

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES IGF2 E
XIST EM OVÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS DE VACAS NELORE (*Bos taurus
indicus*)**

Luís Fernando Soares Gomes

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES IGF2 E
XIST EM OVÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS DE VACAS NELORE (*Bos taurus
indicus*)**

Luís Fernando Soares Gomes

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Abril – 2011

*Deus não trabalha na ansiedade do homem,
as coisas acontecem na hora certa,
as coisas acontecem exatamente quando devem acontecer.*

Se Deus trouxe isto a você, ele lhe trará algo através disto.

Momentos felizes, louve a Deus.

Momentos difíceis, busque a Deus.

Momentos silenciosos, adore a Deus.

Momentos dolorosos, confie em Deus.

Cada momento, agradeça a Deus.

(Autor desconhecido)

*A toda minha família
em especial aos meus pais Agostinho e Noeli
e minha irmã Patrícia
pelo amor e apoio incondicional.
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu força, paz, saúde para que eu pudesse passar por mais esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Machaim Franco pela constante paciência, amizade, ajuda, conselhos fundamentais, valiosos ensinamentos e pelas oportunidades de aprendizado. Mas principalmente pela orientação, que nunca me faltou! Sou muito grato!

À Prof. Dra. Margot Alves Nunes Dode por estar sempre presente e que foi fundamental no desenvolvimento do projeto. Obrigado pela paciência e por sempre estar disposta a me ajudar.

Ao técnico Regivaldo Vieira de Souza que, sempre prestativo, ajudou na realização deste trabalho.

Aos demais pesquisadores Eduardo de Oliveira Melo, Ricardo Alamino Figueiredo e Rodolfo Rumpf pela amizade e incentivo.

À minha namorada Lara pelo companheirismo, amor e apoio incondicional.

Aos colegas de trabalho Isabela Bessa, Valquíria Lacerda, Otávio Bravim, Fernanda Rodrigues e Pablo Rua que me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos amigos da UFU João Helder e Marília Gama pelo apoio e momentos de aprendizado.

Aos amigos da EMBRAPA Cenargen José Carvalho, Allice Ferreira, Juliana Azevedo, Washington Espíndula, Fernanda Paulini, Rosana Nishimura e Grazieli Marinheiro pelo apoio e momentos de aprendizado.

Aos amigos Eleonora Araujo, José Felipe, Heitor Teixeira, Andrei Fidelis e Pablo Rua pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À todos os funcionários da EMBRAPA Campo Experimental Sucupira pela amizade e apoio.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade da formação científica.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos e a secretária Célia Regina Macedo por sempre estarem dispostos a atender e ajudar o aluno.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Ovogênese e foliculogênese.....	3
2.2 Manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA).....	5
2.3 Epigenética.....	7
2.3.1 Metilação do DNA.....	7
2.3.2 Modificações em Histonas.....	10
2.3.3 <i>Imprinting</i> genômico.....	11
2.4 Reprogramação epigenética na ovogênese e desenvolvimento embrionário.....	13
2.5 O gene IGF2.....	15
2.6 O gene XIST.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Isolamento de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais.....	23
4.2 Extração do DNA genômico dos ovócitos.....	26
4.3 Tratamento com bissulfito de sódio.....	26
4.4 Amplificação por PCR e purificação.....	27
4.5 Clonagem dos produtos da PCR, sequenciamento e análises das sequências.....	29
4.6 Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31

6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

ABREVIATURAS

FOPA – Folículo pré-antral
PIVE – Produção *in vitro* de embriões
MCI – Massa celular interna
DMR – Região diferencialmente metilada
ICR – Região controladora de *imprinting*
IGF2 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
XIST – Transcrito específico do cromossomo X inativo
MAO-A – Monoamina oxidase tipo A
DNA – Ácido desoxirribonucléico
RNA – Ácido ribonucléico
pb – Pares de base
CpG – Citosina-fosfato-Guanina
CTCF – Fator ligante CCCTC
NaCl – Cloreto de sódio
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PBS – Solução salina em tampão fosfato
µm – Micrômetro
µL – Microlitro
µg – Micrograma
µM – Micromolar
mM – Milimolar
mL – Mililitro
mg – Miligrama
mm – Milímetro
rpm – Rotação por minuto
dpc – Dias pós coito

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Localização do gene IGF2 (seta vermelha) no cromossomo 29 de bovino. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281240...	16
Figura 2: Estrutura genômica do gene IGF2. Em verde o comprimento total do gene (18.606 pb); em azul o RNA mensageiro (3.824 nucleotídeos); em vermelho a forma alternativa (2.294 nucleotídeos). A seta vermelha indica a posição dos iniciadores na ilha CpG estudada. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281240.....	16
Figura 3: Modelo representando as DMR dos genes IGF2 e H19 em camundongos. As quatro DMR (retângulos) com seus alelos materno (♀) e paterno (♂) e suas metilações preferenciais em preto (metilado) e branco (desmetilado); E-“enhancers”. (Adaptado de LOPES <i>et al.</i> , 2003; MURRELL <i>et al.</i> , 2004).....	17
Figura 4: Modelo ilustrativo mostrando a interação entre as DMR dos genes IGF2 e H19. Em ambos os alelos ocorre a formação de uma região com expressão reprimida (área em cinza). No alelo materno, a DMR1 do IGF2 e a DMRH19 interagem. O promotor do H19 é ativado pelo <i>enhancer</i> (círculos vermelhos). No alelo paterno, ocorre a interação entre a DMR2 do IGF2 e a DMRH19. O <i>enhancer</i> se aproxima da região promotora do IGF2 e induz sua expressão. (Adaptado de MURRELL <i>et al.</i> , 2004; FAGUNDES, 2009).....	19
Figura 5: Localização do gene XIST (seta vermelha) no cromossomo X de bovino. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325.....	20
Figura 6: Estrutura genômica do gene XIST. Em verde o comprimento total do gene (36.535 pb); em azul o RNA mensageiro (22.812 nucleotídeos) A seta vermelha indica a posição dos <i>primers</i> na ilha CpG estudada. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325.....	20

Figura 7: Procedimento mecânico utilizado para isolar os folículos pré-antrais do estroma ovariano. (A) Ovários e bisturi sobre a placa aquecedora a 37°C. (B) Retirada do córtex ovariano com auxílio do bisturi. (C) Fragmentação da estrutura pelo <i>Tissue Chopper</i> . (D) Dissociação dos FOPA do tecido ovariano por repetidas pipetagens. (E) Filtragem usando malha de 500 µm.....	24
Figura 8: Ovócitos oriundos de folículos primordiais e secundários finais de vacas Nelore, respectivamente. Abaixo os mesmos corados com iodeto de propídeo indicando a vesícula germinativa. Ovócitos apresentando diâmetro de 20,0 µm (A) e 68,5 µm (B).....	25
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados após tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio. M - marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). (A) Fragmento de 420 pb referente ao gene IGF2 indicado do 1 ao 4. (B) Fragmento de 405 pb referente ao gene XIST indicado do 1 ao 3.....	31
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio para confirmação do fragmento inserido correspondente aos genes XIST e IGF2. M - marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). C - controle negativo. Fragmento de 421 pb referente ao gene XIST indicado do 1 ao 5. Fragmento de 436 pb referente ao gene IGF2 indicado do 6 ao 14.....	32
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio mostrando produtos de PCR utilizando plasmídeos como molde e os iniciadores universais T7 e SP6, para confirmação do fragmento inserido correspondente ao gene XIST.....	33
Figura 12: Análise comparativa pelo software BiQ Analyzer da sequência obtida no “GenBank” com a sequência obtida no experimento. Em laranja e roxo indica sequências CG não metiladas. As duas sequências em laranja indicam CG metiladas. A e B são sequências referentes ao gene IGF2. O retângulo vermelho indica o 10º sítio CpG, onde em (A) está metilado e em (B) não metilado. (C) Sequência referente ao gene XIST. A identidade destas três sequências e a taxa de conversão foi de 100%.....	35

Figura 13: Análise de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) ($31,09 \pm 31,01\%$). 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. A seta preta indica o novo sítio CpG encontrado comparando com a sequência do “GenBank” 36

Figura 14: (A) e (B) Análise da metilação do éxon 1 do gene XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-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. (A e B; $P=0,0901$) 37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Identificação do Gene, sequências dos iniciadores, acesso no “GenBank”, localização, posição na ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.....	27
Tabela 2: Classificação dos folículos pré-antrais, número total de ovócito utilizado na extração do DNA e diâmetro dos ovócitos (média $\pm$ desvio padrão).....	31

**PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES IGF2 E XIST EM OVÓCITOS
ORIUNDOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE VACAS NELORE (*Bos
taurus indicus*)**

RESUMO - Com o intuito de aumentar a produtividade, visando o máximo de aproveitamento do material genético disponível, várias biotecnologias reprodutivas vêm sendo desenvolvidas e utilizadas. Apesar de ovócitos obtidos de folículos pré-antrais não terem ainda competência para produzir embrião, são uma fonte muito importante de gametas a ser utilizada na produção *in vitro* de embriões. Entender a reprogramação epigenética que acontece nestes ovócitos é necessário quando se vislumbra a possibilidade futura de uso de ovócitos obtidos de folículos pré-antrais para a produção de embriões. Neste trabalho objetivou-se avaliar o padrão de metilação numa DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos de 65-90 μm e do éxon 1 do gene XIST em ovócitos $\leq 20 \mu\text{m}$ e 65-90 μm obtidos de folículos pré-antrais. Para o IGF2, os ovócitos de folículos secundários finais de 65-90 μm apresentaram $31,09 \pm 31,01\%$ de metilação, e para o XIST, os ovócitos de folículos primordiais $\leq 20 \mu\text{m}$ e os ovócitos de folículos secundários finais de 65-90 μm apresentaram $15,17 \pm 32,82\%$ e $4,6 \pm 3,46\%$, respectivamente. O IGF2 apresentou-se hipometilado e analisando com os dados na literatura, observa-se que esta região do gene sofre um processo de reprogramação epigenética durante a ovogênese. O XIST apresentou um processo de desmetilação no decorrer do desenvolvimento do ovócito e com uma tendência de permanecer até a fecundação. Conclui-se que estas duas regiões genômicas estudadas sofrem um processo de reprogramação epigenética durante a gametogênese.

Palavras-chave: Bovino, IGF2, Metilação, Ovócito, XIST

**METHYLATION PATTERN OF THE IGF2 AND XIST GENES IN OOCYTES
OBTAINED OF THE PREANTRAL FOLLICLES FROM NELLORE COWS
(*Bos taurus indicus*)**

ABSTRACT – In order to increase productivity looking for maximum use of genetic material available, various reproductive biotechnologies have been developed and used. Despite the fact that the oocytes obtained from preantral follicles have not been able to produce embryo yet, they are a very important source of gametes to be used *in vitro* of embryos. It is necessary to understand the epigenetics reprogramming that occurs in these oocytes when there is a future possibility of use of these oocytes obtained from preantral follicles for embryo production. This study focus on evaluating the methylation pattern in a DMR of the last exon of IGF2 gene in oocytes of 65-90 μm , and of exon 1 of the XIST gene in oocytes $\leq 20 \mu\text{m}$, and 65-90 μm obtained from preantral follicles. For the IGF2, the oocytes from secondary follicles ends of 65-90 μm presented $31,09 \pm 31,01\%$ of methylation, and for the XIST, the oocytes of primordial follicles $\leq 20 \mu\text{m}$, and the oocytes of secondary follicles ends of 65-90 μm presented $15,17 \pm 32,82\%$ and $4,6 \pm 3,46\%$ respectively. The IGF2 was hipomethylated and being analysed by the literature data, it is observed that this region of the gene suffer a reprogramming process during oogenesis. The XIST presented a demethylation process throughout the development of the oocyte tending to remain until fertilization. In conclusion, these two genomic regions suffers an epigenetic reprogramming process during gametogenesis.

Key words: Bovine, IGF2, Methylation, Oocytes, XIST

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de gado bovino é a mais difundida no Brasil devido a privilégios naturais e a grande utilidade que representa ao homem. O aproveitamento do gado bovino não se restringe ao mero consumo de sua carne e leite, mas também, seus derivados abastecendo segmentos industriais diferentes como, indústria têxtil, calçadista, de cosméticos, farmacêutica, química e alimentícia. O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina, representando este segmento a maior fatia do agronegócio brasileiro (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, ABIEC, 2009).

No entanto, um mercado cada vez mais exigente por proteína animal, devido principalmente ao constante aumento populacional, nos desafia a aumentar a produção de alimentos sem abrir novas fronteiras agrícolas. Para isso, é necessário intensificar a produtividade por área utilizada sem afetar o meio ambiente. Então, com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva visando o máximo de aproveitamento do material genético disponível para obtenção do maior número de descendentes, maximizando assim a produção de animais em um período mais curto de tempo, várias biotécnicas aplicadas à reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e utilizadas.

Biotécnicas como inseminação artificial (IA), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e transferência de embriões (TE) vem sendo utilizadas com sucesso, e outras biotécnicas estão em fase de desenvolvimento e aprimoramento como a clonagem, transgenia e a manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA). Esta última vem sendo objeto de intensas pesquisas tanto na utilização dos folículos pré-antrais para a produção *in vitro* de embriões quanto para a criopreservação.

Ovócitos bovinos oriundos de folículos antrais menores que 6 mm (CAIXETA *et al.*, 2009; FAGUNDES *et al.*, 2011) são menos competentes e ovócitos obtidos de folículos pré-antrais não têm competência para a produção de embriões. Mas, apesar de ainda não serem competentes, os ovócitos inclusos em folículos pré-antrais são uma fonte muito importante de gametas a ser utilizada para a produção *in vitro* de embriões. Então, para a maximização deste potencial reprodutivo,

especialmente em vacas, é importante investigar e compreender os eventos epigenéticos pelos quais passam os gametas para estarem aptos à fecundação e formação de um embrião viável (REIK, WALTER, 2001a; ALLEGRUCCI *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2005).

Portanto, quanto melhor conhecermos e entendermos a reprogramação epigenética e toda a regulação gênica que acontece durante a ovogênese e foliculogênese, maior será nossa capacidade de desenvolver melhores sistemas de produção de embriões viabilizando cada vez mais as biotécnicas de reprodução assistida.

Neste estudo foram eleitos dois genes, o IGF2 e o XIST, para análise do perfil epigenético em ovócitos obtidos de folículos pré-antrais de vacas. A hipótese deste trabalho é que o padrão de metilação no DNA difere em ovócitos oriundos de diferentes estágios de desenvolvimento do folículo pré-antral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovogênese e foliculogênese

O processo da formação do ovócito de mamíferos se inicia durante a vida fetal (FAIR, 2003) quando as células germinativas primordiais (CGP), que estão localizadas na parede do saco vitelínico, migram para o mesênquima da crista genital e colonizam as gônadas em desenvolvimento (FARIN *et al.*, 2007; AERTS, BOLS, 2008). Neste momento perdem sua capacidade de movimentação, multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em ovogônias (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005; SADEU *et al.*, 2006). Após sucessivas divisões mitóticas antes do nascimento, o DNA das ovogônias é replicado e estas células entram em meiose, tornando-se um ovócito primário (AERTS, BOLS, 2008). Estes ovócitos primários passam pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno e páram na fase de diplóteno da prófase I da meiose I. Nesta fase da meiose os cromossomos se condensam e formam uma estrutura nuclear conhecida como vesícula germinativa (VG), permanecendo retido neste estágio até uma estimulação hormonal na puberdade (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005).

A foliculogênese inicia-se durante a vida fetal (FAIR, 2003), sendo a principal função do folículo proporcionar o ambiente adequado ao crescimento e maturação do ovócito, para que no momento da ovulação este esteja apto à fecundação e competente para gerar um embrião.

