à ajudar.

Obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Ovogênese e Foliculogênese.....	4
2.2 Aquisição da competência ovocitária e a Produção <i>In Vitro</i> de Embriões..	9
2.3 Epigenética.....	11
2.3.1 Metilação do DNA.....	13
2.3.2 Modificações de Histonas.....	16
2.3.3 <i>Imprinting</i> Genômico.....	17
2.4 Os Genes IGF2 e IGF2R.....	19
2.4.1 Regulação dos genes IGF2 e H19.....	20
2.5 A Inativação do Cromossomo X e o Gene XIST.....	22
2.6 A Reprogramação Epigenética na ovogênese.....	25
3. OBJETIVO.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Isolamento dos ovócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais....	29
4.2 Recuperação e classificação dos ovócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais.....	33
4.3 Extração do DNA Genômico por lise celular.....	33
4.4 Tratamento com bissulfito de sódio.....	34
4.5 Amplificação do DNA.....	34
4.6 Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial.....	36
4.7 Sequenciamento do DNA e análise das sequências.....	37
4.8 Análises Estatísticas.....	38
5. RESULTADOS.....	39

6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADP – Adenosina difosfato
- AID – Citidina desaminase
- cAMP – Adenosina monofosfato cíclico
- CpG – Citosina-fosfato-Guanina
- CTCF – Fator ligante CCCTC
- DMR – Região diferencialmente metilada
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DNMT – DNA Nucleotídeo Metiltransferases
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético
- EZH2 – Enhancer do Homólogo 2 de Zeste
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- GH – Hormônio de Crescimento
- HAT – Histona Acetiltransferases
- HDAC – Histona Deacetilases
- HDMT – Histona Desmetilase
- HMT – Histona Metiltransferase
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICR – Região controladora de *imprinting*
- ICX – Inativação do cromossomo X
- IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina
- IGF2 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
- IGF2R – Receptor do Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
- IPTG – Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósideo
- LB – Meio Luria-Bertani
- LH – Hormônio Luteinizante
- M – Molar
- mA – Miliampere
- MAO-A – Monoamina oxidase tipo A
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MCI – Massa celular interna

MSCI – Inativação Cromossômica Sexual Meiótica  
mg – Miligrama  
 $MgCl_2$  – Cloreto de magnésio  
min – Minutos  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mM – Milimolar  
MPF – Fator Promotor da Maturação  
mSOF – Meio fluído sintético de oviduto modificado  
N – Normal  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
OCT4 – Fator de transcrição ligante no octâmero 4  
pb – Pares de base  
PBS – Solução salina em tampão fosfato  
PcG – Proteínas Policombs  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
Pmol – Picomol  
PRC2 – Complexo Repressivo Policombs tipo 2  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNase - Ribonuclease  
Rnf12 – Proteína *Ring Finger*  
rpm – Rotação por minuto  
s – Segundo  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SFB – Soro fetal bovino  
SUMO – Modificador semelhante a pequena ubiquitina  
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA  
TCM-199 – Meio de Cultura de Tecidos-199  
TET – Translocação Dez-Onze

U – Unidades

UI – Unidades Internacionais

VEC – Ilhas CpG variavelmente apagáveis

XCE – Elementos Controladores de X

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

Xi – Cromossomo X inativo

XIC – Centro de inativação do cromossomo X

XIST – Transcrito específico de inativação do cromossomo X

XITE – Elementos Transcpcionais Intergênicos de Inativação de X

Xm – Cromossomo X materno

Xp – Cromossomo X paterno

YY1 – Transcrito Ying Yang 1

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ηg – Nanograma

µm – Micrômetro

5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5mC – 5-metilcitosina

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema representando a regulação da expressão imprinted do locus IGF2/H19 em camundongos, tanto no alelo materno (♀) quanto no alelo paterno (♂). (IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008)....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrando a interação entre as DMRs a qual controla a regulação da expressão dos genes IGF2 e H19 em camundongos. No alelo materno a DMR desmetilada do H19 liga-se aos fatores CTCF que interagem com a DMR1 do IGF2, o que possibilita a ativação do H19 pelo <i>enhancer</i> . Já no alelo paterno a DMR do H19 está metilada e associa-se com a DMR2 metilada do IGF2, movendo-o para o domínio de cromatina ativa, com o <i>enhancer</i> induzindo sua expressão. (MURRELL; HEESON; REIK, 2004).....	22
<b>Figura 3.</b> Obtenção do córtex ovariano com o auxílio de um bisturi.....	30
<b>Figura 4.</b> Fragmentação do córtex ovariano no <i>Tissue Chopper</i> . (A) Fragmento ovariano intacto para ser submetido aos cortes no <i>Tissue Chopper</i> . (B) Fragmento ovariano após os cortes no <i>Tissue Chopper</i> . Foram realizados cortes de 150 a 350 $\mu$ m.....	30
<b>Figura 5.</b> Esquema ilustrando as posições dos cortes do córtex ovariano no <i>Tissue Chopper</i> : longitudinal, transversal e oblíquo. Durante todo o procedimento os fragmentos ovarianos foram hidratados com PBS acrescido de SFB.....	30
<b>Figura 6.</b> Dissociação mecânica dos ovócitos inclusos em folículos pré-antrais e antrais utilizando uma pipeta Pasteur de 3 mL. Foram feitas de 10 a 40 suspensões.....	31

<b>Figura 7.</b> Fragmentos ovarianos sendo filtrados utilizando malha de nylon de 245 µm.....	32
<b>Figura 8.</b> Microscópio invertido utilizado para a recuperação dos ovócitos..	32
<b>Figura 9.</b> Exemplos de ovócitos de folículos primordiais (A), secundário final (B), antral incompetente (1 a 3 mm; C) e antral competente (maiores que 6 mm; D). O comprimento exibido nas imagens refere-se ao diâmetro dos ovócitos.....	39
<b>Figura 10.</b> Amplificação do gene XIST submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. <b>M:</b> Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®). <b>1:</b> Fragmento de 405 pb referente ao gene XIST.....	40
<b>Figura 11.</b> Amplificação do gene IGF2 submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. <b>M:</b> Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®). <b>1:</b> Fragmento de 420 pb referente ao gene IGF2.....	41
<b>Figura 12.</b> Produtos de mini-preparação de plasmídeo. Foram aplicados 300 ng de DNA plasmidial de cada amostra em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotodocumentado e apenas amostras apresentando boa qualidade foram enviadas para sequenciamento. <b>M:</b> Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).....	41

**Figura 13.** Exemplos de alinhamentos realizados no programa BiQ Analyzer entre as sequências depositadas no *GenBank* (linha superior) e os produtos de sequenciamento (linha inferior) para o gene XIST (**A**) e IGF2 (**B**). Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas. O retângulo verde na imagem B indica o 10º sítio CG, o qual no exemplo acima encontra-se desmetilado.....

43

**Figura 14.** Padrão de metilação do exón 1 do gene XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que se repetiram estão mostradas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetira. (**A**) Ovócitos de folículos primordiais; (**B**) Ovócitos de folículos secundários finais; (**C**) Ovócitos de folículos antrais incompetentes; (**D**) Ovócitos de folículos antrais competentes.....

44

**Figura 15:** Padrão de metilação do exón 10 do gene IGF2 em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que se repetiram estão mostradas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetira. (**A**) Ovócitos de folículos primordiais; (**B**) Ovócitos de folículos secundários finais; (**C**) Ovócitos de folículos antrais incompetentes; (**D**) Ovócitos de folículos antrais competentes. ....

45

**Figura 16.** Taxa de metilação para os genes XIST (A) e IGF2 (B) em ovócitos de diferentes categorias de folículos – Primordial, Secundário Final, 1-3 mm (Antral Incompetente) e > 6 mm (Antral Competente)..... 47

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Média ( $\pm$ desvio-padrão) do número de folículos pré-antrais por ovário de <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> coletados de fetos, novilhas e vacas (SILVA-SANTOS et al., 2011).....	07
<b>Tabela 2.</b> Relação do diâmetro do ovócito e a categoria do folículo de origem (BESSA, 2011).....	33
<b>Tabela 3.</b> Identificação do Gene, sequências dos iniciadores, acesso no GenBank, localização, posição na ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.....	35
<b>Tabela 4.</b> Condições de Nested PCR para os genes XIST e IGF2.....	36
<b>Tabela 5.</b> Classificação dos folículos, número total de ovócitos utilizados para a extração do DNA, diâmetro dos ovócitos (média $\pm$ desvio padrão) e amplitude dos diâmetros dos ovócitos.....	40
<b>Tabela 6.</b> Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado, para os genes XIST e IGF2.....	46

## **PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES XIST E IGF2 EM OVÓCITOS DE VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) EM DIFERENTES FASES DA OVOGÊNESE**

**RESUMO** – A metilação do DNA é um dos eventos epigenéticos mais conhecidos, sendo um dos responsáveis pela reprogramação epigenética que acontece durante a gametogênese. Entender como ocorre essa reprogramação na ovogênese é importante para a compreensão de aspectos fisiológicos e genéticos envolvidos na gametogênese feminina com o intuito de criar parâmetros para a competência ovocitária e, consequentemente, melhorar a produção *in vitro* de embriões, maximizando a utilização de gametas e melhorando as taxas de produção. Nesse trabalho objetivou-se determinar o padrão de metilação em duas DMRs envolvidas no controle da expressão dos genes XIST e IGF2 em ovócitos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore. O DNA extraído dos ovócitos foi tratado com bissulfito de sódio e amplificado para os genes XIST e IGF2, o qual foi克隆ado em células DH5 $\alpha$ , sendo em seguida purificado e sequenciado. Foram encontrados padrões de metilação para ovócitos de folículos primordiais, secundários finais, antrais incompetentes e antrais competentes de  $91,59 \pm 6,4\%$ ,  $85,70 \pm 19,6\%$ ,  $91,25 \pm 7,2\%$  e  $92,58 \pm 11,7\%$ , respectivamente para o gene XIST e  $60,56 \pm 29,1\%$ ,  $59,68 \pm 34,6\%$ ,  $58,21 \pm 33,0\%$  e  $67,47 \pm 27,8\%$ , respectivamente para o gene IGF2, sendo que o gene XIST está mais metilado que o gene IGF2 ( $P < 0,001$ ). O padrão hipermetilado para o gene XIST sugere que pode ser este o evento epigenético responsável pela reativação do cromossomo X durante a ovogênese, caráter que é observado no ovócito MII. O gene IGF2 também apresentou um padrão hipermetilado, diferente do encontrado no ovócito maturado. Isso sugere que as regiões analisadas sofrem processos de reprogramação epigenética diferentes durante a ovogênese, os quais provavelmente se completam somente com a maturação ovocitária.

**Palavras-chave:** Bovino, Gametogênese, IGF2, Reprogramação Epigenética, XIST

## METHYLATION PATTERN OF THE XIST AND IGF2 GENES IN OOCYTES FROM NELORE COWS (*Bos taurus indicus*) DURING OOCENESIS

**ABSTRACT** – DNA methylation is one of the most studied epigenetic events and is responsible for epigenetic reprogramming which occurs during gametogenesis. Understanding how this reprogramming occurs in oogenesis is important to comprehend physiologic and genetic aspects involved in female gametogenesis in order to create parameters for oocyte competence and, consequently, to improve the in vitro embryo production, maximizing the use of gametes and improving production rates. The aim of this study was to evaluate the DNA methylation pattern in two DMRs involved in the control of XIST and IGF2 genes expression in oocytes from pre antral and antral follicles of Nellore cows. The extracted DNA from oocytes was treated with sodium bisulphite and amplified to XIST and IGF2 genes, which was cloned into DH5a cells, and then purified and sequenced. The methylation patterns found for oocytes of primordial, secondary, incompetent antral and competent antral follicles were  $91.59 \pm 6.4\%$ ,  $85.70 \pm 19.6\%$ ,  $91.25 \pm 7.2\%$  and  $92.58 \pm 11.7\%$ , respectively for XIST gene and  $60.56 \pm 29.1\%$ ,  $59.68 \pm 34.6\%$ ,  $58.21 \pm 33.0\%$  and  $67.47 \pm 27.8\%$ , respectively for IGF2 gene. XIST is more methylated than IGF2 gene ( $P<0,001$ ). The hypermethylated pattern of XIST gene suggests that this event may be responsible for epigenetic reactivation of the X chromosome during oogenesis, which is observed in the final oocyte. The IGF2 gene was also hypermethylated, a different pattern found in matured oocytes. This suggests that the analyzed regions undergo different epigenetic reprogramming processes during oogenesis, which are only completed with oocyte maturation.

**Key-words:** Bovine, DNA Methylation, Epigenetic Reprogramming, Gametogenesis, IGF2, XIST

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um importante papel no cenário mundial enquanto produtor de embriões *in vitro*, além de produtor e exportador de produtos derivados da bovinocultura, especialmente da de corte. Isso revela o compromisso do país com a qualidade de seu rebanho e a constante busca do melhoramento genético e eficiência de produção. Com o passar do tempo e a inclusão constante de novas descobertas científicas no sistema de produção de embriões, a velocidade de ganho em eficiência da técnica vai diminuindo (HIRAO, 2011).

O aprimoramento das biotécnicas relacionadas à reprodução animal tem se mostrado um importante aliado para produtores e pesquisadores que buscam o melhoramento genético animal, seja para aumentar a eficiência da multiplicação de rebanhos em risco de extinção, ou para aumentar a eficiência de produção de rebanhos com elevado valor econômico. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a bovinocultura é uma das principais atividades econômicas do Brasil, sendo o país detentor do maior rebanho bovino efetivo do mundo, com cerca de 209 milhões de cabeças. 80% do rebanho brasileiro é composto por animais *Bos taurus indicus*, sendo que 90% dessa parcela é representada por animais da raça Nelore. Entre janeiro e setembro de 2012 foram abatidos mais de 21.300.000 cabeças de gado em todo o território brasileiro, sendo o país o maior exportador de carne bovina do mundo. Destaca-se também a pecuária leiteira, tal como mostram os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Entre o período de julho de 2011 a junho de 2012, mais de 20,5 bilhões de litros de leite foram industrializados pelos laticínios.

A seleção dos gametas é o fator chave para o aprimoramento das biotécnicas relacionadas à produção de embriões. A escolha de animais com alto potencial genético como doadores de ovócitos e espermatozoides possibilita o real incremento da produção, já que possui o potencial de maximizar o número de gametas utilizados de cada animal de interesse.

A partir do estabelecimento de algumas biotécnicas de reprodução assistida, a multiplicação de animais de alto mérito genético pode ser otimizada num nível que pudesse acelerar ganhos genéticos no contexto dos programas de melhoramento

animal (FRANCO; MELO, 2006). Com a Inseminação Artificial a utilização da genética do macho pode ser maximizada, sendo possível a obtenção de vários descendentes de um único animal. A genética da fêmea continuou pouco utilizada, principalmente pelo fato desta já nascer com todas as células germinativas que utilizará por toda a sua vida reprodutiva. Com o estabelecimento da técnica de Transferência de Embriões esse obstáculo pôde ser parcialmente superado, já que outros animais poderiam receber embriões de um único animal. No entanto, a utilização da genética feminina pôde ser mais otimizada com o advento da Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE), que teve um importante papel na medida em que teve o potencial de ultrapassar barreiras fisiológicas, imunológicas e genéticas para a produção de animais, além de suplantar a eficiência de outras biotécnicas a ela associadas, como a transferência de embriões.

A utilização de ovócitos obtidos por punção folicular de fêmeas vivas ou através de ovários provenientes de abatedouros se dá através de três processos interdependentes: maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A eficiência das etapas é diferenciada, no entanto, o procedimento como um todo é pouco eficiente, já que apenas entre 30% e 40% dos ovócitos submetidos a tal processo alcançam o estágio de blastocisto e as taxas de prenhez são de aproximadamente 38% (RIZOS et al., 2002; CAMARGO et al., 2006; VIANA et al., 2010). Para maximizar o potencial reprodutivo de uma fêmea faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas de cultivo que propiciem um microambiente favorável para o ovócito, não apenas em modelos experimentais de estudo, mas também em sistemas com aplicações práticas na medicina veterinária e no incremento genético de animais (HIRAO, 2011).

Além da utilização dos ovócitos de folículos antrais utilizados rotineiramente na PIVE, a utilização de ovócitos de folículos pré-antrais mostra-se como uma possibilidade de grande potencial para a otimização da multiplicação animal. A possibilidade de utilização de ovócitos de folículos cada vez menores no processo de produção *in vitro* de embriões e de se obter gametas viáveis de fêmeas mortas, fêmeas com distúrbios reprodutivos que as impossibilitem de ovularem ou mesmo maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas de elevado valor econômico pode ser um importante aliado para o incremento das biotécnicas de reprodução assistida.

Além disso, há também a possibilidade de aquisição de gametas viáveis de animais pré-púberes, o que diminuiria o intervalo de geração na reprodução bovina. Como o número de gametas femininos é finito, essa técnica torna-se mais importante em fêmeas do que em machos por possibilitar o aumento do número dessas células aptas a serem utilizadas.

A necessidade de uma correta reprogramação epigenética dos ovócitos é um dos prováveis fatores limitantes para o sucesso da PIVE para que ocorra o desenvolvimento embrionário normal. Esta reprogramação está sob o controle, principalmente, do padrão de metilação do DNA, o qual controla a ativação e o silenciamento de genes importantes para a maturação completa dos ovócitos e, consequentemente, normal desenvolvimento do embrião após a fecundação. Nesse sentido, entender esses mecanismos poderá contribuir significativamente para a prospecção de marcadores moleculares para a qualidade ovocitária ao propiciar o estabelecimento de protocolos para o aprimoramento da PIVE e de outras biotécnicas a ela associadas, como a transferência de embriões.

A importância das biotécnicas para o incremento da bovinocultura no Brasil é indiscutível. Contudo, a compreensão por si só dos fatores epigenéticos envolvidos na ovogênese já tem grande importância pelo melhor entendimento da fisiologia, genética e bioquímica do processo de produção do gameta feminino, propiciando um adequado manejo dos animais em períodos mais críticos do mesmo, possibilitando, consequentemente, o incremento das biotécnicas de reprodução assistida.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Foliculogênese e Ovogênese

Embora haja sobreposição, a ovogênese e a foliculogênese são eventos distintos. O primeiro processo está relacionado com a produção do gameta feminino – o ovócito – desde as células germinativas primordiais até a liberação do ovócito na fase de meiose II (MII). Concomitante com esse evento há a formação do folículo ovariano, uma estrutura que contém tanto células somáticas quanto o ovócito imaturo. Esse processo é denominado foliculogênese, que se inicia com o folículo primordial e vai até o folículo pré-ovulatório.

No início do desenvolvimento embrionário algumas células derivadas do epiblasto proximal migram para o mesoderma extraembrionário – mais precisamente para o saco vitelínico –, formando um *pool* de células germinativas precursoras detectadas primeiramente no alantoide (EPIFANO, DEAN, 2002; AERTS; BOLS, 2010a). Nas fases finais da gastrulação – entre os dias 30 e 64 de gestação na espécie bovina (AERTS; BOLS, 2010a) – as células germinativas migram de volta aos tecidos que formarão o embrião, alojando-se nas cristas urogenitais, proliferando e promovendo sua colonização, levando à formação dos cordões gonadais, que nas fêmeas formam os cordões corticais e, posteriormente, os ovários (EPIFANO, DEAN, 2002; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Quando as células germinativas primordiais alcançam as cristas gonadais já são denominadas ovogônias, as quais são circundadas por uma camada de células somáticas – que são consideradas precursoras das células da granulosa. As ovogônias são diploides e mitoticamente ativas até alcançarem um número determinado de divisões equacionais. A partir daí entram na divisão meiótica e páram na fase de diplóteno da prófase I, originando os ovócitos primários (OKTEM; OKTAY, 2008). Ao nascimento, as fêmeas se encontram nessa etapa da ovogênese.

