

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACUDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRÃO DE METILAÇÃO DA DMR DO ÚLTIMO
ÉXON DO GENE IGF2 EM OVÓCITOS E CÉLULAS
DO CUMULUS DE VACAS NELORE**

Nadia Simarro Fagundes
Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

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

**PADRÃO DE METILAÇÃO DA DMR DO ÚLTIMO
ÉXON DO GENE IGF2 EM OVÓCITOS E CÉLULAS
DO CUMULUS DE VACAS NELORE**

Nadia Simarro Fagundes
Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco
Co-orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

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

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Abril de 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- F Fagundes, Nadia Simarro, 1980-
- 156p Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos e células do cumulus de vacas nelore / Nadia Simarro Fagundes. - 2009.
- 68 f. : il.
- Orientador.:Maurício Machaim Franco.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
- Inclui bibliografia.

1. Bovino - Reprodução - Teses. 2. Genética animal - Teses. I. Franco, Maurício Machaim. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU:

636.2.082.4

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

Agradecimentos

A minha mãe Marilene e às minhas irmãs Nubia, Natalia e Naiara pelo incentivo, apoio, paciência e compreensão pela minha ausência. Amo vocês!

Ao meu pai, pela lição de vida, que me deu forças para não desistir de meus sonhos nunca. Amarei para sempre!

A minha amiga Andréa Cristina Scarpa Bosso, pelos conselhos e principalmente por me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos. Te adoro!

Ao meu orientador Maurício Machaim Franco, por ter me dado a oportunidade de poder aprender, por ter confiado em mim, e compreendido minhas ausências. Você é fantástico!

A minha amiga e companheira incansável de laboratório Valquíria Alice Michalczechen Lacerda, que sempre esteve do meu lado, com apoio incondicional, que foi fundamental para a realização do experimento. Agradeço de coração!

As minhas amigas Ester Siqueira Caixeta e Grazieli Marinheiro Machado por me apoiar em todos os momentos da realização do experimento! Adoro vocês!

A Dra. Margot Alves Nunes Dode pela disposição em me ajudar, me ensinando e orientando. Obrigada pelo carinho!

Ao José Octávio Jacomini por me co-orientar na UFU, e estar sempre disponível a me ajudar.

Aos meus amigos do Cenargen e da Fazenda Sucupira Monique, Michele, Lígia, Zé, Bio, Heitor, Chivas, Allice, Fernanda, Fernanda Rodrigues, Marcelo, Jefferson, Ana Cláudia, Vitor, Antônio, Juliana, Flávia, Caciliana, Carlos, Carol, Bruno, Vagner, Amanda, Cris e Letícia. Obrigada pelos bons momentos vividos!

Aos meus amigos da UFU, Carol, Renata, Mário, Jorge, Hirla pela amizade e companheirismo.

Ao Arlindo, por colaborar com esse experimento, que foi imprescindível para a realização do mesmo. Obrigado pelas caronas e pela disposição que o senhor sempre teve em me ajudar!

Ao Prof. Robson Carlos Antunes por aceitar fazer parte da banca de defesa

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade e crédito para concretização deste trabalho e à CAPES pela bolsa de fomento.

Em fim a todos que mesmo indiretamente me apoiaram sempre!

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Epigenética.....	3
2.2 Metilação do DNA.....	3
2.3 Métodos para avaliação de padrões de metilação no DNA.....	5
2.4 “Imprinting” Genômico.....	6
2.5 Ovogênese, Foliculogênese e Marcações “Imprinting”.....	8
2.6 O gene IGF2.....	12
2.7 Regulação IGF2/H19.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Colheita dos ovócitos e células do cumulus oophorus (CC).....	18
3.2 Extração de DNA dos ovócitos e células do cumulus.....	21
3.3 Tratamento com Bissulfito de Sódio.....	21
3.4 PCR “nested” para o gene IGF2 e purificação dos “amplicons”.....	22
3.5 Clonagem dos produtos da PCR, sequenciamento e análises das sequências.....	23
3.6 Análises Estatísticas.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÃO.....	36
6. Considerações Finais.....	37
Referências.....	38

ABREVIATURAS

- DNA – Ácido desoxirribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
5mC – Metilcitosina
DNMT – DNA metiltransferase
SAM – S-adenosilmetionina
SAH – S-adenosilhomocisteína
DMR – Região diferencialmente metilada
IGF2 – Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 2
pb – Pares de base
CTCF – Fator ligante CCCTC
CCs – Células do cumulus oophorus
NaCl – Cloreto de sódio
PBS – Solução salina em tampão fosfato
SFB – Soro fetal bovino
COC – Complexo cumulus-ovócito
mm – Milímetros
µL – Microlitro
MIV – Meio de maturação
CO₂ – Dióxido de carbono
PCR – Reação em cadeia da polimerase
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Modelo de regulação do <i>locus</i> IGF2/H19 em camundongos, indicando as quatro DMRs (retângulos) com seus alelos materno (M) e paterno (P) e suas metilações preferenciais em azul (metilado) e branco (demetilado); E – “enhancers” (adaptado de LOPES et al., 2003).....	15
Figura 2: Modelo de regulação do <i>locus</i> IGF2/H19 em camundongos. No alelo materno CTCFs se ligam na DMR atuando como barreira para os “enhancers” que ativam o gene H19. No alelo paterno, a DMR apresenta-se metilada, não ocorre a ligação de CTCF e os “enhancers” conseguem ativar o gene IGF2 promovendo sua transcrição (modificado de IDERAABDULLAH et al., 2008)....	16
Figura 3: Modelo de interação entre as DMRs formando dois domínios de cromatina um ativo e outro inativo (área sombreada) nos alelos materno e paterno. No alelo materno a DMR1 e DMR interagem e o gene H19 fica no domínio ativo sendo expresso. No alelo paterno a DMR interage com a DMR2 fazendo com que o gene IGF2 fique no domínio ativo sendo expresso (Modificado de Murrell et al., 2004).....	17
Figura 4: Materiais utilizados para a dissecação e folículos sendo dissecados com auxílio de pinça e lâmina de bisturi.....	18
Figura 5: Folículos dissecados com diâmetro 1 – 3 mm (A) e $\geq 8,1$ mm (B).....	19
Figura 6: Ovócito maturado, desnudo, com o primeiro corpúsculo polar.....	20
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1,5% do gene IGF2, nos ovócitos, com os “primers” “inner” (A), sendo 1 e 2, imaturos e maturados de folículos de 1 – 3 mm; 3 e 4 imaturos e maturados de folículos $\geq 8,1$ mm; 5 – controle negativo (sem DNA); e das CC (B), sendo 1 (0,5 μ L) e 2 (1,0 μ L) de folículos de 1 – 3 mm imaturos, 3(0,5 μ L) e 4 (1,0 μ L) de folículos de 1 – 3 mm maturados, 5 (0,5 μ L) e 6 (1,0 μ L) de folículo $\geq 8,1$ mm imaturo, 7(0,5 μ L) e 8 (1,0 μ L) de folículo $\geq 8,1$ mm maturados e 9 controle negativo (sem DNA).....	23
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do fragmento inserido correspondente ao “amplicon” da DMR do último éxon do gene IGF2 possuindo 332 pb. Cada linha corresponde a uma amostra de DNA plasmidial, sendo a primeira o marcador de 1kb (Promega) e o último ao controle negativo.....	24

Figura 9: Análise de um cromatograma utilizando o programa CHROMAS (A). A letra M indica um dinucleotídeo CG metilado e a letra D um demetilado e transformado pelo bissulfito.. (B) Análise de alinhamento de seqüências (“GenBank” e seqüências geradas com os “primers” T7 e SP6) utilizando o programa DNAMAN 4.0, mostrando as CGs metiladas (M) (a citosina permaneceu inalterada) e demetilada (D) (a citosina se transformou em uracila e após a PCR em timina)..... 25

Figura 10: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos de folículos imaturos e maturados de 1 - 3 e $\geq 8,1$ mm (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. (A e B $P=0,00699$; A e C $P=0,211$; C e D $P=0,042$; B e D $P=0,0519$)..... 30

Figura 11: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos 1 – 3 mm (imaturos e maturados) (A) e $\geq 8,1$ mm (imaturos e maturados) (B) (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. ($P=0,672$)..... 32

Figura 12: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos imaturos (de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm) (A) e maturados (de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm) (B) (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente ($P=0,4$). A seta vermelha indica a 13^a CpG demetilada..... 33

Figura 13: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em CCs de folículos imaturos e maturados de 1 - 3 e $\geq 8,1$ mm (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. (A e B $P=0,4848$; A e C $P=0,167$; C e D $P=0,1472$; B e D $P=0,5567$)..... 34

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Divisão das amostras em 8 grupos.....	20
Tabela 2: Identificação do Gene, sequências dos “primers” utilizados, acesso no “GenBank”, sua localização, posição na ilha CpG, tamanho e o número de CpGs do fragmento amplificado.....	22
Tabela 3: Diâmetro e número de folículos dissecados com seus respectivos complexo cumulus-ovócito de graus I e II (viáveis).....	27
Tabela 4: Diâmetro dos folículos dissecados, números de complexo cumulus-ovócito imaturos e com maturação nuclear.....	28

PADRÃO DE METILAÇÃO DA DMR DO ÚLTIMO ÉXON DO GENE IGF2 EM OVÓCITOS E CÉLULAS DO CUMULUS DE VACAS NELORE

RESUMO

As biotecnologias de reprodução assistida são ferramentas essenciais à pecuária moderna. Dentre estas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se destaca, colocando o Brasil como um dos países que mais produz e transfere embriões no mundo. Apesar da PIVE proporcionar um aumento na produção de embriões por animal, muito ainda se pode melhorar, sendo a qualidade do ovócito um dos aspectos mais importantes do sistema. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o padrão de metilação de uma região diferencialmente metilada (DMR) localizada no éxon 10 do gene IGF2 em ovócitos e células do cumulus (CC) de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm, imaturos e maturados de vacas Nelore. Os complexos cumulus-ovócitos (COC) de folículos $\geq 8,1$ mm apresentaram maior porcentagem de viáveis (40,5%) e de maturação nuclear (60,6%). Os ovócitos imaturos de folículos de 1 – 3 mm foram menos metilados ($33,33\% \pm 34,79\%$) que os de $\geq 8,1$ mm ($83,69\% \pm 8,52\%$). Após a maturação, o padrão de metilação foi diferente entre os grupos de ovócitos, sendo que os de folículos $\geq 8,1$ mm maturados apresentaram menos metilação ($18,51\% \pm 36,36\%$) que os de $\geq 8,1$ mm imaturos ($83,69\% \pm 8,52\%$) e os de 1 – 3 mm maturados ($49,62\% \pm 34,00\%$). Ao avaliar os ovócitos apenas por tamanho do folículo ou estado de maturação, estes grupos não apresentaram diferenças significativas entre eles. As CC, não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos tratamentos avaliados. O padrão menos metilado da DMR nos ovócitos de folículos $\geq 8,1$ mm maturados pode estar relacionado à maior competência destes, sendo que os ovócitos de folículos de 1 – 3 mm podem ainda não estar com os padrões “imprinting” completamente estabelecidos. Conclui-se que a DMR do último éxon do gene IGF2 poderá ser usada como um marcador molecular para o “status” da reprogramação epigenética em ovócitos, auxiliando a PIVE no desenvolvimento e modificações de novos protocolos.

Palavras-chave: Epigenética, Metilação, “Imprinting”, *Bos indicus*, IGF2, Ovócito.

DMR METHYLATION PATTERN OF THE LAST ÉXON OF THE IGF2 GENE IN OOCYTES AND CUMULUS CELLS FROM NELLORE COWS

ABSTRACT

Assisted reproductive biotechnologies are essential instrument for the modern cattle breeding. *In vitro* embryo production (IVP) is prominence, situating Brazil as a country that more produce and transfer *in vitro* embryos in the world. In spite of the IVP big capacity to produce embryos per animal, this production can be better, being the oocyte quality the more important aspect of the system. The objective of this study was to evaluate the methylation pattern of the differentially methylated region (DMR) in the exon 10 of the IGF2 gene in oocytes and cumulus cells (CC) from immature and maturated nellore cows follicles.of 1 – 3 mm and ≥ 8.1 mm diameter. Cumulus-oocytes complexes (COCs) from ≥ 8.1 mm follicles had greater percentages of viable oocytes (40.5%) and nuclear maturation (60.6%). Immature oocytes from 1 – 3 mm follicles were less methylated ($33.33\% \pm 34.79\%$) than those immature from ≥ 8.1 mm follicles ($83.69\% \pm 8.52\%$). After maturation, the methylation pattern were different among oocytes groups, ≥ 8.1 mm maturated follicles showed less methylation ($18.51\% \pm 36.36\%$) than ≥ 8.1 mm immature follicles($83.69\% \pm 8.52\%$) and 1-3 mm maturated follicles ($49.62\% \pm 34.00\%$). When evaluating only the oocytes by follicle size or maturation degree, these groups showed no significant differences between them. The CC showed no significant differences among treatments evaluated. The less methylated DMR pattern in the oocytes from ≥ 8.1 mm maturated follicles can be related with greater competency of those oocytes, however oocytes from 1 – 3 mm follicles can be with imprinting patters not completely established yet. It is concluded that DMR of the last exon of the IGF2 gene can be used as a molecular marker for epigenetic reprogramming status in oocytes, helping the IVP in the development and changes of new protocols.

Key words: Epigenetic, methylation, imprinting, *Bos indicus*, IGF2, oocytes

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de aumentar a produtividade em rebanhos bovinos de interesse econômico e a multiplicação de raças naturalizadas em risco de extinção, várias biotécnicas da reprodução tem sido utilizadas. Para otimizar a exploração do potencial reprodutivo de fêmeas, diminuir o intervalo de gerações e acelerar o ganho genético, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), se torna uma ferramenta importante. Essa biotécnica envolve três processos interdependentes que são a maturação (nuclear e citoplasmática), fecundação e cultivo embrionário.