Logo após a formação dos ovócitos primários, estes são circundados por uma camada de 4 a 8 células epiteliais achatadas e uma lâmina basal intacta, formando efetivamente a primeira categoria de folículos (FAIR, 2003; RODGERS, IRVING-RODGERS, 2010). Os folículos primordiais constituem o “pool” de reserva finita de folículos quiescentes e sua formação é concluída em aproximadamente 90 dias de gestação em fetos bovinos (YANG, FORTUNE, 2008). Todos os dias, um grupo de folículos primordiais é ativado e entra no “pool” de crescimento tornando-se folículos primários, sendo caracterizados por uma camada de 11 a 20 células somáticas cubóides ao redor do ovócito (RODGERS, IRVING-RODGERS, 2010). Van den Hurk

e Zhao (2005) sugerem que os folículos primordiais iniciam o desenvolvimento com base na ordem em que são formados.

O desenvolvimento até folículo secundário também está associado com os primeiros sinais da síntese de RNA e acúmulo de proteínas pelo ovócito (FAIR, 2003). A transição para folículo secundário é caracterizada pelo aparecimento da segunda camada de células da granulosa, início do acúmulo de glicoproteínas ao redor do ovócito para a formação da zona pelúcida e de grânulos corticais dentro do citoplasma dos ovócitos (RODGERS, IRVING-RODGERS, 2010).

Quando o folículo apresenta intenso desenvolvimento das células da granulosa e uma cavidade com fluido se forma, passa a ser denominado folículo terciário ou antral. Neste estágio, as células foliculares tornam-se mais proliferativas já apresentando as células da teca interna e externa, lâmina basal e células do cumulus, assim como a síntese de fluido, entre as células da granulosa (FAIR, 2003; VAN DEN HURK, ZHAO, 2005). O preenchimento de fluido formando uma cavidade ou antro é característico de folículo terciário. Com o desenvolvimento do folículo, a produção do fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, sendo associado com o aumento no tamanho do folículo (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005).

Durante toda a fase do desenvolvimento folicular o ovócito também cresce e se diferencia, mas ainda está retido na fase de diplóteno da prófase I da meiose I. No decorrer do desenvolvimento do ovócito, ocorre um aumento da síntese de proteínas e no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas (revisto por FERREIRA *et al.*, 2009). Em nível bioquímico, o ovócito sintetiza e acumula RNAm e proteínas que serão usados no momento da maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial até a ativação genômica do embrião (revisto por FAIR, 2003; DODE, 2006; WRENZYCKI *et al.*, 2007). O acúmulo de numerosas vesículas pela membrana, grânulos de glicogênio, proteínas e gotículas de lipídeos é indicativo de armazenamento e transporte molecular através da membrana do ovócito. Outra mudança marcante observada durante o crescimento do ovócito é a secreção de glicoproteínas de membrana (ZP1, ZP2 e ZP3) constituindo a zona pelúcida (ZP), que forma uma camada protetora ao redor do ovócito (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005).

Com o pico pré-ovulatório do Hormônio Luteinizante (LH) ou remoção do ovócito do ambiente folicular, espontaneamente a meiose é reiniciada, resultando no rompimento do núcleo do ovócito e liberação do nucleoplasma dentro do citoplasma, um processo conhecido como quebra da vesícula germinativa (AERTS, BOLS, 2008). Nesta etapa ocorre a condensação dos cromossomos, progressão para as fases de metáfase I, anáfase I, telófase I e expulsão do primeiro corpúsculo polar, caracterizando o fim da meiose I. Consequentemente inicia-se a meiose II e o ovócito pára em metáfase II. Após a ovulação, o ovócito somente retoma a meiose com a fecundação, seguido da expulsão do segundo corpúsculo polar (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005).

2.2 Manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA)

A partir do desenvolvimento de algumas biotécnicas aplicadas a reprodução animal como a inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões e a transferência de embriões, a eficiência reprodutiva pôde ser aumentada, viabilizando e acelerando os resultados dos programas de melhoramento genético animal.

Apesar da grande capacidade de multiplicação obtida com as biotécnicas de reprodução muito ainda pode ser feito, principalmente na PIVE. Um exemplo disso é a utilização dos folículos pré-antrais (FOPA), tendo em vista que o armazenamento de um grande estoque destes folículos no ovário (> 90%) é uma importante fonte de gametas a ser utilizada pelas biotécnicas de reprodução assistida (SAUMANDE, 1981; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Visando o isolamento e o resgate do maior número possível de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais para a produção *in vitro* de embriões e/ou conservação (criopreservação), surge a biotecnologia da Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA). Os primeiros registros na literatura envolvendo isolamento de FOPA ocorreram em camundongos (GROB, 1964) e em bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993) utilizando processos enzimáticos e mecânicos, respectivamente. O procedimento de dissociação ou separação dos folículos pré-

antrais dos demais componentes do estroma ovariano de bovinos utiliza o método mecânico por ser o mais eficiente (LUCCI *et al.*, 2002).

O principal destino destes folículos seria o cultivo *in vitro*, sendo um valioso modelo de estudo para melhor compreender a foliculogênese e ovogênese. Consequentemente, espera-se aumentar a disponibilidade de ovócitos, evitando perdas causadas pela atresia e potencializando a quantidade de material biológico para uso na PIVE e clonagem.

Além da possibilidade do uso direto dos ovócitos para a produção *in vitro* de embriões, a criopreservação é uma importante ferramenta a ser utilizada tanto na conservação de ovócitos e folículos isolados, como de tecidos ovarianos. De acordo com Figueiredo e colaboradores (2007), com as dificuldades encontradas no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados do tecido ou mesmo *in situ*, a criopreservação de fragmentos ovarianos permitiria a sua conservação até que fossem desenvolvidos protocolos eficientes de cultivo *in vitro*.

A criopreservação de tecido ovariano já foi descrita em várias espécies como em camundongos (XU *et al.*, 2009), humanos (ABIR *et al.*, 2008), suínos (BORGES *et al.*, 2009), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004) e bovinos (LUCCI *et al.*, 2004; CELESTINO *et al.*, 2008). Esta ferramenta é indispensável para a conservação de material genético de espécies ou raças de animais domésticos de interesse zootécnico, bem como de mamíferos silvestres na formação de bancos de germoplasma, importantes na manutenção da variabilidade genética e preservação da biodiversidade. Além disso, mulheres com problemas reprodutivos ou submetidas a tratamentos de radio e/ou quimioterapia podem ter estocados seus gametas para que possam ser utilizados no futuro (ABIR *et al.*, 2008).

A fase pré-antral da ovogênese e foliculogênese é caracterizada pelo início do crescimento e desenvolvimento do ovócito para que no futuro esteja competente para a fecundação. Além disso, o ovócito passa por uma extensa e complexa reprogramação epigenética para estar apto à fecundação e formação de um embrião viável (REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; ALLEGRUCCI *et al.*, 2005).

Então, para a maximização deste potencial reprodutivo, especialmente em vacas, é importante investigar e compreender os eventos genético-bioquímicos que acontecem durante a ovogênese e foliculogênese.

2.3 Epigenética

Embora a estrutura primária do DNA possua toda a informação genética para determinar as características físicas, biológicas e comportamentais de um indivíduo, outra informação herdável, capaz de alterar as características fenotípicas é o conjunto de fatores epigenéticos que regulam o DNA.

A epigenética é uma área da genética que estuda fatores externos e ligados intimamente ao DNA controlando a expressão gênica e o fenótipo celular, não resultando em uma mudança na sequência do DNA e tendo um impacto significativo sobre o desenvolvimento do organismo (SANTOS, DEAN, 2004; SASASKI, MATSUI, 2008; DUPONT *et al.*, 2009).

As modificações epigenéticas constituem uma variedade de mecanismos especiais que determinam o fenótipo sem alterar o genótipo (GOLDBERG *et al.*, 2007). Estas modificações constituem um perfil único em cada tipo celular e definem a identidade celular pelo padrão de expressão gênica. Este perfil epigenético é modificado durante a diferenciação celular e mantido durante a divisão celular, o que garante que a célula filha tenha o mesmo fenótipo da célula mãe (SASASKI, MATSUI, 2008).

2.3.1 Metilação do DNA

Já se conhecem alguns tipos de marcas epigenéticas que controlam a expressão gênica como, metilação do DNA e modificações pós-traducionais que as histonas sofrem como, acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, nitrilação e glicosilação, e que quando combinados, definem a estrutura da cromatina de um gene e sua atividade transcricional (STRAHL, ALLIS, 2000; LI, 2002; DELCUVE *et al.*, 2009).

Dentre estas modificações, a metilação de DNA é a mais conhecida e estudada modificação epigenética do genoma, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento celular, sendo estáveis e herdáveis entre gerações (REIK, WALTER, 2001a).

No genoma de mamíferos, a metilação do DNA ocorre por uma modificação covalente na qual um radical metil (CH_3) liga-se ao carbono 5 da base nitrogenada citosina formando a 5 metilcitosina (5mC). Normalmente está presente em dinucleotídeos CpG, embora Ramsahoye e colaboradores (2000) encontraram, em células tronco embrionárias de camundongos, o genoma contendo sequências de dinucleotídeos CpA, CpT, CpC e CpG metilados. Esta modificação está associada com o controle da transcrição e estabilidade do cromossomo (DEAN *et al.*, 2003). Além disso, está envolvida no desenvolvimento embrionário normal, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina (REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005).

Segundo Miranda e Jones (2007), as ilhas CpG são definidas como regiões do genoma que apresentam mais de 500 pb e que contenham mais de 55% de CG. A maioria das ilhas CpG não estão metiladas e são comumente encontradas em promotores de genes controlando o início da transcrição (ILLINGWORTH, BIRD, 2009; NIEMANN *et al.*, 2010). No genoma de mamíferos, o padrão de metilação do DNA destas ilhas CpG é uma das características de regiões controladoras de *imprinting* (ICR) (EDWARDS, FERGUSON-SMITH, 2007), também chamadas de regiões diferencialmente metiladas (DMR) (CHAO, D'AMORE, 2008), contribuindo na regulação da expressão dos genes *imprinting* (MATSUZAKI *et al.*, 2010).

A metilação do DNA é um processo dinâmico que é catalisado por enzimas denominadas DNA-metiltransferases (DNMT), que usam a S-adenosil-metionina (SAM) como doador de grupamentos metil. Quando esse grupamento metil é removido para a 5 metilcitosina, o SAM é convertido para S-adenosil-homocisteína (SAH) (LI, 2002; MIRANDA, JONES, 2007; KOTSOPOULOS *et al.*, 2008), a qual é um potente inibidor da maioria das DNA metiltransferases. Já foi visto que a deficiência de alguns substratos alimentares (colina, metionina, ácido fólico e outras vitaminas do complexo B), que estão envolvidos no fornecimento de um carbono para ser transferido para a homocisteína e conseqüentemente formar metionina para ser convertida em SAM, resulta não apenas na hipometilação do DNA, mas principalmente na alteração da expressão gênica (SINCLAIR *et al.*, 2007; KOTSOPOULOS *et al.*, 2008).

As ilhas CpG são o principal alvo para a família das enzimas DNA-metiltransferases, sendo as principais a DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. No início do desenvolvimento embrionário, o genoma é desmetilado até o estágio de 8 a 16 células em camundongos (DEAN *et al.*, 2003) e posteriormente as DNMT3a e DNMT3b tem a função de remetilizar o mesmo, num processo conhecido como metilação *de novo*. Este processo estabelece um novo padrão de metilação para um correto desenvolvimento embrionário. De qualquer forma, o aumento dos níveis destas enzimas nas células embrionárias não significa um aumento na metilação em todo o DNA (LI, 2002), sendo que regiões do genoma que apresentarem desprovidas de metilação permanecem não metiladas durante a proliferação celular (LI *et al.*, 2007).

A DNMT1, a principal metiltransferase de manutenção, está relacionada com o estabelecimento da metilação na nova molécula de DNA hemi-metilada nas células somáticas durante cada ciclo de divisão celular (LI, 2002; BOGDANOVIĆ, VEENSTRA, 2009). No entanto, Hirasawa e colaboradores (2008) observaram em camundongos, que diferentes isoformas da DNMT1 (DNMT1o e DNMT1s) participam na manutenção da metilação *imprinting* em embriões pré-implantação. Já em bovinos, é encontrado apenas a isoforma DNMT1s que também é visto no desenvolvimento ovocitário e embrionário (LODDE *et al.*, 2009).

Outras DNA metiltransferases foram identificadas em mamíferos, como a DNMT2 e DNMT3L. A DNMT2, diferentemente das DNMT1, DNMT3a e DNMT3b que possuem função catalítica e regulatória, exibe apenas função catalítica e apresenta mais atividade metiltransferase em RNAt do que em DNA (JELTSCH *et al.*, 2006; SCHAEFER, LYKO, 2010). No entanto, a DNMT3L é uma proteína reguladora que se liga às DNMT3a e DNMT3b modulando sua atividade catalítica, mas ela própria não apresenta atividade enzimática. É expressa apenas em células germinativas e no estágio onde ocorre metilação *de novo* (HATA *et al.*, 2002; KANEDA *et al.*, 2004; SCHAEFER *et al.*, 2007).

2.3.2 Modificações em Histonas

No núcleo das células eucarióticas, os cromossomos são organizados na forma de cromatina, que é composta de DNA, RNA e proteínas (TSUNAKA *et al.*, 2005). Os nucleossomos são as unidades básicas da cromatina, sendo compostos por um octâmero formado de duas cópias cada uma das quatro histonas, H2A, H2B, H3 e H4, e que estão associados a uma molécula de histona externa ao nucleossomo, a H1 (HAPPEL, DOENECKE, 2009).

As histonas apresentam extremidades aminoterminais que se projetam do nucleossomo, chamadas de caudas das histonas. As caudas das histonas consistem em 15-30 aminoácidos nas regiões N-terminais de todas as quatro histonas e na região C-terminal de H2A (LEWIN, 2009). Essas caudas estão sujeitas a algumas modificações epigenéticas já conhecidas como acetilação e metilação de lisina e arginina, ubiquitinação de lisina e fosforilação de serina (SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005; KOUZARIDES, 2007). Também podem ser vistas alterações extras, como metilação em lisinas e arginas em diferentes formas: mono, di ou trimetilação para lisina e mono e dimetilação (simétrica ou assimétrica) para arginina (KOUZARIDES, 2007). Outras modificações, tais como monoubiquitinação ou sumoilação também ocorrem, porém são menos caracterizadas (LEWIN, 2009).

A combinação do “status” de acetilação, fosforilação e metilação na cauda das histonas determina a atividade de um gene (LI, 2002). A acetilação ocorre em todas as quatro histonas, tendo como principal alvo as lisinas. Uma histona acetilada significa uma cromatina menos compactada, portanto mais acessível aos fatores de transcrição (LEWIN, 2009). Enzimas capazes de acetilar histonas são denominadas de histonas acetiltransferases (HAT). Segundo Lewin (2009), existem dois grupos de enzimas HAT: um grupo que atua em histonas na cromatina, estando envolvido no controle da transcrição; e outro grupo que atua em histonas recém sintetizadas no citosol, estando envolvido na montagem do nucleossomo.

A retirada do grupo acetil das histonas, ou seja, a desacetilação, está associada com a repressão da atividade gênica (WANG *et al.*, 2001), visto que a cromatina fica mais compactada dificultando o acesso dos fatores de transcrição ao

DNA. Enzimas capazes de desacetilar histonas são denominadas de histonas desacetilases (HDAC).