A foliculogênese inicia-se no período perinatal em camundongos (SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000), após o início da ovogênese, sendo que o ovócito possui um importante papel na formação e diferenciação do folículo ovariano. Como as

ovogônias proliferam por mitose elas desenvolvem pontes citoplasmáticas entre uma célula e outra, como resultado da citocinese incompleta. Estes sincícios agregam precursores de células somáticas para formar cordões sexuais que são os precursores dos folículos ovarianos (EPIFANO, DEAN, 2002).

Os ovócitos, medindo entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  e retidos na prófase da primeira divisão meiótica, começam a ser circundados por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso para formar os folículos primordiais. Essa população folicular representa o estoque de gametas femininos que será recrutado em diferentes fases da vida da fêmea para iniciar o período de crescimento (ZUCCOTTI et al., 2011). No caso dos animais domésticos, esse estoque é estabelecido durante a vida fetal do indivíduo (AERTS; BOLS, 2010a) e constitui uma reserva de gametas para as fêmeas que pode ser utilizada ou manipulada para sanar problemas de infertilidade, por exemplo (FORTUNE, 2000).

A ativação dos folículos primordiais para crescimento é um processo complexo que envolve um grande número de fatores autócrinos e parácrinos, muitos deles ainda com a função não totalmente conhecida (FORTUNE et al., 2000; ZUCCOTTI et al., 2011). Um exemplo é a função do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) nessa fase de desenvolvimento folicular. Embora não haja receptores funcionais para esse hormônio, as células da granulosa respondem à ativação de cAMP com o aumento da expressão de aromatase e receptores de FSH (McNATTY et al., 2007). Além disso, fatores externos tais como a nutrição podem influenciar os níveis hormonais circulantes de substâncias endócrinas, tais como o Hormônio de Crescimento (GH), FSH, insulina, leptina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF). Mudanças no metabolismo desses hormônios afetam diretamente o crescimento folicular e a qualidade do ovócito (WEBB et al., 2004).

Na transição do folículo primordial para primário há um aumento do tamanho do ovócito e as células da granulosa passam do formato pavimentoso para cúbico (FAIR, 2003). A partir do momento em que as células da granulosa começam a proliferar e o ovócito passa a ser circundado por mais de uma camada de células somáticas, o folículo passa a ser denominado secundário (SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000) e essa fase vai até o início da formação da cavidade antral (FORTUNE, 2003).

É na fase de folículo secundário que ocorre a formação da zona pelúcida (VAN WENZEL; RODGERS, 1996; FAIR, 2003; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Ocorre o início da deposição do material que formará esta quando o folículo possui no mínimo 40 células da granulosa (AERTS; BOLS, 2010a) e o ovócito possui aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), sendo que quando alcança cerca de 85  $\mu\text{m}$  de diâmetro a zona pelúcida já forma um anel completo ao redor do ovócito (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997).

Folículos primordiais, primários e secundários são, a título de classificação, denominados folículos pré-antrais. Constituem a reserva de gametas não-renovável que será utilizada durante toda a vida reprodutiva da fêmea, representando mais de 90% de todos os folículos presentes no ovário mamífero. No entanto, 99,9% de toda essa população não chega ao estágio ovulatório, sendo eliminada no processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 2007).

São escassos os estudos acerca da abundância, fisiologia e genética dos folículos pré-antrais, embora seja esta uma vasta fonte de gametas a ser utilizada na produção *in vitro* de embriões bovinos. Um recente estudo (SILVA-SANTOS et al., 2011; Tabela 1) mostrou que animais de raças taurinas (Aberdeen Angus) possuem em maior abundância essa população folicular do que raças zebuínas (Nelore), tanto em ovários de animais adultos (72 a 96 meses) quanto em bezerras (20 a 24 meses) e fetos (180 a 240 dias).

Tabela 1. Média ( $\pm$  desvio-padrão) do número de folículos pré-antrais por ovário de *Bos indicus* e *Bos taurus* coletados de fetos, novilhas e vacas (SILVA-SANTOS et al., 2011).

Grupos	Número de folículos pré-antrais por ovário		
	Primordial	Primário	Secundário
Fetos <i>Bos indicus</i> (n=10)	89.051 $\pm$ 40.050 <sup>ab</sup>	53.454 $\pm$ 36.072 <sup>a</sup>	1.423 $\pm$ 1.648 <sup>b</sup>
Fetos <i>Bos taurus</i> (n=10)	234.570 $\pm$ 310.058 <sup>a</sup>	46.414 $\pm$ 17.772 <sup>a</sup>	4.172 $\pm$ 3.437 <sup>a</sup>
Bezerras <i>Bos indicus</i> (n=12)	47.436 $\pm$ 61.888 <sup>c</sup>	25.351 $\pm$ 19.926 <sup>b</sup>	4.063 $\pm$ 2.891 <sup>a</sup>
Bezerras <i>Bos taurus</i> (n=12)	83.726 $\pm$ 85.148 <sup>b</sup>	21.010 $\pm$ 6.666 <sup>b</sup>	4.937 $\pm$ 7.411 <sup>a</sup>
Vacas <i>Bos indicus</i> (n=10)	24.617 $\pm$ 22.057 <sup>c</sup>	14.357 $\pm$ 10.728 <sup>b</sup>	464 $\pm$ 312 <sup>c</sup>
Vacas <i>Bos taurus</i> (n=10)	64.395 $\pm$ 69.371 <sup>bc</sup>	23.323 $\pm$ 18.073 <sup>b</sup>	1.859 $\pm$ 1.477 <sup>ab</sup>

Médias com letras diferentes em uma mesma linha diferem significativamente, com 5% de significância, pelo teste de Mann-Whitney (SILVA-SANTOS et al., 2011).

A transição de folículos pré-antrais para folículos antrais está sob controle tanto de gonadotrofinas – FSH e Hormônio Luteinizante (LH) – quanto de fatores parácrinos secretados pelo ovócito (ZUCCOTTI et al., 2011). Esse é um estágio caracterizado pelo aparecimento de uma cavidade preenchida por um líquido, o antro, que estabelece a separação morfológica e funcional das células da mural granulosa – responsáveis pela produção de hormônios esteroides e outros ligantes – e as células do *cumulus* – intimamente relacionadas ao ovócito através de junções *gap* e responsáveis por suportar o desenvolvimento ovocitário (SU; SUGIURA; EPPIG, 2009; ZUCCOTTI et al., 2011). Embora a formação do antro não seja fundamental para a aquisição de todo o potencial de desenvolvimento do ovócito, o líquido folicular representa um microambiente enriquecido em moléculas nutricionais e reguladoras e fatores apoptóticos (ZUCCOTTI et al., 2011). Além disso, a competência ovocitária está mais relacionada com o diâmetro do folículo do que do próprio ovócito (TROUNSON; ANDRIESZ; JONES, 2001).

Folículos terciários ou antrais passam a responder a concentrações séricas crescentes de FSH. Na espécie bovina, tanto o ovócito quanto o folículo continuam crescendo paralelamente até que o folículo alcance um diâmetro de 3 mm e o ovócito tenha um diâmetro de cerca de 120  $\mu$ m. Nesse estágio final de crescimento, as organelas citoplasmáticas proliferam e redistribuem e aparece o espaço perivitelino (FAIR, 2003). Esse processo de maturação final do ovócito é

caracterizado pela expansão das células do *cumulus*, aumento dos níveis de lipídeos citoplasmáticos e alinhamento dos grânulos corticais (FAIR, 2003).

O pico de LH é essencial para que o ovócito esteja apto a ser fecundado e inicie o desenvolvimento embrionário normal. Dois processos distintos, mas totalmente correlacionados, são responsáveis pela aquisição dessa aptidão no período pré-ovulatório: a maturação nuclear e citoplasmática do gameta feminino.

O reinício da meiose caracteriza-se pelo rompimento da vesícula germinativa e a formação da placa metafásica, caracterizando o final da ovogênese (BEVERS et al., 1997; FAIR, 2003; MEHLMANN, 2005; RICHARD, 2006; AERTS; BOLS, 2010b). O controle da meiose parece ser regulado principalmente pelos níveis intraovocitários de Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP; MEHLMANN, 2005; RICHARD, 2006), que possibilitam ao ovócito alcançar a metáfase II da meiose, sendo novamente interrompida. Nesse momento ocorre a ovulação. Além disso, já é estabelecido que o Fator Promotor da Maturação (MPF), que é um fator universal não-específico, é responsável pela transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular meiótico, promovendo a quebra da vesícula germinativa (JU; TSAY; RUAN, 2003; VIGNERON et al., 2004). O reinício da divisão meiótica também pode ocorrer espontaneamente assim que o ovócito é retirado do folículo (ZUCCOTTI et al., 2011). A meiose somente se completa se houver a fecundação do gameta, a partir da qual começa o desenvolvimento embrionário (HAFEZ; HAFEZ, 2004; VAN DEN HURK, ZHAO; 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O outro evento da maturação ovocitária, que ocorre logo após o pico de LH, é a maturação citoplasmática do gameta. Esse processo caracteriza-se pela reorganização das organelas e término da formação do estoque de mRNA e proteínas que são responsáveis por dar suporte ao período de fecundação, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (BEVERS et al., 1997; MERMILLIOD et al, 2000), até que o embrião tenha o seu genoma ativado – o que no caso da espécie bovina ocorre quando este se encontra no estágio de 8-16 células (BORDIGNON; CLARKE; SMITH, 1999).

## 2.2 Aquisição da competência ovocitária e a Produção *In Vitro* de Embriões

A quantidade e a qualidade dos ovócitos recuperados sofrem influência de alguns fatores, tais como estado nutricional da doadora, armazenamento e transporte após a aspiração e o próprio sistema de produção *in vitro* (DODE, 2006). Além disso, o ambiente folicular de onde o ovócito provém – tamanho do folículo e idade da fêmea – pode ser determinante na competência do gameta para sua utilização em laboratório, através da expressão diferencial de genes em ovócitos de diferentes tamanhos, o que pode estar relacionado com a competência ovocitária, conforme está bem estabelecido na literatura científica (MALARD et al., 2001; FENG et al., 2007; RACEDO, 2008; CAIXETA et al., 2009; MANOSALVA; GONZÁLEZ, 2010; FAGUNDES, et al., 2011).

O crescimento do ovócito em um ambiente favorável para o mesmo – seja *in vivo* ou *in vitro* – reúne uma série de processos em que cada etapa é determinante para o sucesso da etapa seguinte. Desse modo, a qualidade do desenvolvimento e maturação ovocitários podem ser determinantes para a sobrevivência e a saúde dos embriões produzidos (DIELEMAN et al., 2002).

O ovócito deve ter um estoque de mRNA e proteínas que serão fundamentais para a sua maturação final, fecundação e desenvolvimento inicial do embrião, até que este possa ter seu genoma ativado (SIRARD et al., 2006). Dentro do grupo de genes que são transcritos estão os responsáveis por codificar as proteínas histonas, que, ao se ligarem ao DNA, empacotam-no, contribuindo para a compactação da cromatina e, consequentemente, regulação de toda a expressão gênica da célula. O padrão de expressão dos genes codificantes de histonas pode estar relacionado com a aquisição da competência ovocitária (CAIXETA et al., 2009), sendo que o estabelecimento insuficiente do estoque de mRNA poderá ser uma das causas da baixa eficiência na utilização de folículos pré-antrais em procedimentos em laboratório. Além disso, o perfil de expressão do mRNA também é afetado pelo tamanho e estágio de desenvolvimento folicular (RACEDO, 2008), o que pode influenciar na baixa qualidade de gametas oriundos de folículos em fases mais precoces de desenvolvimento.

Uma extensa reprogramação epigenética é necessária aos gametas durante sua formação para que estas células se tornem aptas à fecundação e formação de um embrião viável (REIK; WALTER, 2001; MORGAN et al., 2005; PICTON et al., 2008). Acredita-se que a maioria dos genes *imprinted* é epigeneticamente modificada durante o período de crescimento ovocitário (HIURA et al. 2006). Essas alterações epigenéticas são “apagadas” nas células primordiais precursoras dos gametas e são impostas durante a gametogênese, servindo como uma marca para distinguir os alelos paternos e maternos para restabelecer o padrão correto de expressão na geração seguinte (SATO et al., 2007). Dessa forma, é provável que essas alterações não sejam iniciadas até que o ovócito inicie a fase de crescimento, porém isso não está bem estabelecido em nenhuma espécie doméstica de interesse econômico, tal como a bovina. O incremento das biotécnicas de reprodução assistida pode ter sua eficiência melhorada com estudos a respeito da correta reprogramação epigenética durante a ovogênese e a foliculogênese e da análise das proteínas e mRNA presentes nos ovócitos e da regulação gênica de forma geral, especialmente nos folículos pré-antrais, que constituem a maior parte da população ovariana.

Os folículos em estágios mais tardios de desenvolvimento – antrais – foram e continuam sendo foco de muitas pesquisas, o que resultou em um grande incremento no conhecimento acerca dessa população folicular. Isso se justifica pela sua utilização na produção *in vitro* de embriões. No entanto, os estágios mais precoces – pré-antrais – continuam sendo menos conhecidos, fato que pode ser explicado pela maior dificuldade em se estudar folículos de pequeno tamanho, como são os pré-antrais (FORTUNE, 2003). Além disso, estudos realizados com folículos pré-antrais obtidos de animais domésticos mostraram que o seu desenvolvimento *in vitro* é difícil de ser alcançado (CECCONI et al., 1999, PICTON et al., 2008). Apesar das limitações, o estudo dessa população de folículos – hormônios, mediadores de crescimento e reprogramação epigenética – pode ter um relevante papel no incremento de biotécnicas de reprodução de animais domésticos, juntamente com os recentes avanços de outras técnicas, tais como a criopreservação de tecidos ovarianos, que podem aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas ao se obter

gametas de melhor qualidade (FORTUNE, 2003; FENG, 2007; PICTON, 2008; AERTS; BOLS, 2010a).

### 2.3 Epigenética

A evolução dos organismos multicelulares complexos possibilitou o surgimento de especificidades de sistemas celulares e fisiológicos para manter a homeostase desses organismos. Como consequência desse fato houve a necessidade de um extenso processo de diferenciação celular, capaz de controlar essas especificidades de maneira coordenada. Contudo, é consenso que as bases genéticas – mais precisamente a sequência de nucleotídeos do DNA – de todas as células de um indivíduo são as mesmas, resultado da união de gametas de origem paterna e materna. A explicação para a diversidade de formas, cores, tamanhos, funções e reações observadas nos mais diferentes tipos celulares de um mesmo organismo são os processos epigenéticos que ocorrem separadamente em cada uma deles e que são responsáveis pelo padrão de transcrição célula-específico.

No seu sentido literal, a palavra epigenética significa “fora da genética convencional”, sendo o termo utilizado para descrever o estudo de alterações herdáveis e estáveis no potencial de expressão de genes que possam surgir durante o desenvolvimento embrionário ou proliferação celular (JAENISCH; BIRD, 2003), sendo que essas alterações são preservadas ou regeneradas durante a divisão celular (LAIRD, 2010; MARGUERON; REINBERG, 2010), não ocorrendo mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA (SINGAL; GINDER, 1999). Como essas alterações são herdáveis, as células-filhas possuem o mesmo *epigenoma* da célula parental (SASAKI; MATSUI, 2008).

A importância da influência do meio ambiente em modificar a trajetória de desenvolvimento foi revisada por Faulk e Dolinoy (2011). As primeiras ideias surgiram com Jean-Baptiste Lamarck (1808), que defendia que a utilização excessiva de uma parte do corpo poderia causar o aumento de tamanho herdável daquela parte, já que os organismos possuem uma “tendência à progressão” e que os descendentes poderiam herdar traços adquiridos pelos hábitos dos progenitores.

Já o biólogo ucraniano Trofim Lysenko (1927) acreditava que as plantações poderiam se adaptar a climas mais frios caso as sementes fossem expostas a temperaturas mais baixas. Isso culminou com a sua tentativa de alimentar vacas gestantes mestiças com dietas especiais para a produção de uma prole com alta produtividade de leite. Mesmo com a refutação de tais ideias através de análises empíricas, que afirmavam que as células germinativas não poderiam herdar modificações adquiridas pelo corpo, é consenso entre pesquisadores das áreas de biologia molecular e genética que existe relação entre o ambiente no qual o indivíduo é exposto nos primórdios de seu desenvolvimento e doenças adquiridas em sua vida adulta, por exemplo.

Pelo fato das modificações epigenéticas serem reversíveis, elas podem ser modificadas por fatores ambientais, que podem contribuir para o desenvolvimento de fenótipos anormais. Idade, nutrição (ingestão calórica, níveis nutricionais específicos, fitoquímicos), fatores físicos (comportamento, temperatura, densidade populacional, estresse), fatores químicos (toxinas e fármacos) ou efeitos estocásticos, por exemplo, podem ser fatores de predisposição para hipermetilação de genes supressores de tumores, silenciando-os (JAENISCH; BIRD, 2003; FAULK; DOLINOY, 2011). Assim, tais fatores epigenéticos parecem estar envolvidos na conexão entre genoma e o meio ambiente (FAULK; DOLINOY, 2011; LYKO; MALESZKA, 2011).

De uma forma geral, as alterações epigenéticas estão envolvidas com a conformação da cromatina, podendo ser tanto a nível de DNA quanto de histonas e permitindo uma conformação mais ou menos apta à transcrição. Dentre essas alterações estão modificações no padrão de metilação do DNA e das histonas, alterações pós-traducionais das histonas nos nucleossomos, incorporação de variantes de histonas e remodelagem de outras proteínas associadas à cromatina (STRAHL; ALLIS, 2000; RIDEOUT III; EGGAN; JAENISCH, 2001; LI, 2002; GRIFFITHS et al., 2009; WIJCHERS; FESTENSTEIN, 2011).

### 2.3.1 Metilação do DNA

Ilhas CpG (Citosina-fosfato-Guanina) são regiões do genoma com mais de 500 pb que contêm alta frequência de dinucleotídeos CG e contém aproximadamente 70% dos promotores dos genes humanos (MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008). São nessas regiões que ocorre um dos processos epigenéticos mais conhecidos e importantes, que é a metilação do DNA. Trata-se de uma modificação química do DNA genômico que envolve a adição covalente de um grupo metil no carbono 5 do anel de citosina de um dinucleotídeo CpG, formando uma base denominada 5-metilcitosina (5mC; ZAID et al., 2010; EGLEN; REISIN, 2011; LYKO; MALESZKA, 2011). Mais recentemente, a base 5-hidroximetilcitosina (5hmC), resultado da oxidação de 5mC, foi descoberta, sendo abundante em células pluripotentes e de Purkinje e parecendo ter um papel importante na embriogênese (HASHIMOTO; VERTINO; CHENG, 2010; HACKETT; ZYLICZ; SURANI, 2012).

A metilação do DNA é um dos processos epigenéticos mais estáveis que se conhece e regula funções biológicas cruciais, como o *imprinting* genômico, silenciamento de transposons e estabilidade cromossomal (GEHRING; REIK; HENIKOFF, 2008; ZAID et al., 2010; GUSEVA; MONDAL; KANDURI, 2012). Isso ocorre através da supressão da transcrição gênica, em que o grupo metil da 5mC estende-se para dentro do sulco maior do DNA, interferindo nas proteínas ligantes dos fatores de transcrição (FAULK; DOLINOVY, 2011). Os níveis de compactação da cromatina acentuam-se através da interação entre a metilação do DNA, a ação das DNA metiltransferases e proteínas da cromatina – tais como *Polycomb group Protein* (PcG) e *Enhancer of Zeste homolog 2* (EZH2) – que influenciam as modificações de histona (FAULK; DOLINOVY, 2011).