Embora o sucesso da maturação nuclear *in vitro* e fecundação seja elevado (80%), apenas cerca de 30% dos ovócitos desenvolvem até o estágio de blastocisto (FAIR et al., 2003).

Para aumentar ainda mais a eficiência da PIVE, muitos aspectos precisam ser melhor estudados, sendo a qualidade do ovócito um fator chave para o sucesso dessa técnica. Ele precisa ter um estoque de RNAm e proteínas adequado para garantir uma boa maturação citoplasmática, ter condições para completar a maturação nuclear, fecundação e desenvolvimento embrionário até a ativação genômica do embrião. Além disso, durante a formação do ovócito, o seu material genético deve sofrer uma correta e ampla reprogramação epigenética para que ocorra desenvolvimento embrionário normal. Dentre os fatores que comandam essa reprogramação, a metilação do DNA é um dos mais importantes. Ela consiste na adição de um grupo metil na citosina, transformando em uma 5 metilcitosina (5mC). O padrão de metilação dos genes está associado à ativação e silenciamento da expressão gênica. Existem alguns genes que expressam de forma diferente dependendo da origem parental do alelo, maternal ou paternal, conhecidos como genes “imprinted”. A grande maioria desses genes é importante para o desenvolvimento normal do embrião e placentação. Sendo assim, um ovócito competente precisa apresentar uma maturação completa e estabelecer padrões epigenético adequados.

O gene “imprinted” IGF2 que está envolvido no desenvolvimento embrionário e placentação, foi eleito neste estudo para análise do perfil epigenético em ovócitos e células do cumulus com diferentes graus de competência em bovinos. A hipótese

deste trabalho é que ovócitos de folículos de diferentes tamanhos e em diferentes estágios de maturação apresentam diferentes níveis de metilação em DMRs de genes “imprinted”. O objetivo foi avaliar o padrão de metilação de uma DMR que controla a expressão dos genes IGF2/H19 em ovócitos e células do cumulus de folículos de 1 a 3 mm e $\geq 8,1$ mm antes e após o processo de maturação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epigenética

É uma área da genética que estuda alterações na função gênica que não estão relacionadas a alterações na sequência primária do DNA, podendo ser reversíveis (SINGAL & GINDER, 1999; RUSH & PLASS, 2002) e herdáveis no genoma durante a divisão celular (FEINBERG, 2004).

A regulação epigenética é caracterizada por uma série de modificações complexas, que incluem a metilação do DNA em regiões do genoma geralmente ricas em dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002; LI, 2002; JAENISCH & BIRD, 2003) e modificações das histonas, como acetilação, fosforilação, ubiquitinação e metilação (RICHARDS & ELGIN, 2002; RUSH & PLASS, 2002, LEBEDEV & SAZHENOVA, 2008), associadas com transcritos antisenso e RNA não codificante, incluindo microRNAs (SPAHN & BARLOW, 2003).

2.2 Metilação do DNA

Conforme revisado por Singal e Ginder (1999) o DNA é basicamente composto por 4 bases nitrogenadas, Adenina, Guanina, Citosina e Timina, e em 1948 foi descoberta uma base modificada, a 5 metilcitosina (5mC). Ela é uma citosina metilada, isto é, possui um grupamento metil adicionado ao carbono 5 do seu anel. Porém, a maioria das citosinas presentes no genoma não está metilada. Para que ocorra o processo de metilação é necessário que ela esteja na sequência 5' - CG - 3', conhecida como dinucleotídeo CpG, embora Imamura e colaboradores (2005) observaram metilações em citosinas que não estavam presentes em sítios CpGs.

Conforme Miranda & Jones (2007), as seqüências metiladas dentro do genoma podem ser classificadas em dois grupos diferentes: regiões pobres em CpGs e Ilhas CpGs. Esta última é definida com sendo regiões que apresentam mais

de 500 pb e que contenham mais de 55% de CGs. Quando estão presentes na região promotora ou na região 5' de um gene, são geralmente não metiladas e a metilação está correlacionada com a inativação transcricional dos genes associados (RUSH & PLASS, 2002).

O restante do genoma, tais como regiões intergênicas e intrônicas, são consideradas pobres em CpGs, e em células saudáveis, são normalmente metiladas (MIRANDA & JONES, 2007). Cerca de 3 a 6% das citosinas são metiladas em mamíferos e aproximadamente 70 a 80% das CpGs do genoma humano (YANG et al., 2001).

O processo de metilação é catalisado por uma família de enzimas denominadas DNA-metiltransferases (DNMT), que transferem um grupamento metil para o carbono 5 do anel da citosina, utilizando como doador de metil, a S-adenosilmetionina (SAM). A DNMT catalisa a transferência do grupo metil do SAM para o DNA resultando em um DNA metilado e em uma S-adenosilhomocisteína (SAH), produto do SAM sem o metil (Van den VEYVER 2002; SZYF, 2003).

Segundo Bestor (2000), a primeira DNMT descoberta em mamíferos foi denominada DNMT1. Hoje existem mais três DNMTs descritas em mamíferos, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b.

A DNMT1 é uma metiltransferase semiconservativa e atua durante a replicação do DNA, reconhecendo preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (DNA hemimetilado), convertendo as fitas recém sintetizadas para o seu padrão de metilação, sem induzir uma nova metilação (metilação *de novo*) (ROUNTREE et al., 2000; BIRD, 2002; TURKER, 2002; SZYF, 2003). Foram descritas duas DNMT responsáveis pela metilação em DNA não metilado (metilação *de novo*) em mamíferos, DNMT3a e DNMT3b (SZYF, 2003).

DNMT3a e a DNMT3b metilam com igual eficiência o DNA hemimetilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo* e são altamente expressas em células tronco-embrionárias (YANG et al., 2001; LI et al., 2007). Estas enzimas geralmente atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não existe metilação, mesmo na fita complementar (OKANO et al., 1999; DAS & SINGAL, 2004).

Segundo SZYF (2003), o estado de metilação do DNA é um equilíbrio de reações entre metiltransferases e demetilases, e a direção do equilíbrio é determinada pela estrutura da cromatina.

O processo de demetilação pode ocorrer de forma passiva no qual a DNMT1 é suprimida no decorrer dos ciclos de replicação do DNA ou impedida de interagir com seu substrato durante a divisão celular (SZYF, 2003). E também pode ser ativa, na qual ocorre uma rápida perda de metilação do DNA no prazo de um único ciclo celular, indicando a presença de enzimas que ativamente removem o grupo metil da 5mC. A enzima responsável por essa ação ainda permanece desconhecida (GEHRING et al., 2009).

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas metilases *de novo* DNMT3a e DNMT3b e são copiados nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (BIRD, 2002; TURKER, 2002).

Nos mamíferos, a correta metilação do DNA é essencial para que ocorra o desenvolvimento embrionário normal, envolvendo os processos de demetilação, metilação *de novo* e metilação de manutenção (NEWELL- PRICE et al., 2000). Além disso, a metilação desempenha papéis importantes na inativação do cromossomo X no sexo homogamético, na proteção do genoma contra seqüências de DNA invasivos, no "imprinting" parental, na compartimentalização do genoma em regiões ativas e condensadas, na inativação de oncogenes e na repressão da expressão de genes supressores de tumor no câncer (TURKER & BESTOR, 1997).

2.3 Métodos para avaliação de padrões de metilação no DNA

Os primeiros estudos para análises de metilação do DNA utilizaram a técnica de Southern Blot que consiste basicamente na identificação de regiões diferencialmente metiladas utilizando enzimas de restrição sensíveis à metilação. Com o surgimento da reação em cadeia de polimerase (PCR), novas técnicas foram surgindo possibilitando o aumento da eficiência de identificação de padrões de metilação no DNA.

Na década de 1970 descobriram que o bissulfito de sódio mediava a deaminação de citosina e a utilização deste produto químico para análise da 5mC no DNA foi iniciada por Frommer e colaboradores em 1992. Esta substância promove a deaminação de citosinas não metiladas, transformando-as em uracilas, as quais após a reação de PCR são convertidas em timinas. Por outro lado, as citosinas metiladas permanecem como citosinas, pois o grupamento metil protege contra a reação de deaminação (HAYATSU, 2008). Associando a utilização do bissulfito de sódio à PCR, surgiu a PCR sensível à metilação (“Methylation sensitive PCR” - MSP) que consiste na utilização de dois pares de “primers” específicos para DNA metilado ou não, que irão se complementar conforme o padrão de metilação da amostra, permitindo a detecção de DNA metilado ou demetilado (HERMAN et al 1996).

Além disso, existe a possibilidade de associação do tratamento com o bissulfito de sódio à PCR e seqüenciamento, onde é possível verificar cada CG susceptível a metilação do “amplicon” gerado, tornando essa metodologia mais precisa na avaliação do padrão de metilação de DNA (IMAMURA et al., 2005; GEBERT et al., 2006; LONG & CAI, 2007)

2.4 “Imprinting” Genômico

No início de 1980, experimentos em camundongos constataram que, em mamíferos, a expressão do material genético em nível cromossômico pode diferir conforme sua origem seja paterna ou materna (REIK & WALTER, 2001). Tal fenômeno recebeu a designação “genomic imprinting”, que pode ser traduzida por marca genômica, para indicar que o material genético, em sua passagem pelo organismo masculino ou feminino, ficaria marcado temporariamente para produzir efeitos diferentes, segundo a sua origem parental. Tal marcação, ocorre durante a formação das células da linhagem germinativa (HALL, 1990).

Ou seja, o “imprinting” genômico é um processo que implica na expressão monoalélica de alguns genes específicos nas células diplóides, e é dependente se o alelo é transmitido pelo espermatozóide ou pelo ovócito (BARTOLOMEI et al., 1991; DeCHIARA et al., 1991; MANIPALVIRATN et al., 2009). O “imprinting” parental é um

importante mecanismo genético pelo qual genes tem alelos silenciados e expressos, dependendo exclusivamente da sua origem, materna ou paterna (FEIL et al., 1994). Este mecanismo, que é estabelecido por uma marcação epigenética, faz os genomas parentais funcionalmente desiguais. Sendo assim, embriões uniparentais, que contêm somente genoma de um sexo, paterno ou materno, não conseguiriam se desenvolver, morrendo logo após a implantação (McGRATH & SOLTER 1984; OBATA et al., 2000).

O “conflito” entre o genoma materno e paterno na determinação dos recursos maternos para o desenvolvimento do embrião tem sido proposto para explicar evolutivamente a origem do “imprinting” genômico. (MOORE, 2001). Esta é uma das hipóteses mais aceitas, a chamada teoria do conflito, também conhecida como “batalha dos sexos” (MOORE & HAIG, 1991; HURST & McVEAN, 1997, 1998). Ela baseia-se no interesse tanto do macho quanto da fêmea em obter o número máximo de proles viáveis a fim de que fossem mantidos seus genes na população. Quando a reprodução é poligâmica, o macho teria o interesse em assegurar o crescimento máximo de sua prole. Assim recrutaria o máximo de recursos da fêmea, tanto quanto possível, visando beneficiar a progênie, para que a mesma fosse maior e mais forte, aumentando as chances de sobrevivência no ambiente, mesmo que isso ocorresse em detrimento da fêmea pela utilização de mais nutrientes maternos. Em contrapartida, a fêmea deve limitar o crescimento embrionário e fetal para que a mesma esteja apta a reproduzir-se novamente, com outro macho. Ela necessitaria dividir seus recursos em diferentes gestações. As fêmeas que conseguissem restringir o crescimento fetal e produzir maior número de proles com a limitação de recursos, conseguiriam a longo prazo, ter mais êxito em suas vidas reprodutivas (YAMAZAKI, 2006).

Além da teoria do conflito, um “modelo de desenvolvimento” sugere que o “imprinting” genômico ocorreria em resposta à pressão ambiental, induzindo a rápidas mudanças de expressão ou inativação dos alelos parentais de acordo com a necessidade (BEAUDET & JIANG, 2002).

Segundo Reik & Walter (2001), tem sido estabelecido a importância da metilação do DNA, na manutenção do “imprinting”. Nos genes “imprinted”, o padrão de metilação derivado dos gametas se difere da metilação alélica nas células

somáticas; por esta razão, a metilação do DNA é proposta como sendo a marca epigenética que estabelece o “imprinting” genômico (BRANDEIS et al., 1993; THORVALDSEN et al., 1998).

No geral, os genes “imprinted” diferem dos não “imprinted” devido ao status de suas metilações, estrutura da cromatina e o tempo de replicação (GARDNER & LANE, 2005). Quase todos os genes “imprinted” ocorrem em “clusters” que são regiões genômicas contendo dois ou mais genes (IDERAABDULLAH, et al., 2008). Em bovinos, até o presente momento, ainda há poucos genes caracterizados como “imprinted” (<http://igc.otago.ac.nz/home.html>).

A metilação alelo específica é típica para regiões diferencialmente metiladas (DMRs), que são ricas em CpGs e o seu padrão de metilação está envolvido na regulação da expressão de genes “imprinted” (MOORE, et al., 1997; MURRELL, et al., 2001; REIK & WALTER, 2001).

Segundo Lopes e colaboradores (2003), alguns elementos foram caracterizados participando da regulação da expressão parental específica dos genes “imprinted”. Estes incluem promotores, promotores de RNAs “antisense”, “chromatin boundaries”, “silencers” e “enhancers”. Estes elementos estão freqüentemente envolvidos na regulação de mais de um gene em um “cluster imprinting”. Os mecanismos da reprogramação da metilação “imprinting” ainda não são bem conhecidos (GÖNDÖR & OHLSSON, 2009).

2.5 Ovogênese, Foliculogênese e Marcações “Imprinting”

O processo de formação, crescimento e maturação do gameta feminino, é conhecido como ovogênese. Ela se inicia durante a vida fetal (AUSTIN & SHORT, 1982; HAPER, 1994; FAIR, 2003), quando as células germinativas primordiais se diferenciam em ovogônias, se proliferam por mitose antes do nascimento e então entram em meiose, tornando-se um ovócito primário (AUSTIN & SHORT, 1982).