A metilação, tanto de histonas como do DNA, estão envolvidas no controle da expressão gênica de mamíferos e relacionadas com a formação da heterocromatina, podendo ser reversível (CEDAR, BERGMAN, 2009). Além disso, a metilação do DNA e as modificações em histonas estão correlacionadas. É visto que a metilação nas histonas contribui para direcionar as DNA metiltransferases a metilar o DNA onde estas histonas se localizam, e a metilação do DNA pode servir como padrão para algumas das modificações em histonas, após a replicação do DNA (CEDAR, BERGMAN, 2009; CHENG, BLUMENTHAL, 2010).

A fosforilação é outra modificação pós-traducional que tem consequências importantes para a compactação da cromatina (KOUZARIDES, 2007) e também um papel importante na mitose (ciclo celular) e apoptose (AHN *et al.*, 2005; FISCHLE *et al.*, 2005; SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005).

O conjunto de todas essas modificações é conhecido como Código das Histonas (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Estas modificações pós-traducionais nas histonas são capazes de alterar a carga da molécula da proteína, e como resultado, são potencialmente capazes de modificar as propriedades funcionais dos octâmeros. Portanto, estão relacionadas com o grau de compactação dos nucleossomos. Se a estrutura da cromatina estiver menos condensada é chamada de eucromatina já se estiver mais condensada de heterocromatina (GRIFFITHS *et al.*, 2008; CEDAR, BERGMAN, 2009).

2.3.3 Imprinting genômico

O fenômeno “imprinting” genômico foi descoberto a quase 30 anos em mamíferos (McGRATH, SOLTER, 1984). É um mecanismo que consiste na expressão diferencial dos alelos de um gene de acordo com sua origem parental, ocorrendo uma expressão monoalélica. Ou seja, quando o gene *imprinted* tem o alelo materno inativado por fatores epigenéticos, impedindo sua transcrição, ocorre expressão monoalélica pelo alelo paterno. O mesmo é visto quando herdado o alelo

imprinted paterno, com expressão do alelo materno. Mas esta marcação epigenética é apagada na formação dos gametas, onde ambos alelos vão ser reprogramados de acordo com o sexo do feto (REIK *et al.*, 2001; REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005).

O principal mecanismo epigenético que regula a expressão dos genes *imprinted* é a metilação do DNA (REIK, WALTER, 2001a). É um processo que resulta na adição enzimática de grupos metil em dinucleotídeos CpG simétricos, sendo que estes contribuem para bloquear o acesso dos fatores de transcrição ao promotor ou mesmo alteram a estrutura da cromatina, então dificultando a transcrição (BILIYA, BULLA JR, 2010).

Os genes *imprinted* estão localizados em “clusters” e geralmente são controlados por elementos que se ligam na região controladora de *imprinting* (ICR) (EDWARDS, FERGUSON-SMITH, 2007). Um desses elementos envolvidos no controle da expressão é a proteína CTCF, que se liga em ICR não metiladas ou hipometiladas bloqueando a transcrição (MATSUZAKI *et al.*, 2010) (Figura 4). De acordo com Kim e colaboradores (2009), as ICR são sequências de DNA ricas em CpG que são metiladas em um dos dois gametas parentais. Esta metilação *imprinting* é adquirida durante a gametogênese, sendo que antes da determinação do sexo, os *imprinting* parentais são apagados nas células germinativas na gônada fetal. Como o embrião desenvolve em macho ou fêmea, o *imprinting* gamético é colocado em genes *imprinted* paternos durante a produção de espermatozóides ou genes *imprinted* maternos durante a formação dos ovócitos. Após a fecundação, esta metilação *imprinted* é mantida no mesmo cromossomo parental através das divisões celulares (KIM *et al.*, 2009).

A explicação mais aceita para a existência do *imprinting* genômico é a teoria do “conflito genético” (HAIG, GRAHAM, 1991; MOORE, HAIG, 1991), que também é considerado como um efeito evolutivo em mamíferos (BEAUDET, JIANG, 2002; WALTER, PAULSEN, 2003; HUTTER *et al.*, 2010). Um exemplo disso envolve os genes IGF2 e H19, que são intimamente ligados em um “cluster” de genes *imprinted*. O IGF2 tem o alelo paternal ativo contribuindo para o crescimento fetal, enquanto que o alelo materno do H19 é ativo e expressa um RNA não codificante que tem propriedades de inibir a transcrição do IGF2, assim regulando o crescimento fetal

(KAFFER *et al.*, 2001). Portanto, apresentando uma expressão monoalélica desses genes após a fecundação. Isto sugere que o interesse paternal é na otimização de seus alelos para adquirir maior quantidade possível de nutrientes, assim garantindo descendentes maiores e mais fortes. No entanto, o interesse das fêmeas é de restringir o crescimento fetal, assim assegurando sua sobrevivência e do feto, possibilitando uma vida reprodutiva mais longa (REIK, WALTER, 2001b).

2.4 Reprogramação epigenética na ovogênese e desenvolvimento embrionário

As modificações epigenéticas no genoma como a metilação do DNA e as modificações na cromatina são relativamente estáveis e herdáveis em células somáticas, mas em células germinativas e no período inicial do desenvolvimento embrionário em mamíferos elas sofrem uma reprogramação em todo o genoma (REIK *et al.*, 2001; HAJKOVA *et al.*, 2002). Portanto, em embriões de mamíferos ocorrem dois eventos de reprogramação epigenética no genoma, um no início do desenvolvimento do embrião e outro em suas células germinativas, que são essenciais para formação de gametas aptos à fecundação e consequentemente formação de um embrião viável (REIK *et al.*, 2001; REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005).

Com a fecundação, os genomas paterno e materno sofrem uma rápida reprogramação, mas em tempos diferentes. O genoma do espermatozóide é mais metilado que o do ovócito e desmetilado primeiro (OSWALD *et al.*, 2000). Inicialmente, em camundongos, ocorre uma desmetilação no pronúcleo masculino, sendo um processo de desmetilação ativa, onde seus cromossomos descondensam e remodelam a cromatina, substituindo as protaminas por histonas maternas (MAYER *et al.*, 2000; KIMMINS, SASSONE-CORSI, 2005; ABDALLA *et al.*, 2009). Em bovinos, o genoma paternal também sofre desmetilação ativa e modificações na cromatina como nos roedores (PARK *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007). No entanto, no genoma materno, a metilação é mantida até o início da clivagem quando o DNA sofre replicação, ocorrendo desmetilação passiva em cada ciclo mitótico (ROUGIER *et al.*, 1998). Esta desmetilação passiva no genoma maternal pode ser devido a

ausência da enzima de manutenção (DNMT1) no núcleo DNMT1 durante as divisões celulares (CARDOSO, LEONHARDT, 1999), já que a é relacionada com a manutenção do padrão de metilação dos genes durante a divisão celular (HIRASAWA *et al.*, 2008; LODDE *et al.*, 2009). Os genes *imprinted* permanecem altamente metilados, protegidos da desmetilação, sendo, portanto preservados no início do desenvolvimento embrionário (LI, 2002).

Após esse processo de desmetilação, inicia-se um evento de metilação *de novo*, mais intensamente na massa celular interna (MCI), no estágio de blastocisto em camundongos (YANG *et al.*, 2007). Enquanto que em embriões bovinos isto acontece no estágio de 8 a 16 células, concomitantemente com a ativação do genoma embrionário (DEAN *et al.*, 2001). As células da MCI terão um padrão hipermetilado em relação às células do trofoblasto. Isto indica um papel importante da metilação na diferenciação das linhagens celulares (SANTOS *et al.*, 2002).

Entre os tecidos somáticos que derivam da MCI estão as células germinativas primordiais (CGP) (GINSBURG *et al.*, 1990), altamente metiladas, responsáveis pelo segundo ciclo da reprogramação epigenética. Estas células estão localizadas inicialmente na parede do saco vitelínico e migram para o mesênquima da crista genital colonizando as gônadas em desenvolvimento (FARIN *et al.*, 2007; AERTS, BOLS, 2008), aonde vão se transformar em gametas, concluindo o complexo ciclo da reprogramação epigenética.

No decorrer do desenvolvimento das células germinativas, durante a migração para a crista genital, ocorre uma redução ou perda do padrão de metilação de regiões *imprints* e não *imprints* do genoma (HAJKOVA *et al.*, 2002) para a formação de uma nova geração de gametas de acordo com o sexo do indivíduo em formação. Morgan e colaboradores (2005) sugerem que pode haver uma desmetilação ativa nesta etapa, mas não se sabe se existe semelhança no mecanismo de desmetilação ativa entre as CGP e o zigoto.

Em camundongos, após a desmetilação, o reestabelecimento da metilação ocorre depois do nascimento, durante a diferenciação em ovogônias e crescimento do ovócito dentro do folículo recrutado (HAJKOVA *et al.*, 2002). Durante este evento em camundongos é visto o reestabelecimento da metilação *imprinting* e não *imprinting* (REIK *et al.*, 2001; DEAN *et al.*, 2003). Apesar de haver evidências

significativas sobre os eventos da reprogramação epigenética nas CGP de camundongos, pouco ainda se sabe sobre o tempo preciso em que essas modificações epigenéticas ocorrem no início do desenvolvimento, principalmente em espécies domésticas como em bovinos.

O reestabelecimento do padrão de metilação do DNA durante a gametogênese é parcialmente dependente da DNMT3L, por ela ser uma proteína que regula a ação das DNMT3a e DNMT3b que são necessárias para a remetilação de ICRs em ovócitos (KANEDA *et al.*, 2004; SCHAEFER *et al.*, 2007). De acordo com isto, Hata e colaboradores (2002) sugerem que a deficiência da DNMT3L desestabiliza a cooperação com as DNMT3a e DNMT3b e consequentemente prejudica a estabilidade para a metilação *de novo* de genes *imprinted* no gameta feminino. Outra enzima candidata a estabelecer o padrão de metilação nas células germinativas é a DNMT1 (MERTINEIT *et al.*, 1998). Mas segundo Howell e colaboradores (2001), a inativação da DNMT1 em ovócitos não desestabiliza a metilação de genes *imprinted* no gameta, mas afeta a manutenção do *imprinting* em embriões pré-implantação.

Portanto, com o reestabelecimento da metilação na gametogênese, serão formadas células altamente especializadas que levarão todas as informações necessárias para o início de um novo ciclo de vida após a fecundação.

2.5 O gene IGF2

O gene Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2 (IGF2) está localizado no cromossomo 29 (29qter) do genoma bovino (Figura 1), possuindo um comprimento total de 18.606 pb, codificando um RNA mensageiro de 3.824 nucleotídeos, uma forma alternativa de 2.294 nucleotídeos e um microRNA (mir-483) de 68 nucleotídeos já descritos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281240>) (Figura 2).

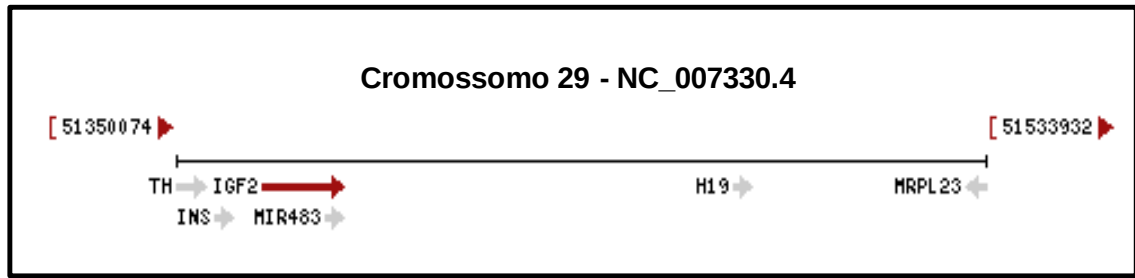


Figura 1 - Localização do gene IGF2 (seta vermelha) no cromossomo 29 de bovino. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281240>.

O gene codifica um fator de crescimento que desempenha papel fundamental na diferenciação dos tecidos, no crescimento fetal (DeCHIARA *et al.*, 1990; CURCHOE *et al.*, 2005) e desenvolvimento da placenta (CONSTÂNCIA *et al.*, 2002; SIBLEY *et al.*, 2004). É um gene *imprinted* identificado e bem estabelecido em algumas espécies de mamíferos como em bovinos (GOODALL, SCHMUTZ, 2003; DINDOT *et al.*, 2004), humanos (BRISSENDEN *et al.*, 1984), camundongos (DeCHIARA *et al.*, 1991; CASPARY *et al.*, 1998), suínos (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2004), ovinos (ANSARI *et al.*, 1994).

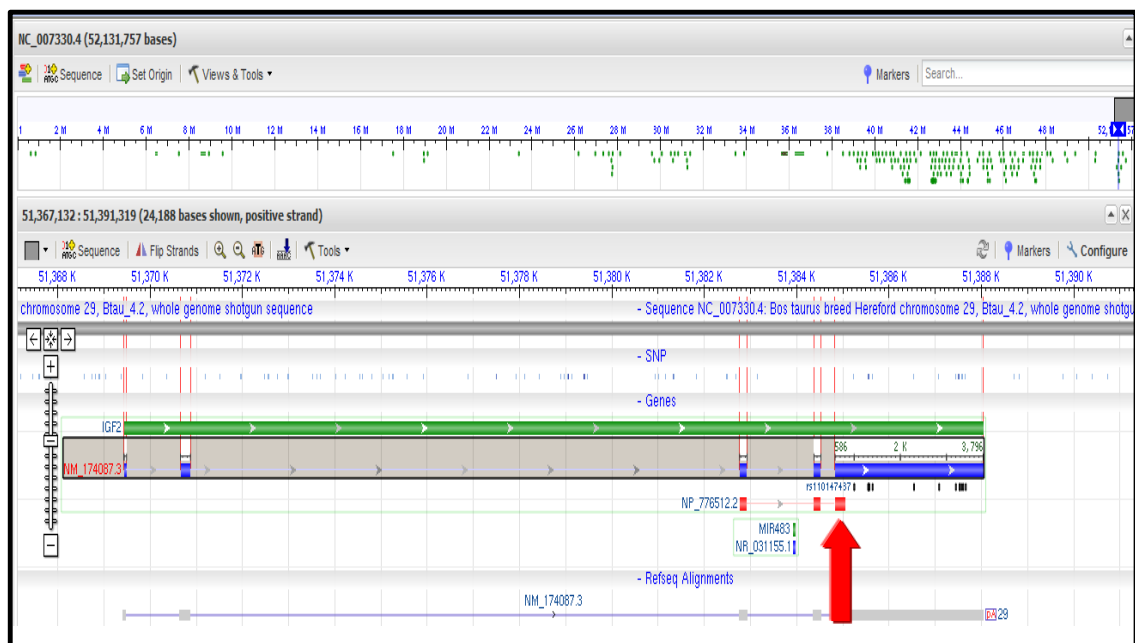


Figura 2 - Estrutura genômica do gene IGF2. Em verde o comprimento total do gene (18.606 pb); em azul o RNA mensageiro (3.824 nucleotídeos); em vermelho a forma alternativa (2.294 nucleotídeos). A seta vermelha indica a posição dos iniciadores na ilha CpG estudada. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281240>.

Por ser um gene *imprinted* apresenta expressão monoalélica, sendo um padrão de metilação diferencial entre os alelos parentais um dos principais mecanismos de sua regulação (REIK, WALTER, 2001a). No genoma de mamíferos já é conhecido que a metilação do DNA ocorre principalmente em ilhas CpG, sendo a presença destas ilhas uma das características das regiões controladoras de *imprinting* (ICR), encontradas em sua maioria em promotores de genes (EDWARDS, FERGUSON-SMITH, 2007). Estas regiões, também chamadas de regiões diferencialmente metiladas (DMR) (CHAO, D'AMORE, 2008) contribuem na regulação da expressão dos genes *imprinted* (MATSUZAKI *et al.*, 2010).