Em mamíferos é bem estabelecido que ocorre um extenso processo de reprogramação epigenética em certos períodos de desenvolvimento, no qual o genoma sofre eventos de desmetilação e remetilação em um padrão célula ou tecido-específico. Reik, Dean e Walter (2001), Faulk e Dolinoy (2011) e Guseva, Mondal e Kanduri (2012) revisaram esses eventos em camundongos, tanto no processo da gametogênese quanto no desenvolvimento embrionário inicial. O primeiro ciclo de reprogramação acontece nas CGP, em que se encontram

desmetiladas no início do desenvolvimento embrionário. A remetilação ocorre nas proespermatoxenias nas células germinativas masculinas – ainda na fase fetal – e após o nascimento do indivíduo nos ovócitos em crescimento. Em bovinos a remetilação precoce na gametogênese masculina parece não ocorrer tal como em camundongos. Estudos preliminares mostraram que essa reprogramação ainda está ocorrendo durante a formação do espermatozoide (NISHIMURA, 2012).

O segundo ciclo de reprogramação ocorre no período imediatamente após a fecundação. A desmetilação do DNA ocorre de forma ativa no genoma paterno e passiva no materno. Ambos os genomas voltam a estar metilados – através de um processo de metilação *de novo* em um período próximo à implantação do embrião, sendo que o genoma das células que formarão os tecidos extraembrionários – trofoblasto – adquire um padrão de metilação menor que os que formarão os tecidos embrionários – botão embrionário (REIK; DEAN; WALTER, 2001; FAULK; DOLINOV, 2011; GUSEVA; MONDAL; KANDURI, 2012).

O início da embriogênese é o momento em que a síntese de DNA é alta e, concomitantemente, há o estabelecimento do padrão de metilação do DNA necessário para o desenvolvimento normal do organismo. Isso explica o porquê dessa fase ser mais vulnerável a fatores ambientais. Fêmeas gestantes expostas a fatores que predispõem a alguma alteração epigenética podem afetar o padrão de metilação tanto de sua prole direta (geração F1) – nas células somáticas pluripotentes do embrião em formação – quanto na prole da geração F1 (geração F2) – nas células germinativas primordiais da geração F1 (FAULK; DOLINOV, 2011).

A metilação do DNA é estabelecida por um grupo de enzimas denominadas DNA Nucleotídeo Metiltransferases (DNMTs), as quais parecem ser bastante conservadas na história evolutiva dos animais, tanto vertebrados quanto invertebrados (LYKO; MALESZKA, 2011). As enzimas pertencentes a esse grupo são DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L, sendo que não se conhece atividade catalítica de DNMT2 e DNMT3L (HSIEH, 2000; JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011), embora se saiba que esta última é um importante fator regulatório de DNMT3a e DNMT3b nas células germinativas (SCHAEFER et al., 2007; JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

A DNMT1 é a enzima responsável por manter o padrão de metilação na célula durante a divisão celular ao inserir um grupo metil em dinucleotídeos CpG (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011), possuindo alta afinidade por DNA hemimetilado (HSIEH, 2000; SCHAEFER et al., 2007). É necessária para manter o padrão *imprinting* e a estabilidade do cromossomo X inativo, além de ser essencial para o desenvolvimento embrionário normal de mamíferos, proliferação e sobrevivência celular (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

Já as DNMT3a e DNMT3b estabelecem o padrão de metilação celular no processo de metilação *de novo*, o qual ocorre logo após a implantação de embriões mamíferos (HSIEH, 2000; SCHAEFER et al., 2007). São essenciais para o desenvolvimento embrionário normal de mamíferos e parecem ser responsáveis por manter o padrão de metilação do DNA em regiões de heterocromatina (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

Se o processo de metilação do DNA envolvendo as DNMTs é relativamente bem conhecido, não se pode dizer o mesmo da desmetilação. Embora seja extremamente importante para a formação das CGP e para o início do desenvolvimento embrionário, a atividade desmetilase continua sendo enigmática e controversa (IQBAL et al., 2011). No caso do processo de desmetilação dos pró-núcleos masculino e feminino logo após a fecundação, a assimetria observada parece estar relacionada com enzimas específicas envolvidas em cada um dos processos. No caso do genoma materno, a desmetilação ocorre devido à ausência de DNMT1 durante a replicação do DNA. Embora ainda controversa, sabe-se que a desmetilação ativa do genoma paterno ocorre de uma forma independente da replicação do DNA, através de atividade desmetilase. A ativação induzida por citidina desaminase (AID) parece trabalhar junto com DNA glicosilases para remover 5mC do DNA através da desaminação da mesma, convertendo-a em timina, que é excisada e substituída por uma citosina em um processo de reparação (POPP et al., 2010; IQBAL et al., 2011). Outro processo para a desmetilação de 5mC sem a necessidade de reparação no DNA é através da oxidação do seu grupo metil, produzindo 5hmC por meio de um grupo de enzimas chamada proteínas Ten-Eleven-Translocation (TETs) (TAHILIANI et al., 2009). Iqbal e colaboradores (2010)

observaram a presença de 5hmC no pró-núcleo paterno, porém, não no materno, um provável produto da oxidação de 5mC do genoma de origem paterna.

### **2.3.2 Modificações de Histonas**

As histonas – proteínas de caráter básico que se associam ao DNA na cromatina – são sujeitas a um vasto número de modificações pós-traducionais, tais como metilação de resíduos de arginina, metilação, acetilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação e SUMOilação de resíduos de lisina e fosforilação de resíduos de serina e treonina (SMOLLE; WORKMAN, 2012). Essas modificações podem alterar os padrões de contato do DNA com o octâmero de histonas, influenciando diretamente a estrutura da cromatina (SMOLLE; WORKMAN, 2012).

O processo de metilação de histonas ocorre com a adição de um grupo metil em resíduos de lisina ou arginina das histonas H3 e H4 (XU; ANDREASSI, 2011). Resíduos de lisina, incluindo H3K4, H3K9, H3K27 e H3K36 podem ser mono, di ou trimetilados, sendo que o número de metilações e o local onde elas ocorrem proporcionam diferentes conformações da cromatina e, consequentemente, diferentes padrões de expressão gênica (STRAHL; ALLIS, 2000; EGLEN; REISINE, 2011). A metilação e a desmetilação de histonas são processos catalisados por Histonas Metiltransferases (HMTs) e Histonas Desmetilases (HDMTs), respectivamente, sendo que sua expressão ocorre de uma maneira tecido-específica (XU; ANDREASSI, 2011).

A acetilação é o processo epigenético mais conhecido a nível de histonas. É catalisado por dois grupos de enzimas: Histona Acetyltransferases (HATs) e Histona Desacetilases (HDACs). As HATs transferem grupos acetil do composto acetil-CoA para grupos amino dos resíduos de lisinas das histonas (EGLEN; REISINE, 2011), sendo um processo que normalmente aumenta a expressão gênica. Já as HDACs compreendem uma família de enzimas que removem os grupos acetil das histonas. Há quatro classes de HDACs que se diferenciam por sua sequência, estrutura e localização celular (EGLEN; REISINE, 2011).

O processo de fosforilação de histonas está relacionado com a apoptose celular, mitose e meiose, além de contribuir para a ativação da transcrição. SUMOilação de histonas possui função contrária, estando envolvida com a repressão da transcrição. Já a ubiquitinação possui função de ativação ou repressão transcripcional de acordo com o resíduo de lisina que recebe essa alteração (SMOLLE; WORKMAN, 2012).

### 2.3.3 *Imprinting* Genômico

Experimentos de transferência pronuclear, realizados em camundongos no início da década de 1980, mostraram que as contribuições genéticas paternas e maternas não são equivalentes, sendo ambas indispensáveis para o desenvolvimento embrionário normal (MCGRATH; SOLTER, 1984). Isso cria regiões de disomia uniparental, mostrando que há áreas discretas do genoma murino que estão sujeitas à regulação parental diferencial (FROST; MOORE, 2010).

Uma considerável proporção de genes em mamíferos e fanerógamas está reprimida em apenas um cromossomo e sua transcrição ocorre de acordo com a sua origem parental (WUTZ et al., 1997; REIK; DEAN, 2001; MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008). Em insetos a característica *imprinted* está relacionada com as diferenças entre os sexos na progênie (KOTA; FEIL, 2010). No caso de mamíferos, esses genes estão relacionados com a regulação do crescimento fetal, desenvolvimento pós-natal, comportamento e metabolismo (HALL, 1997; REIK; WALTER, 2001; DAELEMANS et al., 2010), o que levou à teoria do conflito genético, segundo a qual os genes paternos tendem a aumentar o tamanho fetal a fim de extrair o máximo de nutrientes das fêmeas para que seus descendentes obtenham maior sucesso evolutivo. Em contrapartida, os genes de origem materna precisam ser mais conservativos para que o potencial materno não se esgote em uma única prole, o que justifica a tendência para que genes das fêmeas suprimam o crescimento fetal (MOORE; HAIG, 1991). Distúrbios nesse “desbalanço” da expressão gênica podem causar anomalias, como as Síndromes de Prader Willi e Angelman observadas em humanos (FROST; MOORE, 2010).

A característica *imprinted* é estabelecida durante a gametogênese. Nos primeiros estágios pós-fecundação é “apagada” nas células que originarão os gametas femininos e masculinos, provavelmente durante a onda de desmetilação geral do genoma que ocorre por volta do dia 12 do desenvolvimento embrionário em camundongos (MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008). O restabelecimento do padrão *imprinted* em camundongos ocorre logo em seguida e de acordo com o sexo do indivíduo, tendo início ainda nas células germinativas e se estendendo após o nascimento. Em ovócitos esse processo se inicia nos primórdios da gametogênese e somente se completa no momento próximo à ovulação, a cada ciclo reprodutivo da fêmea. Por outro lado, as espermátides arredondadas – que são células características do início da gametogênese masculina – já possuem o padrão *imprinted* característico dos espermatozoides (MANIPALVIRATN; DECHEMEY; SEGARS, 2008). Durante a onda de desmetilação geral do genoma que ocorre logo após a fecundação do ovócito pelo espermatozoide os genes *imprinted* ficam protegidos de sofrerem o processo de desmetilação. Isso permite a herança transgeracional das características epigenéticas desses genes (MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008).

A expressão dos genes *imprinted* é diferenciada dependendo se o cromossomo for de origem materna ou paterna (FEIL et al., 1994; HALL, 1997; REIK; WALTER, 2001). Ou seja, apenas um alelo está ativo enquanto o outro está quase completamente silenciado, dependendo do sexo do indivíduo (DAELEMANS et al., 2010). Esses “sinais” sexo-específicos são proporcionados principalmente por metilação do DNA em regiões determinadas e estão confinados em pequenas regiões desses genes, denominadas Regiões Diferentemente Metiladas (DMRs) (GEBERT et al.; 2009). Genes *imprinted* raramente são encontrados sozinhos, sendo que cerca de 80% deles estão nos mesmos *clusters* de outros genes *imprinted* (REIK; WALTER, 2001; MANIPALVIRATN; DECHEMEY; SEGARS, 2008), o que permite sua regulação coordenada no domínio cromossomal.

## 2.4 Os Genes IGF2 e IGF2R

O gene do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 2 (IGF2) – ou somatomedina A – está localizado no cromossomo 29 bovino e é constituído de 10 exons na maioria das espécies, inclusive na bovina (GEBERT et al., 2006). Foram encontrados quatro promotores diferentes nesse gene, inclusive em ruminantes, o que permite a produção de isoformas de RNA mensageiro específicas para cada tecido em cada estágio de desenvolvimento do indivíduo (GEBERT et al., 2006).

O gene IGF2 possui ação mitogênica para várias linhagens celulares e é um dos responsáveis pelo crescimento fetal (FROST; MOORE, 2010), além da diferenciação tecidual e desenvolvimento de placenta (GEBERT et al., 2006). Isso justifica o aparecimento de neoplasias em indivíduos nos quais a regulação desse gene ocorre de forma errada (OTTE et al., 1998).

O gene que codifica esse fator é expresso pelo alelo paterno e é o gene *imprinted* mais estudado em diferentes espécies de mamíferos, já que esta parece ser uma característica evolutiva conservada em várias espécies, tais como humanos, camundongos, suínos, ovinos e bovinos (DeCHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991; GEBERT et al., 2006). Em camundongos foram encontradas três DMRs envolvidas na regulação do IGF2, duas das quais são paternalmente metiladas (GEBERT et al., 2006; MURRELL et al., 2001).

Murrell e seus colaboradores (2001) especularam a presença de uma possível DMR intragênica metilada como responsável pelo início da transcrição diferenciada do gene IGF2 em camundongos, o que poderia influenciar a interação entre o promotor desse gene e *enhancers* mais distalmente localizados. Já Gebert e sua equipe (2006), através de análise dos níveis de metilação entre gametas femininos e masculinos, identificaram uma DMR intragênica no exão 10 do gene IGF2 bovino – correspondente à DMR2 em camundongos – que é reprogramada após a fecundação, mas cujo estado hipermetilado é restabelecido durante o desenvolvimento embrionário. Esta DMR é responsável por ativar elementos transpcionais no alelo paterno em camundongos.

O gene que expressa o receptor do gene IGF2 é o IGF2R – que também é um gene *imprinted* –, é maternalmente expresso e possui efeito oposto ao IGF2,

regulando-o negativamente ao se ligar nele, reduzindo sua bioviabilidade e o marcando para a degradação lisossomal (FROST; MOORE, 2010). Sua expressão é controlada por uma ICR (Região Controladora de *Imprinting*) diferencialmente metilada. Esse gene está localizado no cromossomo 9 bovino.

#### 2.4.1 Regulação dos genes IGF2 e H19

O gene H19 transcreve um RNA não-codante de 2,3 kb, importante por suas propriedades antitumorais (IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008). É um gene *imprinted*, sendo maternalmente expresso e dividindo um *cluster* com o IGF2 – está a 90 kb *downstream* do gene IGF2 (OHLSSON; RENKAWITZ; LOBANENKOV, 2001) –, o que possibilita um estreito controle na expressão desses dois genes.

A região *upstream* ao H19 traz consigo uma metilação *imprinted* de origem paterna. Isso permite que a DMR do H19 seja um limite entre a cromatina transcracionalmente fechada quando desmetilada e aberta quando metilada. O fator de repressão CTCF (Fator de Ligação CCCTC), que é uma proteína nuclear, tem a capacidade de se ligar no alelo materno desmetilado, mas não no paterno metilado, funcionando como um insulador que bloqueia a atividade proximal do promotor do IGF2 ao impedir a atuação de *enhancers* localizados *downstream* a H19 (IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008; PARADOWSKA et al, 2009).

No alelo materno desmetilado a ligação do CTCF ocorre de forma a prevenir o acesso do IGF2 a seu *enhancer*, resultando no seu silenciamento e promovendo a transcrição de H19. Já o alelo paterno traz consigo a ICR metilada, o que impede a ligação do CTCF, possibilitando o recrutamento de *enhancers* e fatores de transcrição para o promotor do IGF2 e, consequente, sua expressão. Já o gene H19 fica transcracionalmente inativo, provavelmente devido ao “espalhamento” de metilação durante o desenvolvimento, o que parece estar envolvido com a ligação de proteínas ligantes de CpG metiladas e desacetilação de histonas. Isso previne a interação desse complexo com o promotor do H19 e, consequentemente, a ativação de IGF2. (SASAKI; ISHIHARA; KATO, 2000; CHAO; D'AMORE, 2008;

IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008; PARADOWSKA et al, 2009). A interação entre os genes IGF2 e H19 e a expressão alelo-específica de ambos está esquematizada na Figura 1.

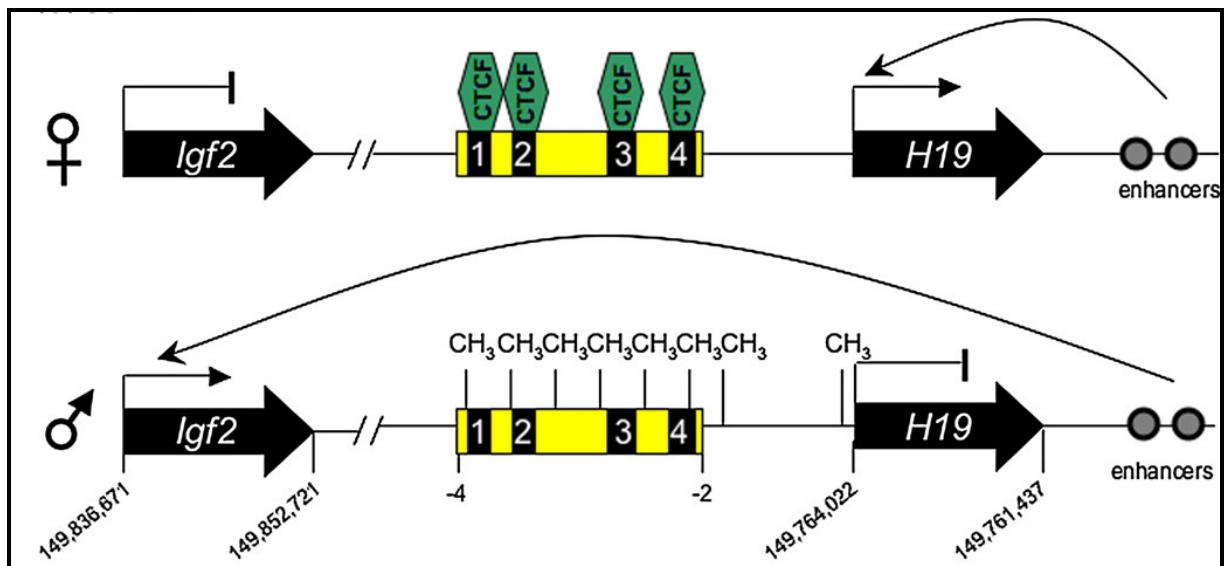


Figura 1. Esquema representando a regulação da expressão *imprinted* do locus IGF2/H19 em camundongos, tanto no alelo materno (♀) quanto no alelo paterno (♂). (IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008).

Outro modelo foi proposto para explicar a estreita regulação epigenética dos genes IGF2 e H19, tanto nas DMRs e nos fatores protéicos que se ligam a elas. No cromossomo paterno a DMR do H19 – que está metilada –, associa-se com a DMR2 metilada do IGF2, enquanto no materno o CTCF se associa com elementos silenciadores desmetilados na DMR1 do gene IGF2. A interação entre a DMR1 do IGF2 e a DMR do H19 no alelo materno estabelece dois domínios da cromatina: H19 em um estado ativo e IGF2 em um estado inativo. Já no alelo paterno a DMR de H19 interage com a DMR2, levando o gene IGF2 para um estado de cromatina ativa. Como ambas as DMR estão metiladas, não há ligação de CTCF e outros fatores. Este modelo de cromatina em *loop* é consistente com resultados obtidos em experimentos anteriores, sendo interessante para determinar outros genes *imprinted* e/ou outros genes com regulação epigenética localizados em *clusters* e com comportamento epigenético de silenciamento similar ao modelo IGF2/H19 (MURRELL; HEESON; REIK, 2004). A Figura 2 mostra o modelo em *loop* para explicar o padrão alelo-específico dos genes IGF2/H19.