Conforme Van den Hurk & Zhao (2005), o ovócito primário passa pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno e pára em diplóteno da prófase I da meiose I, na qual permanece retido durante todo o período de desenvolvimento folicular. Nessas

primeiras fases meióticas, quando várias proteínas de reparo do DNA e muitos outros fatores são necessários para um bom alinhamento e recombinação dos cromossomos, os ovócitos são extremamente vulneráveis e muitos deles podem se degenerar.

Em ruminantes e primatas, ainda durante a vida fetal, logo após a formação do ovócito ocorre a formação do folículo. Cada folículo tem seu próprio ambiente endócrino individual dentro do ovário, levando a progressão do desenvolvimento folicular e seu crescimento de modo assincromático (FORTUNE et al., 2000). Esse desenvolvimento pode ser dividido em três estágios: ativação do folículo primordial, transição do primário para o secundário e a formação do antro. O crescimento folicular é um processo contínuo durante a vida reprodutiva (FORTUNE, 2003).

Em bovinos, os folículos primordiais que ainda não estão em crescimento, apresentam uma única camada de células epiteliais achatadas, formando uma população finita dentro do ovário (MATZUK et al., 2002). Do “pool” de primordiais, o folículo recrutado se torna primário, sendo caracterizado por apresentar uma camada completa de 11 a 20 células cubóides da granulosa ao redor do ovócito. Ele se torna secundário quando for constituído por duas camadas de células da granulosa e por apresentar uma deposição inicial de material da zona pelúcida ao redor do ovócito. Ao mesmo tempo, grânulos corticais são formados dentro de seu citoplasma e os primeiros sinais de síntese de RNA são detectados. A transição para o folículo terciário caracteriza-se por uma contínua proliferação e diferenciação das células que circundam o ovócito, em teca interna e externa, lâmina basal e células do cumulus, assim como a síntese de fluído que se acumula formando o antro inicial (FAIR 2003).

Durante o crescimento e capacitação do ovócito é formado o estoque molecular necessário para a maturação, fecundação, até o momento da ativação do genoma embrionário no estágio de 8-16 células no embrião bovino (DONNISON & PFEFFER, 2004; SONG & WESSEL, 2005).

O reinício da meiose ou saída do estágio de diplóteno pode ser mediado por um estímulo hormonal *in vivo*, ou simplesmente pela retirada do ovócito de dentro do folículo (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994). Entretanto, somente ovócitos competentes têm a capacidade de completar a meiose. (EPPIG 1991).

Dois eventos celulares envolvem a maturação ovocitária, os nucleares e os citoplasmáticos. De acordo com Cha & Chian (1998) os eventos nucleares envolvem a reorganização da rede de microtúbulos para o deslocamento dos cromossomos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos, o que resulta na progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I e expulsão do primeiro corpúsculo polar caracterizando o fim da meiose I. A segunda divisão meiótica é iniciada rapidamente após completar a primeira divisão alcançando a metáfase II na qual antecede a ovulação.

Já a maturação citoplasmática acontece com a reorganização de organelas e o uso do estoque molecular estabelecido durante a ovogênese, deixando o ovócito apto à fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (DODE, 2006).

Sendo assim, o ovócito maturo é definido como aquele que reiniciou a divisão meiótica passando do estágio de vesícula germinativa para a metáfase II, com a maturação citoplasmática necessária para a fecundação e desenvolvimento inicial do embrião (CHA & CHIAN, 1998).

Segundo Varago e colaboradores (2008), o tempo de cultivo mais utilizado para maturação *in vitro* é de 24 horas. Embora ovócitos bovinos maturados por 18 horas resultem em taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário semelhantes às observadas aos maturados por 24 horas.

A ativação ovocitária e o término da meiose só ocorrem no momento da penetração do espermatozóide no ovócito, a qual é acompanhada da extrusão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelínico (VARAGO et al., 2008).

Uma característica essencial para a coordenação da ovogênese e da foliculogênese é a comunicação bidirecional entre células granulosa e o ovócito dentro do folículo. Ela se torna um requisito essencial para um crescimento folicular normal e desenvolvimento de ovócitos competentes (CARABATSOS et al., 2000). Ou seja, essa comunicação é indispensável para o crescimento do ovócito, diferenciação, estado de meiose nuclear, maturação citoplasmática e atividade de transcrição genômica (Van den HURK & ZHAO, 2005). A retirada dessas células reduz significativamente sua competência e o desenvolvimento embrionário subsequente (ZHANG et al., 1995; SHIOYA et al., 1998; KRISHER, 2004).

Um critério de avaliação da qualidade do ovócito que tem sido rotineiramente utilizado é a avaliação morfológica baseada no número e compactação das células do cumulus e homogeneidade do citoplasma (de WIT et al., 2000; STOJKOVIC et al., 2001; LONERGAN et al., 2003). Entretanto, a avaliação morfológica por si só é insuficiente para distinguir os ovócitos competentes, que têm a habilidade de levar uma gestação à termo (LONERGAN et al., 2003; COTICCHIO et al., 2004; KRISHER, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a capacidade de desenvolvimento *in vitro* de ovócitos bovinos pode ser afetada pelo tamanho e qualidade dos folículos dos quais são obtidos (LONERGAN et al., 1994; MACHATKOVA et al., 2004; KAUFFOLD et al., 2005; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009), sendo que ovócitos de folículos maiores são mais competentes.

Quanto à ovogênese, além da importância da aquisição da competência ovocitária citada anteriormente, outro importante aspecto é a aquisição do padrão do “imprinting” materno. Em camundongos ele é estabelecido durante o crescimento do ovócito (BAO et al., 2000; OBATA & KONO, 2002) e a aquisição da metilação do DNA de DMRs de vários genes “imprinted” correlaciona-se com o aumento do diâmetro do ovócito (LUCIFERO et al. 2004).

No início do desenvolvimento das células germinativas primordiais em fetos de camundongos, todo seu DNA é demetilado. A remetilação na linhagem germinativa feminina começa antes do nascimento na fase fetal, durante o crescimento dos ovócitos na ovogênese. Como esse crescimento é um processo de desenvolvimento prolongado, é concebível que as sequências possam ser metiladas em momentos diferentes (REIK et al., 2001).

A metilação “imprinting” é adquirida assincronicamente de maneira gene específica, enquanto os ovócitos permanecem parados na prófase I (LUCIFERO et al., 2004).

Esse “imprinting” parental é apagado e restabelecido durante a gametogênese antes da fecundação para que esses padrões “imprinting” estejam corretos em seus gametas de acordo com seu sexo. Assim, o desenvolvimento das células germinativas do macho ou da fêmea diverge para dar origem ao espermatozóide ou ovócito respectivamente (SASAKI & MATSUI, 2008).

Durante a fecundação, os padrões “imprinting” estabelecidos no ovócito e no espermatozóide na linha germinativa são mantidos enquanto que as sequências com metilações não “imprinting” são apagadas e reestabelecidas durante o desenvolvimento embrionário inicial. As marcas “imprinting” desse embrião só serão apagadas durante a formação de seus gametas para que ele fique com o padrão “imprinting” de acordo com o seu sexo, completando assim o ciclo. Nas células somáticas os padrões “imprinting” são mantidos, podendo ser modificados durante o desenvolvimento (REIK & WALTER, 2001).

A remoção, estabilização e manutenção do padrão “imprinting” são processos dinâmicos que devem ser corretamente reprogramados a cada ciclo reprodutivo. A questão de saber se as condições para a maturação de ovócitos *in vitro* podem suportar o correto estabelecimento e manutenção dos padrões de “imprinting” merece ser investigada (BORGHOL et al., 2006).

Embora, em modelos bovinos, o sucesso da maturação *in vitro* e da fecundação seja elevado (80%), apenas cerca de 30% dos ovócitos conseguem desenvolver até o estágio de blastocisto. Um fator chave para aumentar essa proporção seria a qualidade intrínseca do ovócito (FAIR, 2003).

Uma das principais causas de mortalidade embrionária em animais domésticos é atribuída às alterações cromossômicas (KING, 1990). Concomitante a essa informação, o monitoramento da qualidade de gametas torna-se importante, uma vez que estes podem ser susceptíveis às variáveis externas dos sistemas de cultivo *in vitro*. Entre elas, destacam-se choques térmicos, choques osmóticos, resfriamentos, sistemas e meios de cultivo, hormônios, tempo de cultivo, pH, osmolaridade, antibióticos, luz, micromanipulações e criopreservação (LECHNIAK et al., 1996; OCAÑA-QUERO et al., 1999; LUNA et al., 2001; CORRÊA et al., 2008).

2.6 O Gene IGF2

O Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 2 (IGF2) regula o crescimento e a diferenciação celular em muitas espécies animais (CHAO & D'AMORE, 2008).

O IGF2 é um potente mitógeno, atua no crescimento fetal (DeCHIARA et al., 1990; EFSTRATIADIS, 1998; CURCHOE et al., 2005) e desenvolvimento da placenta (CONSTÂNCIA et al., 2002; CHAO & D'AMORE, 2008). Curchoe e colaboradores (2005) sugerem que ele também tenha uma importante função após o desenvolvimento fetal. É predominantemente expresso pelo alelo paternal e silenciado no materno, sendo que várias DMRs tem sido identificadas dentro do gene (FEIL et al., 1994). Em camundongos ele localiza-se no cromossomo 7 (ROTWEIN & HALL, 1990; CHAO & D'AMORE, 2008), em humanos no 11 (BRISSENDEN et al., 1984; TRICOLI, et al., 1984), suínos no 2 (JEON et al., 1999; NEZER et al., 1999), ovinos no 21 (ANSARI et al., 1994) e em bovinos localiza-se no 29 (29qter) (GOODALL & SCHMUTZ, 2003). A organização molecular e sua regulação são conservadas nestas espécies. Em grandes mamíferos, o gene consiste de 10 éxons (De PAGTER-HOLTHUIZEN et al., 1988; AMARGER et al., 2002). Em camundongos é diferente, pois contem seis éxons funcionais e dois não funcionais, “pseudo-éxons” (ROTWEIN & HALL, 1990).

Em mamíferos, o IGF2 foi o primeiro gene “imprinted” identificado, sendo as espécies mais estudadas, camundongos (DeCHIARA et al., 1991), humanos (OHLSSON et al., 1993; RAINIER et al., 1993), ovinos (FEIL et al., 1998; McLAREN & MONTGOMERY, 1999), suínos (NEZER et al., 1999), e bovinos (DINDOT et al., 2004).

Uma significativa diferença nos níveis de metilação no último éxon do gene IGF2 entre gametas masculinos e femininos bovinos indica a presença de uma DMR intragênica, sendo observado um alto nível de metilação no DNA do espermatozóide e um baixo nível no ovócito (GEBERT et al., 2006).

Segundo Murrell e colaboradores 2001, a DMR do último éxon do gene IGF2 é intragênica, e metilada desempenha uma função de iniciação da transcrição do IGF2; e essa metilação promove altos níveis de sua expressão.

Em camundongos, essa DMR (DMR2) contém uma região central de 54 pb (MURRELL et al., 2001) e é conservada dentro da DMR intragênica homóloga do gene IGF2 bovino. A deleção dessa região no alelo paterno está associada com o retardo no crescimento fetal.

A identificação dessa DMR intragênica, em bovinos, dará subsídios para mais investigações das características “imprinting”, sendo seus mecanismos regulatórios fundamentais para o desenvolvimento do embrião (GEBERT et al., 2006).

A alteração no crescimento fetal, como a síndrome do bezerro grande, relacionadas a biotécnicas da reprodução como a fecundação *in vitro* e transferência nuclear, está associada a regulação do gene IGF2 em bovinos (CURCHOE et al., 2005).

2.7 Regulação IGF2/H19

Os genes IGF2 e H19 estão localizados no mesmo “cluster” e compartilham a ação dos mesmos “enhancers” (CHAO & D’AMORE, 2008).

Segundo Arnosti & Kulkarni (2005) “enhancers” são elementos reguladores que estimulam a transcrição independentemente de sua posição e orientação com relação ao respectivo sítio de iniciação da transcrição.

O H19 transcreve um RNA não codificante, que inicialmente foi identificado como supressor tumoral, mas, no entanto, tem sido demonstrado com propriedades oncogênicas (IDERAABDULLAH et al., 2008).

Em camundongos, a expressão dos genes IGF2 e H19 é regulada por metilações alelo específicas de quatro DMR (LOPES et al., 2003). A DMR H19 está “upstream” ao gene H19, atuando como um elemento silenciador; a DMR2 é um ativador sensível a metilação, presente dentro do último éxon do IGF2 e a DMR1 é um elemento silenciador sensível à metilação, localizado “upstream” ao promotor fetal do IGF2. Todas essas três DMRs apresentam metilação no alelo paterno. A DMR0 sobrepõe um promotor placenta-específico do IGF2 sendo metilado somente no alelo materno (Figura 1).

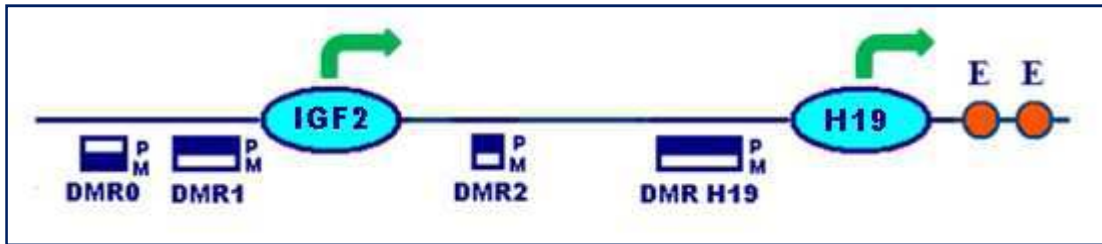


Figura 1. Modelo de regulação do *locus* IGF2/H19 em camundongos, indicando as quatro DMRs (retângulos) com seus alelos materno (M) e paterno (P) e suas metilações preferenciais em azul (metilado) e branco (demetilado); E – “enhancers” (adaptado de LOPES et al., 2003)

No *locus* H19/IGF2, conforme Chão & D’Amore, (2008) “enhancers” em comuns ativam o gene H19 no cromossomo materno e o IGF2 no cromossomo paterno. “Upstream” ao promotor do H19 localiza-se uma DMR, que quando deletada ativa o IGF2 no cromossomo materno. Essa DMR contém sítios que se ligam um fator ligante CCCTC (CTCF), uma proteína isoladora que demarca domínios em cromatina ativos e inativos. Quando a DMR encontra-se metilada os CTCFs não encontram os sítios para ligação impedindo assim sua atuação. Então, no cromossomo paterno, a DMR é metilada, as CTCF não se ligam e os “enhancers” conseguem atingir o promotor do IGF2 levando-o à sua expressão. Já no cromossomo materno a DMR não é metilada, ocorrendo então a ligação de CTCF, formando um isolamento (“insulator”) da cromatina bloqueando o acesso dos “enhancers” que ativariam o IGF2 (Figura 2).