Em camundongos, o gene IGF2 é controlado por três DMR bem definidas (MOORE *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2003; MURREL *et al.*, 2004). A DMR0 está localizada em um promotor placenta-específico (éxon 1) e metilada no alelo materno. Já as DMR1 e DMR2 apresentam metilação no alelo paterno, sendo que a primeira está localizada 3 kb *upstream* ao promotor fetal e a segunda presente dentro do último éxon (éxon 6 em camundongo) do gene. Uma quarta DMR, também com o alelo paterno metilado, localizada na região 5' do gene H19, interage diretamente com as outras 3 DMRs do gene IGF2 regulando a expressão tanto do gene H19 quanto do IGF2 (MOORE *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2003; MURREL *et al.*, 2004) (Figura 3).

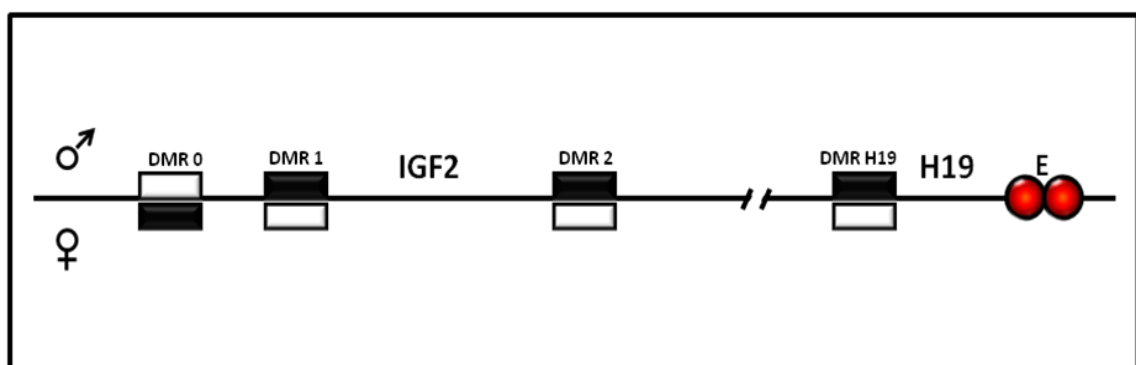


Figura 3 - Modelo representando as DMR dos genes IGF2 e H19 em camundongos. As quatro DMR (retângulos) com seus alelos materno (♀) e paterno (♂) e suas metilações preferenciais em preto (metilado) e branco (desmetilado); E-“enhancers”. (Adaptado de LOPES *et al.*, 2003; MURRELL *et al.*, 2004).

Os genes *imprinted* IGF2 e H19 estão localizados adjacentes no cromossomo 29 (Figura 1) e compartilham um mesmo *enhancer*, localizado em uma região *downstream* dentro do gene H19 (REIK, WALTER, 2001a), sendo que a interação entre o *enhancer* e os promotores dos dois genes é determinada pelo padrão de metilação das DMR.

Um modelo proposto para o controle da expressão dos dois genes está exemplificado na Figura 4. Caso a DMRH19 esteja desmetilada, proteínas isoladoras conhecidas como CTCF se ligam a essa região e este complexo se aproxima fisicamente da DMR1 não metilada do IGF2. Com isto, o *enhancer* fica distante do promotor do gene IGF2, que está dentro do *loop*, ativando assim o promotor do H19. Este padrão acontece no alelo materno. No alelo paterno, a DMRH19 se encontra metilada não ocorrendo a ligação de CTCF. Com isso aumenta sua afinidade pela DMR2 metilada do IGF2, movendo o IGF2 para dentro do domínio da cromatina ativa. Isto aproxima o *enhancer* ao promotor do IGF2 ativando sua expressão e bloqueando a expressão do gene H19, mesmo este estando no domínio ativo (YANG *et al.*, 2003; MURREL *et al.*, 2004). Como resultado o IGF2 apresenta expressão monoalélica pelo alelo paterno e o H19 pelo alelo materno (Figura 4).

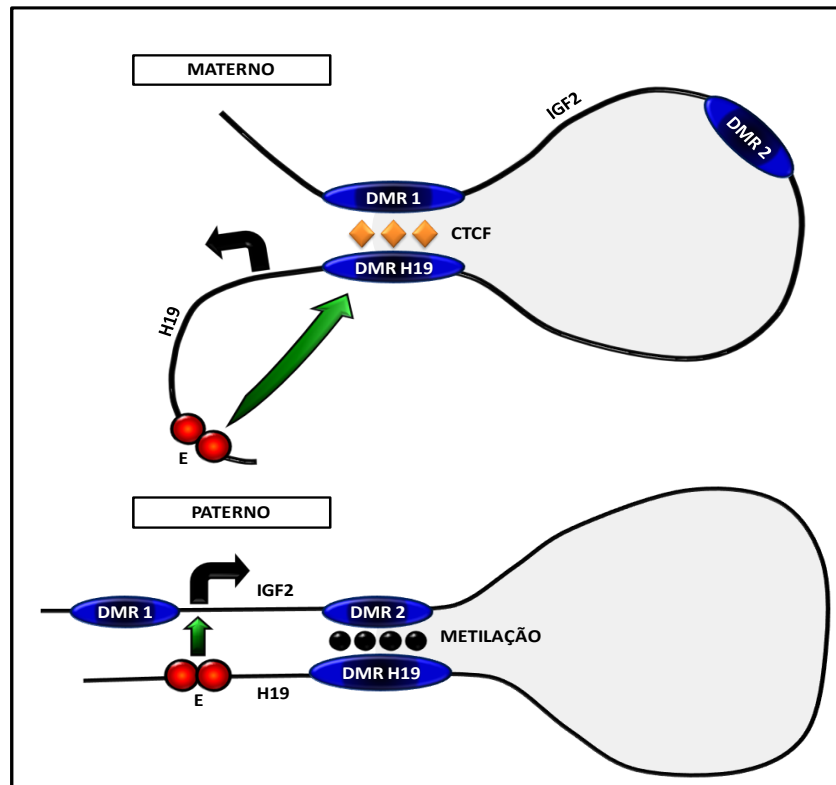


Figura 4 - Modelo ilustrativo mostrando a interação entre as DMR dos genes IGF2 e H19. Em ambos os alelos ocorre a formação de uma região com expressão reprimida (área em cinza). No alelo materno, a DMR1 do IGF2 e a DMRH19 interagem. O promotor do H19 é ativado pelo *enhancer* (círculos vermelhos). No alelo paterno, ocorre a interação entre a DMR2 do IGF2 e a DMRH19. O *enhancer* se aproxima da região promotora do IGF2 e induz sua expressão. (Adaptado de MURRELL *et al.*, 2004; FAGUNDES, 2009).

2.6 O gene XIST

Em 1991 foi identificado um gene candidato para a região denominada Centro de inativação do X (XIC) do cromossomo X em humanos e camundongos (BROCKDORFF *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1991). Foi observado que este gene era expresso apenas nas fêmeas e também apenas pelo alelo do cromossomo X inativo. O gene foi denominado de Transcrito específico do cromossomo X inativo (XIST) (BROCKDORFF *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1991).

O gene XIST está localizado no cromossomo X do genoma bovino (Figura 5), possuindo um comprimento total de 36.535 pb, tendo como principal característica a transcrição de um RNA *anti-sense* de 22.812 nucleotídeos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>) (Figura 6).

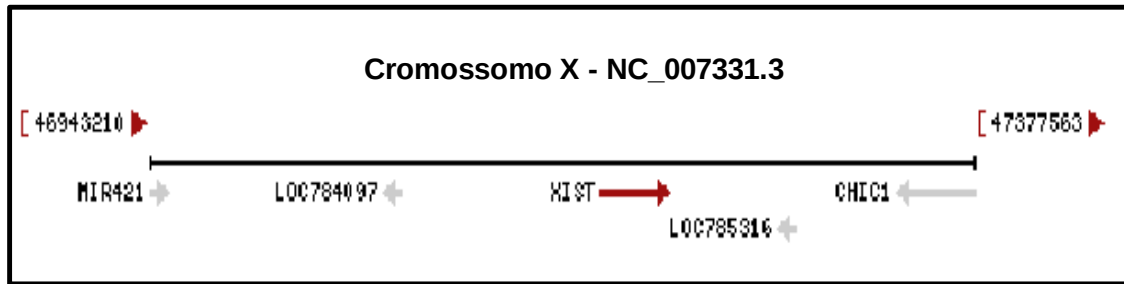


Figura 5 - Localização do gene XIST (seta vermelha) no cromossomo X de bovino. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>.

É um RNA não codante, encontrado no núcleo com a função de iniciar o mecanismo de inativação do cromossomo X (XCI) (BROCKDORFF, 2002; LIU *et al.*, 2008; AGRELO, WUTZ, 2009). Essa inativação do cromossomo X ocorre para equalizar a dosagem de genes ligados ao X em fêmeas (XX), em relação aos machos (XY), sendo primeiramente descrito por Lyon (1961).

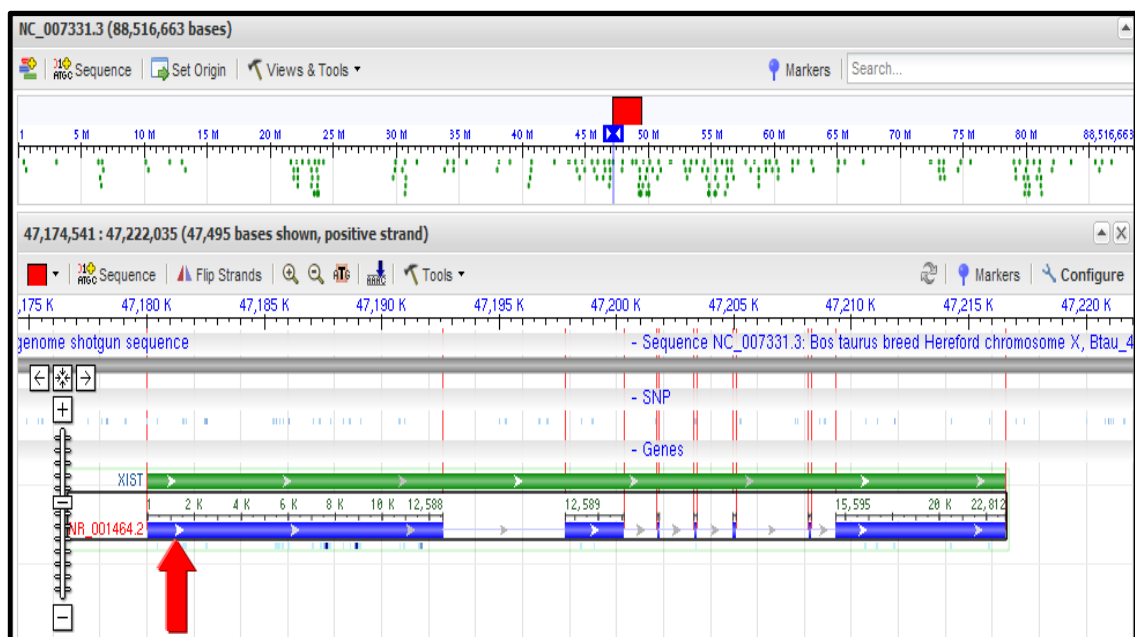


Figura 6 - Estrutura genômica do gene XIST. Em verde o comprimento total do gene (36.535 pb); em azul o RNA mensageiro (22.812 nucleotídeos) A seta vermelha indica a posição dos *primers* na ilha CpG estudada. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338325>.

O XIST é unicamente expresso em tecidos de fêmeas pelo cromossomo X a ser inativado (KAY, 1998). Contudo, o início da sua transcrição ocorre, em níveis

baixos, em ambos os cromossomos X ativos, até que os transcritos se acumulem e atuem no futuro cromossomo X a ser inativado (KAY, 1998). Embora o XIST seja essencial para a função do XIC, outros genes agem nesta região podendo regular a expressão do XIST (LEE *et al.*, 1999; OGAWA, LEE, 2003). Baseado nisto, outro gene já foi identificado, estando localizado a 15 kb *downstream* ao XIST em camundongos (LEE *et al.*, 1999). O gene apresenta uma transcrição no sentido contrário ao XIST, ou seja, transcreve um RNA *anti-sense* que sobrepõe completamente ao gene XIST, e por causa desta orientação reversa o nome do gene foi denominado TSIX (LEE *et al.*, 1999; SENNER, BROCKDORFF, 2009). O RNA TSIX é encontrado exclusivamente no núcleo e localizado na região XIC. Além disso, antes da inativação do X ele é visto expresso nos dois cromossomos X e sua expressão sendo associada ao cromossomo X que permanecerá ativo e persistindo até que o gene XIST seja silenciado nesse cromossomo (LEE *et al.*, 1999; SENNER, BROCKDORFF, 2009).

O TSIX por sua vez, é regulado pelo XITE (*X inactivation intergenic transcription elements*), que também transcreve um RNA *anti-sense* não codante estando localizado no *locus* XCE (*X controlling element*) *downstream* ao TSIX. O XITE é apontado como um dos principais candidatos na escolha de qual cromossomo X será inativado, pelo fato de permitir que o TSIX persista sua expressão sobre o futuro cromossomo X ativo (OGAWA, LEE, 2003; TASAI *et al.*, 2008). Segundo Brockdorff (2002), outros fatores estão envolvidos na inativação do cromossomo X como, metilação do DNA, modificações em histonas e recrutamento de proteínas específicas.

Em mamíferos, no início do desenvolvimento embrionário, os dois cromossomos X estão ativos, sendo que ambos têm a mesma probabilidade de ser silenciado (WUTZ, GRIBNAU, 2007). A primeira inativação é vista nas duas primeiras linhagens celulares originadas, trofotoderma e endoderma primitivo de blastocisto. No tecido extra-embrionário, é vista a inativação do cromossomo X de origem paterna (Xp) e sendo este padrão mantido no decorrer do desenvolvimento. Já nas células do epiblasto, derivadas da massa celular interna (MCI), a inativação do X é aleatória, afetando tanto o Xp quanto o Xm (KAY, 1998; OKAMOTO *et al.*, 2004; WUTZ, GRIBNAU, 2007; PANNING, 2008).

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi determinar o padrão de metilação numa DMR presente no último éxon do gene IGF2 e numa DMR presente no exón 1 do gene XIST em ovócitos oriundos de diferentes estágios de desenvolvimento do folículo pré-antral de vacas nelore (*Bos taurus indicus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais

Os ovários de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) foram obtidos de abatedouros no município de Luziânia, Goiás, Brasil. O material biológico foi coletado imediatamente após o abate e transportado 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, a uma temperatura de 35 – 37°C.

Para isolar os folículos pré-antrais, retirou-se o córtex ovariano com auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo os ovários mantidos em placa de Petri com solução salina sobre placa aquecedora a temperatura de 36°C (Figura 7).

Para fragmentar a estrutura do estroma ovariano, os pedaços do córtex foram levados individualmente ao Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, United Kingdom) e cortados em 200, 250, 300 e 350 µm, respectivamente, sendo que em todos os pedaços os cortes foram feitos em três sentidos, longitudinal, transversal e oblíquo. O córtex ovariano fragmentado foi transferido para um tubo de 50 mL contendo solução salina em tampão fosfato (PBS). Em seguida, para promover a dissociação dos FOPA do tecido ovariano, foram realizadas sucessivas pipetagens com pipeta de Pasteur. Por fim, foi realizada uma filtragem usando malha de nylon de 500 µm e a solução foi deixada para decantar por 3 minutos (Figura 7). Utilizando este procedimento, foram isolados folículos primordiais, primários e secundários.