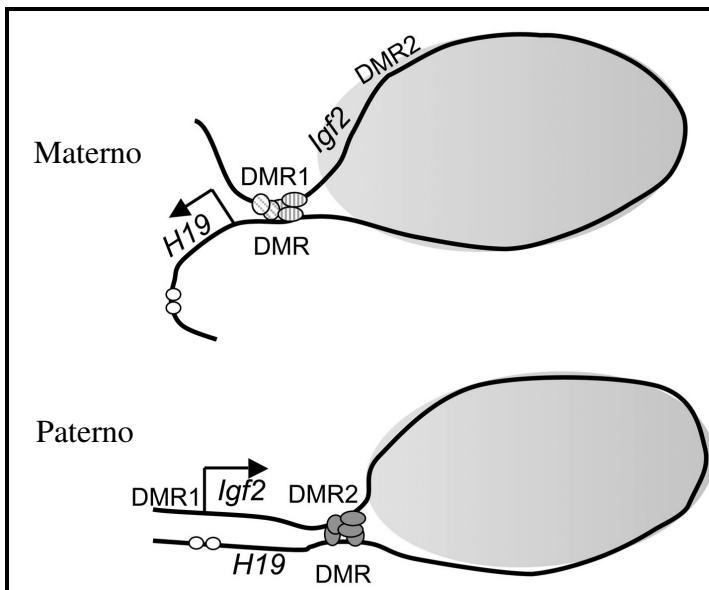


Figura 2. Esquema ilustrando a interação entre as DMRs a qual controla a regulação da expressão dos genes IGF2 e H19 em camundongos. No alelo materno a DMR desmetilada do H19 liga-se aos fatores CTCF que interagem com a DMR1 do IGF2, o que possibilita a ativação do H19 pelo *enhancer*. Já no alelo paterno a DMR do H19 está metilada e associa-se com a DMR2 metilada do IGF2, movendo-o para o domínio de cromatina ativa, com o *enhancer* induzindo sua expressão. (MURRELL; HEESON; REIK, 2004).

## 2.5 A Inativação do Cromossomo X e o Gene XIST

No início da diferenciação dos cromossomos autossomos em cromossomos sexuais a maioria dos genes estava presentes tanto no cromossomo X quanto no cromossomo Y; assim, era quase inexistente a diferença entre os produtos desses dois cromossomos no sexo feminino e masculino (GRIBNAU; GROOTEGOED, 2012). Pelo fato do cromossomo Y nunca sofrer recombinação, houve uma gradual “degradação” do mesmo, o que favoreceu o aumento de regiões presentes apenas no cromossomo X e, consequentemente, maior tendência em expressar os produtos em indivíduos do sexo feminino do que masculino (GRIBNAU; GROOTEGOED, 2012; PESSIA et al., 2012). A fim de compensar esse imbalanço entre os sexos homo e heterogamético, a evolução lançou mão da Inativação do Cromossomo X (ICX) no decorrer do período de desenvolvimento da fêmea, processo no qual um dos cromossomos sexuais femininos é epigeneticamente silenciado (LYON, 1961; AUGUI; NORA; HEARD, 2011; TEKLEMBURG et al., 2012).

O processo de inativação de um dos cromossomos X inicia-se em uma região conhecida como Centro de Inativação de X (XIC), a qual produz o Transcrito Específico de Inativação de X (XIST). O XIST em camundongos é também *imprinted*. Ele está presente no cromossomo X e é responsável pela inativação do mesmo (MOHANDAS; SPARKES; SHAPIRO, 1981; HALL, 1991; JOHN; SURANI, 1996; SIMON et al., 1999; WIJCHERS; FESTENSTEIN, 2011). Embora não seja um RNA codificante, é um elemento chave para o processo de ICX ao atuar em *cis*, sendo expresso somente no cromossomo X inativo das células somáticas (DUTHIE et al., 1999; AUGUI; NORA; HEARD, 2011). Elementos Controladores de X (XCE) parecem exercer influência sobre o processo de escolha aleatória de inativação de X, sendo uma região que inclui XIST (GRIBNAU; GROOTEGOED, 2012).

Um transcrito de comprimento de 17 kb não-codante é produzido pelo gene que codifica XIST, o qual é sujeito a *splicing* e poliadenilação. Sua estrutura é relativamente conservada entre os mamíferos eutérios, embora sua sequência de nucleotídeos possa ser divergente entre as espécies (HOKI et al., 2009).

O XIC também produz um RNA antisense não-codificante de XIST, o TSIX, que possui um padrão de expressão antagonista à XIST; ou seja, TSIX é expresso no cromossomo X ativo (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999). A regulação desse gene é feita por Elementos Transcpcionais Intergênicos de Inativação de X (XITE). Dessa forma, muitas, senão todas as vias regulatórias de iniciação da ICX são mediadas por um estreito controle dos padrões de expressão de XIST/TSIX (NAVARRO; AVNER, 2010). Ogawa, Sun e Lee (2008) mostraram, inclusive, a possibilidade da formação de um RNA fita dupla com os transcritos de XIST e TSIX, o qual funcionaria como um RNA de interferência ao ser clivado por uma enzima Dicer.

O processo de ICX em camundongos parece estar bem estabelecido, conforme revisão de Lee (2011) e Payer, Lee e Namekawa (2011). A inativação *imprinted* de X ocorre primeiramente em embriões em estágios bem precoces de desenvolvimento. No estágio de duas células, o X paterno (Xp) é preferencialmente inativado, já que ele possui uma “marca” de supressão transcacial derivada do processo de Inativação Cromossômica Sexual Meiótica (MSCI) ocorrido durante a espermatogênese. Desse modo, até o estágio de blastocisto, todas as células dos

embriões possuem o Xp silenciado. No período de peri-implantação há uma divergência no processo de ICX nos diferentes tecidos embrionários. Nas células do trofoblasto o padrão de inativação do Xp é mantido. Já no botão embrionário ocorre a reativação de Xp e posterior inativação aleatória de uma dos cromossomos X (LEE, 2011; PAYER; LEE; NAMEKAWA, 2011).

O botão embrionário é a origem das células germinativas primordiais (CGP) e é durante a formação e o crescimento do ovócito que ocorre o segundo ciclo de reativação do cromossomo X. Dessa forma, nas CGP ambos os cromossomos X permanecem ativos e adquirem um sinal *imprinted*, o que possibilita que esse cromossomo – o futuro X de origem materna (Xm) – resista à ICX na próxima geração (LEE, 2011).

Mesmo passados mais de 50 anos das primeiras especulações acerca do processo de inativação do cromossomo X promovidas por Lyon (1961), ainda existem muitas contradições em relação aos mecanismos envolvidos e ao período de desenvolvimento no qual ocorre a ICX. Além disso, parece haver diferenças significativas entre as espécies, o que motiva estudos que tendem a transpor o conhecimento obtido até então na espécie murina. Basu e Zhang (2011) revisaram os quatro principais aspectos que atraem a atenção de cientistas sobre a ICX: (1) mecanismos epigenéticos pelos quais um cromossomo X é inativado e o outro permanece ativo, mesmo ambos tendo a mesma sequência de DNA; (2) momento no qual ocorre o evento de ICX no decorrer da embriogênese; (3) ICX como um promissor marcador de pluripotência celular; (4) ICX como foco de estudos acerca da evolução dos mamíferos.

Diversos fatores estão envolvidos no processo de inativação do cromossomo X e no seu posterior *status* inativado durante a vida das fêmeas, conforme revisado por Augui, Nora e Heard (2011) e Jeon, Sarma e Lee (2012). Em células-tronco indiferenciadas fatores de pluripotência, como OCT4 e NANOG bloqueiam a expressão de XIST e de seu ativador *Ring Finger Protein 12* (*Rnf12*), ativando a expressão de TSIX em *cis*. Com o início da diferenciação celular e o pareamento dos cromossomos X, uma cascata de eventos tem início. A interação entre OCT4 e um insulador CTCF resulta em uma distribuição de fatores de transcrição nos dois X, possibilitando simultaneamente a ativação de XIST no futuro Xi e a repressão de

TSIX no mesmo cromossomo. TSIX recruta a DNA metiltransferase DNMT3a, a qual é responsável por metilar o promotor do XIST no futuro Xa, não ocorrendo, portanto, a cascata de eventos descrita anteriormente e mantendo o padrão ativo desse cromossomo X (AUGUI; NORA; HEARD, 2011; JEON; SARMA; LEE, 2012).

A partir de então é expresso o RNA *RepA*, um transcrito da região *Repeat A* que se localiza na região 5' de XIST. Esse transcrito é conservado entre todas as espécies placentárias e é essencial para o início do processo de silenciamento de X ao permitir a funcionalidade do RNA XIST (DUSZCZYK et al., 2011). *RepA* recruta o fator PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) para o futuro Xi, regulando *Jpx* e *Rnf12*, ambos promovendo a expressão de XIST, o qual recruta o fator PRC2 para o Xi. Em seguida, o fator de transcrição YY1 (Ying Yang 1) proporciona a expressão de XIST em todo Xi. Finalmente, XIST recruta vários fatores de silenciamento – como a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3), a incorporação da variante de histona Macro H2A e a metilação do DNA – para manter o cromossomo X em um estado inativo (JEON; SARMA; LEE, 2012).

O caráter *imprinted* do gene XIST em camundongos (ZUCCOTTI; MONK, 1995) não é conservado nas diferentes espécies de mamíferos placentário, sendo essa característica ausente no gene XIST de humanos e coelhos (OKAMOTO et al., 2011). Azevedo (2012) mostrou que esse gene parece ter um caráter não *imprinted* em bovinos, já que fibroblastos de pele apresentaram um padrão de metilação de  $87,58 \pm 1,17\%$ , diferente do esperado para um gene com padrão *imprinted* – 50% (REIK; WALTER, 2001).

## 2.6 A Reprogramação Epigenética na ovogênese

Durante a gametogênese feminina ocorrem modificações epigenéticas e transcricionais únicas, tanto na migração e diferenciação das CGP quanto nas ovogônias e em ovócitos primários estacionados em mitose e/ou meiose (PAN et al, 2012). Ocorre uma extensa reprogramação epigenética quando as CGP de mamíferos colonizam as gônadas, sendo que o padrão de metilação é apagado tanto nos genes *imprinted* quanto nos não-*imprinted* (HAJKOVA, 2002; PETKOV;

REH; ANDERSON, 2009). O momento em que os genes *imprinted* são “desligados” nas CGP é crucial, porque assegura que células germinativas masculinas e femininas alcancem um estado epigenético equivalente antes da diferenciação em células germinativas masculinas e femininas, estado semelhante a uma célula totipotente. O *imprinting* genômico é subsequentemente restabelecido de uma maneira gradativa e sexo-específica (PAN et al., 2012). Quando as CGP se diferenciam em ovogônias, o padrão de metilação continua baixo, e assim permanecem quando o gameta entra em meiose e na sua transição para folículo primordial (LUCIFERO et al., 2004; PAN et al., 2012). Embora esse seja o padrão de metilação global esperado para essa fase, estudos mais recentes mostraram que existem genes que perdem o padrão de metilação em estágios mais tardios nas CGP, bem como outros que são protegidos de sofrerem desmetilação durante a gametogênese, permanecendo metilados durante todas as fases, incluindo em ovócitos maturados e espermatozoides (SEISENBERGER et al., 2012).

Durante o crescimento folicular ocorrem modificações epigenéticas necessárias para o crescimento e desenvolvimento normais do ovócito. A metilação dos genes *imprinted* em ovócitos é estabelecida entre o 10º e o 15º dias pós-parto em camundongos (LUCIFERO et al., 2007). Em camundongos a remetilação do DNA tem início no estágio de folículo secundário e apenas se completa no estágio de folículo antral, quando alcançam o estágio de vesícula germinativa (OBATA; KONO, 2002; KAGEYAMA et al., 2007). Fagundes e colaboradores (2011) mostraram que no caso da espécie bovina ocorre reprogramação epigenética na fase antral do folículo, no processo de maturação de ovócitos de folículos competentes.

A acetilação de histonas é outra importante modificação epigenética que ocorre em ovócitos. Kageyama et al. (2007) relataram que nos resíduos de H3K9, H3K18, H4K5 e H4K12 a acetilação está em níveis baixos em ovócitos de camundongos de 5 dias de idade, aumentando progressivamente em animais de 10 e 15 dias e em ovócitos no estágio de vesícula germinativa tardio. Além disso, Akiyama, Nagata e Aoki (2006) demonstraram o envolvimento de desacetilação de histonas no período final da ovogênese. Ovócitos em estágio de vesícula

germinativa cultivados na presença de tricostatina A – um conhecido inibidor de HDACs – apresentaram meiose anormal e morte embrionária.

As metilações em histonas também foram estudadas na gametogênese feminina. Ovócitos de folículos primários até o estágio antral mostraram-se positivos para mono, di e trimetilação de H3K4, padrão o qual é alterado durante o desenvolvimento ovocitário (SENEDA et al., 2008). Além disso, ocorrem importantes eventos de metilação de histonas durante o período de maturação meiótica em ovócitos bovinos – como H3K9me2, relacionada com o silenciamento de genes, com possível relação com a competência do gameta feminino (RACEDO et al., 2009).

Outras alterações epigenéticas a nível de histonas já foram relatadas no decorrer da ovogênese. A fosforilação da H3 – incluindo pH3/ser10 e pH3/ser28 – parece estar relacionada com o início da condensação da cromatina durante a maturação ovocitária (BUI et al., 2007). Já a ubiquitinação da histona H2A pode estar relacionada com o *imprinting* carregado pelo cromossomo X paterno em fêmeas murinas, que é relacionado com a inativação preferencial do Xp em embriões antes da inativação aleatória do cromossomo X (BAARENDS et al., 2005).

### **3. OBJETIVO**

O objetivo do trabalho foi determinar o padrão de metilação em duas regiões diferencialmente metiladas (DMR) envolvidas no controle da expressão dos genes XIST e IGF2 em ovócitos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, Distrito Federal.

### 4.1 Isolamento dos ovócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais

Os ovócitos foram obtidos a partir de ovários de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) provenientes de abatedouros da região de Luziânia-GO. Os ovários foram coletados e, imediatamente após o abate, encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia em frascos contendo solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Sto Louis MO, USA) a uma temperatura entre 35 e 37ºC.

A metodologia de obtenção dos folículos e recuperação dos ovócitos dos folículos pré-antrais e antrais foi realizada de acordo com LUCCI et al. (2002), adaptado por BESSA (2011). Foram utilizados aproximadamente quatro ovários por manipulação, os quais foram mantidos em solução salina e em placa aquecedora à temperatura constante de 37ºC.

O córtex ovariano foi separado da medula com o auxílio de uma lâmina de bisturi e em seguida foi submetido a cortes longitudinais, transversais e oblíquos no *Tissue Chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, Gomshall, Surrey, England). Realizou-se cortes de 150, 200, 250, 300 e 350 µm, sendo que durante todo o processo o material foi hidratado com PBS (*Phosphate buffered saline*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Figuras 3, 4 e 5).

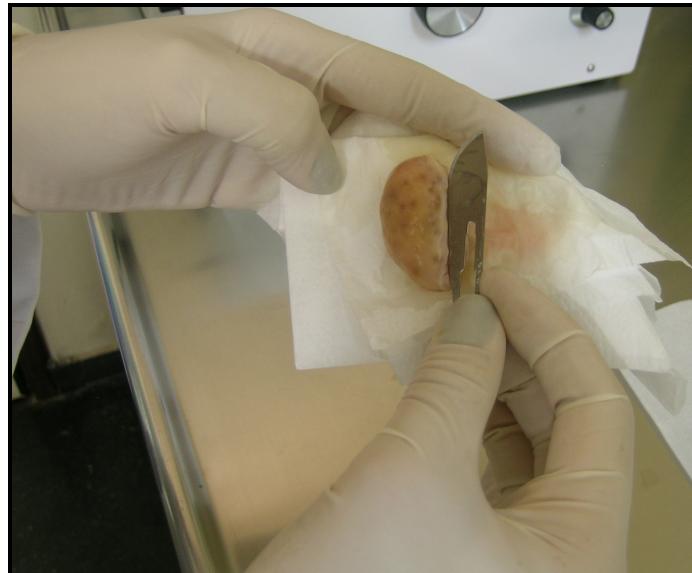


Figura 3. Separação do córtex da medula ovariana com o auxílio de um bisturi.

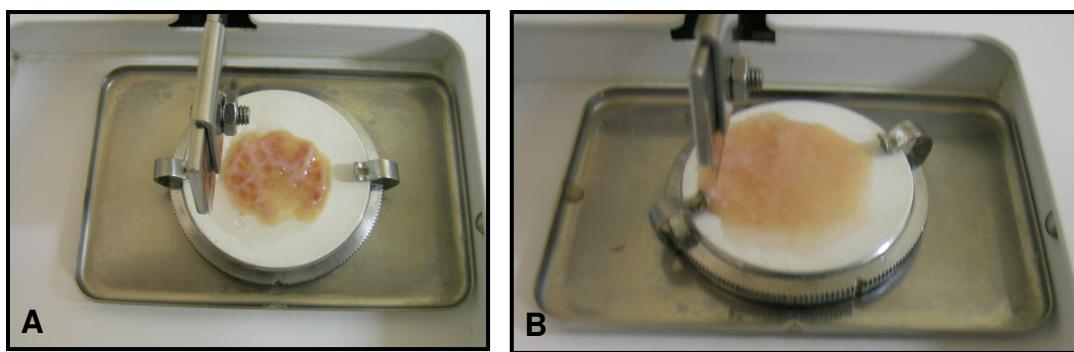


Figura 4. Fragmentação do córtex ovariano no *Tissue Chopper*. (A) Fragmento ovariano intacto para ser submetido aos cortes no *Tissue Chopper*. (B) Fragmento ovariano após os cortes no *Tissue Chopper*. Durante todo o procedimento os fragmentos ovarianos foram hidratados com PBS acrescido de SFB.

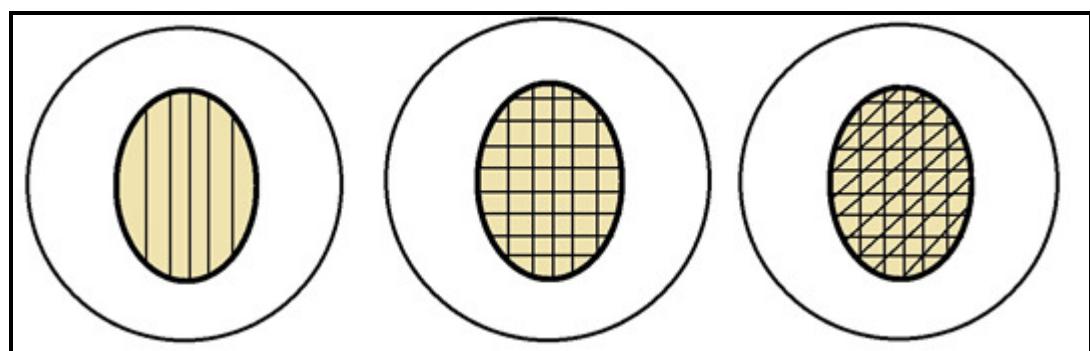


Figura 5. Esquema ilustrando as posições dos cortes do córtex ovariano no *Tissue Chopper*: longitudinal, transversal e oblíquo. Foram realizados cortes de 150 a 350  $\mu\text{m}$ .

Os fragmentos obtidos desse processo foram depositados em um tubo de 50 mL contendo aproximadamente 5 mL de PBS com 10 % de SFB. A dissociação mecânica dos ovócitos foi realizada através de sucessivas suspensões utilizando uma pipeta Pasteur de 3 mL. O material foi suspenso cerca de 10 a 40 vezes e filtrado em malha de nylon de 500 e 245  $\mu\text{m}$  para a recuperação de ovócitos maiores e menores, respectivamente. O tubo contendo os ovócitos foi deixado em repouso por no mínimo 10 minutos para a decantação dos mesmos. Amostras de 1 mL do *pellet* foram analisadas separadamente através de um microscópio invertido (Axiovert 135 M, Zeizz, Germany; Figuras 6, 7 e 8).



Figura 6. Dissociação mecânica dos ovócitos inclusos em folículos pré-antrais e antrais utilizando uma pipeta Pasteur de 3 mL. Foram feitas de 10 a 40 suspensões.