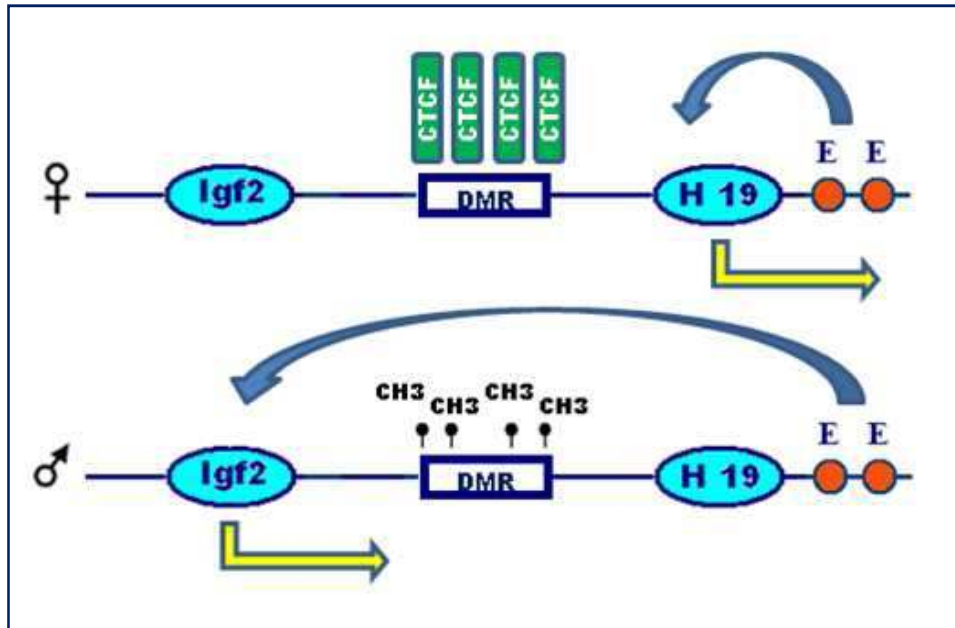


Figura 2: Modelo de regulação do *locus* IGF2/H19 em camundongos. No alelo materno CTCFs se ligam na DMR atuando como barreira para os “enhancers” que ativam o gene H19. No alelo paterno, a DMR apresenta-se metilada, não ocorre a ligação de CTCF e os “enhancers” conseguem ativar o gene IGF2 promovendo sua transcrição (modificado de IDERAABDULLAH et al., 2008).

Murrell e colaboradores (2004) propuseram um modelo mais elaborado para explicar a interação entre as DMR do *locus* IGF2/H19, o de cromatina “loop”. No cromossomo materno a CTCF se liga à DMR H19 não metilada, e possivelmente outras proteínas, e todo esse complexo se junta à DMR1 também não metilada, resultando em dois domínios de cromatina, com o H19 e os “enhancers” no domínio ativo e o IGF2 no inativo dentro de um “loop” e longe dos “enhancers”. No alelo paterno, a DMR H19 metilada impede o acesso de CTCF, e se associa a DMR2 também metilada, provavelmente através de fatores protéicos, movendo o IGF2 para dentro do domínio de cromatina ativa. A localização da DMR2 na posição final do IGF2 faz com que seus promotores fiquem próximos dos “enhancers” localizados “downstream” do H19. E apesar do H19 estar no domínio ativo ele é silenciado pela metilação do DNA (Figura 3).

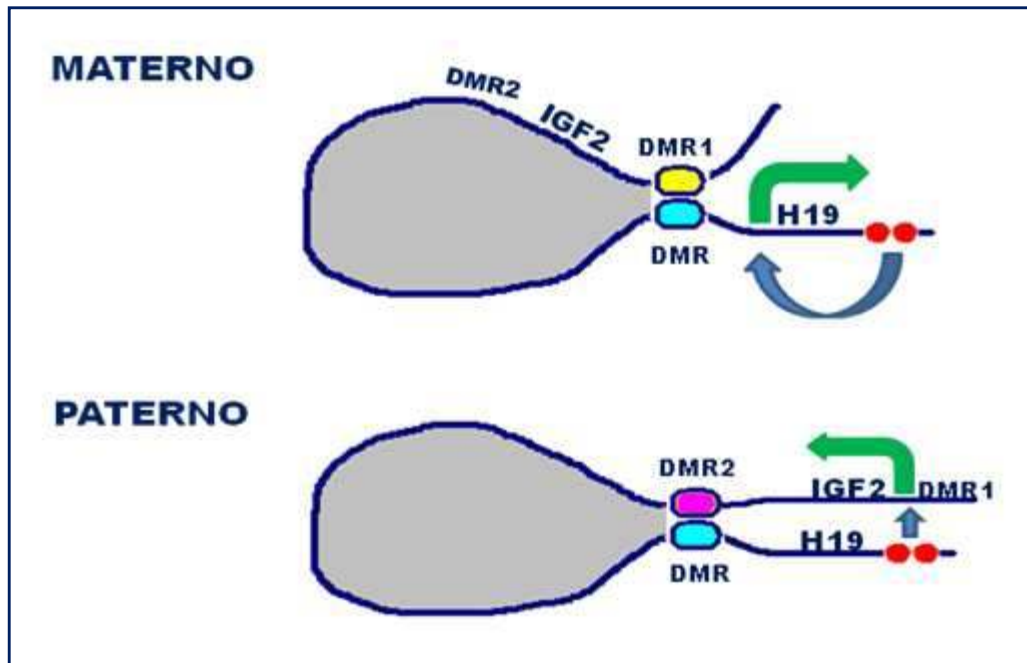


Figura 3: Modelo de interação entre as DMRs formando dois domínios de cromatina um ativo e outro inativo (área sombreada) nos alelos materno e paterno. No alelo materno a DMR1 e DMR interagem e o gene H19 fica no domínio ativo sendo expresso. No alelo paterno a DMR interage com a DMR2 fazendo com que o gene IGF2 fique no domínio ativo sendo expresso (Modificado de Murrell et al., 2004).

O modelo de cromatina “loop” descreve um parâmetro epigenético pelo qual IGF2 (cujos promotores não são regulados por metilação do DNA) é transportado para domínio inativo ou ativo perto de “enhancers”. Ele será interessante para determinar se genes “imprinted”, ou genes que são regulados epigeneticamente, localizados em “clusters”, possuem trocas epigenéticas similares (MURRELL et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita dos ovócitos e células do cumulus oophorus (CC)

Os ovários de fêmeas nelore foram obtidos de abatedouros na região de Luziânia Goiás, sendo coletados imediatamente após o abate e transportados 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. As coletas foram realizadas entre os meses de Abril a Novembro de 2008.

Os folículos foram dissecados da córtex ovariana em placa aquecedora a 36°C, com o auxílio de tesoura, lâmina de bisturi e pinças (Figura 4). Foram mantidos em solução salina em tampão fosfato (PBS) acrescida de soro fetal bovino (SFB) 10% sobre a placa aquecedora durante todo o processo.



Figura 4: Materiais utilizados para a dissecação e folículos sendo dissecados com auxílio de pinça e lâmina de bisturi.

Os folículos foram mensurados utilizando-se estereomicroscópio e uma ocular graduada (*micrometer eyepiece* OSM-4® Olympus, Tokyo, Japan), rompidos, e os complexos cumulus-ovócitos (COC) rastreados e distribuídos em dois grupos: oriundos de folículos de 1 - 3 mm e maiores que 8,1 mm (Figuras 5 A e B). Cada COC foi classificado de acordo com o aspecto e distribuição das células do cumulus e uniformidade do citoplasma. Somente os COCs classificados como Grau 1 (ovócito com citoplasma homogêneo e granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus) e Grau 2 (ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas

áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos cinco camadas completas) foram utilizados neste estudo.

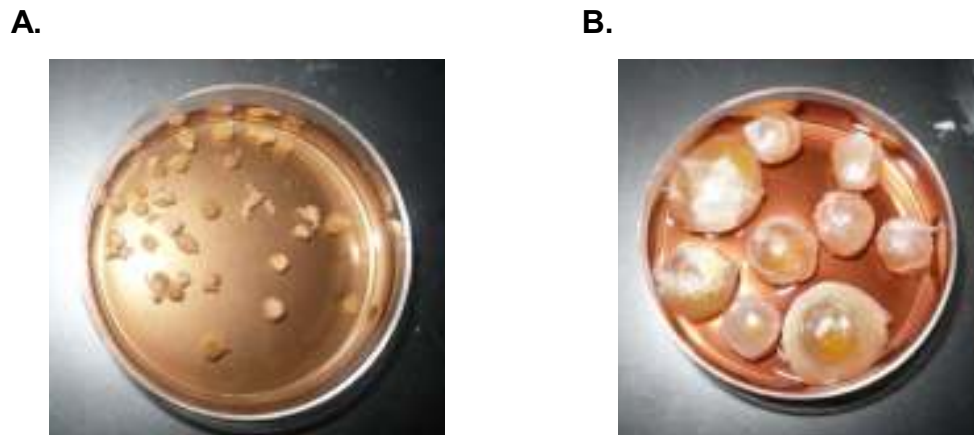


Figura 5: Folículos dissecados com diâmetro 1 – 3 mm (A) e $\geq 8,1$ mm (B).

Os COC obtidos de cada grupo foram divididos em mais dois grupos, os que passaram pelo processo de maturação *in vitro*, e os congelados imaturos. O primeiro foi lavado em meio de maturação (MIV), transferidos para gotas de 50 μ L MIV, cobertas com óleo mineral e incubados em estufa de atmosfera umidificada a 5% de CO₂, temperatura de 39°C por 22 a 24 horas. O meio de maturação foi composto por TCM 199 com sais de Earl's (Gibco BRL®), suplementado com 10% de SFB (Gibco BRL®), 24 UI/ml de hormônio luteinizante (LH Sigma®), 10 μ g/ml de hormônio folículo estimulante (FSH – Sigma®), 1 μ g/ml L-glutamina (Sigma®), 250 mg/ml de amicacina (Sigma®). Após o período de maturação, os ovócitos foram colocados em gotas de 50 μ l de hialuronidase (0,2%) por 10 minutos, desnudos por repetidas pipetagens e os que liberaram o primeiro corpúsculo polar (Figura 6) foram congelados a -80°C em PBS para posterior análise de metilação.

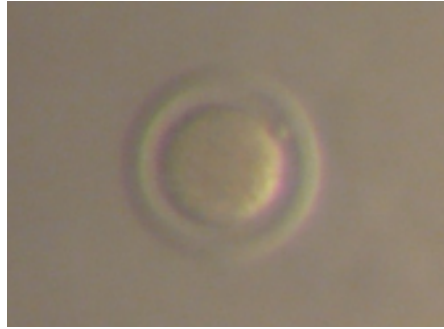


Figura 6: Ovócito maturado, desnudo, com o primeiro corpúsculo polar

O segundo grupo, composto por COC imaturos foi transferidos para uma gota de 50 μ L de solução PBS e desnudos através de sucessivas pipetagens garantindo a ausência completa de células do cumulus. Após a remoção das células do cumulus, os ovócitos intactos e completamente desnudos foram também congelados a -80°C.

As células do cumulus, tanto dos ovócitos imaturos quanto dos maturados que ficaram nas gotas de PBS após os desnudamentos foram transferidas para tubos de 0,2 mL e centrifugadas duas vezes por 2 minutos à 700g para lavagem. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionados 2 μ L de PBS ao “pellet” de células para congelamento a -80°C para posterior análise de metilação.

No fim do procedimento todos os tubos com os ovócitos e as células do cumulus de cada grupo, foram armazenados em freezer a -80°C. Sendo assim, os grupos ficaram divididos conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Divisão das amostras em 8 grupos.

1-3 mm	≥ 8,1 mm
Ovócitos imaturos	Ovócitos imaturos
Ovócitos maturados	Ovócitos maturados
CCs imaturas	CCs imaturas
CCs maturadas	CCs maturadas

Foram utilizados 60 ovócitos e CC de 60 ovócitos de cada grupo para avaliar o padrão de metilação da DMR2 do gene “imprinted” IGF2.

3.2 Extração de DNA dos ovócitos e células do cumulus

As amostras foram retiradas do freezer a -80°C , selecionadas em nitrogênio líquido e acondicionadas 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 um tubo de 0,2 mL 60 ovócitos referentes a cada grupo, com um volume final de $15\mu\text{L}$ de PBS. Adicionou-se às amostras a enzima pronase E, para promover a digestão da zona pelúcida, com uma concentração final de 10 mg/mL , resultando um volume final de $30\mu\text{L}$. As amostras foram incubadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) à 37°C por 35 minutos. Como alguns ovócitos ainda se apresentavam aderidos à parede do tubo, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por mais 12 minutos a 37°C no mesmo termociclador. Em seguida acrescentou-se uma gota de óleo mineral em cada amostra e a enzima foi inativada a 85°C por 15 minutos em termociclador.

Para liberar o DNA dos ovócitos, 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.