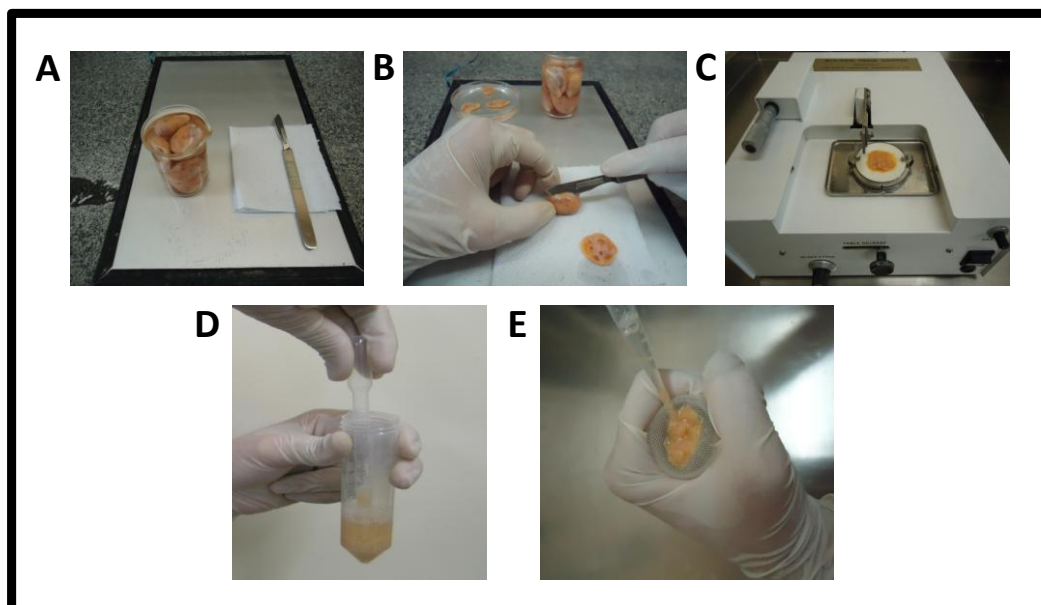


Figura 7 - Procedimento mecânico utilizado para isolar os folículos pré-antrais do estroma ovariano. (A) Ovários e bisturi sobre a placa aquecedora a 37°C. (B) Retirada do córtex ovariano com auxílio do bisturi. (C) Fragmentação da estrutura pelo *Tissue Chopper*. (D) Dissociação dos FOPA do tecido ovariano por repetidas pipetagens. (E) Filtragem usando malha de 500 µm.

O isolamento dos ovócitos inclusos nos folículos pré-antrais foi realizado conforme Monti e colaboradores (2006), com modificações. Após a decantação, retirou-se uma amostra do *pellet* e acrescentou collagenase tipo II (Sigma, Sto Louis, MO, USA) na concentração de 0,5 mg/mL em TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canadá). Incubou-se a solução em banho-maria a temperatura de 37°C por 20 minutos. Adicionou-se albumina de soro bovino, fator V (BSA) (SIGMA®) a 1% diluído em TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canadá) e centrifugou a 190g por 2 minutos. Retirou-se o sobrenadante, mas não todo, deixando também o *pellet* e ressuspendeu com EDTA 2,4 mM para inativar a collagenase e incubou-se novamente em banho-maria a temperatura de 37°C por 3 minutos. Posteriormente, foram realizadas sucessivas pipetagens utilizando pipeta graduada, com a intenção de liberar os ovócitos das células da granulosa.

Depois, a amostra foi colocada em uma placa de Petri e os ovócitos oriundos dos folículos pré-antrais foram localizados e separados utilizando um microscópio invertido Axiovert 135M (Zeiss, Germany), mas apenas foram selecionados ovócitos sem alterações morfológicas e totalmente sem células da granulosa.

Durante o estabelecimento da técnica, utilizou-se em alguns ovócitos a coloração com 5 µg/mL de iodeto de propídeo para a visualização da cromatina na vesícula germinativa. Antes de corar, todas as estruturas foram passadas por cinco gotas de 100 µL e permanecidas na última gota por 5 min. Após, as estruturas foram colocadas em lâminas, vedadas com lamínulas e levadas ao microscópio de fluorescência Axiovert 135M (Zeiss, Germany), para a visualização da fluorescência (Figura 8).

Após os ovócitos serem selecionados, foram fotografados para mensurar o diâmetro sem medir a zona pelúcida e registrados usando o programa Motic Images Plus 2.0. Em seguida, os ovócitos foram separados por tamanho.

Neste experimento utilizou-se ovócitos medindo ≤ 20 µm, oriundos de folículos primordiais, e ovócitos de 65 a 90 µm, oriundos de folículos secundários finais, classificados como grupos A e B, respectivamente. Posteriormente, os ovócitos foram passados várias vezes em gotas de PBS sem cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e armazenados imediatamente em freezer a -80°C para posterior análise molecular.

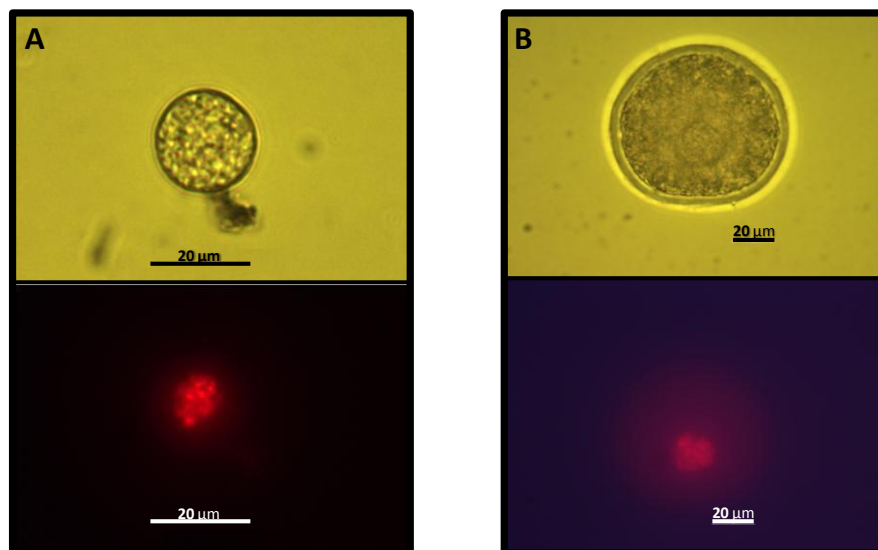


Figura 8 - Ovócitos oriundos de folículos primordiais e secundários finais de vacas Nelore, respectivamente. Abaixo os mesmos corados com iodeto de propídeo indicando a vesícula germinativa. Ovócitos apresentando diâmetro de 20,0 µm (A) e 68,5 µm (B).

4.2 Extração do DNA genômico dos ovócitos

As amostras foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo. A extração do DNA genômico dos ovócitos foi realizada de acordo com o protocolo de Melo e colaboradores (2005), com modificações. Foram colocados em dois tubos de 0,2 mL, 64 e 62 ovócitos referentes aos grupos A ($\leq 20 \mu\text{m}$) e B (65 a 90 μm), respectivamente, em um volume final de 15 μL de PBS. Adicionou-se às amostras a enzima pronase E para promover a digestão da zona pelúcida, em uma concentração final de 10 mg/mL, num volume final de 30 μL . As amostras foram incubadas em termociclador (PXE 0.5 Thermal Cycler, Electron Corporation) a 37°C por 30 minutos. Em seguida acrescentou-se uma gota de óleo mineral em cada uma das duas amostra e a enzima foi inativada a 85°C por 15 minutos no termociclador. Para romper as células e liberar o DNA, foi utilizado um procedimento de choque térmico. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente colocadas no termociclador a 95°C por 1 minuto. Esse procedimento foi realizado por 5 vezes, e finalmente as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para posterior tratamento com bissulfito de sódio.

4.3 Tratamento com bissulfito de sódio

O tratamento do DNA com bissulfito de sódio foi realizado utilizando o kit EZ DNA methylation® (Zymo Research), segundo protocolo fornecido pelo fabricante, apenas com alteração da temperatura de conversão, que foi de 55°C. Basicamente este tratamento consistiu na conversão, mediada pelo bissulfito de sódio, das citosinas não metiladas em uracilas, enquanto que as citosinas metiladas permaneciam no DNA. Após o tratamento, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

4.4 Amplificação por PCR e purificação

Utilizando-se as amostras de DNA dos ovócitos dos grupos A ($\leq 20 \mu\text{m}$) e B (65 a 90 μm) tratadas com bissulfito de sódio, foram realizadas reações de PCR *nested* 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 1.

Tabela 1 - Identificação do Gene, sequências dos iniciadores, acesso no “GenBank”, localização, posição na ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Acesso no “GenBank”	Localização dos iniciadores	Posição da Ilha CpG	Tamanho do amplicon
XIST ** externo	F: GGGTGTTTTTGTGTTAGTGTGTAGTA R:CTTTAATACCCACCCACTAAAATTAATAC	AJ421481.1	1127-1252 1581-1608	éxon 1	482 pb
XIST ** interno	F:TTGTTATATAGTAAAAGATGGT R: ACCAATCCTAACTAACTAAATA	AJ421481.1	1169-1190 1552-1573	éxon 1	405 pb
IGF2 * Externo	F:TGGGTAAGTTTTTTTAAATATGATATT R:TTTAAAACCAATTAATTTTATACATT	X53553.1	243-268 672-697	último éxon (DMR)	455 pb
IGF2 * interno	F:ACATTTTTTAAAAATATTATTCT R:TAATATGATATTTGGAAGTAGT	X53553.1	257-278 655-676	último éxon (DMR)	420 pb

* GEBERT *et al.*,(2006); ** LIU *et al.*, (2008).

A primeira reação de PCR para o gene XIST foi realizada utilizando-se um volume final de 20 μL . Utilizou-se solução tampão 1X; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,4 mM de cada dNTP; 0,5 μM de cada iniciador externo; 1,0 U da enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 3,0 μL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 94°C por 7 min, seguidos de 40 ciclos com 94°C por 45 s, 47°C por 1 min e 30 s, 72°C por 1 min, acrescidos de uma extensão final de 72°C por 15 min.

Para a segunda reação de PCR para o gene XIST, as condições de amplificação, utilizando os iniciadores internos, foram as mesmas utilizadas na

primeira reação, com exceção para a quantidade de DNA molde que aqui foi utilizado 0,5 µL do produto da primeira PCR. As condições de amplificação foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 94°C por 4min, seguidos de 40 ciclos com 94°C por 40 s, 42°C por 45 s, 72°C por 45 s, acrescidos de uma extensão final de 72°C por 15 min.

A primeira reação de PCR para o gene IGF2 foi realizada utilizando-se solução tampão 1X; 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada iniciador externo; 1,0 U da enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 3,0 µL de DNA tratado com bissulfito, em um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguidos de 45 ciclos com 94°C por 40 s, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min, acrescidos de uma extensão final de 72°C por 15 min.

A segunda reação de PCR para o gene IGF2 foi realizada utilizando-se iniciadores internos ao produto amplificado, sob as mesmas concentrações de reagentes da primeira reação e utilizando-se 0,5 µL de produto amplificado na primeira reação. As condições de amplificação também foram iguais à primeira, alterando-se apenas a temperatura de anelamento que aqui foi de 40°C. Todas as reações foram realizadas em termocicladores PXE 0,5 X (Thermo Scientific) e Mastercycler Gradiante (Eppendorf).

Após as reações de PCR, os volumes totais dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e utilizando-se um marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen®). Os produtos foram visualizados e o gel fotografado utilizando-se um fotodocumentador Image Capture 300 (GE®). Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados com o kit Gene Clean III (MP Biomedicals, LLC), seguindo-se as recomendações do fabricante ou utilizando-se um protocolo de precipitação com Acetato de Amônia e Etanol estabelecido no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em seguida, as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®) e uma alíquota de 2µL foi submetida novamente a eletroforese em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio (10mg/mL) para verificação da qualidade do produto purificado.

4.5 Clonagem dos produtos da PCR, sequenciamento e análises das sequências

Os produtos de DNA purificados referentes a cada grupo, A ($\leq 20 \mu\text{m}$) e B (65 a $90 \mu\text{m}$), foram inseridos no vetor pGEM-T Easy (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em células XL-1 Blue por eletroporação (MicroPulser – BIO-RAD®) e a bactéria semeada em placas de Petri 90 x 15 mm contendo meio LB Ágar com ampicilina a $100 \mu\text{g/mL}$, $20 \mu\text{L}$ de X-Gal a 40 mg/mL e $40 \mu\text{L}$ de IPTG a $0,1\text{M}$. As placas foram fechadas, invertidas e vedadas com parafilme e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Logo após, foram acondicionadas a 4°C por 2 horas. Somente as colônias brancas foram selecionadas para serem cultivadas em meio LB com $100 \mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Para isso utilizou-se de palito de madeira autoclavado, retirando-se a colônia com uma das pontas e inserindo em tubo de 15 mL contendo 3mL de meio líquido de cultivo com antibiótico e permanecendo em agitador (New Brunswick Scientific) a 250 rpm, 37°C para crescimento “overnight”. Os conteúdos dos tubos que apresentaram turbidez foram aliquotados em tubos de 1,5 mL. O vetor foi extraído seguindo o protocolo de minipreparação de plasmídeo (SAMBROOK, RUSSELL, 2001) e tratado com RNase $10 \mu\text{g/mL}$ em banho maria a 60°C por 30 min.

Uma alíquota da minipreparação foi utilizada para realizar uma digestão enzimática com a endonuclease ECO RI (Invitrogen®) incubando-se a 37°C por 16 horas, ou como molde para uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores universais T7 e SP6, para a confirmação do fragmento inserido. Para a visualização, os produtos da digestão enzimática ou da PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo a 10 mg/mL .

As amostras que confirmaram o sucesso da clonagem foram purificadas com Acetato de Amônio 7,5 M. Primeiramente adicionou-se água milliQ para obter um volume final de $80 \mu\text{L}$. Logo após, foi acrescentado $20 \mu\text{L}$ de Acetato de Amônio 7,5 M. As amostras foram homogeneizadas, adicionou-se 2,5 vezes o volume de Etanol absoluto gelado ($250 \mu\text{L}$) em relação ao volume da amostra, homogeneizando-se novamente e incubando-se a -20°C “overnight”. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $17000 \times g$ por 15 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o *pellet*

lavado com 200 µL de Etanol 70%. Centrifugou-se novamente com a mesma velocidade por 10 min, o sobrenadante foi descartado e a amostra seca e diluída em 20 µL de água milliQ. Uma nova quantificação foi realizada, utilizando-se o mesmo espectrofotômetro. Para confirmar a quantificação e a qualidade do material purificado, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 2,0% e corado com brometo de etídio 10 mg/mL.

As amostras contendo o fragmento inserido foram diluídas a 100 ng/µL e encaminhadas à plataforma de sequenciamento da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando-se a metodologia de dideoxi com os iniciadores universais T7 e SP6. Após obter as sequências, elas foram analisadas utilizando o programa BiQ Analyzer (BOCK *et al.*, 2005), sendo comparadas com sequências depositadas no “GenBank”, para estabelecer o padrão de metilação das CG. As citosinas não seguidas de guaninas (não CpG) foram avaliadas quanto a taxa conversão e, apenas as sequências que apresentaram uma eficiência de conversão pelo bissulfito $\geq 90\%$ foram consideradas para as análises de metilação.

4.6 Análise estatística

Os dados de quantificação do padrão de metilação foram comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se o teste de *Mann-Whitney*. Todas as análises foram avaliadas utilizando o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996). O padrão de metilação, nos 28 sítios CpG para o gene IGF2 e 17 para o XIST, também foram comparados quanto a quantidade de clones hipermetilados, apresentando $\geq 50\%$ de sítios CpGs metilados na sequência (IMAMURA *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS

Foram utilizados para a extração do DNA genômico e avaliação do padrão de metilação para os genes IGF2 e XIST um total de 127 ovócitos, sendo que 65 ovócitos medindo $\leq 20,0 \mu\text{m}$ e classificados como Grupo A e 62 ovócitos medindo $65,0$ a $90,0 \mu\text{m}$ e classificados como Grupo B (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação dos folículos pré-antrais, número total de ovócito utilizado na extração do DNA e diâmetro dos ovócitos (média $\pm$ desvio padrão).

