



Implicações da Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal

Maurício Machaim Franco¹, Thiago Felipe Braga², Anelise dos Santos Mendonça³,
Allice Rodrigues Ferreira⁴

Resumo: A epigenética é a área da genética que estuda as mudanças na função gênica e que não estão relacionadas à sequência primária do DNA. A importância da epigenética para a reprodução animal, principalmente no desenvolvimento das biotécnicas de reprodução, é incontestável, pois dois importantes ciclos de reprogramação epigenética acontecem, um na formação dos gametas e outro durante o desenvolvimento embrionário inicial. No contexto do melhoramento animal pouco ainda se sabe sobre suas implicações, mas a possibilidade de mudanças no padrão epigenético em gametas e embriões influenciadas por fatores ambientais afetarem o desenvolvimento futuro do indivíduo e futuras gerações, abre novas possibilidades nessa área. A possibilidade de manipulação de padrões epigenéticos por fatores ambientais como, por exemplo, a nutrição, alterando o fenótipo da progênie e quem sabe de futuras gerações, pode-se apresentar como uma poderosa ferramenta para a reprodução e o melhoramento genético animal. Essa revisão tem o objetivo de aprofundar um pouco mais sobre a epigenética e sua importância para o melhoramento animal e a reprodução.

1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

2- FAV/UnB – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

3- FAMEV/UFU – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

4- FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP, Brasil.

E-mail para correspondência: mauricio.franco@embrapa.br



Implicações da Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal

Abstract: Epigenetics is the area of genetics that studies the changes in gene function that are not related to the primary sequence of DNA. It is very important for animal reproduction, especially in the development of reproductive technologies, because two major cycles of epigenetic reprogramming happens, one in the formation of gametes and the other during early embryonic development. In the context of animal breeding, little is known about its implications. But the possibility of environmental factors alters epigenetic patterns in the gametes and embryos consequently affecting the future development of the animal and future generations, opens new possibilities in this area. The possibility of manipulating epigenetic patterns by the nutrition, altering offspring phenotype and perhaps the phenotype of future generations, may present as a powerful tool for reproduction and animal breeding. This review discusses the importance of epigenetics for animal breeding and reproduction.



Introdução

Historicamente, a genética nasceu como ciência a partir dos trabalhos dos grandes cientistas Charles Robert Darwin e Gregor Johann Mendel publicados em 1859 e 1865, respectivamente. Somente nos primeiros anos do século 20 os trabalhos de Mendel foram melhor compreendidos e replicados e a teoria da origem das espécies pela seleção natural de Darwin até hoje fomenta muito debate, apesar de tantas evidências incontestáveis suportando sua teoria. A partir da segunda década deste mesmo século, vários outros importantes trabalhos na área da genética foram publicados, mostrando que o DNA era a molécula responsável pela herança genética, até que em 1953 a estrutura química da molécula do DNA foi desvendada por Watson e Crick. A partir daí, rápidos avanços foram surgindo, e no início da década de 1970 surgia a era da genética molecular com o nascimento da chamada “engenharia genética”. Rapidamente foi possível a produção de plantas e animais transgênicos, animais clonados e o sequenciamento de DNA de vários organismos.

A seleção de animais data da domesticação dos animais pelo homem, onde os animais que apresentam características que mais lhe convinha eram selecionados como reprodutores. Mas o melhoramento animal só avançou como ciência a partir das grandes descobertas da genética, os conhecimentos da genética quantitativa e o advento dos computadores. Hoje, essas ferramentas, associadas a modelos matemáticos complexos e elaborados, são a base de todos os programas de avaliação genética realizados em todo o mundo, onde centenas de milhares de animais foram e são avaliados. Os indivíduos são avaliados quanto a sua capacidade de transmissão de características desejáveis à sua progênie, sendo os melhores selecionados como pais da geração seguinte. Com isso, a média da produção da progênie é igual à média da produção de seus progenitores, sendo



superior à média da produção da população. Assim, a premissa básica é que a cada geração as populações de animais são melhores que a geração anterior.

A viabilização dos programas de melhoramento só foi possível com o surgimento e difusão da inseminação artificial. Um touro só pode ser testado com confiabilidade se tiver uma progênie muito grande e isso só é possível através da inseminação artificial. Hoje, além da inseminação, a superovulação e transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) fazem parte da rotina dos programas de melhoramento, intensificando a multiplicação dos melhores animais. Num futuro próximo, a clonagem e a transgenia irão se associar a estas últimas, contribuindo para o futuro dos programas de melhoramento.

Mais recentemente, apesar do termo ter sido cunhado nos anos 1940, surge uma nova área da genética, a Epigenética. A epigenética pode ser definida como a área da genética que estuda as mudanças na função gênica e que não estão diretamente relacionadas à sequência primária do DNA (Reik, 2007). Estas mudanças podem ser herdáveis e passíveis de alterações por influência do ambiente, diferentemente da informação genética que está contida no DNA (Whitelaw & Whitelaw, 2008). Hoje se sabe, por exemplo, que o estresse, a nutrição e doenças podem alterar um determinado padrão epigenético e essa alteração ser transmitida à geração seguinte (Sinclair et al., 2007). Apesar de ainda muito polêmicas, estas informações podem mudar muitos conceitos e redirecionar caminhos. Podemos levantar aqui dois pontos importantes: o primeiro é que a teoria de Jean-Baptiste de Lamarck da herança dos caracteres adquiridos não estaria totalmente incorreta, pelo menos num nível molecular, apesar de Lamarck não ter noção desses conceitos naquela época; outro aspecto interessante é se



considerar a possibilidade de influenciar e modificar, através da nutrição, por exemplo, um padrão de herança que será transmitido para uma geração futura.