Para a extração do DNA das CC foi utilizado um protocolo baseado em “salting out” já bem estabelecido no Laboratório de Reprodução Animal I da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.3 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 . As amostras de ovócitos foram eluídas em $10\mu\text{L}$, enquanto que as das células foram em $15\mu\text{L}$. Basicamente, este tratamento consistiu na conversão mediada pelo bissulfito de sódio das citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas não

são convertidas. As amostras foram armazenadas a -20°C , para posterior amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase).

3.4 PCR “nested” para o gene IGF2 e purificação dos “amplicons”

A partir das amostras de DNA tratado com bissulfito de sódio dos ovócitos e das CCs, foi realizado um primeiro “round” de amplificação para cada tratamento, sob as mesmas condições. O volume final para realização dos mesmos foi de $20\ \mu\text{L}$ utilizando solução tampão 1X; $2,0\ \text{mM}$ de MgCl_2 ; $100\ \mu\text{M}$ de cada dNTP; $0,5\ \mu\text{M}$ de cada “primer”; $1,0\ \text{U}$ da enzima Taq Polimerase Platinum (Invitrogen®) e $3,0\ \mu\text{L}$ de DNA tratado com bissulfito. A reação de PCR para o gene IGF2 utilizou uma desnaturação inicial de 94°C por 3min, seguidos de 45 ciclos com 94°C por 40s, 45°C por 1min, 72°C por 1min, acrescidos de uma extensão final de 72°C por 15min.

O segundo “round” de PCR foi realizado sob as mesmas condições do PCR da primeira reação, mudando apenas o molde de DNA utilizado como “template”, sendo $1,0\ \mu\text{L}$ do produto do primeiro PCR para os ovócitos e $0,5\ \mu\text{L}$ e $1,0\ \mu\text{L}$ para as CC. As condições de amplificação para o “primer” interno (“inner”) do IGF2 foram as mesmas condições da primeira reação, alterando apenas a temperatura de anelamento que foi de 40°C . As sequências dos “primers” utilizados nas reações, acesso ao “GenBank”, localização, posição na ilha CpG, tamanho do fragmento amplificado e números de CpGs estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2: Identificação do Gene, sequências dos “primers” utilizados, acesso no “GenBank”, sua localização, posição na ilha CpG, tamanho e o número de CpGs do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos “primers” (5’- 3’)	Acesso sequência	Localização do “primer”	Posição da Ilha CpG	Tamanho do fragmento Amplificado	Nº de CpGs
Igf2 “out”	F: TGGGTAAGTTTTTTAATATGATATT R:TTTAAAACCAATTAATTTTATACATT	X53553.1	243-268 672-697	éxon 10 (DMR)	455 pb	-
Igf2 “inner”	F:ACATTTTTAAAAATATTATTCT R:TAATATGATATTTGGAAGTAGT	X53553.1	257-278 655-676	éxon 10 (DMR)	420 pb	27

Após a amplificação realizou-se a eletroforese dos “amplicons” (produtos da PCR) utilizando gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Logo após, o gel foi visualizado e fotografado utilizando um fotodocumentador como mostram as Figuras 7 A e B. Os produtos da PCR foram recortados do gel e purificados utilizando o kit GenClean® III (MP Biomedicals, LLC), seguindo as recomendações do fabricante.

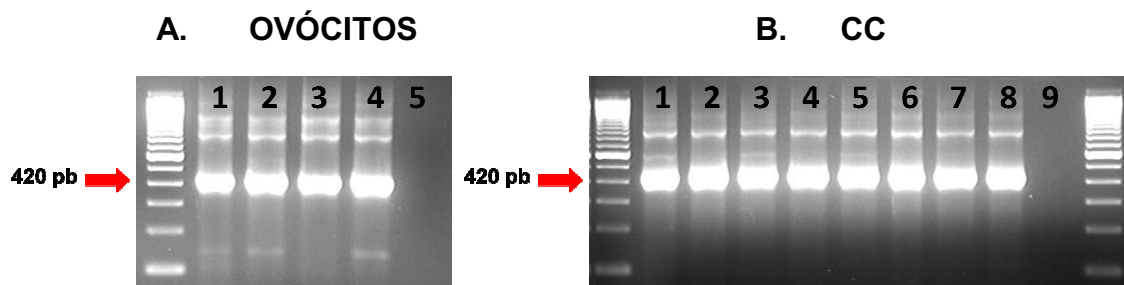


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1,5% do gene IGF2, nos ovócitos, com os “primers” “inner” (A), sendo 1 e 2, imaturos e maturados de folículos de 1 – 3 mm; 3 e 4 imaturos e maturados de folículos \geq 8,1 mm; 5 – controle negativo (sem DNA); e das CC (B), sendo 1 (0,5 μ L) e 2 (1,0 μ L) de folículos de 1 – 3 mm imaturos, 3(0,5 μ L) e 4 (1,0 μ L) de folículos de 1 – 3 mm maturados, 5 (0,5 μ L) e 6 (1,0 μ L) de folículo \geq 8,1 mm imaturo, 7(0,5 μ L) e 8 (1,0 μ L) de folículo \geq 8,1 mm maturados e 9 controle negativo (sem DNA).

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

Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro ND-1000® (NanoDrop) e os fragmentos referentes a cada grupo 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 choque térmico e o produto foi semeado em placas de petri 90 x 15 mm contendo meio LB Ágar com ampicilina a 60 μ g/mL, 40 μ L de X-Gal a 20 mg/mL e 4 μ L IPTG a 200 mg/mL. As placas foram fechadas, invertidas, vedadas com parafilme e incubadas em estufa a 37°C por 16 h. Logo após, as placas foram acondicionadas a 4°C por 2 horas. Somente as colônias brancas foram selecionadas para serem cultivadas em meio LB com 100 μ g/mL de ampicilina. Para isso, utilizou-se palito de madeira autoclavado, onde em uma das pontas retirou-se a colônia, e foi inserido em tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio líquido de cultivo com antibiótico, para crescimento “overnight”.

Os conteúdos dos tubos que apresentaram turbidez, foram aliqüotados em 2 tubos de 1,5 mL. O vetor foi extraído seguindo o protocolo de mini preparação de plasmídeo (SAMBROOK, et al., 1989). Uma alíquota de 5 μ L foi utilizada para realizar a digestão enzimática com a endonuclease ECO RI (Invitrogen) incubando a 37°C para confirmação do fragmento inserido. Para isso, realizou-se eletroforese de gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 10 mg/mL e a fotodocumentação do mesmo (Figura 8).

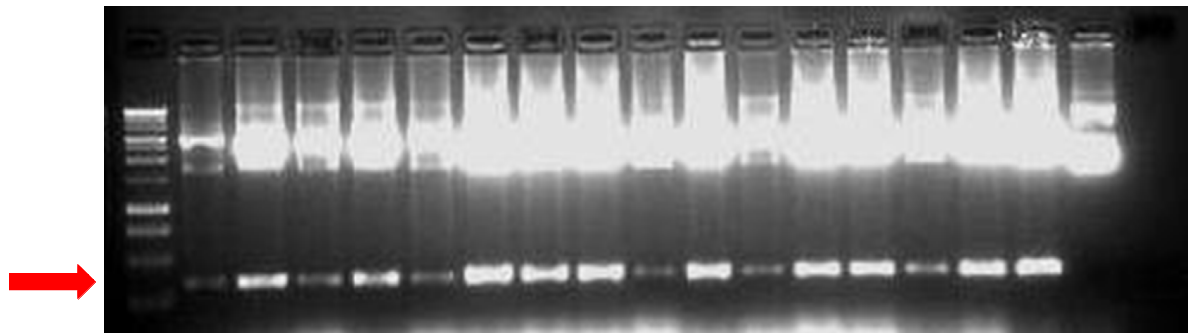


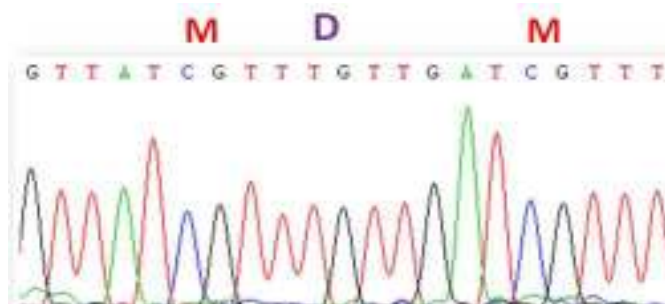
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do fragmento inserido correspondente ao “amplicon” da DMR do último éxon do gene IGF2 possuindo 332 pb. Cada linha corresponde a uma amostra de DNA plasmidial, sendo a primeira o marcador de 1kb (Promega) e o último ao controle negativo.

As amostras que confirmaram o sucesso da clonagem foram submetidas à eletroforese e purificadas utilizando o kit GenClean® III (MP Biomedicals, LLC), seguindo as recomendações do fabricante. Uma nova quantificação foi realizada utilizando o mesmo espectrofotômetro e uma eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio foi realizada para confirmar a quantificação e qualidade do material purificado. As amostras de DNA da minipreparação foram encaminhadas para a plataforma de sequenciamento, e as seqüências foram obtidas utilizando-se a metodologia de dideoxi com os “primers” universais SP6 e T7. Somente seqüências derivadas de clones com conversão de citosinas não CpG \geq 95% foram analisadas. Os padrões de metilação foram usados para discriminar clones originados de diferentes “templates” de DNA. Das amostras dos ovócitos, foram avaliadas 9 seqüências do grupo dos ovócitos de folículos de 1 – 3 mm imaturos, 10 do grupo de 1 – 3 mm maturados, 5 de \geq 8,1 mm imaturos e 6 de \geq 8,1 mm maturados. Já para as células do cumulus, foram avaliadas 9 seqüências de cada grupo provenientes de

folículos de 1 – 3 mm imaturos e maturados, 11 do grupo de $\geq 8,1$ mm imaturos e 10 de $\geq 8,1$ mm maturados.

As seqüência foram analisadas utilizando os programas CHROMAS e DNAMAN 4.0 sendo comparadas com seqüências depositadas no “GenBank”, para o gene IGF2 como observado nas Figuras 9 A e B.

A.



B.

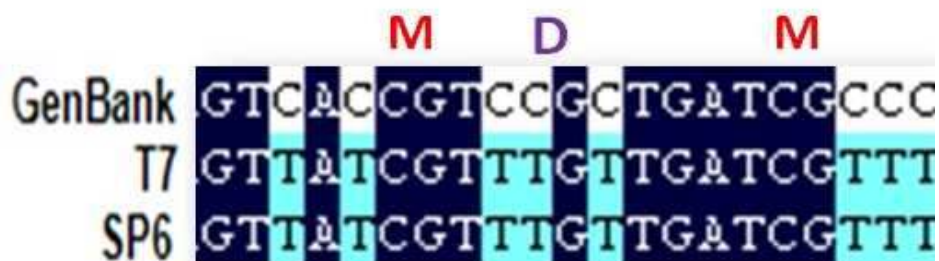


Figura 9: Análise de um cromatograma utilizando o programa CHROMAS (A). A letra M indica um dinucleotídeo CG metilado e a letra D um demetilado e transformado pelo bissulfito.. (B) Análise de alinhamento de seqüências (“GenBank” e seqüências geradas com os “primers” T7 e SP6) utilizando o programa DNAMAN 4.0, mostrando as CGs metiladas (M) (a citosina permaneceu inalterada) e demetilada (D) (a citosina se transformou em uracila e após a PCR em timina).

3.6 Análises estatísticas

Os dados relativos ao número de folículos dissecados, Complexo Cumulus Ovócitos obtidos e maturação foram comparados pelo teste do Qui-quadrado. Os padrões de metilação entre os tratamentos experimentais, nas 27 ilhas CpG, foram comparados utilizando tanto a porcentagem de CGs metiladas sobre seu total quanto a quantidade de clones hipermetilados ($\geq 50\%$ de sítios CpG metilados na

seqüência; IMAMURA et al., 2005) sobre o total de clones. Para isso, utilizou-se o teste *t* de *Student* ou o teste de *Mann-Whitney* quando os dados apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todos os dados foram avaliados utilizando o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a dissecação dos folículos, estes foram mensurados e os COC rastreados de graus 1 e 2 foram selecionados e classificados como viáveis. O resultado obtido pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3: Diâmetro e número de folículos dissecados com seus respectivos complexo cumulus-ovócito de graus I e II (viáveis).

DIÂMETRO DOS FOLÍCULOS	Nº DISSECADOS	COC VIÁVEIS (%)	P
1 – 3 mm	2.249	493 (22%) ^a	P<0,05
≥ 8,1 mm	1.118	453 (40,5%) ^b	
TOTAL	3.367	946 (28%)	

Nossos resultados mostram que folículos $\geq 8,1$ mm apresentam uma maior porcentagem de COC viáveis (40,5%) do que os de 1 – 3 mm (22%). Resultados semelhantes foram obtidos por Ramos e colaboradores (2006) que observaram que os folículos grandes e médios apresentavam uma maior quantidade de COCs de grau I do que os de folículos menores.

A baixa relação entre número de folículos dissecados e COCs de graus I e II no grupo de 1 – 3 mm (22%) pode ter sido causada por uma alta incidência de folículos em estágio de atresia nessa categoria. Segundo Castilhos e colaboradores (2007) após ocorrer a seleção do folículo dominante os demais que foram recrutados no início da onda entram no estágio de atresia e que quando a aspiração folicular é realizada, independente da fase do ciclo estral, mais de 85% dos folículos ovarianos são atrésicos.

Vários estudos têm demonstrado que a capacidade de desenvolvimento *in vitro* de ovócitos bovinos, pode ser afetada pelo tamanho e qualidade dos folículos dos quais são obtidos (LONERGAN et al., 1994; SIRARD & BLODIN, 1996).

Nossos resultados mostram que os ovócitos dos folículos $\geq 8,1$ mm responderam melhor ao processo de maturação *in vitro* (60,6%), com liberação do primeiro corpúsculo polar, do que os de 1 - 3 mm (52,5%) conforme Tabela 4.