Folículo	Número total de ovócitos	Diâmetro dos ovócitos (μm)
Primordial	65	$17,98 \pm 0,93$
Secundário final	62	$80,3 \pm 8,31$

Após a PCR para os genes IGF2 e XIST, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese e fotodocumentados. Os produtos amplificados são observados na Figura 9.

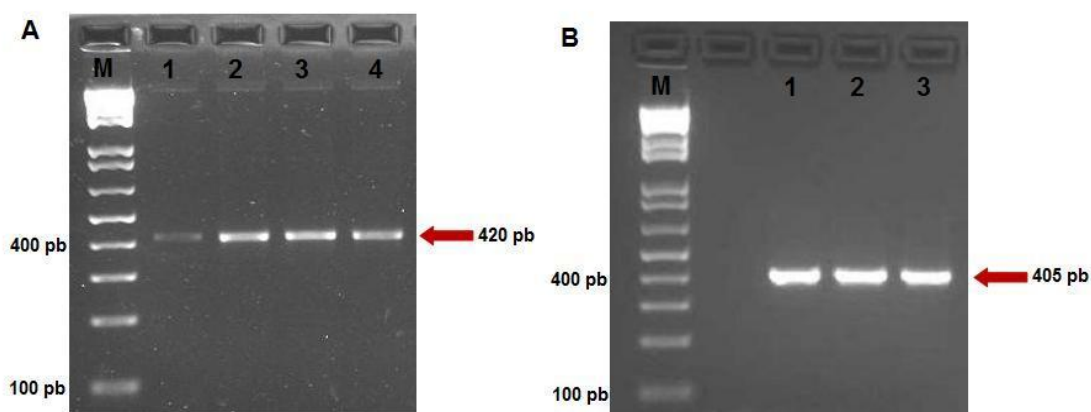


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados após tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio. M - marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). (A) Fragmento de 420 pb referente ao gene IGF2 indicado do 1 ao 4. (B) Fragmento de 405 pb referente ao gene XIST indicado do 1 ao 3.

Após a clonagem, apenas os plasmídeos que apresentaram o fragmento inserido foram enviados para a plataforma de sequenciamento da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para confirmar a ligação dos fragmentos correspondentes à DMR do último éxon do gene IGF2 e também do éxon 1 do gene XIST de bovinos realizou-se a digestão enzimática com a enzima de restrição EcoRI (New England, BioLabs®) como mostrado na Figura 10.

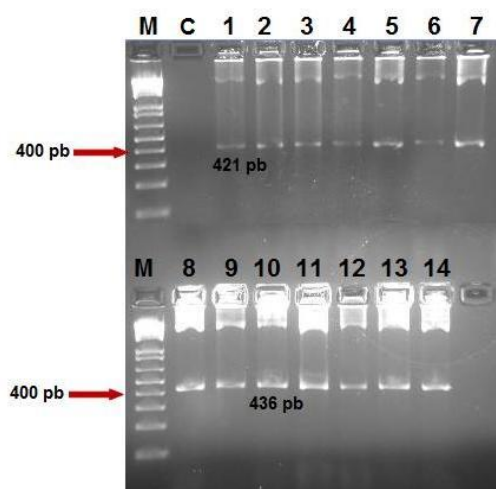


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio para confirmação do fragmento inserido correspondente aos genes XIST e IGF2. M - marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). C - controle negativo. Fragmento de 421 pb referente ao gene XIST indicado do 1 ao 5. Fragmento de 436 pb referente ao gene IGF2 indicado do 6 ao 14.

Também foi utilizado a PCR usando os iniciadores universais T7 e SP6 como outro método, além da digestão com a enzima de restrição EcoRI (New England, BioLabs®), para confirmar a ligação dos fragmentos de DNA dos genes IGF2 e XIST nos plasmídeos (Figura 11).

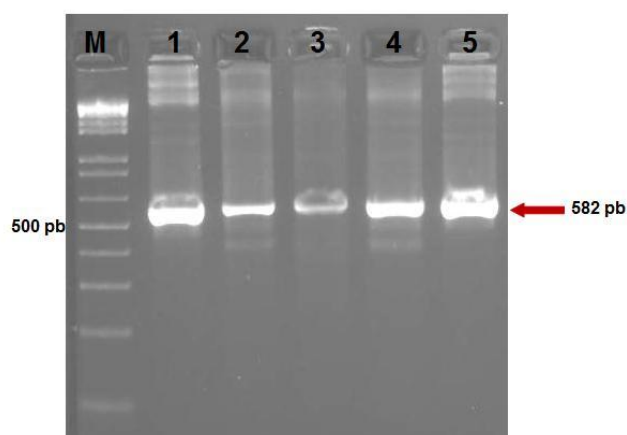


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio mostrando produtos de PCR utilizando plasmídeos como molde e os iniciadores universais T7 e SP6, para confirmação do fragmento inserido correspondente ao gene XIST.

Após receber as sequências dos genes IGF2 e XIST, estas foram comparadas com a sequência de cada um dos genes depositada no “GenBank” utilizando o software BiQ Analyzer (BOCK *et al.*, 2005) para a análise do padrão de metilação das CpG. Um exemplo de alinhamento é mostrado na Figura 12. As citosinas não CpG foram avaliadas quanto a taxa de conversão pelo programa BiQ Analyzer (BOCK *et al.*, 2005) e, apenas as sequências que apresentaram uma eficiência de conversão pelo bissulfito de sódio $\geq 90\%$ foram consideradas.

A

```

Genomic_Sequence -----
[2] 23_SP6__ GGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGCGCGCAATTCAGTAGTGATTTAATATGA

Genomic_Sequence -----TTATTTAGCGTTTGCGTAGGGGTTTGTTCGTTTTTTTGCGAGTACG
[2] 23_SP6__ TATTGGAAAGTAGTTTATTTAGCGTTTGTCTAGGGGTTTGTTCGTTTTTTTGCGAGTATG

Genomic_Sequence TCGGGTCTACGTTCTGTTAAGGAGTTGGAGCTTTTAGAGAGGTTAAGAGTTATCGTTTC
[2] 23_SP6__ TCGGGTCTACGTTCTGTTAAGGAGTTGGAGCTTTTAGAGAGGTTAAGAGTTATCGTTTC

Genomic_Sequence GTTGATCGTTTTGTTTATTTAGGATTTTGTATTATTCGCGGGCGTTTTTTTAAAGGTATT
[2] 23_SP6__ GTTGATCGTTTTGTTTATTTAGGATTTTGTATTATTCGCGGGCGTTTTTTTAAAGGTATT

Genomic_Sequence TAGCGATTAGAAGTGAGTTAAAGTGTCTGTAATTTTGTTAAGTGATTATTTATTTTCGCG
[2] 23_SP6__ TAGCGATTAGAAGTGAGTTAAAGTGTCTGTAATTTTGTTAAGTGATTATTTATTTTCGCG

Genomic_Sequence TCGATTTTTTGATCGGGATCGTTTTATTAGGTTTTTTTTTGAAATTTTGTATCGTTTTG
[2] 23_SP6__ TCGATTTTTTGATCGGGATCGTTTTATTAGGTTTTTTTTTGAAATTTTGTATCGTTTTG

Genomic_Sequence TTTGCGGGTTTTTTGTTTCGTTTTTGTGTTTAAATTTTTTACGTTAGGCGAATTTTT
[2] 23_SP6__ TTTGCGGGTTTTTTGTTTCGTTTTTGTGTTTAAATTTTTTACGTTAGGCGAATTTTT

Genomic_Sequence TTTGCGTTTTTTTTATTTGGTTGAGGGGATT-----
[2] 23_SP6__ TTTGCGTTTTTTTTATTTGGTTGAGGGGATTAGAATAATTTTTTAAAAATGTAATCGAAT

```

B

```

Genomic_Sequence -----TTATTTAGCGTTTGCGTAGGGGTTTG
[2] 1A__ TCACTAGTGATTTAATATGATATTTGGAAGTAGTTTATTTAGTGTGTTGCGTAGGGGTTTG

Genomic_Sequence TTCTTTTTTTGCGAGTACGTCGGGTCTACGTTCTGTTAAGGAGTTGGAGCTTTTAGA
[2] 1A__ TTCTTTTTTTGCGAGTACGTCGGGTCTACGTTCTGTTAAGGAGTTGGAGCTTTTAGA

Genomic_Sequence GAGGTTAAGAGTTATCGTTCTGTTGATCGTTTTGTTTATTTAGGATTTTGTATTATTCGGG
[2] 1A__ GAGGTTAAGAGTTATCGTTCTGTTGATCGTTTTGTTTATTTAGGATTTTGTATTATTCGGG

Genomic_Sequence GGCGTTTTTTTAAAGGTATTTAGCGATTAGAAGTGAGTTAAAGTGTCTGTAATTTTGTTAA
[2] 1A__ GGCGTTTTTTTAAAGGTATTTAGCGATTAGAAGTGAGTTAAAGTGTCTGTAATTTTGTTAA

Genomic_Sequence GTGGTATTATTTATTTTCGCGTCGATTTTTTGATCGGGATCGTTTTATTAGGTTTTTTTTT
[2] 1A__ GTGGTATTATTTATTTTCGCGTCGATTTTTTGATCGGGATCGTTTTATTAGGTTTTTTTTT

Genomic_Sequence GAAATTTTGTATCGTTTTGTTTTCGGGTTTTTTGTTTCGTTTTTGTGTTTAAATTTT
[2] 1A__ GAAATTTTGTATCGTTTTGTTTTCGGGTTTTTTGTTTCGTTTTTGTGTTTAAATTTT

Genomic_Sequence TTTACGTTAGGCGAATTTTTTTTCGTTTTTTTTATTTGGTTGAGGGGATT-----
[2] 1A__ TTTACGTTAGGCGAATTTTTTTTCGTTTTTTTTATTTGGTTGAGGGGATTAGAATAATAT

```

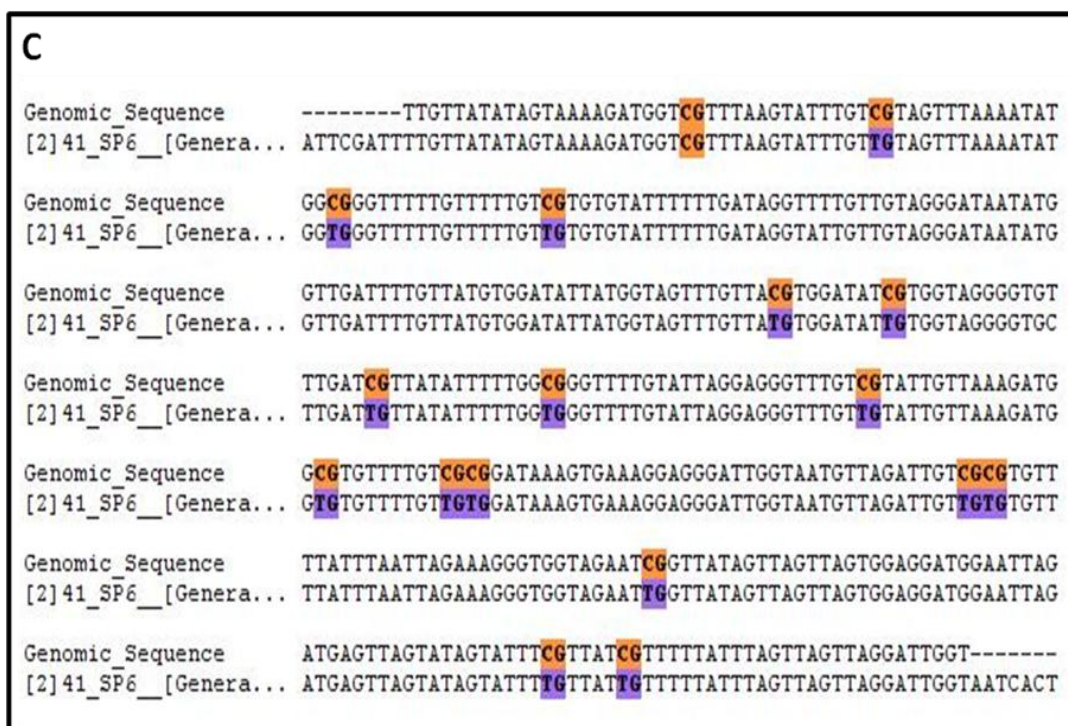


Figura 12 - Análise comparativa pelo software BiQ Analyzer da sequência obtida no “GenBank” com a sequência obtida no experimento. Em laranja e roxo indica sequências CG não metiladas. As duas sequências em laranja indicam CG metiladas. A e B são sequências referentes ao gene IGF2. O retângulo vermelho indica o 10º sítio CpG, onde em (A) está metilado e em (B) não metilado. (C) Sequência referente ao gene XIST. A identidade destas três sequências e a taxa de conversão foi de 100%.

Para o gene IGF2, foi avaliado o padrão de metilação apenas para o grupo B. Foram analisadas 28 sequências, com 28 sítios CpG para cada clone analisado. Contudo, observou-se que o 10º sítio CpG não estava presente na sequência obtida no “GenBank” (X53553.1), mas sendo detectado em todos os clones analisados no experimento (Figuras 12 e 13).

Com base no padrão de metilação das 28 sequências analisadas, foram detectados pelo menos 11 alelos diferentes neste experimento. Os resultados mostraram uma região hipometilada ($31,09 \pm 31,01\%$) (Figura 13).

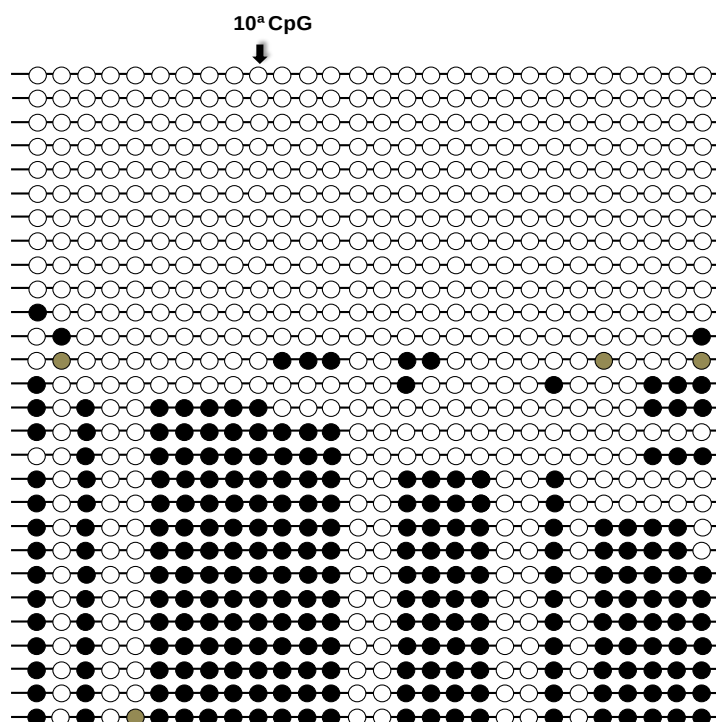


Figura 13 - Análise de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) ($31,09 \pm 31,01\%$). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. A seta preta indica o novo sítio CpG encontrado comparando com a sequência do "GenBank".

Avaliando o padrão de metilação de acordo com Imamura e colaboradores (2005), que consideram sequências hipermetiladas ou hipometiladas definidas como $\geq 50\%$ e $< 50\%$ de sítios CpGs metilados, respectivamente, essa região apresentou 39,28% (11/28) de sequências hipermetiladas.