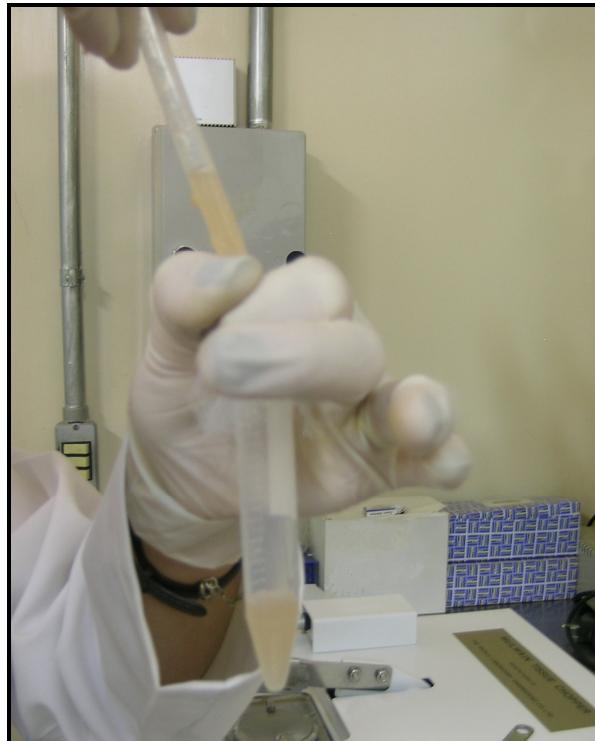


Figura 7. Fragmentos ovarianos sendo filtrados utilizando malha de nylon de 245  $\mu\text{m}$ .

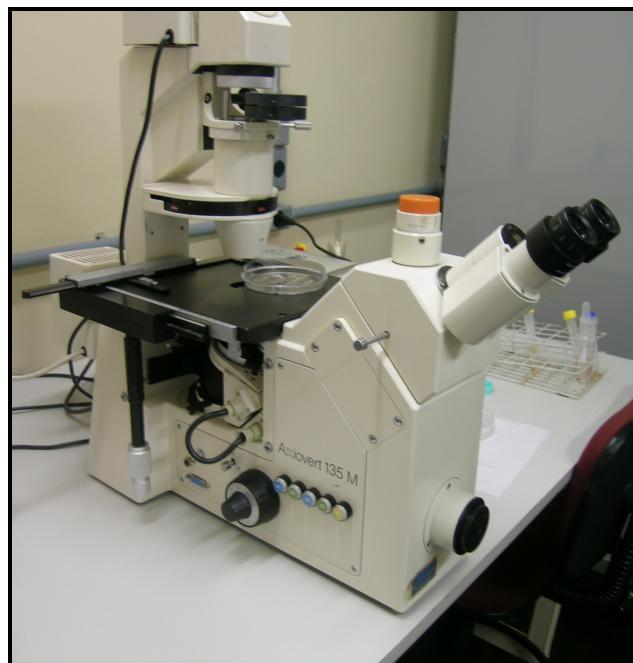


Figura 8. Microscópio invertido utilizado para a recuperação dos ovócitos.

#### 4.2 Recuperação e classificação dos ovócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais

Ovócitos com aparência normal, citoplasma homogêneo e livres de células da granulosa foram transferidos para uma gota de 10 µL de TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram feitas várias lavagens dos ovócitos para a retirada de células da granulosa e impurezas. Os ovócitos isolados foram fotografados e mensurados utilizando o programa Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China). A medida do diâmetro foi realizada excluindo a zona pelúcida. A classificação dos ovócitos nas diferentes categorias de folículos pré-antrais e antrais foi feita conforme tabela 2.

Tabela 2. Relação do diâmetro do ovócito e a categoria do folículo de origem (BESSA, 2011).

Diâmetro do ovócito	Categoria do folículo
Menor que 20 µm	Folículo Primordial
Entre 65 e 85 µm	Folículo Secundário Final
Entre 100 e 120 µm	Folículo antral de 1 a 3 mm (Incompetente)
Maior que 128 µm	Folículo antral maior que 6 mm (Competente)

Foram realizados 4 banhos em PBS sem cálcio e magnésio nos ovócitos das diferentes categorias, sendo em seguida transferidos para um tubo de 0,2 ml. O tempo total de recuperação e classificação dos ovócitos em cada manipulação não excedeu a 3 horas. Os tubos contendo os ovócitos foram então congelados em freezer a -80°C, onde foram estocados até a análise.

#### 4.3 Extração do DNA Genômico por lise celular

Para a quantificação do padrão de metilação foram utilizados 140 ovócitos para cada tratamento experimental (tratamentos: folículo primordial; folículo secundário final; folículo de 1 a 3 mm; folículo maior que 6 mm) divididos em duas

réplicas (*pools* de 70 ovócitos cada). Para a extração do DNA os ovócitos referentes a cada grupo foram colocados em PBS juntamente com a enzima pronase E (Sigma, Sto Louis MO, USA) para promover a digestão da zona pelúcida, em uma concentração de 10 mg/mL, seguido por incubações sucessivas em termociclador (PXE 0.5 Thermal Cycler, Electron Corporation, Asheville, NC, USA) a 37ºC por 35 minutos e a 85ºC por 15 minutos para inativação da enzima. O DNA foi extraído através de choque térmico, em que as amostras com ovócitos congelados em nitrogênio líquido foram imediatamente colocadas em termociclador a 95ºC por 1 minuto. Esse processo foi repetido por 5 vezes. O material resultante foi armazenado em *freezer* a -20ºC.

#### **4.4 Tratamento com bissulfito de sódio**

Para o tratamento com bissulfito de sódio utilizou-se o kit EZ DNA Methylation Kit® (Zymo Research, Irvine, CA, USA) conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, a técnica possibilita a conversão de citosinas não-metiladas em uracilas mediada por bissulfito de sódio. O DNA tratado foi armazenado em *freezer* a -80ºC para posterior amplificação.

#### **4.5 Amplificação do DNA**

As amostras tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas à *Nested PCR* utilizando o termociclador PXE 0.5 Thermal Cycler (Electron Corporation, Asheville, CA, USA). Foram realizadas reações para os genes XIST e IGF2. As sequências dos iniciadores utilizados nas reações, acesso ao *GenBank*, localização, posição na ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação do Gene, sequências dos iniciadores, acesso no *GenBank*, localização, posição na ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência de iniciadores (5'→3')	Acesso no <i>GenBank</i>	Localização dos iniciadores	Posição da ilha CpG	Tamanho do amplicon
XIST* externo	F: GGGTGTTTTGTTTAGTGTAGTA R: CTTTAATACCACCCACTAAAATTAATAC	AJ421481.1	1127-1252 1581-1608	Éxon 1	482 pb
XIST* interno	F: TTGTTATATAGTAAAAGATGGT R: ACCAACCTAACTAACTAAATA	AJ421481.1	1169-1190 1552-1573	Éxon 1	405 pb
IGF2** externo	F: TGGGTAAGTTTTTAATATGATATT R: TTTAAAACCAATTAATTTATACATT	X53553.1	243-268 672-697	Último éxon	455 pb
IGF2** interno	F: TAATATGATATTGGAAGTAGT R: ACATTTTAAAAATATTATTCT	X53553.1	257-278 655-676	Último éxon	420 pb

\*Liu et al., 2008; \*\*Gebert et al., 2006

Ambas as reações para o gene XIST foram conduzidas utilizando solução tampão 1 X; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 0,4 mM; 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); e 1 μM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20 μL com água deionizada. Já as reações para o gene IGF2 foram conduzidas utilizando solução tampão 1 X; MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM; dNTP 0,4 mM; 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); e 1 μM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20 μL com água. Foram realizadas 4 replicatas para cada reação a fim de aumentar a quantidade de *amplicons* para posterior purificação. O volume de DNA utilizado e as condições de cada uma das reações estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Condições de *Nested PCR* para os genes XIST e IGF2.

Gene	Reação	Volume de DNA	Desnaturação Inicial	Ciclos (40 para XIST e 45 para IGF2)			Extensão Final
				Desnaturação	Anelamento	Extensão	
XIST	1 <sup>a</sup> reação	3,0 µL	94 °C 7 min.	94 °C 45 s.	47 °C 1min. e 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 15 min.
	2 <sup>a</sup> reação	0,5 µL da primeira reação	94 °C 4 min.	94 °C 40 s.	42 °C 45 s.	72 °C 45 s.	72 °C 15 min.
IGF2	1 <sup>a</sup> reação	3,0 µL	94 °C 3 min.	94 °C 40 s.	45 °C 1min.	72 °C 1 min.	72 °C 15 min.
	2 <sup>a</sup> reação	0,5 µL da primeira reação	94 °C 3 min.	94 °C 40 s.	40 °C 1min.	72 °C 1 min.	72 °C 15 min.

Os *amplicons* foram submetidos à eletroforese a corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) em meio TBE 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel foi fotografado em um fotodocumentador Image Capture 300<sup>®</sup> (GE). Os produtos do PCR foram recortados do gel e purificados utilizando o *kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. Em seguida as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

#### 4.6 Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial

Após purificação e quantificação em espectrofotômetro, os *amplicons* de cada grupo foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fabricantes. A transformação foi realizada em células DH5 $\alpha$  por choque térmico e o produto foi espalhado em placas de petri 90 x 15 mm contendo ágar com ampicilina 100 µg/mL, 40 µL de X-Gal (Sigma) a 20 mg/mL e 4 µL de IPTG

0,1 M (Sigma), seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37ºC por 14 horas e a 4ºC por duas horas.

Colônias brancas foram selecionadas para serem cultivas em meio Luria-Bertani (LB) líquido acrescido de ampicilina 100 µg/mL. Foi utilizado um palito de madeira estéril para a retirada da colônia da placa de cultivo e sua deposição no tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio LB. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37ºC por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA).

Metade do conteúdo dos tubos foi utilizada para a extração do plasmídeo, segundo o protocolo de mini-preparação de plasmídeo (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), com modificações. As células foram centrifugadas e lavadas em PBS pH 7,4. Em seguida foram tratadas com uma solução contendo Tris 25 mM e EDTA 10 mM, acrescida de RNase em uma concentração final de 10 µg/mL por amostra. A lise celular foi realizada com detergente em meio alcalino (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e o DNA foi precipitado com acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M. As amostras foram incubadas por pelo menos 2 horas em *freezer* a -20ºC com isopropanol 100% e tratadas com cloreto de lítio 500 mM. O DNA foi tratado sucessivamente com etanol 100% e 70% para purificação. Os *pellets* secos foram eluídos em 20 µL de água deionizada e quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

#### **4.7 Sequenciamento do DNA e análise das sequências**

As amostras de plasmídeo contendo o DNA de interesse foram diluídas em água deionizada para uma concentração de 100 ng/µL e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL para verificação da presença dos fragmentos amplificados e da qualidade das mesmas. 300 ng das amostras de plasmídeo contendo o DNA de interesse foram enviadas para o sequenciamento de DNA utilizando metodologia de dideoxi com o iniciador universal T7.

A qualidade do sequenciamento foi analisada utilizando o programa Chromas®. Para a quantificação do padrão de metilação das CpG utilizou-se o

programa BiQ Analyser<sup>®</sup>, comparando as sequências obtidas com a depositada no *GenBank*, tanto para o gene XIST (AJ421481.1) quanto para o gene IGF2 (X53553.1).

No presente estudo considerou-se apenas sequências que apresentaram no mínimo 90% de conversão pelo bissulfito de sódio – quando se observou a taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina – e sequências com o mínimo de 90% de homologia – quando comparadas com a sequência depositada no *GenBank*.

#### **4.8 Análises estatísticas**

Os dados de quantificação do padrão de metilação foram comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* ou *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Systat*, versão 10.2 (Inc., Richmond, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

Os ovócitos coletados, fotografados e mensurados utilizando o programa Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China) estão representados na figura 9.

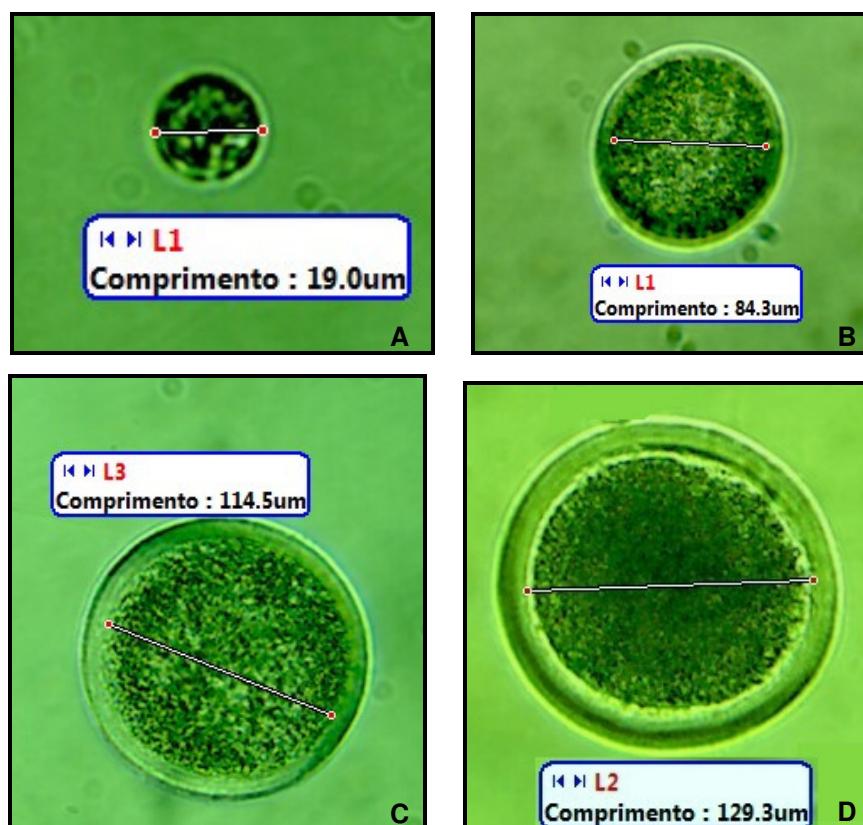


Figura 9. Exemplos de ovócitos de folículos primordiais (**A**), secundário final (**B**), antral incompetente (1 a 3 mm; **C**) e antral competente (maiores que 6 mm; **D**). O comprimento exibido nas imagens refere-se ao diâmetro dos ovócitos.

O número total de ovócitos utilizados, as médias e desvios-padrões dos diâmetros e a amplitude dos diâmetros dos ovócitos dos diferentes grupos de folículos (somando-se as duas réplicas) estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Classificação dos folículos, número total de ovócitos utilizados para a extração do DNA, diâmetro dos ovócitos (média ± desvio padrão) e amplitude dos diâmetros dos ovócitos.

Categoria de Folículo	Número total de ovócitos	Diâmetros dos ovócitos [Média ± Desvio Padrão (μm)]	Amplitude dos diâmetros dos ovócitos (μm)
<b>Primordial</b>	140	16,96 ± 2,2	14,0 – 19,6
<b>Secundário Final</b>	140	76,20 ± 6,5	66,2 – 85,0
<b>Antral Incompetente</b>	140	108,61 ± 6,9	100,2 – 120,0
<b>Antral Competente</b>	140	131,34 ± 3,3	128,0 – 140,5

Após a extração do DNA genômico e tratamento com bissulfito de sódio foram realizadas amplificações em PCR para os genes XIST e IGF2. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo. Antes das bandas serem cortadas para posterior purificação os genes foram fotodocumentados, conforme exemplos das figuras 10 e 11.

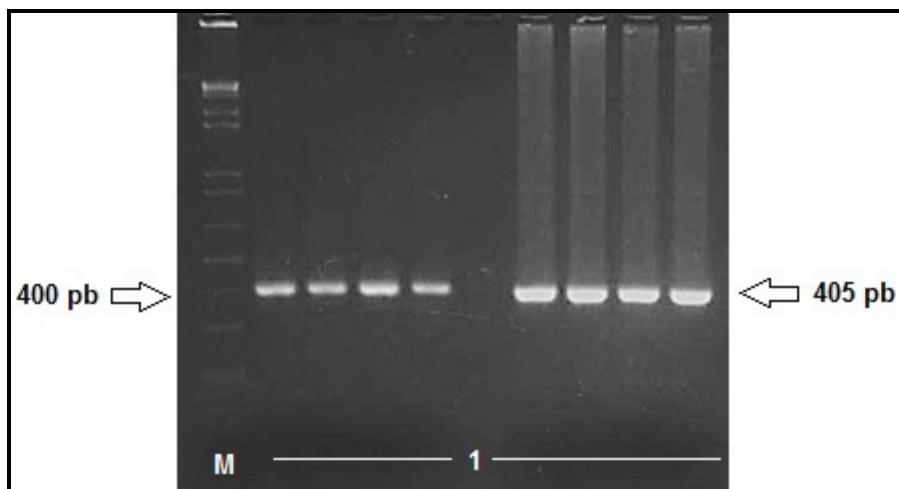


Figura 10. Amplificação do gene XIST submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. **M**: Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®). **1**: Fragmento de 405 pb referente ao gene XIST.

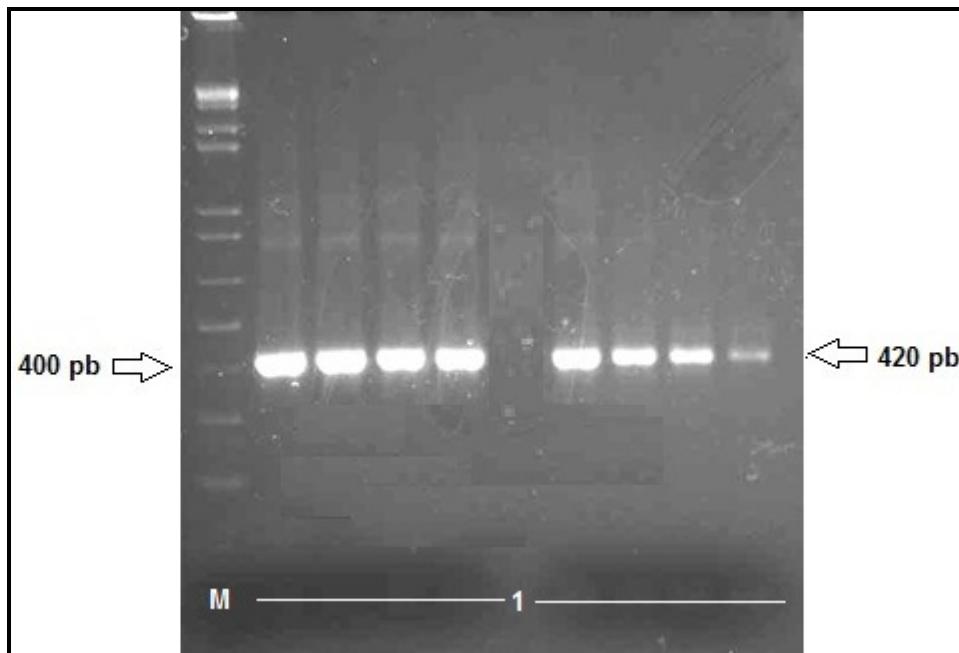


Figura 11. Amplificação do gene IGF2 submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. **M**: Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen<sup>®</sup>). **1**: Fragmento de 420 pb referente ao gene IGF2.

Após a purificação das bandas do gel de agarose o DNA foi clonado em bactérias DH5 $\alpha$ , tendo seu plasmídeo extraído e sequenciado em seguida. Para a visualização da quantidade de plasmídeo extraído foi feita eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL, conforme modelo representado na figura 12.