Tabela 4: Diâmetro dos folículos dissecados, números de complexo cumulus-ovócito imaturos e com maturação nuclear.

DIÂMETRO DOS FOLÍCULOS	Nº DE COC IMATUROS	MATURAÇÃO NUCLEAR (%)	P
1 – 3 mm	219	115 (52,5%) ^a	<i>P</i> <0,01
≥ 8,1 mm	188	114 (60,6%) ^b	
TOTAL	407	229 (56%)	

Vários estudos também observaram que ovócitos derivados de folículos grandes são mais competentes do que os de folículos pequenos na maturação *in vitro* (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; BLONDIN & SIRARD, 1995; YANG et al., 1998; HAGEMANN et al., 1999; MERMILLOD et al., 1999; MARCHAL et al., 2002; MACHATKOVA et al., 2004; KAUFFOLD et al., 2005; LEQUARRE et al., 2005; FENG et al., 2007; RACEDO et al., 2008).

Yang e colaboradores (1998) acreditam que o baixo desenvolvimento dos ovócitos de folículos pequenos, pode ter sido causado por algum fator intrínseco do ovócito, como incompetência nuclear e citoplasmática.

A competência para maturar é adquirida progressivamente durante o crescimento folicular, e o fato dos ovócitos chegarem ao estágio de MII *in vitro* não necessariamente significa que eles sejam competentes para suportar uma fecundação normal e posteriormente desenvolvimento embrionário (CROZET et al., 1995). Isso demonstra que ovócitos oriundos de folículos pequenos são capazes de sustentar uma maturação nuclear, mas podem não ser capazes de completar a maturação citoplasmática e se tornarem embrião (DODE et al., 2000). A completa competência para maturar parece ser adquirida somente quando os folículos atingem em torno de 3 mm (FAIR et al., 1995; CAIXETA et al., 2009). Como visto que ovócitos coletados de folículos de 1-2 mm não tem capacidade de se desenvolver *in vitro* (PAVLOK et al., 1992), ao passo que os coletados de folículos de 6 mm ou mais têm maior potencial de desenvolvimento (LONERGAN et al., 1994).

Fair e colaboradores (1995) mostraram que ovócitos de folículos pequenos (\leq 2mm) têm um diâmetro menor e uma menor capacidade de realizar o rompimento da vesícula germinativa e de chegar à metáfase II. E os ovócitos de folículos maiores (\geq 6mm) (SIRARD & BLODIN, 1996), têm capacidade de sofrer maturação nuclear e citoplasmática e de se desenvolver até o estágio de blastocisto.

Caixeta e colaboradores (2009) mostraram que ovócitos de folículos pequenos (1 – 3mm) apresentaram menor diâmetro e que não houve alteração no tamanho do ovócito a partir do momento em que os folículos atingiram 3 mm. Além disso, ovócitos oriundos destes folículos pequenos apresentaram uma menor taxa de clivagem, possivelmente por não ter completado o seu crescimento total.

Conforme Fukui & Sakuma (1980), cerca de 54% dos ovócitos de folículos ≤ 5 mm de diâmetro alcançaram o estágio de metáfase II, porém não houve diferença significativa da maturação de ovócitos coletados de folículos de tamanho maior. Vários autores também não observaram diferenças na taxa de maturação de ovócitos de diferentes tamanhos (CAROLAN et al., 1996; DODE et al., 2000; SENEDA et al., 2001).

Neste estudo, utilizou-se ovócitos de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm, ou seja, menos e mais competentes para a maturação *in vitro*, respectivamente. Como o padrão “imprinting” é estabelecido durante a ovogênese e a foliculogênese, eles podem diferir entre esses dois grupos. Foi escolhida uma DMR presente no último éxon do gene IGF2 bovino, para análise do padrão de metilação. Essa DMR, conforme vários autores é altamente metilada em espermatozoides e pouco metilada em ovócitos de camundongos (OSWALD et al. 2000; LOPES et al., 2003; GEBERT et al., 2006; SHIM et al. 2008).

Os resultados dos sequenciamentos e análises do padrão de metilação da DMR estão representados na Figura 10. Dentro de cada grupo dos ovócitos, ao menos 4 correspondem a alelos diferentes, baseando-se no padrão diferente de metilação entre cada clone. Os ovócitos imaturos oriundos de folículos de 1 – 3 mm apresentaram-se menos metilados ($33,33\% \pm 34,79\%$) (Fig.10 A) quando comparados com os imaturos de $\geq 8,1$ mm ($83,69\% \pm 8,52\%$) (Fig. 10 B).

A maior porcentagem de metilação observada nos ovócitos imaturos de folículos $\geq 8,1$ mm comparados com de 1 – 3 mm com diferenças significativas (Figuras 10 A e B) pode ser devida ao processo de remetilação que começa nas células germinativas primordiais, tornando-se estável antes que ocorra a fecundação. Portanto, especula-se que os ovócitos de folículos maiores imaturos, que já pararam de crescer, teriam recebido mais metilação que os ovócitos imaturos de folículos de 1 – 3 mm que ainda são menores, mesmo em regiões que se

esperam demetiladas no gameta feminino apto à fecundação, como é o caso desta DMR (GEBERT et al., 2006). Talvez haja uma metilação geral antes, para depois demetilar as DMR com padrão não metiladas em fêmeas antes mesmo da fecundação. Esta hipótese está de acordo com Imamura e colaboradores (2005) que mostraram haver uma atividade demetilante antes da fecundação. Hendriksen e colaboradores (2000) e Caixeta e colaboradores (2009) relataram que ovócitos derivados de folículos grandes apresentam uma maior porcentagem de blastocistos que dos de folículos pequenos e que ovócitos de folículos de 6 a 8 mm são mais competentes que os de 3 a 6 mm. Sendo assim, o padrão mais metilado dos ovócitos de folículos $\geq 8,1$ mm imaturos talvez seja o mais adequado para iniciar, prosseguir e completar a maturação.

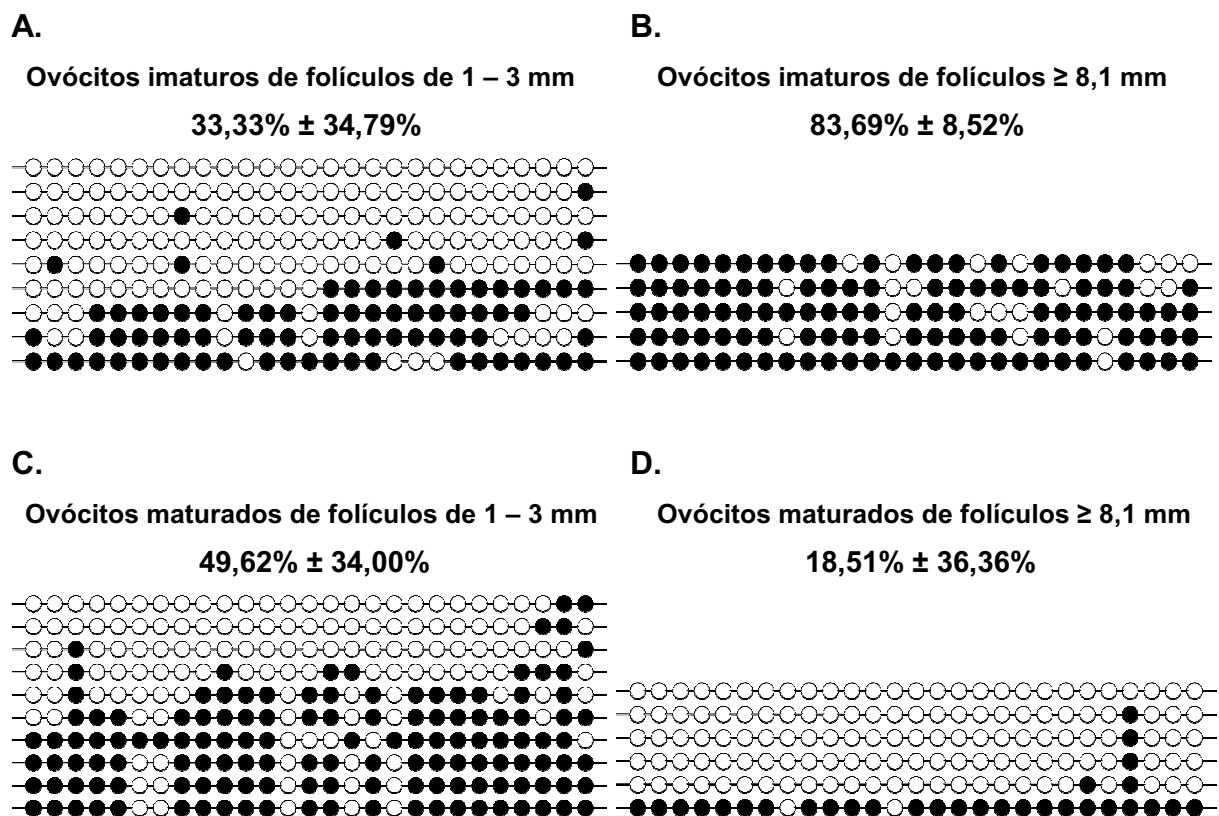


Figura 10: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos de folículos imaturos e maturados de 1 - 3 e $\geq 8,1$ mm (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. (A e B $P=0,00699$; A e C $P=0,211$; C e D $P=0,042$; B e D $P=0,0519$).

Após o processo de maturação, os ovócitos de folículos de 1 – 3 mm mantiveram o mesmo padrão de metilação que apresentavam antes da maturação, $33,33\% \pm 34,79\%$ e $49,62\% \pm 34,00\%$ (Figuras 10 A e C). Os ovócitos de folículos \geq

8,1 mm apresentaram porcentagens de metilação diferentes após a maturação, $83,69\% \pm 8,52\%$ e $18,51\% \pm 36,36\%$ (Figuras 10 B e D). Quando se avaliou apenas os maturados, os ovócitos de folículos de 1 – 3 mm maturados apresentaram um padrão de metilação mais alto que os de folículos $\geq 8,1$ mm, $49,62\% \pm 34,00\%$ e $18,51\% \pm 36,36\%$, respectivamente (Figuras 10 C e D). Considerando que os ovócitos de folículos $\geq 8,1$ mm são mais competentes, baseando-se nas taxas de maturação nuclear mostrados neste estudo e em vários outros trabalhos da literatura, esse padrão de metilação baixo da DMR do último éxon ($18,51\% \pm 36,36\%$), deve ser o mais adequado para os ovócitos com maturação nuclear completa e esse deve ser o padrão feminino dessa DMR. Isto está de acordo Murrell e colaboradores (2001) que afirmam que, metilada, esta região desempenha uma função de iniciação da transcrição do IGF2, e essa metilação promove altos níveis de sua expressão e este gene é transcricionalmente ativo no alelo masculino.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que há um processo de remetilação nesta região “imprinting” no final da ovogênese e antes da maturação. E que essa metilação é perdida ou diminuída durante o processo de maturação *in vitro*, em ovócitos que já atingiram seu crescimento, para regiões com um padrão esperado demetilado ou hipometilado em ovócitos. Portanto, o padrão “imprinted” é totalmente estabelecido durante a maturação do ovócito.

Além disso, El Maarri e colaboradores (2001) observaram que as marcas “imprinted” também podem ser estabelecidas durante e após a fecundação, e em concordância Park e colaboradores (2009) encontraram alterações no padrão “imprinted” durante o desenvolvimento embrionário inicial em suínos.

Imamura e colaboradores (2005), estudando padrões de metilação em genes “imprinted”, avaliaram estes padrões considerando sequências hipermetiladas ou hipometilada, sendo definidas com $\geq 50\%$ e $< 50\%$ de sítios CpGs metilados, respectivamente. Sendo assim, ao analisar a porcentagem de clones hipermetilados encontramos $33,33\%$ e 100% para ovócitos imaturos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm, respectivamente; e de 60% e $16,66\%$ para ovócitos maturados de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm, respectivamente. Este tipo de abordagem reforça os resultados já descritos com a porcentagem de metilação geral mostrada na Figura 10, onde ovócitos de folículos de 1 – 3 mm imaturos apresentaram menor padrão de metilação que os de

$\geq 8,1$ mm imaturos, e que os ovócitos de folículos $\geq 8,1$ mm maturados apresentam a menor taxa de metilação.

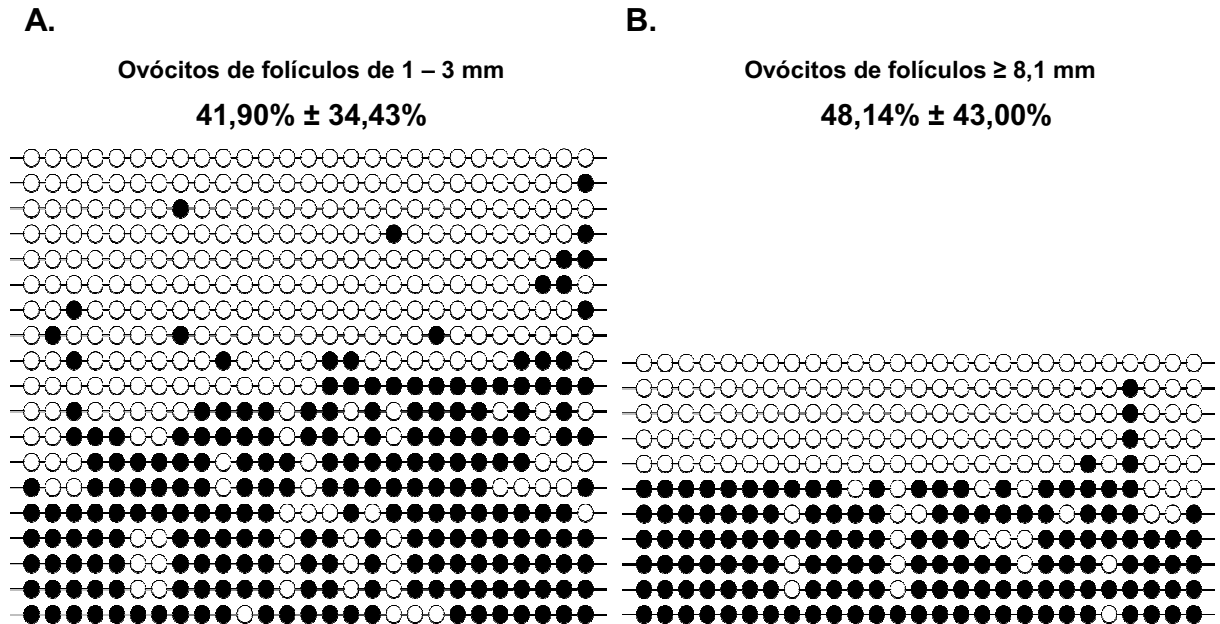


Figura 11: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos 1 – 3 mm (imaturos e maturados) (A) e $\geq 8,1$ mm (imaturos e maturados) (B) (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. ($P=0,672$)

Observando a Figura 11, ao reunir em apenas dois grupos, imaturos e maturados separados somente pelo tamanho do folículo, não foi encontrada uma diferença significativa entre eles. Os ovócitos de folículos de 1 – 3 mm apresentaram 41,90% \pm 34,43% de metilação comparados com 48,14% \pm 43,00% dos $\geq 8,1$ mm. Este resultado, mostrando que não há diferenças entre ovócitos de folículos de diferentes tamanhos, pode ser devido à grande influência do processo de maturação sobre o padrão de metilação desses ovócitos, como mostrado na Figura 10.