Para o gene XIST, foram analisados 17 sítios CpG em cada clone sequenciado. Foram analisadas 19 sequências para o grupo A e 27 para o grupo B. Com base no padrão de metilação das 19 sequências analisadas para o grupo A e 27 para o grupo B, foram detectados pelo menos 6 alelos diferentes para o grupo A e 5 para o grupo B.

Os dois grupos apresentaram um padrão hipometilado, sendo que o grupo A ($15,17 \pm 32,82\%$) apresentou-se mais metilado que o grupo B ($4,6 \pm 3,46\%$) ($P=0,0901$) (Figura 14).

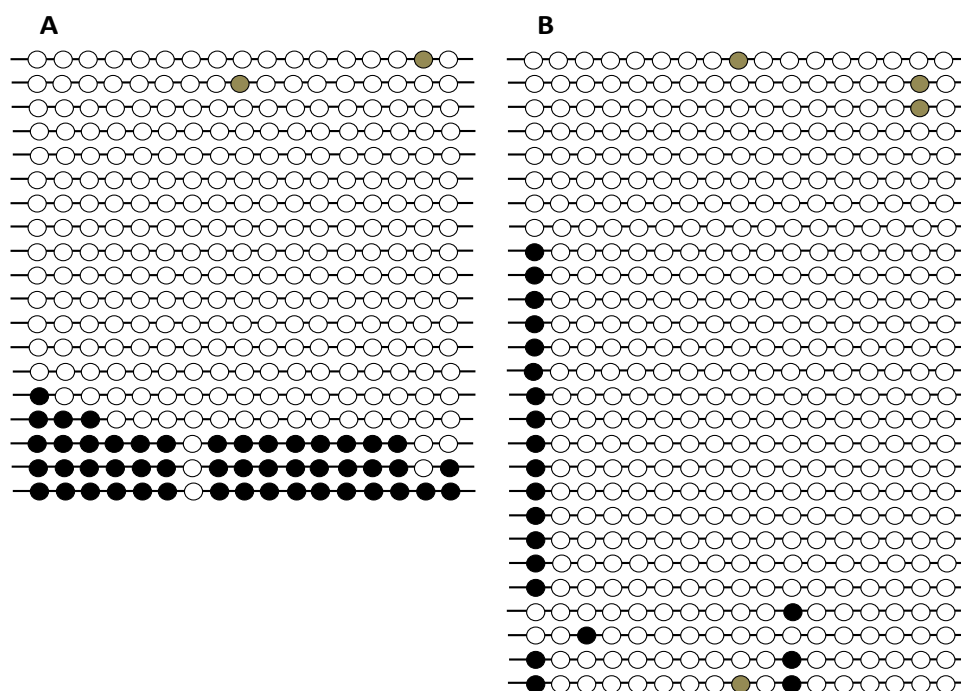


Figura 14 - (A) e (B) Análise da metilação do éxon 1 do gene XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da CpG. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento.(A e B; $P=0,0901$).

Comparando as sequências de acordo com Imamura e colaboradores (2005), o grupo A apresentou 3/19 (15,78%) de sequências hipermetiladas e o grupo B não apresentou nenhuma sequência hipermetilada.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisado o padrão de metilação dos genes IGF2 e XIST em ovócitos oriundos de dois diferentes estágios de desenvolvimento de folículos pré-antrais. Apesar destes ovócitos obtidos de folículos pré-antrais não terem competência para a produção de embriões, são uma fonte muito importante de gametas a ser explorada e utilizada para a PIVE. Entender a reprogramação epigenética que acontece nestes ovócitos (REIK *et al.*, 2001; REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005) é de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas mais eficientes de produção *in vitro* de embriões.

Para o gene IGF2 este trabalho analisou uma DMR presente no último éxon do gene (Figura 2) apenas em ovócitos de 60-95 μm (oriundos de folículos secundários finais). Analisando os resultados obtidos neste estudo em conjunto com resultados de outros trabalhos da literatura que avaliaram a mesma região do IGF2, pôde-se observar que há um processo de reprogramação epigenética ocorrendo nesta região.

Gebert e colaboradores (2006) observaram um padrão *imprinting* e encontraram uma significativa diferença no nível de metilação do último éxon do gene IGF2 entre os gametas masculinos ($99 \pm 0,3\%$) e femininos ($16 \pm 0,8\%$), indicando a presença de uma DMR intragênica. Hajkova e colaboradores (2002), estudando camundongos como modelo, e analisando a mesma região do gene IGF2 em células germinativas primordiais (CGP) de fetos em diferentes estágios do desenvolvimento (10,5 a 13,5 dpc), observaram que esta região do gene estava num processo de desmetilação na medida em que as CGP migravam para a crista genital. Em nosso estudo, avaliando ovócitos oriundos de folículos pré-antrais no estágio secundário final (60-95 μm), encontramos um padrão de metilação de $31,09 \pm 31,01\%$, considerado um padrão hipometilado (Figura 13). Fagundes e colaboradores (2011) analisaram a mesma região do IGF2 em ovócitos imaturos obtidos de folículos antrais de 1-3 mm e ≥ 8 mm e mostraram um padrão de metilação de $51,1 \pm 10,75\%$ e $77,38 \pm 6,76\%$, respectivamente. Além disso, mostraram que ovócitos de folículos antrais ≥ 8 mm maturados *in vitro*, apresentaram $28,93 \pm 10,26\%$ de metilação, próximo ao encontrado em ovócitos MII

de bovinos por Gebert e colaboradores (2006). Isto demonstra que está região do gene, antes encontrada hipermetilada, após a maturação *in vitro* do ovócito, apresenta-se hipometilada, observando-se que o padrão de metilação para esta região só é totalmente estabelecido durante a maturação do ovócito (FAGUNDES *et al.*, 2011). Como estes estudos foram realizados *in vitro*, faz-se necessária uma avaliação desse processo em ovócitos maturados *in vivo*.

Analizando esses resultados em conjunto, pode-se observar que essa região do gene IGF2 está sujeita a um processo de reprogramação epigenética, pois perde metilação quando as CGP migram para a crista genital e durante a ovogênese começa a ganhar um padrão de metilação sexo específico. Como mostrado aqui neste estudo, começa um processo de remetilação na fase pré-antral que continua até a fase de folículo antral e, pelo menos durante o processo de maturação *in vitro*, sofre um novo processo de desmetilação culminando com um padrão hipometilado específico do gameta feminino (FAGUNDES *et al.*, 2011).

Isto está de acordo com Reik e Walter (2001a), que citam que a metilação parental-específica das DMRs é normalmente estabelecida durante a gametogênese e embriogênese inicial. Portanto, o correto estabelecimento do padrão de metilação desta região em ovócitos de folículos de diferentes tamanhos pode estar relacionado com a competência destes para serem utilizados na produção *in vitro* de embriões bovinos (FAGUNDES *et al.*, 2011).

Se avaliarmos estes padrões de metilação de acordo com Imamura e colaboradores (2005), a porcentagem de clones hipermetilados para estes ovócitos de folículos pré-antrais foi de 39,28% (11/28) (Figura 13). Fagundes e colaboradores (2011), encontraram 53,85% (7/13) de sequências hipermetiladas em ovócitos imaturos de folículos de 1-3 mm e 91,66% (11/12) em ovócitos imaturos de folículos ≥ 8 mm. Estes resultados reforçam a hipótese levantada acima de que esta região está sofrendo um processo de reprogramação epigenética na ovogênese, ganhando metilação até o momento em que o ovócito pára seu crescimento e antes da maturação nuclear. Ao avaliar os ovócitos maturados *in vitro* de folículos ≥ 8 mm, Fagundes e colaboradores (2011), observaram uma menor porcentagem de clones hipermetilados (40%; 4/10), estando também de acordo com o padrão hipometilado

esperado para esta região no gameta feminino (GEBERT *et al.*, 2006; FAGUNDES *et al.*, 2011).

Nosso trabalho objetivou a avaliação do padrão de metilação para esta região do gene IGF2 apenas em ovócitos, mas Gebert e colaboradores (2009) analisaram esta mesma região em embriões bovinos produzidos *in vitro*, e encontraram um padrão de desmetilação no decorrer do desenvolvimento embrionário, sendo em zigotos $28,4 \pm 3,8\%$ e embriões no estágio de 4 células $6,3 \pm 2,2\%$, observando um início de remetilação em blastocistos ($10 \pm 0,7\%$). Estes resultados não estão de acordo com o que se espera de uma região *imprinted* durante o início do desenvolvimento embrionário, a qual deve manter seu perfil de metilação alelo-específico (REIK *et al.*, 2001; REIK, WALTER, 2001a; DEAN *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005).

No presente estudo foram encontrados e analisados 28 sítios CpG em todos os clones sequenciados, diferentemente do encontrado na sequência usada como referência “GenBank” X53553.1, e do encontrado por Gebert e colaboradores (2006), como pode ser visto nas Figuras 12 A e B. Este polimorfismo, uma troca de uma citosina por uma guanina criando um sítio CpG na sequência, foi também encontrado por Fagundes e colaboradores (2011) e também é mostrado na sequência “GenBank” NM_174087.3. Fagundes e colaboradores (2011) especulam que esta diferença é devida às diferentes subespécies utilizadas nos experimentos (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). Resta ainda ser mais investigado se realmente é um polimorfismo entre estas duas subespécies, tendo ou não um significado biológico, ou se foi um erro de sequenciamento na sequência depositada no “GenBank”.

Em mamíferos, após a fecundação e no início do desenvolvimento embrionário, os cromossomos X materno (Xm) e X paterno (Xp) estão ativos (WUTZ, GRIBNAU, 2007; KAY, 1998). A primeira inativação é vista nas duas primeiras linhagens celulares originadas, trofoblasto e embrioblasto de blastocisto. No trofoblasto, é vista a inativação preferencial do Xp, sendo este padrão mantido no decorrer do desenvolvimento (KAY, 1998).

O Xp é ativo nos zigotos, mas no estágio de 4 células inicia-se um processo gradual de inativação deste cromossomo com a transcrição do gene XIST e o

revestimento do cromossomo a ser inativado com o RNA XIST (OKAMOTO *et al.*, 2004; OKAMOTO *et al.*, 2005). Em camundongos, o Xp inativo é mantido no estágio de mórula até a fase de blastocisto inicial, e no estágio de blastocisto tardio, o Xp inativo é reativado na massa celular interna (MCI), e finalmente acontece um processo de inativação aleatória dos dois cromossomos X, afetando tanto o Xp quanto o Xm (KAY, 1998; OKAMOTO *et al.*, 2004; WUTZ, GRIBNAU, 2007; PANNING, 2008).

Observação semelhante foi feita por Ferreira e colaboradores (2010), caracterizando a inativação do cromossomo X pela avaliação da expressão alelo-específica do gene MAO-A em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Estes autores mostraram a presença do RNAm do gene MAO-A transcrito a partir do cromossomo X materno nos embriões nos estágios de 4 células até blastocisto expandido, no entanto, não foi detectado RNAm transcrito pelo cromossomo X paterno no estágio de mórula, mas reaparecendo em blastocisto.

Segundo De La Fuente e colaboradores (1999), a transcrição do gene XIST é o evento inicial para ocorrer a inativação do cromossomo X, mostrando uma associação do RNA XIST com o futuro cromossomo X inativo em embriões bovinos produzidos *in vitro* na fase de blastocisto. Comentam, ainda, ser um evento bem conservado em outras espécies de mamíferos. Após a escolha aleatória do cromossomo X a ser inativado, o XIST perde sua capacidade transcricional. No entanto, além da metilação, modificações em histonas estabilizam e retêm o cromossomo X inativo (BROCKDORFF, 2002; REIK, LEWIS, 2005).

No decorrer do desenvolvimento embrionário e fetal, diferenciam-se, a partir da MCI, as células germinativas primordiais (CGP), que permanecem com apenas um cromossomo X ativo (HAJKOVA *et al.*, 2002; NAPOLES *et al.*, 2007). No entanto, durante o tempo da migração das CGP para o mesênquima da crista genital e posterior colonização das gônadas, é visto a reativação do cromossomo X inativo (NESTEROVA *et al.*, 2002). Também é considerado que, durante o tempo de migração das CGP, começa um dos ciclos epigenéticos, que é a desmetilação de genes *imprinted* e não *imprinted* (REIK *et al.*, 2001; HAJKOVA *et al.*, 2002; DEAN *et al.*, 2003). De acordo com isto, Hajkova e colaboradores (2002), observaram que

durante a migração das CGP fetais de camundongos, o promotor do gene XIST, presente no éxon 1, sofreu um processo de desmetilação.

Além disso, outros trabalhos analisaram o cromossomo X inativo de CGP na crista genital de camundongos e encontraram uma progressiva diminuição de RNA XIST até seu desaparecimento na maioria das CGP fetais ao redor de 13,5 dpc (NESTEROVA *et al.*, 2002). Portanto, com um progressivo processo de desmetilação do promotor XIST, associado a uma progressiva diminuição de transcritos deste gene, resultando na reativação do cromossomo X inativo durante a migração das CGP, sugere-se que outros fatores epigenéticos que não metilação devam estar interferindo na repressão transcricional do gene XIST (HAJKOVA *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho, analisamos o padrão de metilação no éxon 1 do gene XIST (Figura 6) de dois diferentes tamanhos de ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de *Bos taurus indicus* (grupo A, $\leq 20 \mu\text{m}$ e grupo B, 65-90 μm). Encontramos uma diferença ($P=0,0901$) no padrão de metilação entre estes dois grupos de ovócitos, com o grupo A apresentando-se mais metilado ($15,17 \pm 32,82\%$) que o grupo B ($4,6 \pm 3,46\%$), apesar de um padrão hipometilado em ambos (Figura 14).

Baseando-se no trabalho de Hajkova *et al.* (2007), que citam um processo de desmetilação sofrido pelas CGP quando da sua migração para a cristal gonadal, nosso resultado sugere que, pelo menos em bovinos, esse processo ainda não terminou nos ovócitos $\leq 20 \mu\text{m}$ sendo que estes se mostraram mais metilados que os de 65-90 μm . Mostrando ainda que esta região do gene XIST em bovinos está sujeita a um processo de reprogramação epigenética durante a ovogênese.

Ao avaliarmos estes padrões de metilação de acordo com Imamura e colaboradores (2005), encontramos 3/19 (15,78%) clones hipermetilados no grupo A, não sendo encontrado nenhum no grupo B, reforçando a hipótese de que nesta fase ainda está ocorrendo um processo de desmetilação dessa região em bovinos.

Avaliando estes dois grupos de ovócitos, nossos resultados mostraram que o padrão de metilação desta região do éxon 1 do gene XIST manteve-se hipometilado no decorrer da ovogênese, pelo menos até ovócitos com diâmetro de 65-90 μm . Ainda, especulamos que essa região se mantém hipometilada ou desmetilada até que o ovócito atinja seu crescimento total, ao redor de 128 μm num folículo de 6

mm (CAIXETA *et al.*, 2009), e termine a ovogênese. Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos por McDonald e colaboradores (1998) que mostraram que esta região do gene XIST está desmetilada em ovócitos MII. Além disso, estes autores encontraram esta mesma região hipometilada em espermatozóides e desmetilada em ambos os alelos de embriões até o estágio de blastocisto e em células da MCI. Isto sugere que o padrão de metilação no DNA para esta região não é o responsável pela característica *imprinted* da inativação preferencial do cromossomo X paterno nas células do trofotoderma e sim outro evento epigenético, como modificações em histonas (REIK, LEWIS, 2005). Mas estes mesmos autores, avaliando células somáticas, encontraram que o cromossomo X se encontra hipermetilado em tecidos de machos e um alelo hipermetilado e outro desmetilado em fêmeas e afirmam ainda que esta região se encontra metilada no cromossomo X ativo e desmetilada no cromossomo X inativo, uma característica *imprinted*.