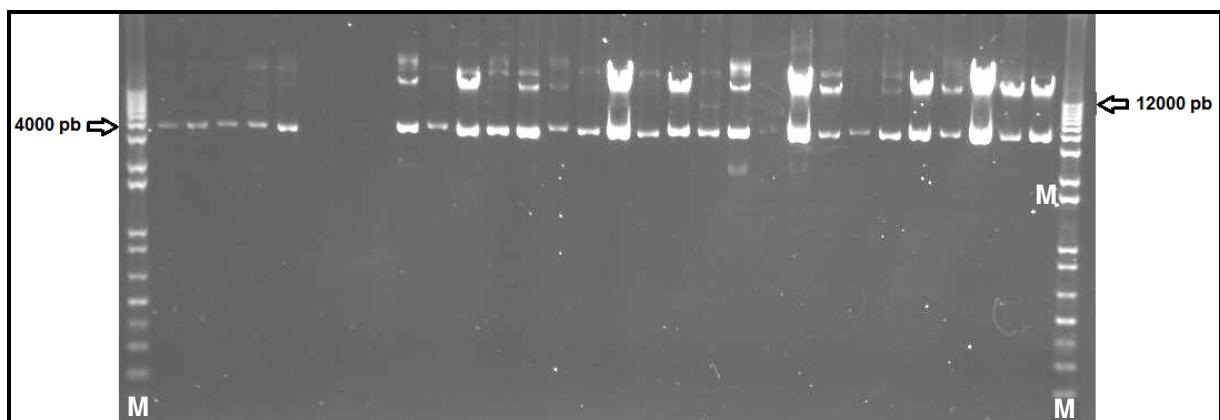


Figura 12. Produtos de mini-preparação de plasmídeo. Foram aplicados 300  $\mu$ g de DNA plasmidial de cada amostra em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotodocumentado e apenas amostras apresentando boa qualidade foram enviadas para sequenciamento. **M**: Marcador de peso molecular de 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen<sup>®</sup>).

As sequências analisadas no programa BiQ Analyzer e que tiveram boas taxas de identidade e conversão pelo bissulfito de sódio (> 90%) foram consideradas para as análises. Exemplos de alinhamentos para o gene XIST e para o gene IGF2 estão representados na figura 13A e 13B, respectivamente.

Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	----- GGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTGCCCTTGTATATAGTAAAAGATGGTC	C
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	GTTTAAGTATTGTCTAGTTAAAATATGCCGGTTTGTGTTCTGTGTTATTGTT GTTTAAGTATTGTCTAGTTAAAATATGCCGGTTTGTGTTCTGTGTTATTGTT	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	TTGATAGGTTTGTAGGGATAATATGGTGATTTGTTATGTGGATATTATGGTAGT TTGATAGGTTTGTAGGGATAATATGGTGATTTGTTATGTGGATATTATGGTAGT	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	TTGTTACGTGGATATCGTGGTAGGGTGTGATCGTTATATTTGCCGGTTTGTAT TTGTTACGTGGATATCGTGGTAGGGTGTGATCGTTATATTTGCCGGTTTGTAT	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	TAGGAGGGTTGTCTGATTGTTAAAGATGGCGTGTGTTGTCGCGGATAAAAGTGAAAGGAG TAGGAGGGTTGTCTGATTGTTAAAGATGGCGTGTGTTGTCGCGGATAAAAGTGAAAGGAG	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	GGATTGGTAATGTTAGATTGTCTCGCTGTTTATTAATTAGAAAGGGTGGTAGAACCGT GGATTGGTAATGTTAGATTGTCTCGCTGTTTATTAATTAGAAAGGGTGGTAGAACCGT	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	TATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAGTTAGTATAGTATTTCGTTATCGTTT TATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAGTTAGTATAGTATTTCGTTATCGTTT	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	----- TATTTAGTTAGTTAGGATTGGTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTG	
Genomic_Sequence [2]_AC15_C07_03	----- GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTAGTATTCTATAGTGTCAACCI	A
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	----- TCAAGCTATGCATCAAGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCAGTGTG	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	----- CTGGAATTGCCCTTAAATATGATATTGGAAGTAGTTTATTTAGTGTGTTAGGGT	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	TTGTTCGTTTTTGCGAGTACGTGGGGTCTACGTTCTTAAGGAGTTGGAGGTTTT TTGTTTGTGTTTTTGAGTATGTTGGGGTTGTATGTTGTTAAGGAGTTGGAGGTTTT	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	AGAGAGGTTAAGAGTTACGTTCTTGATCGTTTGTATTAGGATTGGTTATTAC AGAGAGGTTAAGAGTTACGTTCTTGATCGTTTGTATTAGGATTGGTTATTAC	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	GGGGGCGTTTTTAAGGTATTAGCGATTAGAAGTGAAGTTAAAGTGTCTGAATTGTT GGGGGCGTTTTTAAGGTATTAGCGATTAGAAGTGAAGTTAAAGTGTCTGAATTGTT	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	TAAGTGGTATTATTATTCGCGTCGATTTTGATCGGGATCGTTTATTAGGTTTT TAAGTGGTATTATTATTCGCGTCGATTTTGATCGGGATCGTTTATTAGGTTTT	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	TTTGAATTTGTATCGTTTGTGCGGGTTTTGTTCGGTTTTGTGTTTAAT TTTGAATTTGTATCGTTTGTGCGGGTTTTGTTCGGTTTTGTGTTTAAT	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	TTTTTACGTTAGGCCAATTTTTCGGTTTTTATTGGTTGAGGGGATT----- TTTTTACGTTAGGCCAATTTTTCGGTTTTTATTGGTTGAGGGGATTAGAATAA	
Genomic_Sequence [2]_AI173_E11_05	----- TATTTTAAAGTAAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG	B

Figura 13. Exemplos de alinhamentos realizados no programa BiQ Analyzer entre as sequências depositadas no GenBank (linha superior) e os produtos de sequenciamento (linha inferior) para o gene XIST (A) e IGF2 (B). Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas. O retângulo verde na imagem B indica o 10º sítio CG, o qual no exemplo acima encontra-se desmetilado.

Foram analisados 17 sítios CpG para o gene XIST e 28 para o gene IGF2, sendo que o 10º sítio deste último não se encontrava presente na sequência depositada no *GenBank*, estando, no entanto, presente em todas as sequências estudadas. O padrão de metilação encontrado para o gene XIST e IGF2, para as categorias de ovócitos analisadas estão apresentadas nas figuras 14 e 15, respectivamente.

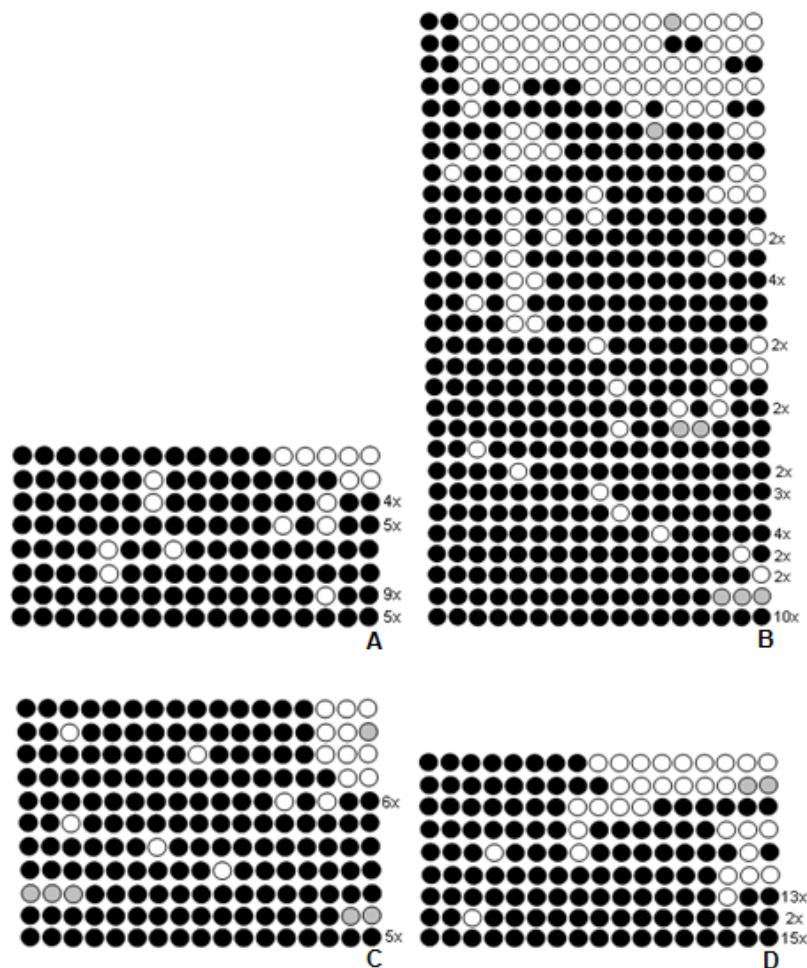


Figura 14. Padrão de metilação do éxon 1 do gene XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que se repetiram estão mostradas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetira. (A) Ovócitos de folículos primordiais; (B) Ovócitos de folículos secundários finais; (C) Ovócitos de folículos antrais incompetentes; (D) Ovócitos de folículos antrais competentes.

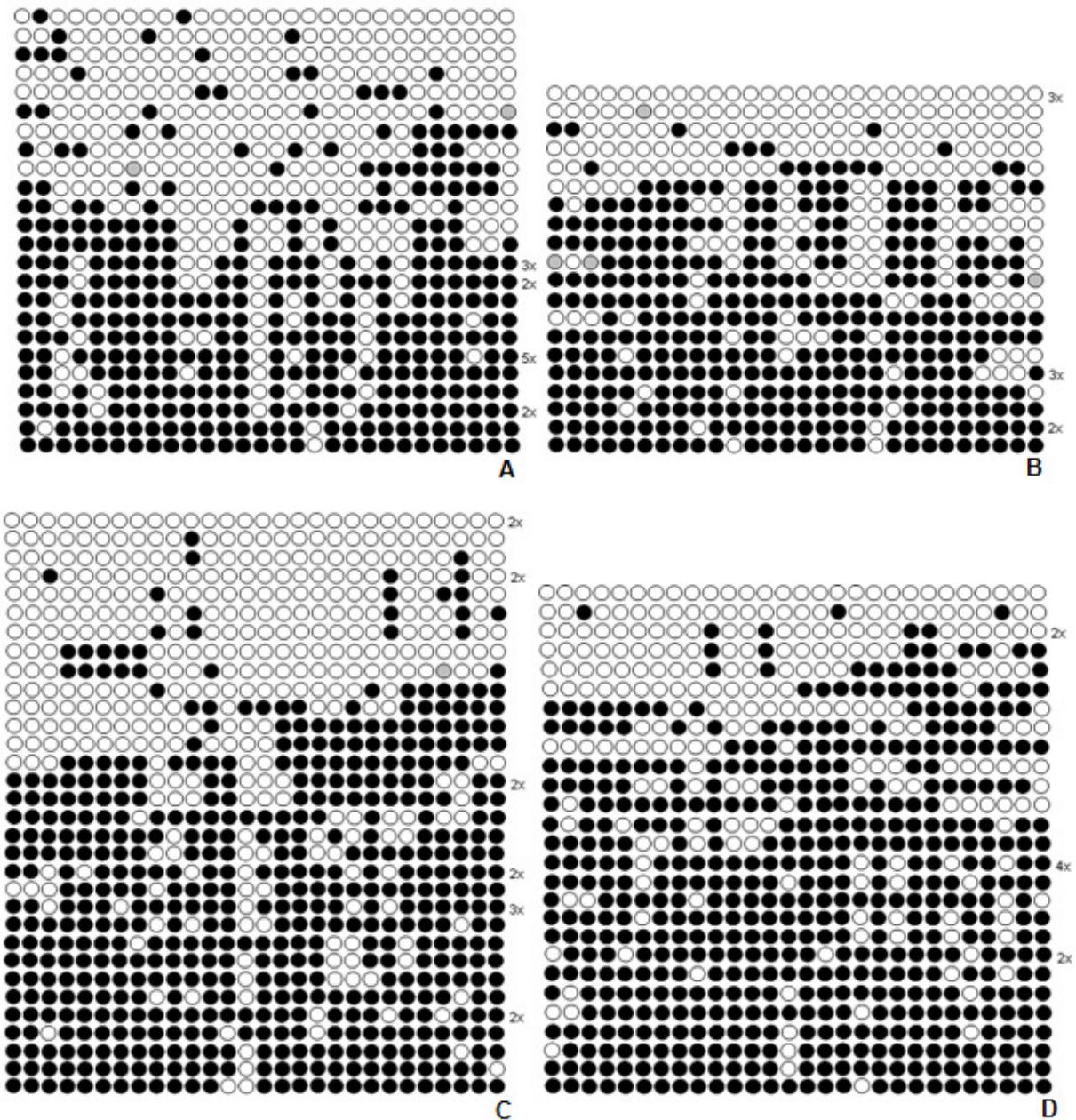


Figura 15: Padrão de metilação do éxon 10 do gene IGF2 em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais e antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que se repetiram estão mostradas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetiram. (A) Ovócitos de folículos primordiais; (B) Ovócitos de folículos secundários finais; (C) Ovócitos de folículos antrais incompetentes; (D) Ovócitos de folículos antrais competentes.

A taxa de metilação, número de sequências analisadas, o número mínimo de alelos encontrados e o número de sequências hipermetiladas ( $\geq 50\%$  de sítios CpGs metilados, de acordo com IMAMURA et al., 2005) para cada grupo de ovócitos

estudado, somando-se as sequências obtidas das duas réplicas, estão representados na tabela 6.

Tabela 6. Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado, para os genes XIST e IGF2.

Categoria de Folículo	Taxa de metilação $\pm$ Desvio-Padrão	Número de sequências analisadas	Número mínimo de alelos diferentes	Número de sequências hipermetiladas
<b>Primordial</b>	$91,59 \pm 6,4^a$	27	08	27 (100%)
<b>Secundário Final</b>	$85,70 \pm 19,6^a$	52	29	48 (93%)
<b>Antral Incompetente</b>	$91,25 \pm 7,2^{a,b}$	20	11	20 (100%)
<b>Antral Competente</b>	$92,58 \pm 11,7^b$	36	09	35 (97%)
<b>XIST</b>	<b>Primordial</b>	$60,56 \pm 29,1^c$	32	24
	<b>Secundário Final</b>	$59,68 \pm 34,6^c$	25	20
	<b>Antral Incompetente</b>	$58,21 \pm 33,0^c$	39	32
	<b>Antral Competente</b>	$67,47 \pm 27,8^c$	32	27
<b>IGF2</b>	<b>Primordial</b>	$21 (66\%)$		
	<b>Secundário Final</b>	$18 (72\%)$		
	<b>Antral Incompetente</b>	$26 (67\%)$		
	<b>Antral Competente</b>	$25 (78\%)$		

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados para cada gene separadamente, considerando-se  $P \leq 0,05$ .

De acordo com as análises estatísticas realizadas não houve diferenças estatisticamente significativas para os ovócitos dos diferentes grupos de folículos estudados para o gene IGF2, em que se encontrou um valor de  $P=0,587$ . Já para o gene XIST foi encontrado  $P=0,042$ , valor que mostra que houve diferenças significativas nas taxas de metilação entre os grupos analisados. Fazendo as análises para todos os grupos aos pares, constatou-se que os ovócitos de folículos antrais competentes possuem maior padrão de metilação do que ovócitos de folículos pré-antrais, sendo que esses grupos não diferem estatisticamente dos ovócitos de folículos antrais incompetentes.

A fim de se comparar as taxas de metilação entre os genes XIST e IGF2 foi feita a análise tanto por grupo quanto reunindo as taxas de todos os grupos de ovócitos. Todos os resultados mostraram que houve diferenças estatisticamente

significativas entre os padrões de metilação dos dois genes analisados, sendo o gene XIST mais metilado durante todas as fases da ovogênese estudadas, com  $P<0,001$  para todas as análises.

As taxas de metilação para os genes XIST e IGF estão sintetizadas na figura 16.

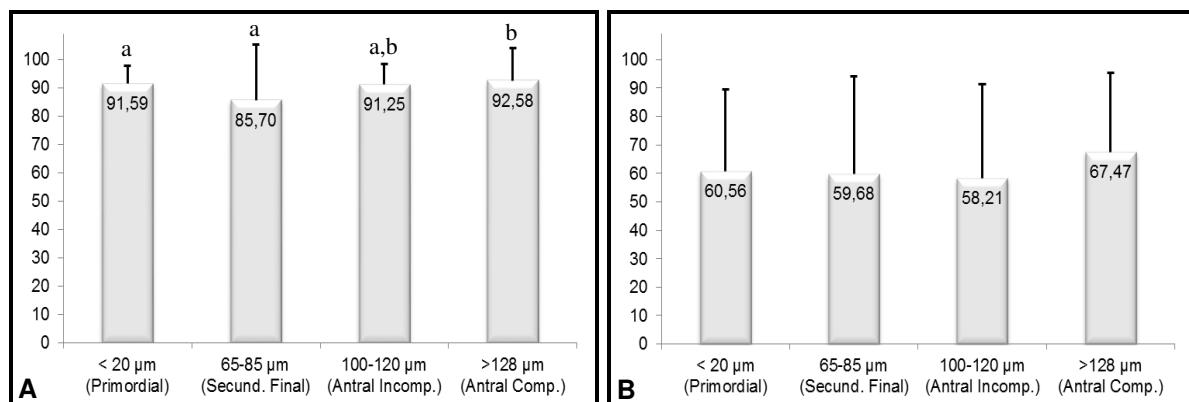


Figura 16. Taxa de metilação para os genes XIST (A) e IGF2 (B) em ovócitos de diferentes categorias de folículos – Primordial, Secundário Final, 1-3 mm (Antral Incompetente) e  $> 6$  mm (Antral Competente).

## 6. DISCUSSÃO

A reprogramação epigenética ocorre em duas fases diferentes no ciclo de vida de um mamífero: durante a formação dos gametas e durante o desenvolvimento embrionário inicial (HACKETT; SURANI, 2012). Entender como ocorre esse processo na gametogênese é importante para a compreensão dos fatores envolvidos na aquisição da competência ovocitária e, consequentemente, na otimização das biotécnicas de reprodução, especialmente, da produção *in vitro* de embriões.

Um dos mais importantes eventos epigenéticos que acontece durante a ovogênese é o processo de reprogramação do gene XIST, essencial para o desenvolvimento embrionário inicial normal (KOHDA; ISHINO, 2012). Logo após a fecundação do ovócito pelo espermatozoide ambos os cromossomo X – materno e paterno – estão ativos. O processo de ICX começa a ocorrer em camundongos no estágio de quatro células, sendo que o Xp é preferencialmente inativado, caracterizando um *imprinting* paterno nessa espécie (AUGUI; NORA; HEARD, 2011). Nas células que originarão os tecidos embrionários ocorre a reativação do Xp, sendo seguido por um novo processo de inativação aleatória de um dos dois cromossomos X ainda nas células da massa celular interna do blastocisto (WUTZ; GRIBNAU, 2007; OHHATA; WUTZ, 2012).

Esse padrão ativo de apenas um dos cromossomos X é mantido nas CGP. Logo após estas migrarem para a crista genital e posteriormente colonizarem as gônadas, o cromossomo X silenciado é novamente reativado (HAJKOVA et al., 2002; NESTEROVA et al., 2002; YANG et al., 2007; OHHATA; WUTZ, 2012), provavelmente por volta do dia 13,5 pós-coito em camundongos (NAPOLES; NESTEROVA; BROCKDORFF, 2007).

Essa dinâmica de inativação do cromossomo X na embriogênese inicial de camundongos parece ser um evento relativamente bem conservado nos mamíferos placentários como camundongos, humanos e coelhos, conforme revisado por Escamilla-Del-Arenal, Rocha e Heard (2011). Ferreira e colaboradores (2010) também caracterizaram essa inativação em embriões bovinos produzidos *in vitro*

através da detecção da expressão alelo específica do gene MAO-A, sendo que o Xm permanece ativo em embriões nos estágios de 4 células até blastocisto expandido, enquanto o Xp mostrou-se inativo no estágio de mórula, sendo reativado em blastocisto inicial.