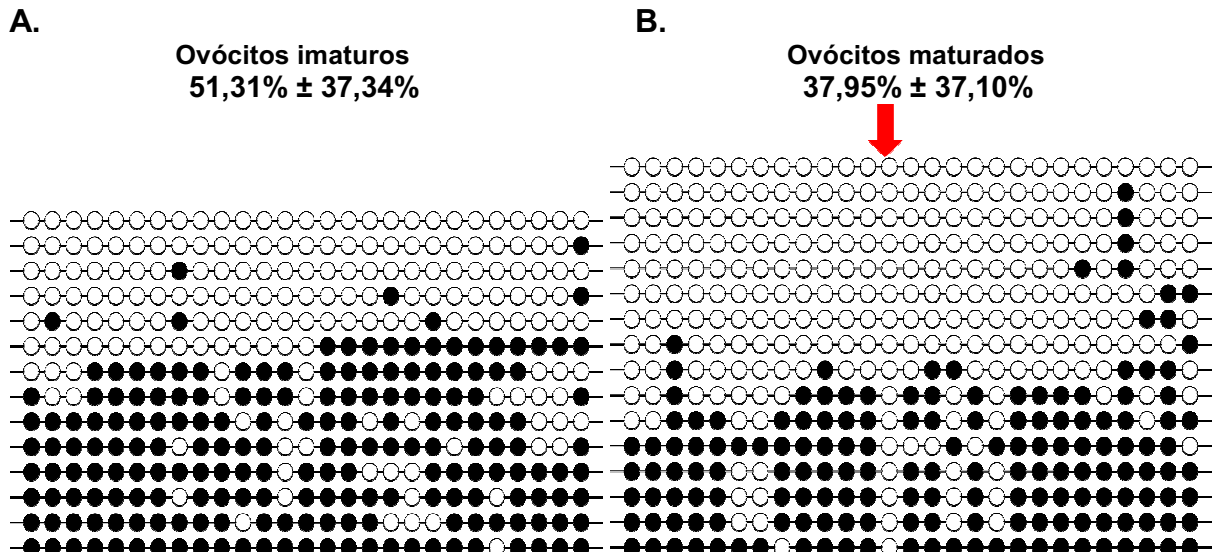


Figura 12: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em ovócitos imaturos (de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm) (A) e maturados (de folículos de 1 – 3 mm e $\geq 8,1$ mm) (B) (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente ($P=0,4$). A seta indica a 13^a CpG demetilada.

Quando os ovócitos foram agrupados em imaturos e maturados, independentemente do tamanho do folículo proveniente, não apresentaram diferenças significativas (Figuras 12 A e B). Apesar de que no grupo de ovócitos imaturos, os incompetentes para maturar estão presentes. Da mesma forma que o efeito da maturação sobre o padrão de metilação possa ter contribuído para não se observar diferenças entre ovócitos de folículos de diferentes tamanhos, aqui o efeito de tamanho de folículo, mostrado também na Figura 10, pode ter contribuído para não se observar diferenças entre imaturos e maturados.

Baseado no padrão do “imprinting” genômico, espera-se que essa DMR tenha um padrão demetilado no gameta feminino e metilado no masculino. De acordo com nossos resultados e outros da literatura, observamos que nem todos os alelos estudados estão demetilados no gameta feminino. Neste trabalho foi encontrado 37,95% de metilação em ovócitos maturados, sendo que Gebert e colaboradores (2006) encontraram 16% e Park e colaboradores (2009) em suínos, 10,1%. Quando se avalia a porcentagem de sequências hipermetiladas neste grupo de ovócitos maturados, encontramos 43,75% (7/16) enquanto que Gebert e colaboradores (2006) encontraram 22,22% (4/18), em bovinos. Portanto, especulamos que mesmo para um padrão “imprinted” esperado demetilado, há sequências hipermetiladas. A maior porcentagem de metilação encontrada neste trabalho, em relação ao estudo

de Gebert e colaboradores (2006), pode ser devido à origem dos ovócitos, que são *Bos taurus indicus* neste experimento, ao sistema de maturação diferente e/ou à classificação por tamanho de folículos. Gebert e colaboradores (2006) não citam o tamanho dos folículos aspirados e, neste experimento se for considerar apenas os ovócitos maturados de folículos $\geq 8,1$ mm a porcentagem de metilação é de 18,51%, muito próximo dos 16% encontrado por eles.

Um fato interessante observado nos resultados em todos os tratamentos dos ovócitos foi a resistência da 13^a CpG à metilação, como observado na Figura 12 (B). Talvez possa existir algum fator intrínseco que a impeça de ser metilada. Kovacheva e colaboradores (2007), em um estudo com o gene IGF2 em tecidos adultos, observaram que no fígado a 19^a CpG apresentava pouco metilada (4 – 8%), e que a 8^a e a 15^a CpG apresentavam hipermetiladas, mostrando que pode haver diferenças entre os padrões de metilação entre CpGs. Especula-se que essas diferenças em CpGs específicas para aceitarem ou não metilação possam ter algum significado biológico relevante, o que não foi avaliado neste estudo.

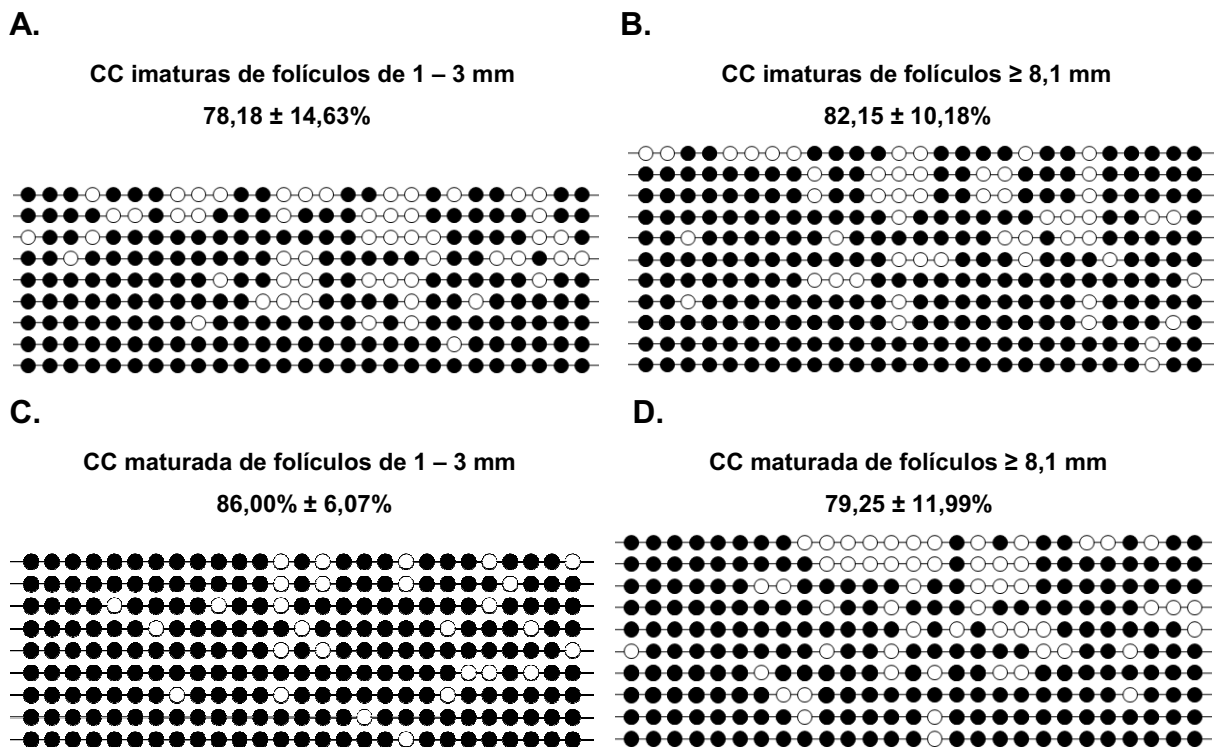


Figura 13: Padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 em CCs de folículos imaturos e maturados de 1 - 3 e $\geq 8,1$ mm (média \pm desvio padrão). Cada linha horizontal representa um clone e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG (total de 27 CpGs). Os círculos pretos e brancos indicam metilado e não metilado respectivamente. (A e B $P=0,4848$; A e C $P=0,167$; C e D $P=0,1472$; B e D $P=0,5567$)

Analisando as CC, que são células somáticas ($2n$) apresentando um alelo materno e outro paterno, diferentemente dos ovócitos, podemos observar que não houve diferenças significativas entre elas (Figura 13). Estas células não devem sofrer reprogramação “imprinting” e seu padrão epigenético resiste às condições adversas da maturação *in vitro*. Ao contrário dos resultados vistos nos ovócitos, os quais apresentaram variações nos padrões de metilação entre os grupos. Segundo Reik e colaboradores (2001), os padrões de metilação em células somáticas são geralmente estáveis e herdáveis, ao contrário das células da linha germinativa que sofrem reprogramação. Isto está de acordo com nossos resultados, que mostraram variações no padrão de metilação em ovócitos, mas não nas CC. Um fato que deve ser considerado é que o que se espera em um padrão “imprinted” em células somáticas é um alelo metilado e o outro não. Baseado nessa afirmação encontramos um padrão hipermetilado nas CC.

Apesar do fato de que vários anos foram dedicados a aperfeiçoar o processo de maturação do ovócito *in vitro*, o desenvolvimento da competência total ainda está longe dos parâmetros normais de um animal *in vivo*. As anomalias do desenvolvimento são freqüentemente registradas, e as prováveis causas podem ser alterações epigenéticas (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; NIEMANN et al. 2002). Segundo Lucifero e colaboradores (2004) as marcas “imprinting” dos ovócitos podem ser vulneráveis às técnicas de reprodução assistida como maturação *in vitro* e hiperestimulação ovariana.

O processo de maturação *in vitro* pode provocar perda das marcas “imprinting”, resultando na falha do desenvolvimento do embrião (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; YOUNG et al., 2001).

Em humanos, genes “imprinted” como o H19, IGF2 e também reguladores epigenéticos como DNMT1 e DNMT3 tem sido vistos expressos inadequadamente em produtos da reprodução assistida (PICTON et al., 2008).

Segundo Kovacheva e colaboradores (2007), o longo período para o restabelecimento dos padrões “imprinting” na linha germinativa, pode tornar a reprogramação da DMR do último éxon do gene IGF2 sensível ao ambiente externo.

5. CONCLUSÃO

O padrão mais metilado da DMR do último éxon do gene IGF2 nos ovócitos imaturos de folículos $\geq 8,1$ mm pode estar relacionado à maior competência, visto que eles responderam melhor ao processo de maturação nuclear. E os ovócitos de folículos de 1 – 3 mm podem ainda não apresentarem os padrões “imprinting” adequados para suportar uma maturação, sendo menos competentes. Concluí-se que a DMR do último éxon do gene IGF2 poderá ser usada como um marcador molecular para o “status” da reprogramação epigenética em ovócitos, auxiliando a PIVE no desenvolvimento e modificações de novos protocolos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos para a caracterização dos padrões epigenéticos deverão ser realizados em ovócitos bovinos de folículos pré-antrais e antrais para o estabelecimento do perfil “imprinted” completo na ovogênese. Assim como estudos para avaliar a influência de fatores ambientais e nutricionais no perfil epigenético de ovócitos utilizados na produção *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AMARGER, V.; NGUYEN, M.; van LAERE, A.S.; BRAUNSCHWEIG, M.; NEZER, C.; GEORGES, M.; et al., Comparative sequence analysis of the INS-IGF2-H19 gene cluster in pigs, **Mammalian Genome**, New York, v.13, p. 388–398, 2002.

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**, United States v. 24, p. 451–455, 1994.

ARNOSTI D.N.; KULKARNI M.M. Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards?. **Journal of cellular biochemistry**, United States, v.94, p.890–898, 2005.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ cells and fertilization: Reproduction in mammals**:1.2.ed. Ed. Cambridge: New York, 1982. 177p.

BAO, S.; OBATA, Y.; CARROLL, J.; DOMEKI, I.; KONO, T. Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice, **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v.62, p.616–621, 2000.

BARTOLOMEI, M. S., ZEMEL, S., AND TILGHMAN, S. M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. **Nature**, England, v.351, p.153–155, 1991.

BEAUDET, A.L.; JIANG, Y.H. A rheostat model for a rapid and reversible form of imprintingdependent evolution. **American journal of human genetics**, United States, v.70, p.1389-1397, 2002.