Portanto, considerando que esta região está desmetilada no ovócito MII até blastocisto (McDONALD *et al.*, 1998), que um cromossomo X é aleatoriamente inativado a partir de blastocisto tardio em camundongos (OKAMOTO *et al.*, 2004) e que acontece um processo de desmetilação e reativação do cromossomo X inativo quando a migração das CGP em direção à crista genital (HAJKOVA *et al.*, 2002; NAPOLES *et al.*, 2007), sugerimos que um padrão de metilação é adquirido na MCI de blastocisto tardio sendo este padrão mantido nas células que darão origem aos diferentes tecidos do feto, mas apagado nas células que originarão as CGP e permanecendo assim durante a ovogênese, como mostrou nossos resultados.

Finalmente, é importante ressaltar que discutimos e comparamos nossos resultados também com alguns trabalhos da literatura que usaram o camundongo como modelo de estudo e, portanto diferenças inerentes à espécie devem ser consideradas.

7. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a região genômica estudada para o gene XIST sofre um processo de reprogramação epigenética durante a gametogênese.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento de como esse processo genético/fisiológico ocorre e é estabelecido durante a foliculogênese e ovogênese é necessário quando se vislumbra a possibilidade futura de uso de ovócitos oriundos de folículos pré-antrais para a produção de embriões. Além disso, pode contribuir para a melhoria dos sistemas comerciais de produção *in vitro* de embriões, considerando a possibilidade de que esse processo possa se estender ou ser finalizado durante a fase de maturação do ovócito.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, H.; YOSHIKAWA, Y.; HOCHI, S. Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 356-360, 2009.
- ABIR, R.; BEN-HAROUSH, A.; FELZ, C.; OKON, E.; HILA RAANANI, H.; ORVIETO, R.; NITKE, S.; FISCH, B. Selection of patients before and after anticancer treatment for ovarian cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 869-877, 2008.
- AGRELO, R.; WUTZ, A. X inactivation and disease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, p.194-200, 2010.
- AHN, S-H.; CHEUNG, W.L.; HSU, J-Y.; DIAZ, R.L.; SMITH, M.M.; ALLIS, C.D. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide induced apoptosis in *S. cerevisiae*. **Cell**, v. 120, p. 25-36, 2005.
- ALERTS, 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**, v. 45, p. 171-179, 2008.
- ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, A.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction and Fertility**, v. 129, p. 137-149, 2005.
- ANSARI, H.A.; PEARCE, P.D.; MAHER, D.W.; BROAD, T.E. Regional assignment of conserved reference loci anchors unassigned linkage and syntenic groups to ovine chromosomes, **Genomics**, v. 24, p. 451-455, 1994.
- BEAUDET, A.L.; JIANG, Y. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprinting-dependent evolution. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, p. 1389-1397, 2002.

BILIYA, S.; BULLA JR, L.A. Genomic imprint: the influence of differential methylation in the sexes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, p. 139-147, 2010.

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, n. 21, p. 4067-4068, 2005.

BOGDANOVIĆ, O; VEENSTRA, G.J.C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromosoma**, v. 118, p. 549-565, 2009.

BORGES, E.N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; ROCHA-JUNIOR, C.M.C.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v. 59, p. 195-200, 2009.

BRAUNSCHWEIG, M.H.; LAERE, A-S.V.; BUYS, N.; ANDERSSON, L.; ANDERSSON, G. IGF2 antisense transcript expression in porcine postnatal muscle is affected by a quantitative trait nucleotide in intron 3. **Genomics**, v. 84, p. 1021-1029, 2004.

BRISSENDEN, J.E.; ULLRICH, A.; FRANKE, U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. **Nature**, v. 310, p. 781-784, 1984.

BROCKDORFF, N.; ASHWORTH, A.; KAY, G.F.; COOPER, P.; SMITH, S.; MCCABE, V.M.; NORRIS, D.P.; PENNY, G.D.; PATEL, D.; RASTAN, S. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 351, p. 329-331, 1991.

BROCKDORFF, N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 7, p. 352-358, 2002.

BROWN, C.J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J.L.; LAFRENIERE, R.G.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H.F. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 349, p. 38-44, 1991.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; BURATINI, J.; 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**, v. 21, p. 655-664, 2009.

CARDOSO, M.C.; LEONHARDT, H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. **Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 25-32, 1999.

CASPARY, T.; CLEARY, M.A.; BAKER, C.C.; GUAN, X-J.; TILGHMAN, S.M. Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 6, p. 3466-3474, 1998.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, p. 295-304, 2009.

CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; LOPES, C.A.P.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; MELO, M.A.P.; BÁO, S.N.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 309-318, 2008.

CHAO, W.; D'AMORE, P.A. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111-120, 2008.

CHENG, X.; BLUMENTHAL, R.M. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of dna and histone methylation. **Biochemistry**, v. 49, p. 2999-3008, 2010.

CONSTÂNCIA, M.; HEMBERGER, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; STEWART, F.; KELSEY, G.; FOWDENK, A.; SIBLEY, C.; REIK, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945-948, 2002.

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

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (XIST) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.

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

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States os America**, v. 98, p. 13734-13738, 2001.

DeCHIARA, T.M.; EFSTRATIADIS, A.; ROBERTSON, E.J. A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 78-80, 1990.

DeCHIARA, T.M.; ROBERTSON, E.J.; EFSTRATIADIS, A. Parental *imprinting* of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 849-859, 1991.

DELCUVE, G.P.; RASTEGAR, M.; DAVIE, J.R. Epigenetic control. **Journal of Cellular Physiology**, p. 243-250, 2009.

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

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 115-130, 2006.

DUPONT, C.; ARMANT, D.R.; BRENNER, C.A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 351-357, 2009.

EDWARDS, C.A.; FERGUSON-SMITH, A.C. Mechanisms regulating *imprinted* genes in clusters. **Cell Biology**, v. 27, p. 281-289, 2007.

FAGUNDES, N.S. **Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos e células do cumulus de vacas Nelore**. 2009. 55 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.

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**, v. 17, n. 2, p. 85-91, 2011.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 203-216, 2003.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 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 MAOA gene and X chromosome inactivation in *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 7, p. 615-621, 2010.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

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**, v. 31, p. 143-152, 2007.

FISCHLE, W.; TSENG, B.S.; DORMANN, H.L.; UEBERHEIDE, B.M.; GARCIA, B.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; FUNABIKI, H.; ALLIS, C.D. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature**, v. 438, p. 1116-1122, 2005.

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**, v. 88, p. 222-229, 2006.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GROGER, 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**, v. 94, p. 63-69, 2009.

GINSBURG, M.; SNOW, M.H.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521-528, 1990.

GOLDBERG, A.D.; ALLIS, C.D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A landscape takes shape. **Cell**, v. 128, p. 635-638, 2007.

GOODALL, J.J.; SCHMUTZ, S.M. Linkage mapping of IGF2 on cattle chromosome 29. **Animal Genetics**, v. 34, n. 4, p. 313, 2003.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à Genética**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008, p. 337-339.

GROB, H.S. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**, v. 146, n. 3640, p. 73-74, 1964.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic *imprinting* and the strange case of the insulinlike growth factor II receptor. **Cell**, v. 64, p. 1045-1046, 1991.

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

HAPPEL, N.; DOENECKE, D. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. **Gene**, v. 431, p. 1-12, 2009.

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

HIRASAWA, R.; CHIBA, H.; KANEDA, M.; TAJIMA, S.; LI, E.; JAENISCH, R.; SASAKI, H. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation *imprints* during preimplantation development. **Genes and Development**, v. 22, p. 1607-1616, 2008.

HOWELL, C.Y.; BESTOR, T.H.; DING, F.; LATHAM, K.E.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J.M.; CHAILLET, J.R. Genomic *imprinting* disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. **Cell**, v. 104, p. 829-838, 2001.

HUTTER, B.; BIEG, M.; HELMS, V.; PAULSEN, M. Divergence of *imprinted* genes during mammalian evolution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 1-10, 2010.

ILLINGWORTH, R.S.; BIRD, A.P. CpG islands - 'A rough guide'. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1713-1720, 2009.

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**, v. 280, n. 20, p. 20171-29175, 2005.

JELTSCH, A.; NELLEN, W.; LYKO, F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 6, 2006.

KAFFER, C.R.; GRINBERG, A.; PFEIFER, K. Regulatory mechanisms at the mouse Igf2/H19 locus. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 23, p. 8189-8196, 2001.

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

KAY, G.F. Xist and X chromosome inactivation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 71-76, 1998.

KIM, J.K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 596-612, 2009.

KIMMINS, S.; SASSONE-CORSI, P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. **Nature**, v. 434, mar, p. 583-589, 2005.

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

KOTSOPOULOS, J.; SOHN, K.-J.; KIM, Y.-I. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 703-709, 2008.

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

LEWIN, B. **Genes IX**. 9 ed. Porto Alegre:Artmed, 2009, p. 797-844.

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

LI, J. K.; PU, M. T.; HIRASAWA, R. ; LI, B. Z. ; HUANG, Y. N. ; ZENG, R. ; JING, N.H.; CHEN, T.; LI, E.; SASAKI, H.; XU, G. L. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 24, p. 8748-8759, 2007.

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

LODDE, V.; MODINA, S.C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I.; LUCIANO, A.M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, *in vitro* maturation and early embryonic development in cow. **European Journal of Histochemistry**, v. 53, p. 199-207, 2009.

LOPES, S.; LEWIS, A.; HAJKOVA, P.; DEAN, W.; OSWALD, J.; FORNE, T.; MURRELL, A.; CONSTANCIA, M.; BARTOLOMEI, M.; WALTER, J.; REIK, W. Epigenetic modifications in na *imprinting* cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. **Human Molecular Genetics**, 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 and efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, p. 1467-1483, 2002.

LUCCI, C.M; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1101-1114, 2004.

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

MATSUZAKI, H.; OKAMURA, E.; FUKAMIZU, A.; TANIMOTO, K. CTCF binding is not the epigenetic mark that establishes post-fertilization methylation *imprinting* in the transgenic H19 ICR. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 7, p. 1190-1198, 2010.

MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, p. 501-502, 2000.

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

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

MELO, E.O.; SOUSA, R.V.; IGUMA, L.T.; FRANCO, M.M.; RECH, E.L.; RUMPF, R. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 812-821, 2005.

MERTINEIT, C.; YODER, J.A.; TAKETO, T.; LAIRD, D.W.; TRASLER, J.M.; BESTOR, T.H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. **Development**, v. 125, p. 889-897, 1998.

MIRANDA, T.B.; JONES, P.A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 384 390, 2007.

MONTI, M.; GARAGNA, S.; REDI, C.; ZUCCOTTI, M. Gonadotropins affect oct 4 gene expression during mouse oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 685-691, 2006.

MOORE, T.; CONSTANCIA, M.; ZUBAIR, M.; BAILLEUL, B.; FEIL, R.; SASAKI, H.; REIK, W. Multiple *imprinted* sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative *imprinting* control region upstream of mouse Igf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 23, p. 12509-12514, 1997.

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

MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 47-58, 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**, v. 36, p. 889-893, 2004.

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**, v. 2, n. 9, p. e860, 2007.

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**, v. 69, p. 216-225, 2002.

NIEMANN, H.; CARNWATH, J.W.; HERRMANN, D.; WIECZOREK, G.; LEMME, E.; LUCAS HAHN, A.; OLEK, S. DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, p. 33-42, 2010.

OGAWA, Y.; LEE, J.T. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. **Molecular Cell**, v. 11, p. 731-743, 2003.

OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LE BACCON, P.; OTTE, A.P.; DISTECHE, C.M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for *de novo imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. **Nature**, v. 438, p. 369-373, 2005.

OKAMOTO, I.; OTTE, A.P.; ALLIS, C.D.; REINBERG, D.; HEARD, E. Epigenetic dynamics of *imprinted* X inactivation during early mouse development. **Science**, v. 303, p. 644-649, 2004.

OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology**, v. 10, p. 475-478, 2000.

PANNING, B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. **Journal of Biology**, v. 7, n. 30, p. 30.1-30.4, 2008.

PARK, J.S.; JEONG, Y.S.; SHIN, S.T.; LEE, K-K.; KANG Y-K. Dynamic DNA methylation reprogramming: Active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 2523-2533, 2007.

RAMSAHOYE, B.H.; BINISZKIEWICZ, D.; LYKO, F.; CLARK, V.; BIRD, A.P.; JAENISCH, R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5237-5242, 2000.

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

REIK, W.; LEWIS, A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, p. 403-410, 2005.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic *imprinting*: parental influence on the genome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001a.

REIK, W.; WALTER, J. Evolution of *imprinting* mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. **Nature Genetics**, v. 27, p. 255-256, 2001b.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction and Fertility**, v. 139, p. 309-318, 2010.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 61, p. 1009-1024, 2004.

ROUGIER, N.; BOURC'HIS, D.; GOMES, D.M.; NIVELEAU, A.; PLACHOT, M.; PÀLDI, A.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. **Genes and Development**, v. 12, p. 2108-2113, 1998.

SADEU, J.C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERSTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen–thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1130-1141, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, New York, 3ª edição, 2001.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetics reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, p. 643-651, 2004.

SANTOS F, HENDRICH B, REIK W, DEAN W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Developmental Biology**, v. 241, p. 172-182, 2002.

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

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogénèse. **Recueil de Médecine Vétérinaires**, v. 157, p. 29-38, 1981.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and câncer. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2381-2402, 2005.

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

SCHAEFER, M.; LYKO, F. Solving the Dnmt2 enigma. **Chromosoma**, v. 119, p. 35-40, 2010.

SENNER, C.E.; BROCKDORFF, N. Xist gene regulation at the onset of X inactivation. **Current Opinion in Genetics e Development**, v. 19, p. 122-126, 2009.

SIBLEY, C.P.; COAN, P.M.; FERGUSON-SMITH, A.C. DEAN, W.; HUGHES, J.; SMITH, P.; REIK, W.; BURTON, G.J.; FOWDEN, A.L.; CONSTÂNCIA, M. Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 21, p. 8204-8208, 2004.

SINCLAIR, K.D.; CINZIA ALLEG RUCCI, C.A.; SINGH, R.; GARDNER, D.S.; SEBASTIAN, S.; BISPHAM, J.; THURSTON, A.; HUNTLEY, J.F.; REES, W.D.; MALONEY, C.A.; LEA, R.G.; CRAIGON, J.; MCEVOY, T.G.; YOUNG, L.E. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19351-19356, 2007.

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

TSAI, C-L.; ROWNTREE, R.K.; COHEN, D.E.; LEE, J.T. Higher order chromatin structure at the X-inactivation center via looping DNA. **Developmental Biology**, v. 319, n. 2, p. 416-425, 2008.

TSUNAKA, Y; KAJIMURA, N; TATE, S; MORIKAWA, K. Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 1, p. 3424-3434, 2005.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

WALTER, J.; PAULSEN, M. The potential role of gene duplications in the evolution of *imprinting* mechanisms. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 215-220, 2003.

WANG, X.; HE, C.; MOORE, S.C.; AUSIO, J. Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12764-12768, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. 77-83, 2007.

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

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1153-1161, 2008.

YANG, Y.; HU, J-F.; ULANER, G.A.; LI, T.; YAO, X.; VU, T.H.; HOFFMAN, A.R. Epigenetic regulation of *Igf2/H19 imprinting* at CTCF insulator binding sites. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, p. 1038-1055, 2003.

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

XU, M.; BANC, A.; WOODRUFF, T.K; SHEA, L.D. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 2, p. 378–386, 2009.