A transcrição do gene XIST parece ser um dos primeiros eventos para que ocorra a inativação do cromossomo X em mamíferos (NESTEROVA et al., 2002; GRIBNAU; GROOTEGOED, 2012), embora se conheça outros fatores que são responsáveis por manter o padrão inativo e herdável dessa característica (NESTEROVA et al., 2002; JEON; SARMA; LEE, 2012). Estudos realizados com embriões produzidos através de transferência nuclear de célula somática mostrando o processo de ICX ocorrendo de forma incorreta ou experimentos em que houve *knockout* ou *knockdown* de XIST mostraram alto índice de morte embrionária tanto em estágios pré quanto pós-implantação (KOHDA; ISHINO, 2012). Estes resultados sugerem a importância da correta ação do gene XIST no processo de ICX para o desenvolvimento embrionário inicial normal.

Recentes estudos mostraram um pequeno RNA produzido dentro do próprio gene XIST, na extremidade 5' deste, e que é bem conservado entre mamíferos placentários (DUSZCZYK et al., 2011; SADO; BROCKDORFF, 2013). Esse transcrito, conhecido como RNA *Repeat A* (*Rep A*), é essencial para o início da inativação do cromossomo X, recrutando PRC2 para o Xi, sendo o epicentro da ligação XIST/PRC2. Além disso, possibilita a H3K27me3 do cromossomo Xi (ZHAO et al., 2008; SADO; BROCKDORFF, 2013). Estudos que mudaram a conformação de *Rep A* *in vitro* e que provocaram sua deleção mostraram que não houve o processo de ICX (SADO; BROCKDORFF, 2013).

Hajkova e sua equipe (2002) encontraram um padrão hipometilado para o promotor do gene XIST em células germinativas primordiais de camundongos. Nesterova e colaboradores (2002) observaram baixa expressão do gene XIST nas mesmas células. Esses resultados são conflitantes, já que o padrão hipometilado de um gene indica um estado apto a transcrição e, consequentemente, há um aumento da expressão do referido gene. Assim, sugere-se que outros mecanismos epigenéticos, que não a metilação do DNA, são responsáveis pela reativação do cromossomo X nas CGP neste momento. Napoles, Nesterova e Brockdorff (2007)

mostraram baixa detecção de PRC2 no Xi das CGP com concomitante perda de metilação da H3K27, clara característica de reativação do cromossomo X inativo.

Embora esteja bem estabelecido o caráter *imprinted* do gene XIST em camundongos (ZUCCOTTI; MONK, 1995) e não *imprinted* em humanos e coelhos (OKAMOTO et al., 2011), os resultados com relação à espécie bovina são divergentes. Estudos recentes realizados em nosso laboratório (AZEVEDO, 2012) mostraram que o padrão de metilação desse gene em fibroblastos de pele de bovinos foi de mais de 87%, resultado que contraria o índice de 50% esperado para um gene com padrão *imprinted* (REIK; WALTER, 2001). Contudo, McDonald, Paterson e Kay (1998) determinaram padrão de metilação diferentes do gene XIST em espermatozoides e ovócitos de camundongos. Azevedo (2012) especula que no início do desenvolvimento embrionário este gene apresenta o padrão *imprinted*, importante para a escolha do cromossomo X a ser inativado, sendo esse padrão perdido após a diferenciação celular. Isso reforça a ideia de que a partir da diferenciação celular existem outros processos que culminam com a manutenção do cromossomo X inativo.

Os padrões de metilação da região estudada encontrados para os ovócitos de folículos primordiais, secundários finais, de 1 a 3 mm e maiores que 6 mm ( $91,59 \pm 6,4\%$ ;  $85,70 \pm 19,6\%$ ;  $91,25 \pm 7,2\%$ ;  $92,58 \pm 11,7\%$ , respectivamente) mostram um *status* hipermetilado para o gene XIST no gameta feminino durante a ovogênese. Embora nem todos os grupos de ovócitos de folículos pré-antrais tenham sido avaliados nesse estudo, ao se analisar os extremos dessa fase (folículos primordiais e secundários finais), acredita-se que os resultados encontrados podem ser inferidos para todo o processo da gametogênese feminina. Os dados encontrados indicam que a metilação de XIST pode ser um dos eventos que possibilita a reativação do cromossomo X durante a ovogênese bovina, culminando com um padrão ativo do mesmo no momento da fecundação. Isso pode ser explicado pelo fato de que ovócitos de folículos competentes serem mais metilados do que ovócitos provenientes de folículos pré-antrais (Figura 16A). Assim, os presentes resultados estão de acordo com os encontrados por outros trabalhos que identificaram diminuição da expressão de XIST (NESTEROVA et al., 2002) e redução da detecção de PRC2 e H3K27me3 (NAPOLES; NESTEROVA; BROCKDORFF, 2007), todos

processos relacionados com perda da atividade de XIST e reativação do cromossomo X.

Nossos resultados, ao mostrarem um padrão hipermetilado da região estudada (Figura 14), sugerem que essa ilha CpG permanece metilada nas CGP de bovinos ou metila antes de iniciar a ovogênese. Seisenberger e colaboradores (2012), visando compreenderem como ocorre a reprogramação epigenética nas CGP, identificaram regiões no genoma murino que são protegidas de serem desmetiladas durante a onda de desmetilação geral do genoma que ocorre durante a migração e proliferação dessas células para as cristas gonadais no desenvolvimento embrionário. Essas regiões, conhecidas como *variably erased CpG islands* (VECs), mantém-se metiladas até mesmo no ovócito maduro e são responsáveis por transmitir a herança epigenética entre as gerações de indivíduos (SEISENBERGER et al., 2012). A região estudada para o gene que codifica XIST pode ser uma VEC, o que justifica o padrão hipermetilado já encontrado em ovócitos de folículos primordiais (Figura 14). Além disso, Seisenberger e colaboradores (2012) comentam que o padrão de metilação das ilhas CpGs do cromossomo X se mantém ativamente metiladas durante a desmetilação geral do genoma, ocorrendo uma tardia desmetilação. Baseado nisso e em nossos resultados sugerimos que esta região não seja desmetilada nesse período. O padrão hipermetilado encontrado para a região estudada pode estar de acordo com o processo de reativação do cromossomo X neste período, estando relacionada com o bloqueio da transcrição do gene XIST, o que culmina com o padrão ativo de X.

Os presentes resultados diferem dos encontrados por Hajkova e colaboradores (2002), que mostram um padrão hipometilado nas CGP de camundongos antes do início da ovogênese. Embora analisando uma região presente no exon 1 do gene que codifica XIST, não é possível verificar se as regiões estudadas são homólogas para as espécies murina e bovina, o que poderia ser uma justificativa para as diferenças encontradas caso não fossem regiões de homologia. Além disso, os resultados encontrados para camundongos vão contra a hipótese de que XIST deve estar hipermetilado para possibilitar a reativação de Xi na ovogênese (McDONALD; PATERSON; KAY, 1998).

O padrão de metilação global é totalmente perdido nas CGP a fim de “apagar” as marcas dos respectivos genomas parentais – inclusive dos genes *imprinted* –, sendo que o gameta em formação (ovogônia e, posteriormente, ovócito) passa a adquirir um padrão epigenético específico, caracterizando a plasticidade genômica (MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008; De FELICI, 2011; HACKETT; SURANI, 2012; SMALLWOOD; KELSEY, 2012). Contudo, os resultados de Seisenberger e colaboradores (2012) mostraram que, pelo menos em camundongos, essa onda de desmetilação parece não ocorrer no mesmo momento e da mesma forma em todos os genes, tendo sido possível a identificação de regiões genômicas que sofrem um processo tardio de desmetilação ou simplesmente não sofrem tal processo, permanecendo altamente metilados durante toda a gametogênese. Os autores corroboram os dados constatando a presença de transcrição de DNMT1 durante a fase de desmetilação global do genoma, sugerindo a importância de sua transcrição para manter algumas regiões metiladas nesse período.

Napoles, Nesterova e Brockdorff (2007) especulam também que a reativação de X nas CGP ocorre como parte de um programa para converter o genoma para um estado pluripotente, semelhante ao que ocorre nas células da massa celular interna no estágio de blastocisto. O padrão hipermetilado encontrado para a região do gene XIST analisada corrobora essa ideia, já que o *status* de silenciamento gênico desse transcrito, com consequente reativação de Xi, é importante para o estabelecimento de um padrão de totipotência das CGP (De FELICI, 2011), o qual provavelmente se estende na ovogênese, culminando com ambos os cromossomos X ativos no ovócito. O caráter totipotente dessas células é importante para o estabelecimento de um padrão de metilação gameta-específico, sendo este altamente metilado em espermatozoides (aproximadamente 90%) e parcialmente metilado em ovócitos (aproximadamente 40%; HACKETT; SURANI, 2012; KOHDA; ISHINO, 2012). Nesses últimos, o padrão de metilação somente é completamente estabelecido durante a fase final de maturação do gameta (MANIPALVIRATN; DeCHEMEY; SEGARS, 2008; FAGUNDES et al., 2011).

Os presentes resultados podem ser especulados também para a expressão de *Rep A*. Como a região do gene XIST analisada está bem próxima ao local que

transcreve o RNA *Rep A*, *downstream* à mesma, é possível que ambas as regiões compartilhem o mesmo promotor, já que o gene XIST possui mais de um promotor (ZHAO et al., 2008). Dessa forma, a metilação encontrada nesse estudo pode estar influenciando diretamente a transcrição de *Rep A*, o que culminaria também com a não ligação de PRC2 no cromossomo X a ser inativo, reativando-o.

McDonald, Paterson e Kay (1998) mostraram que essa mesma região do gene XIST está desmetilada em ovócitos murinos maturados (MII). Kohda e Ishino (2012) também discutem o caráter parcialmente desmetilado do gameta feminino de camundongos. Por outro lado, Kim, Kang e Kim (2009) encontram uma DMR do gene que codifica XIST hipermetilada em ovócitos MII também em camundongos, com um padrão de metilação de 85%, valor próximo ao encontrado no presente trabalho. Além disso, Nesterova e colaboradores (2002) afirmam que ovócitos humanos maturados possuem ambos os cromossomo X ativos. Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com os dados obtidos por Kim, Kang e Kim (2009) e Nesterova e colaboradores (2002), já que o caráter hipermetilado encontrado para essa região do gene XIST em ovócitos de folículos maiores que 6 mm sugere que o cromossomo X no final da ovogênese está ativo. Mesmo não submetendo os gametas ao processo de maturação *in vitro* pode-se inferir que o mesmo não deva interferir no padrão de metilação da região analisada, para que o *status* de hipermetilação se conserve no ovócito apto à fecundação.

Diferentemente do gene XIST, o qual a característica *imprinted* é ainda discutível na espécie bovina (AZEVEDO, 2012), estudos mostram a expressão monoalélica paterna do gene IGF2 nessa espécie (MURREL et al., 2001; DINDOT et al., 2004). Gebert e colaboradores (2006) também mostraram o padrão *imprinted* da região do éxon 10 desse gene em gametas bovinos, tanto em ovócitos maturados *in vitro* quanto em espermatozoides, sendo que nos primeiros foi encontrado um padrão hipometilado (16%) e no segundo um padrão hipermetilado (99%). Outros trabalhos também mostraram um padrão hipermetilado para espermatozoides bovinos (96,4%; CARVALHO et al., 2012) e hipometilado para ovócitos de camundongos (LOPES et al., 2003) e bovinos (FAGUNDES et al., 2011), mais uma evidência da existência de uma DMR intragênica e da expressão paterna do gene IGF2.

Heinzmann e colaboradores (2011) também analisaram padrões epigenéticos de genes relacionados com o desenvolvimento embrionário em ovócitos bovinos imaturos, maturados *in vitro* em dois diferentes meios de maturação (TCM e mSOF) e maturados *in vivo*. Para a DMR do gene H19 foi encontrado um padrão hipometilado para todos os grupos. Como esse gene compartilha o promotor com o gene IGF2, a região hipometilada analisada está de acordo com a literatura e sugere ser esse o *status* final para o gameta feminino. A DMR do H19 estando metilada associa-se com a DMR2 metilada do gene IGF2, o que induz sua expressão (MURRELL; HEESON; REIK, 2004), tal como o que ocorre no alelo paterno. Entretanto, caso a DMR do H19 esteja desmetilada – situação encontrada por Heinzmann e colaboradores (2011) – não ocorre essa interação, inibindo a expressão do gene IGF2. Sendo assim, espera-se que ambas as DMR do gene H19 e do gene IGF2 (DMR2) estejam hipometiladas em ovócitos maturados.

O provável padrão hipometilado para o gene IGF2 em ovócitos prontos para a fecundação são corroborados pelos resultados existentes para o gene IGF2R, o qual também é *imprinted*, com expressão no alelo materno e é responsável por “sequestrar” os transcritos de IGF2 e transportá-los para o lisossomo para degradação, impedindo sua expressão (LONG; CAI, 2007). Sendo assim, tem ação antagonista ao IGF2. Lucifero e colaboradores (2004) mostraram que os ovócitos MII de camundongos apresentam um padrão hipermetilado. Como os genes IGF2 e IGF2R possuem ações contrárias é esperado um caráter hipermetilado para o IGF2R em ovócitos, visto que o gene IGF2 está hipometilado em ovócitos MII de camundongos, suínos e bovinos (HAJKOVA et al., 2002; PETKOV; REH; ANDERSON, 2009; FAGUNDES et al., 2011).

Durante a migração das CGP para as cristas gonadais foi observada uma reprogramação epigenética no último éxon do gene IGF2, com um processo de desmetilação ocorrendo nessas células em camundongos (HAJKOVA et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados em embriões suínos, nos quais o gene IGF2 das CGP perderam metilação logo após migrarem para a crista genital (PETKOV; REH; ANDERSON, 2009). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram um padrão hipermetilado para ovócitos tanto no início da fase pré-antral ( $60,56 \pm 29,1\%$ ) quanto no final desta ( $59,68 \pm 34,6\%$ ; Figura 15A e 15B), sugerindo

que assim que as CGP se diferenciam em ovogônias e estas entram em meiose ocorre um processo de remetilação dessa região, culminando com o padrão hipermetilado observado já em ovócitos de folículos primordiais.

Outra hipótese é que a região analisada para o gene IGF2 é uma VEC em bovinos, a qual é protegida de sofrer o processo de desmetilação durante toda a migração e diferenciação das CGP e, posteriormente, a ovogênese, somente perdendo esse padrão durante a maturação do ovócito (FAGUNDES, 2011; SEISENBERGER et al., 2012). Isso poderia também explicar o alto desvio padrão observado nessa região do gene IGF2 entre os diferentes grupos de ovócitos estudados (Figura 16B), já que essa “instabilidade” no padrão de metilação é uma característica dessas regiões que se mantém metiladas durante a gametogênese (SEISENBERGER et al., 2012).

Os resultados encontrados nesse estudo mostraram um padrão hipermetilado para a região analisada do éxon 10 do gene IGF2 em ovócitos imaturos de folículos antrais, tanto de folículos de 1 a 3 mm ( $58,21 \pm 33,0\%$ ) quanto maiores que 6 mm ( $67,47 \pm 27,8\%$ ; Figura 15C e 15D). A literatura já mostrou que ovócitos bovinos maturados *in vitro* apresentam um padrão hipometilado (GEBERT et al., 2006; FAGUNDES et al., 2011). Um estudo analisando essa mesma região em ovócitos bovinos de folículos de 1 a 3 mm e maiores que 8 mm apresentaram um padrão hipermetilado ( $51,1 \pm 10,75\%$  e  $77,38 \pm 6,76\%$ , respectivamente), sem diferença estatisticamente significativa antes da maturação (FAGUNDES et al., 2011). Entretanto, após a maturação *in vitro*, ovócitos oriundos de folículos grandes (maiores que 8 mm) apresentaram-se menos metilados que os ovócitos provenientes de folículos entre 1 e 3 mm ( $28,93 \pm 10,26\%$  e  $52,58 \pm 8,17\%$ , respectivamente; FAGUNDES et al., 2011). Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados por Gebert e colaboradores (2009), que mostraram um padrão hipometilado em ovócitos bovinos maturados (MII). Isto sugere que após a maturação essa região deve perder metilação, apresentando um padrão hipometilado.

O padrão de metilação encontrado nesse trabalho para ovócitos de folículos antrais não submetidos ao processo de maturação *in vitro* possui valores próximos aos encontrados por Fagundes e colaboradores (2011) para a mesma região

estudada. Isso sugere que realmente pode estar ocorrendo um processo de reprogramação epigenética para essa região estudada durante a maturação ovocitária.

O'Doherty, O'Shea e Fair (2012) mostraram o estabelecimento do padrão de metilação de genes *imprinted* durante a fase de crescimento do ovócito antral bovino. Para a maioria dos genes analisada ocorreu um aumento do padrão de metilação durante o crescimento ovocitário, estando de acordo com o que se espera para genes *imprinted*, cujo padrão é estabelecido durante a fase de crescimento do gameta feminino (HIURA et al., 2006). Contudo, alguns genes – como o gene IGF2R – não teve o seu padrão de metilação alterado durante a mesma fase. Isso está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho para o gene IGF2, sugerindo que os genes *imprinted* diferentes não se reprogramam ao mesmo tempo.

O padrão de metilação da região estudada do gene IGF2 nesse trabalho também foi analisado em embriões produzidos *in vitro*. Lopes e colaboradores (2003) observaram que logo após a fecundação essa região sofre um processo de desmetilação do alelo paterno até o estágio de mórula – evidenciando o caráter hipermetilado do gameta masculino antes da fecundação, sendo o padrão de metilação restabelecido após a implantação do embrião murino. Já Gebert e colaboradores (2009) encontraram taxas de metilação de  $28,4 \pm 3,8\%$  em zigotos,  $6,3 \pm 2,2\%$  em embriões de quatro células e  $10 \pm 0,7\%$  no estágio de blastocisto, o que indica um processo de desmetilação sofrido por essa região na embriogênese inicial bovina, com a remetilação ocorrendo a partir de blastocisto. Embora todos os resultados demonstrem um padrão hipometilado do gameta feminino no momento da fecundação, eles não estão de acordo com o que se espera de uma característica *imprinted*, a qual deve manter seu padrão de metilação alelo-específica na embriogênese inicial, sendo esse apagado apenas no processo de formação das CGP e gametas (LUCIFERO et al., 2007; PAN et al., 2012).

Foram encontrados 28 dinucleotídeos CpG em todos os clones analisados nesse estudo para o gene IGF2 – tanto em ovócitos de folículos pré-antrais quanto de folículos antrais – como pode ser observado na figura 13B. Esse mesmo número foi encontrado por Fagundes e colaboradores (2011), Gomes (2011) e Carvalho e colaboradores (2012), ambos trabalhando com gametas oriundos de animais *Bos*

*taurus indicus*. No entanto, Gebert e colaboradores (2006), analisado gametas de animais *Bos taurus taurus* encontraram apenas 27 dinucleotídeos, o que sugere um polimorfismo que cria o 10º dinucleotídeo CpG na sequência analisada em animais zebuíños ao trocar uma citosina por um guanina. Isso pode ser devido a uma característica evolutiva, sendo uma diferença entre as duas subespécies utilizadas nos experimentos.

Os resultados encontrados para os genes XIST e IGF2 mostram padrões de metilação distintos durante todo o período da ovogênese analisado nesse trabalho, sendo que o gene XIST está mais metilado que o gene IGF2 ( $P<0,001$ ). Isso sugere assincronia entre diferentes genes no processo de reprogramação epigenética durante a gametogênese feminina, indicando que os genes se reprogramam em fases diferentes durante a ovogênese.