BESTOR TH. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, England, v.9, n.16, p.2395-2402, 2000.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, United States, v. 16, n. 1, p. 6-21, jan. 2002.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.41, p.54-62, 1995.

BORGHOL N.; LORNAGE J.; BLACHERE T.; SOPHIE GARRET A.; LEFEVRE A. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. **Genomics**, Pittsburgh, v.87, p.417–426, 2006.

BRANDEIS, M.; KAFRI, T.; ARIEL, M.; CHAILLET, J.R.; McCARREY, J.; RAZIN, A. The ontogeny of allele-specific methylation associated imprinted genes in the mouse. **EMBO Journal**, England, v.12, p.3669-3677, 1993.

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**, England v.310, p. 781–784, 1984.

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**, Australia, v. 21. p. 655-664, 2009.

CARABATSOS, M.J.; SELBITTO, C.; GOODENOUGH, D.A.; ALBERTINI, D.F., Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental biology**. United States, v.226, p.167–179, 2000.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MONGET, P. et al. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 43, p.477-483, 1996.

CASTILHO, C.; ASSIS, G.S.; GARCIA, J.M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arquivo**

Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia. Belo Horizonte, v.59, n.2, p. 288-294, 2007.

Catalogue of Parent of Origin Effects. Imprinted Genes and Related Effects. GenBank. Disponível em: <<http://igc.otago.ac.nz/home.html>>. Acesso em: 08 jun. 2009.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction**, Oxford, *UpDate*, v.4, p.103-120, 1998.

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

CONSTÂNCIA, M.; HEMBERGER, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; et al., Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth, **Nature**, England, v.417, p.945–948, 2002.

CORRÊA, A. G.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v.104, p.132-142, 2008.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.1034, p.132-144, 2004.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.103, n.2, p.293-298, Mar. 1995.

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

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA methylation and cancer. **Journal of Clinical Oncology**, United States, v. 22, n. 22, p. 4632-4642, 2004.

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**, England, v. 345, n. 6270, p. 78-80, May 1990.

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

de PAGTER-HOLTHUIZEN, P.; JANSEN, M.; VAN DER KAMMEN, R. A.; VAN SCHAIK, F. M.; SUSSENBACH, J. S. Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene: characterization of the IGF-II mRNAs and na mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 950, n. 3, p. 282-295, Sep. 1988.

de WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, United States, v.78, n. 5, p.1277-1283, 2000.

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

DODE M. A. N., RODOVALHO N. C.; UENO V. G.; ALVES R. G. de O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.1, p. 207-214, 2000.

DODE M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34 (Supl 1), p.115-130, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v.71, p.1813-1821, 2004.

EFSTRATIADIS, A. Genetics of mouse growth. **The International Journal of Developmental Biology**, Spain, v. 42, n. 7, p. 955-976, 1998.

EI-MAARRI, O; BUITING, K.; PEERY, E. G.; et al. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. **Nature Genetics**, United States, v. 27, p. 341-344, 2001.

EPPIG, J.J. Mammalian oocyte development in vivo and in vitro. In: WASSARMAN, P.W. (Ed.). **Elements of mammalian fertilization**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 57-76.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 42, p. 437-442, 1995.

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

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

FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep, **Mammalian Genome**, New York, v.9 p.831–834, 1998.

FEINBERG, A. P. The epigenetics of cancer etiology. **Seminars in Cancer Biology**, United States, v. 14, n. 6, p. 427-432, 2004.

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

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Ireland, v. 163, n. 1, p. 53-60, May 2000.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 78, n. 3, p. 135-163, Oct. 2003.

FROMMER, M., MCDONALD, L.E., MILLAR, D.S., COLLIS, C.M., WATT, F., GRIGG, G.W., MOLLOY, P.L. AND PAUL, C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, United States, v. 80, p. 1579–1583, 1992.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of Bovine Oocytes Cultured in vitro: Relation to Ovarian Activity, Follicular Size and the Presence or Absence of Cumulus Cells, **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v. 22, p.669-673, 1980.

GARDNER, D. K.; LANE, M. *Ex vivo* early embryo development and effects on gene expression and imprinting. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 17, n. 3, p. 361-370, Feb. 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**, United States, v.88, p.222–229, 2006.

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**, London, v. 25, n. 2, p. 82-90, Feb. 2009.

GÖNDÖR A, OHLSSON R. Replication timing and epigenetic reprogramming of gene expression: a two-way relationship?, **Nature Reviews. Genetics**, England, v. 10, n. 4, p. 269-276, 2009.

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

HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H.R. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.53, p.451-458, 1999.

HALL, J. G. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. **American Journal of Human Genetics**, United States, v. 46, n. 5, p. 857-873, May 1990.

HAPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEILL, D.J. **The physiology of reproduction**. v.1, 2.ed. Ed. New York: Raven press, 1994. p.123-187.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis a personal account. **Journal Seek entry for Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences**, Japan, v. 84, n.8, p.321-330, 2008.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, United States, V.53, P.11-20, 2000.

HERMAN JG, GRAFF JR, MYÖHÄNEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.93, p.9821-9826, 1996.

HURST, L. D.; McVEAN, G. T. Growth effects of uniparental disomies and the conflict theory of genomic imprinting. **Trends in Genetics**, England, v.13, n. 11, p.436-443, Nov. 1997.

HURST, L.D.; McVEAN, G.T. Do we understand the evolution of genomic imprinting? **Current Opinion in Genetics and Development**, England, v. 8, n. 6, p.701-708, Dec. 1998.

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

IMAMURA, T.; KERJEAN, A.; HEAMS T.; KUPIEC, J.; THENEVIN, C.; PÀLDI, A. Dynamic CpG and Non-CpG Methylation of the *Peg1/Mest* Gene in the Mouse Oocyte and Preimplantation Embryo. **The Journal Of Biological Chemistry**, USA v. 280, n. 20, p. 20171–20175, 2005.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, United States, v. 33, suplemento, p. s245-s254, mar. 2003.

JEON, J. T.; CARLBORG, Ö.; TÖRNSTEN, A.; GIUFFRA, E.; AMARGER, V.; CHARDON, P.; ANDERSSON-EKLUND, L.; ANDERSSON, K.; HANSSON, I.; LUNDSTROM, K.; ANDERSSON, L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus, **Nature Genetics**, United States, v. 21, n. 2, p. 157-158, Feb. 1999.

KAUFFOLD, J.; AMER, H. A.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **The Journal of reproduction and development**, Japan, v. 51, n. 3, p. 325-332, Jun. 2005.

KING, W. A. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. **Advances in Veterinary Science Comparative Medicine**, United States, v. 34, p. 229-250, 1990.

KOVACHEVA, V.P.; MELLOTT, T.J.; DAVISON, J.M.; WAGNER, N.; LOPEZ-COVIELLA, I.; SCHNITZLER, A.C.; BLUSZTAJN, J.K. Gestational choline deficiency causes global- and *igf2* gene- dna hypermethylation by upregulation of *dnmt1* expression. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 282, n.43, p.31777-31788, 2007.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, Supplement, United States, v. 8, p. E14-E23, 2004.

LEBEDEV, I. N.; SAZHENOVA, E. A. Epimutations of Imprinted Genes in the Human Genome: Classification, Causes, Association with Hereditary Pathology, **Russian Journal of Genetics**, Russian, v.44, n. 10, p. 1176–1190, 2008.

LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M.; SOSNOWSKI, M. The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, United States, v. 46, n. 2, p. 267-277, Jul. 1996.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, Los Altos, v.63, p.841-859, 2005.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews. Genetics**, England, v. 3, n. 9 p. 662-673, sep. 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 in the methylation of Oct4 and Nanog. **Molecular and Cellular Biology**, United States, v. 27, n. 24, p. 8748-8759, Dec. 2007.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular and Reproduction Development**, New York, v.37, p.48-53, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 38, n. 4, p.259-267, Aug. 2003.

LONG, J.E.; CAI, X. Igf2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, Netherlands, v. 388, p. 125-134, 2007.

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 an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. **Human Molecular Genetics**, England, v. 12, n. 3, p. 295-305, 2003.

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

LUNA , H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocyte at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 68, n. 1, p. 23-28, Oct. 2001.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, United States. v. 61, n. 3, p. 329-335, 2004.

MANIPALVIRATN, S.; DECHERNEY, A.; SEGARS, J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, United States, v. 91, n. 2, p. 305-315, Feb. 2009.

MARCHAL, R., VIGNERON, C., PERREAU, C., BALI-PAPP, A., MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p.1523–1532, 2002.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Ovary: Oocytes Carry the Conversation Intercellular Communication in the Mammalian. **Science**, New York, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, Jun, 2002.

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

McLAREN, R.J.; MONTGOMERY, G.W. Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep, **Mammalian Genome**, New York, v.10, p.588–591, 1999.

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**, Brazil, v. 4, n. 4, p.812-821, 2005.

MERMILLOD, P., OUSSAID, B., COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.54, p.449–460, 1999.

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

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

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**, United States, v. 94, n. 23, p. 12509-12514, Nov. 1997.

MOORE, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 185-193, 2001.

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

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

NEWELL-PRICE, J.; CLARK, A. J. L.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, United States, v. 11, n. 4, p. 142-148, May 2000.

NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B.; COPPIETERS, W.; DETILLEUX, J.; HANSET, R.; KARIM, L.; KVASZ, A.; LEROY, P.; GEORGES, M. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs, **Nature Genetics**, United States, v. 21, n. 2, p. 155-156, Feb. 1999.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, United States, v.53, p.21–34, 2000.

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

OBATA, Y.; ONO, Y.; AKUZAWA, H.; KWON, O. Y.; YOSHIZAWA, M.; KONO, T. Post-implantation developmental of mouse androgenetic embryos produced by in-vitro fertilization of enucleated oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 874-880, Apr. 2000.

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

OCAÑA-QUERO, J. M.; PINEDO-MERLÍN, M.; MORENO-MILLÁN, M. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, United States, v. 51, n. 3, p. 667-672, Feb. 1999.

OHLSSON, R.; NYSTROEM, A.; PFEIFER-OHLSSON, S.; TOEHOENEN, V.; HEDBORG, F.; SCHOFIELD, P.; FLAN, F.; EKSTROM, T. J. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith–Wiedemann syndrome, **Nature Genetics**, United States, v. 4, n. 1, p. 94-97, May 1993.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, United States, v. 99, n. 3, p. 247-257, Oct. 1999.

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**, England, v.10, p.475-478, 2000.

PARK, C.H.; KIM, H.S.; LEE, S.G.; LEE, C.K. Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation embryos. **Genomics**, United States, v.93, p.179–186, 2009.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.31, p.63-67, 1992.

PICTON HM, HARRIS SE, MURUVI W, CHAMBERS EL. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, Cambridge, v.136, n.6 p.703-715, 2008.

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

RAINIER, S.; JOHNSON, L. A.; DOBRY, C. J.; PING, A. J.; GRUNDY, P. E.; FEINBERG, A. P. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, England, v. 362, n. 6422, p. 747-749, Apr. 1993.

RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia**. Belo Horizonte, v. 58, n.3, p.341-347, 2006.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Science**, United States, v. 293, n.5532, p. 1089-1093, 2001.

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

RICHARDS, E.J.; ELGIN, S.C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. **Cell**, United States, v.108, p.489-500, 2002.

ROTWEIN, P.; HALL, L. J. Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. **DNA and Cell Biology**, United States, v. 9, n. 10, p. 725-735, Dec. 1990.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. **Nature Genetics**, United States, v. 25, n. 3, p. 269-277, Jul. 2000.

RUSH, L.J.; PLASS, C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. **Cancer Letters**, Ireland, v.185, p.1-12, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: **A laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, vol.1, 1989.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews. Genetics**, England, v. 9, n. 2, p. 129-140, Feb. 2008.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdsam, v.67, p.37-43, 2001.

SHIM, S.W.; HAN, D.W.; YANG, J.H.; LEE, B.Y.; KIM, S.B.; SHIM, H.; LEE, H.T. Derivation of Embryonic Germ Cells from Post Migratory Primordial Germ Cells, and Methylation Analysis of Their Imprinted Genes by Bisulfite Genomic Sequencing. **Molecules and cells**. Korea (South), v.25, n.3, p.358-367, 2008.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M.; FUKUSHIMA, M. et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**, United States, v.30, p.489-489, 1998.

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

SIRARD, M.A.; BLODIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdsam, v.42, n.1/4, p.417-426, Apr. 1996.

SONG, J.L.; WESSEL, G.M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, England, v.73, p.1-17, 2005.

SPAHN, L.; BARLOW, D.P. An ICE pattern crystallizes. **Nature Genetics**, United States, v.35, n. 1, p.11-12, Sep. 2003.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and denosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, United States, v. 64, n. 3, p.904-909, Mar. 2001.

SZYF, M. Targeting DNA methylation in cancer. **Ageing Research Reviews**, England, v. 2, n. 3, p. 299-328, Jul. 2003.

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

TRICOLI, J. V.; RALL, L. B.; SCOTT, J.; BELL, G. I.; SHOWS, T. B. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. **Nature**, England, v. 310, n. 5980, p. 784-786, Aug. 1984.

TURKER, M. S.; BESTOR, T. H. Formation of methylation patterns in the mammalian genome. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Netherlands, v. 386, n. 2, p. 119-130, Apr. 1997.

TURKER, M. S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. **Oncogene**, New York, v. 21, n. 35, p. 5388-5393, Aug. 2002.

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

Van Den VEYVER, I. B. Genetic effects of methylation diets. **Annual Review Nutrition**, United States, v. 22, p. 255–282, 2002.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 100-109, abr./jun. 2008.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p. 79-122.

YAMAZAKI, W. **Estudo do “genomic imprinting” na placenta de clones bovinos**. 2006. 105f. Tese (Doutorado em Produção animal) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCEI, G.A. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. **Theriogenology**, United States, v.49, p.471-482, 1998.

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N. E. DNA methylation in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, England, v. 8, n. 2, p. 115-127, jun. 2001.

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

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.40, p.338-344, 1995.