## 7. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que as regiões estudadas para os genes XIST e IGF2 não estão sofrendo um processo de reprogramação do padrão de metilação do DNA em ovócitos bovinos durante as fases analisadas da ovogênese, diferente do que é observado para outros genes. Como não se trabalhou com ovócitos MII, ressalta-se a importância de se analisar, em estudos futuros, o padrão de metilação das mesmas regiões em ovócitos maturados *in vitro* e, posteriormente, maturados *in vivo*, a fim de se obter o padrão de metilação final do gameta feminino bovino e saber se o processo de maturação *in vitro* pode alterar esse padrão.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 45, p. 171-179. 2010a.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 45, p. 180-187. 2010b.
- AKIYAMA, T.; NAGATA, M.; AOKI, F. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 19, 7339-7344. 2006.
- AUGUI, S.; NORA, E. P.; HEARD, E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, 429-442. 2011.
- AZEVEDO, J. M. **Impactos do uso da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos**. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- BAARENDs, W. M.; WASSENAAR, E.; van der LAAN, R.; HOOGERBRUGGE, J.; SLEDDENS-LINKELS, E.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; de BOER, P.; GROOTEGOED, J. A. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 25, n. 3, p. 1041-1053. 2005.
- BASU, R.; ZHANG, L.-F. X Chromosome inactivation: a silence that needs to be broken. **Genesis**, New York, v. 49, p. 821-834. 2011.

BESSA, I. R. **Perfil da expressão de genes candidatos para aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos.** 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HUK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine, **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p. 13-22. 1997.

BORDIGNON, V.; CLARKE, H. J.; SMITH, L. C. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic Histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocyte. **Biology of Reproduction**, New York, v. 61, p. 22-30. 1999.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 109, p. 165-171. 1997.

BUI, H-T.; THUAN, N. V.; KISHIGAMI, S.; WAKAYAMA, S.; HIKICHI, T.; OHTA, H.; MIZUTANI, E.; YAMAOKA, E.; WAKAYAMA, T.; MIYANO, T. Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 133, p. 371-382. 2007.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTEC, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 21, p. 655-664. 2009.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M. SÁ, W. F.; MOREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 19-28. 2006.

CARVALHO, F. O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; SARTORI, R.; RODRIGUES, F. C.; BRAVIM, O.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 79, p.77-84. 2012.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In Vitro* development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, p. 594-601. 1999.

CHAO, W; D'AMORE, P. A. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 19, p. 111-120. 2008.

DAELEMANS, C.; RITCHIE, M. E.; SMITS, G.; ABU-AMERO, S.; SUDBERY, I. M.; FORREST, M. S.; CAMPINO, S.; CLARK, T. G.; STANIER, P.; KWIATKOWSKI, D.; DELOUKAS, P.; DERMITZAKI, E. T.; TAVARÉ, S.; MOORE, G. E. DUNHAM, I. High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. **BMC Genetics**, London, v. 11, n. 25, p. 1-20. 2010.

DeCHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of the mouse Insulin-Like Growth Factor II gene. **Cell**, Cambridge, v. 64, p. 849-859, 1991.

De FELICI, M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germcells: epigenetic contribution. **Stem Cells International**, London, v. 2011, p. 1-15. 2011.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCK, C.; KRUIP, T. A. M.; NIEMAN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, p. 5-20. 2002.

DINDOT, S. V.; FARIN, P. W.; FARIN, C. E.; ROMANO, J.; WALKER, S.; LONG, C.; PIEDRAHITA, J. A. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71, p. 470-478. 2004.

DODE, M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XXI ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34, 2006, Araxá. **Anais...** Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p. 115-129, 2006.

DUSZCZYK, M. M.; WUTZ, A.; RYBIN, V.; SATTLER, M. The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. **RNA**, New York, v. 17, p. 1973-1982, 2011.

ESCAMILLA-DEL-ARENAL, M.; ROCHA, S. T.; HEARD, E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. **Human Genetics**, Berlin, v. 130, p. 307-327. 2011.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v.13, n. 4, p. 169-173. 2002.

EGLEN, R. M.; REISINE, T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome: an overview. **Journal of Biomolecular Screening**, New York, v. 16, n. 10, p. 1137-1152. 2011.

FAGUNDES, N. S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; CAIXETA, E. S.; MACHADO, G. M.; RODRIGUES, F. C.; MELO, E. O.; DODE, M. A. N.; FRANCO, M. M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the *IGF2* locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 85-91. 2011.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 203-216. 2003.

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Times is everything: The when and how the environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, Georgetown, v. 6, n. 7, p. 791-797. 2011.

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

FENG, W. G.; SUI, H. S.; HAN, Z. B.; CHANG, Z. L.; ZHOU, P.; LIU, D. J.; BAO, S.; TAN, J. H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 1339-1350. 2007.

FERREIRA, A. R.; MACHADO, G. M.; DIESEL, T. O.; CARVALHO, J. O.; RUMPF, R.; MELO, E. O.; DODE, M. A. N.; FRANCO, M. M. Allele-specific expression of the MAO-A gene and x chromosome inactivation in *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 77, p. 615-621. 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 143-152. 2007.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 163, p. 53-60. 2003.

FRANCO, M. M.; MELO, E. O. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida.** Brasília, DF, Documentos 188. 2006. 14 p.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The importance of imprinting in the human placenta. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, p. 1-9. 2010.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; THIEL, J.; REINHARDT, R.; LEHRACH, H.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics**, San Diego, v. 94, p. 63-69. 2009.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GRÖGER, D.; REINHARDT, R.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.; LEHRACH, H.; NIEMANN, H. The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. **Genomics**, San Diego, v. 88, p. 222-229. 2006.

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 82-90. 2008.

GOMES, L. F. S. **Padrão de metilação dos genes IGF2 e XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de vacas nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 395p.

GRIBNAU, J.; GROOTEGOED, J. A. Origin and evolution of X chromosome inactivation. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 24, p. 1-8. 2012.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à Genética.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 712p.

GUSEVA, N.; MONDAL, T.; KANDURI, C. Antisense noncoding RNA promoter regulates the timing of de novo methylation of an imprinting control region. **Developmental Biology**, New York, v. 361, p. 403-411. 2012.

HACKETT, J. A.; SURANI, M. A. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 368, p. 1-8. 2012.

HACKETT, J. A.; ZYLICZ, J. J.; SURANI, M. A. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.28, n. 4, p. 164-174. 2012.

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

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**, Shannon, v. 117, p. 15-23. 2002.

HALL, J. G. Genomic imprinting: nature and clinical relevance. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 48, p. 35-44. 1997.

HALL, J. G. Genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 1, p. 34-39. 1991.

HASHIMOTO, H.; VERTINO, P. M.; CHENG, X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. **Epigenomics**, London, v. 2, n. 5, p. 657-669. 2010.

HEINZMANN, J.; HANSMANN, T.; HERRMANN, D.; WRENZYCKI, C.; ZECHNER, U.; HAAF, T.; NIEMANN, H. Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 78, p. 188-201. 2011.

HIRAO, Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes *in vitro*. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 82, p. 187-197. 2011.

HIURA, H.; OBATA, Y.; KOMIYAMA, J.; SHIRAI, M.; KONO, T. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. **Genes to Cells**, Malden, v. 11, p. 353-361. 2006.

HOKI, Y.; KIMURA, N.; KANBAYASHI, M.; AMAKAWA, Y.; OHHATA, T.; SASAKI, H.; SADO, T. A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 139-146. 2009.

HSIEH, C.-L. Dynamics of DNA methylation pattern. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 10, p. 224-228. 2000.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Quantidade de leite cru, resfriado ou não (mil litros) – Brasil**. 2010. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=3&z=t&o=23&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em: 11 dez. 2012.

IDERAABDULLAH, F. Y.; VIGNEAU, S.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 647, p. 77-85. 2008.

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

IQBAL, K.; JIN, S.-G.; PFEIFER, G. P.; SZABÓ, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 9, p. 3643-3647. 2011.

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

JEON, Y.; SARMA, K.; LEE, J. T. New and Xisting regulatory mechanisms of X chromosome inactivation. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 22, p. 1-10. 2012.

JOHN, R. M., SURANI, M. A. Imprinted genes and regulation of gene expression by epigenetic inheritance. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 8, p. 348-353. 1996.

JU, J.-C.; TSAY, C.; RUAN, C.-W. Alterations and reversibility in the chromatin, cytoskeleton and development of pig oocytes treated with Roscovitine. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 64, p. 482-491. 2003.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA Methyltransferases. **Chembiochem**, Weinhei, v. 12, p. 206-222. 2011.

KAGEYAMA, S.; LIU, H.; KANEKO, N.; OOGA, M.; NAGATA, M.; AOKI, F. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction**, Cambridge, v. 133, p. 85-94. 2007.

KIM, J. D.; KANG, K.; KIM, J. YY1's role in DNA methylation of *Peg3* and *Xist*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 17, p. 5656-5664. 2009.

KOHDA, T.; ISHINO, F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**. London, v. 368, p. 1-9. 2012.

KOTA, S. K.; FEIL, R. Epigenetic Transition in Germ Cell Development and Meiosis. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 19, p. 675-686. 2010.

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 191-203. 2010.

LEE, J. T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 12, p. -815-826. 2011

LEE, J. T.; DAVIDOW, L. S.; WARSHAWSKY, D. *Tsix*, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre. **Nature Genetics**, New York, v. 21, p. 400-404. 1999.

LI E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 9, p. 662-673. 2002.

LIU, J.-E.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.-Y.; SUN, Q.-Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 75, p. 598-607. 2008.

LONG, J.-E.; CAI, X. Ig f-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, Amsterdam, v. 388, p. 15-134. 2007.

LOPES, S.; LEWIS, A.; HAJKOVA, P.; DEAN, W.; OSWALD, J.; FORNÉ, T.; MURREL, A. CONSTÂNCIA, M.; BARTOLOMEI, M.; WALTER, J.; REIK, W. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 295-305. 2003.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 5, p. 1467-1483. 2002.

LUCIFERO, D.; SALLE, S.; BOURC'HIS, D.; MARTEL, J.; BESTOR, T. H.; TRASLER, J. M. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. **BMC Developmental Biology**, London, v. 7, n. 36, p. 1-14. 2007.

LUCIFERO, D.; MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S.; TRASLER, J. M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 839-849., 2004.

LYKO, F.; MALESZKA, R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 127-131. 2011.

LYON, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, London, v. 190, p. 372-373. 1961.

MALARD, P. F.; PEIXER, M. A. S.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; RUMPF, R. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 677-682. 2001.

MANIPALVIRATN, S.; DeCHEMEY, M. D. A.; SEGARS, M. D. J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, New York, v. 91, n. 2, p. 305-315. 2008.

MANOSALVA, I.; GONZÁLEZ, A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, p. 1539-1547. 2010.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICUTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. 2012. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/41\\_exportacao\\_ano.asp](http://www.abiec.com.br/41_exportacao_ano.asp). Acesso em: 11 dez. 2012.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 285-296. 2010.

McDONALD, L. E.; PATERSON, C. A.; KAY, G. F. Bisulfite genomic sequencing-derived methylation profile of the XIST gene throughout early mouse development. **Genomics**, San Diego, v. 54, p. 379-386. 1998.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. **Science**, New York, v. 226, n. 4680, p. 1317-1319. 1984.

McNATTY, K. P.; READER, K.; SMITH P.; HEATH D. A.; JUENGE, J. L. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 206 perspective. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, Nottingham, v. 64, p. 55-68. 2007.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, Cambridge, v. 130, p. 791-799. 2005.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 55, p. 89-95. 2000.

MOHANDAS, T.; SPARKES, R. S.; SHAPIRO, L. J. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. **Science**, Washington, v. 211, p. 393-396. 1981.

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 7, issue 2, p. 45-49. 1991.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, R47-R58. 2005.

MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 2, p. 889-893. 2004.

MURRELL, A.; HEESON, S.; BOWDEN, L.; CONSTÂNCIA, M.; DEAN, W.; KELSEY, G.; REIK, W. An intragenic methylated region in the imprinted Igf2 gene augment transcription. **EMBO reports**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 1101-1106. 2001.

NAPOLES, M.; NESTEROVA, T.; BROCKDORFF, N. Early loss of XIST RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. **PLoS ONE**, San Francisco, issue 9, e860. 2007.

NAVARRO, P.; AVNER, P. An embryonic story: Analysis of the gene regulative network controlling *Xist* expression in mouse embryonic stem cells. **Bioessays**, Cambridge, v. 32, p. 581-588. 2010.

NESTEROVA, T. B.; MERMOUD, J. E.; HILTON, K.; PEHRSON, J.; SURANI, M. A.; McLAREN A.; BROCKDORFF, N. *Xist* expression and macroH2A1.2 localisation in mouse primordial and pluripotent embryonic germ cells. **Differentiation, research in biological diversity**, London, v. 69, p. 216-225. 2002.

NISHIMURA, R. C. **Perfil de metilação do éxon 1 do gene XIST em células da linhagem espermatogênica de bovinos**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OBATA, Y; KONO, T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.277, n. 7, p. 5285-5289. 2002.

O'DOHERTY, A. M.; O'SHEA, L. C.; FAIR, T. Bovine DNA methylation imprints are established in a oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. **Biology of Reproduction**, New York, v. 86, n. 3, p. 1-10. 2012.

OGAWA, Y.; SUN, B. K.; LEE, J. T. Intersection of the RNAi and X-inactivation pathways. **Science**, Washington, v. 320, n. 5881, p. 1336-1341. 2008.

OHHTA, T.; WUTZ, A. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, 2012.

OHLSSON, R.; RENKAWITZ, R.; LOBANENKOV, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.17, n. 9, p. 520-527. 2001.

OKAMOTO, I.; PATRAT, C.; THE'POT, D.; PEYNOT, N.; FAUQUE, P.; DANIEL, N.; DIABANGOUAYA, P.; WOLF, J.-P.; RENARD, J.-P.; DURANTHON, V.; HEARD, E. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. **Nature**, London, v. 472, p. 370-376. 2011.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The Ovary: Anatomy and function throughout human life. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1127, p. 1-9. 2008.

OTTE, K.; CHOUDHURY, D.; CHARALAMBOUS, M.; ENGSTRÖM, W.; ROZELL, B. A conserved structural element in horse and mouse IGF2 genes binds a methylation sensitive factor. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1605-1612. 1998.

PAN, Z.; ZHANG, J.; LI, Q.; LI, Y.; SHI, F.; XIE, Z.; LIU, H. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijin, v. 39, p. 111-123. 2012.

PARADOWSKA, A.; FENIC, I.; KONRAD, L.; STURM, K.; WAGENLEHNER, F.; WEIDNER, W. STEGER, K. Aberrant epigenetic modifications in the CTCF binding domain of the IGF2/H19 gene in prostate cancer compared with benign prostate hyperplasia. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 35, p. 87-96. 2009.

PAYER, B.; LEE, J. T.; NAMEKAWA, S. H. X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. **Human genetics**, Berlin, v. 130, p. 265-280. 2011.

PETKOV, S. G.; REH, W. A.; ANDERSON, G. B. Methylation changes in porcine primordial germ cells. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 76, p. 22-30. 2009.

PESSIA, E.; MAKINO, T.; BAILLY-BECHET, M.; McLYSAGHT, A.; MARAIS, G. A. B. Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 14, p. 5346-5351. 2012.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, Colchester, v. 136, p. 703-715. 2008.

POPP, C.; DEAN, W.; FENG, S.; COKUS, S. J.; ANDREWS, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by Aid deficiency. **Nature**, London, v. 463, n. 7284, p. 1101-1105. 2010.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKIC, C.; LEPIKHOV, K.; SALAMONE, D.; WALTER, J.; NIEMANN, H. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 21, p. 738-748. 2009.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKIC, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 75, p. 17-25. 2008.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 28382843. 2001.

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

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Genetics**, New York, v. 2, p. 21-32. 2001.

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

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 61, p. 234-248. 2002.

SADO, T.; BROCKDORFF, N. Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA Xist. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 368, p. 1-10. 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, vol. 1, 2001.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9; p. 129-140. 2008.

SASAKI, H.; ISHIHARA, K.; KATO, R. Mechanisms of Igf2/H19 Imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 127, p. 711-715. 2000.

SATO, A.; OTSU, E.; NEGISHI, H.; UTSUNOMIYAL, T.; ARIMA, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n.1, p. 26-35. 2007.

SCHAEFER, C. B.; OOI, S. K. T.; BESTOR, T. H.; BOURC'HIS, D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. **Science**, Washington, v. 316, p. 398-399. 2007.

SEISENBERGER, S.; ANDREWS, S.; KRUEGER, F.; ARAND, J.; WALTER, J.; SANTOS, F.; POPP, C.; THIENPONT, B.; DEAN, W.; REIK, W. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 48, p. 849–862. 2012.

SENEDA, M. M.; GODMANN, M.; MURPHY, B. D.; KIMMINS, S.; BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. **Reproduction**, Oxford, v. 135, p. 829-838. 2008.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURIONL.; MELO-STERZA, F. A.; SENE DA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, p. 1051-1057, 2011.

SIMON, I.; TENZEN, T.; REUBINOFF, B. E.; HILLMAN, D.; McCARREY, J. R.; CEDAR, H. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. **Nature**, London, v. 401, p. 929-932, Oct. 1999.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA Methylation. **Blood**, Washington, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, Jun.1999.

SIRARD, M.- A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, p. 126-136. 2006.

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

SMOLLE, M.; WORKMAN, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, pii: S1874-9399(12)00151-4. 2012.

SOYAL S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FGα, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 4645-4654. 2000.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modification. **Nature**, London, v. 403, p. 41-45. 2000.

SU, Y.- Q; SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Seminars in reproductive medicine**, New York, v. 27, n. 1, p. 32-42, 2009.

TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND L.; RAO, A. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL Partner TET1. **Science**, Washington, v. 324, n. 5929, p. 930-935. 2009.

TEKLEMBURG, G.; WEIMAR, C. H. E.; FAUSER, B. C. J. M.; MACKLON, N.; GEIJSEN, N.; HEIJNEN, C. J.; LOPES, S. M. C. S.; KUIJK, E. W. Cell lineage specific distribution of H3K27 trimethylation accumulation in an *in vitro* model for human implantation. **PLoS one**, San Francisco, v. 7, issue 3, e32701. 2012.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. **Reproduction**, Cambridge, v.121, p. 51-75. 2001.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and maturation within ovarian follicle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, p. 1717-1751. 2005.

VAN WENZEL, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, New York, v. 55, p. 1003-1011.1996.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, sup. 2, s661-s674. 2010.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIÈS-TRAN, R.; JOLY, C.; HUMBLOT, P.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by Roscovitine inhibition of MPF activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 69, p. 457-465. 2004.

WEBB R; GAMSWORTHY, P. C. GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. E62-E74, 2004.

WIJCHERS, P. J.; FESTENSTEIN, R. J. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 132-140. 2011.

WUTZ, A.; GRUBNAU, J. X inactivation Xplained. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 17, p. 387-393. 2007.

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 CpGisland. **Nature**, London, v. 389, p. 745-749. 1997.

XU, J.; ANDREASSI, M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. **Hormones and Behavior**, New York, v. 59, p. 383-392. 2011.

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

ZAID, S. K.; YOUNG, D. W.; MONTECINO, M.; LIAN, J. B.; STEIN, J. L.; WIJNEN, A. J.; STEIN, G. S. Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 30, n. 20, 4758-4766. 2010.

ZHAO, J.; SUN, B. K.; ERWIN, J. A.; SONG, J.-J.; LEE, J. T. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. **Science**, Washington, v. 322, p. 750-756. 2008.

ZUCCOTTI, M.; MERICO, V.; CECCONI, S. REDI, C. A.; GARAGNA, S. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 525-540. 2011.

ZUCCOTTI, M.; MONK, M. Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted Xist expression and paternal X-inactivation. **Nature Genetics**, New York, v. 9, p. 316-320. 1995.