A seguir, vamos aprofundar um pouco mais sobre a epigenética e sua importância para o melhoramento animal e a reprodução.

Epigenética: conceitos, aplicações e implicações

Conceitos

Sabe-se há muito que o DNA é a estrutura química básica que é passada de geração a geração. Quando nos referimos a animais produzidos a partir de pais de duas raças diferentes, erroneamente dizemos que esse animal tem um determinado “grau de sangue”. Biologicamente isto não é correto, pois não há transmissão de sangue em um acasalamento ou cruzamento, sendo a via de herança, o DNA. Portanto, o correto seria se referir a porcentagem de alelos. O DNA é constituído por duas fitas complementares e sua unidade básica é o nucleotídeo, formado por uma molécula de fósforo, um açúcar, a desoxirribose, e por quatro bases nitrogenadas, adenina, guanina, citosina e timina. A epigenética é a área da genética que estuda as mudanças herdáveis na função gênica e que não estão diretamente relacionadas à sequência primária do DNA (Reik, 2007).

Os fatores epigenéticos conhecidos até o momento são a metilação do DNA e metilação, acetilação, fosforilação, glicosilação, ubiquitinação, SUMOilação e ADPribosilação das proteínas histonas (Strahl & Allis, 2000). A adição de um grupamento metil (CH₃) no DNA de mamíferos normalmente ocorre em uma citosina que antecede uma guanina, nos chamados sítios 5'-CpG-3'. Algumas regiões do genoma são ricas em repetições CpG sendo denominadas ilhas CpG. Estas regiões geralmente estão localizadas em promotores de genes e são passíveis de serem



metiladas. De uma maneira geral, quando estão metiladas o gene está transcricionalmente inativo e quando desmetiladas, o gene está ativo. Quando uma ilha CpG, em um promotor gênico, tem um alelo metilado e o outro desmetilado, esta região é geralmente conhecida como uma região diferencialmente metilada, do inglês *Differently Methylated Region* (DMR) e regula a expressão de um gene *imprinted*. Se essa região é diferencialmente metilada e se encontra fora de um promotor gênico, regulando a expressão de um *cluster* de genes, é denominada região controladora de *imprinting*, do inglês *Imprinting Control Region* (ICR) (Hemberger et al., 2009).

O DNA se encontra dentro do núcleo das células associado a moléculas de RNA e várias proteínas, formando a cromatina, sendo as histonas as proteínas mais abundantes. Estas são proteínas básicas que se associam ao DNA formando os nucleossomos. Cada nucleossomo é formado por uma porção de 146 pares de bases de DNA enrolada a um octâmero de quatro proteínas histonas, sendo duas de cada, H2A, H2B, H3 e H4. Externamente, uma molécula de histona H1 facilita a ligação entre dois nucleossomos. A cromatina pode estar mais aberta, quando os nucleossomos estão mais distantes, e é chamada eucromatina ou mais fechada, quando os nucleossomos estão mais ligados, formando a heterocromatina. As histonas podem receber várias modificações pós-traducionais, as quais já foram citadas anteriormente, e estas modificações interferem na afinidade de ligação das histonas ao DNA. Além das diferentes modificações que as histonas podem receber, pode haver também diferenças nas quantidades dessas modificações. Por exemplo, uma histona pode ser mono, di ou trimetilada. De uma maneira geral, cada modificação está relacionada a uma maior ou menor compactação da cromatina. Por exemplo, DNA metilado associado a histonas desacetiladas e metiladas é característica de heterocromatina e região não permissível à



ligação de fatores de transcrição. O contrário, DNA desmetilado com histonas acetiladas e desmetiladas está associado à formação de eucromatina e região permissível à ligação de fatores de transcrição. Mas tudo isso também vai depender de qual aminoácido na cauda de histona está recebendo essa modificação. Por exemplo, uma exceção a essa regra é a metilação da lisina 4 da histona H3, denominada H3K4me. A presença desta modificação está relacionada a formação de eucromatina (Eissenberg et al., 2010). O conjunto de todas essas modificações é denominado de “Código das Histonas” (Strahl & Allis, 2000).

Todas as células que constituem o corpo de um indivíduo contêm o mesmo DNA, conseqüentemente o mesmo genoma. Mas como há diferentes tecidos constituídos por diferentes tipos celulares se estas células têm o mesmo genoma? A resposta está na epigenética. Cada tipo celular diferente foi determinado, durante o desenvolvimento embrionário e fetal, por diferentes modificações epigenéticas específicas para cada tecido. Portanto, a diferenciação celular é determinada e mantida por uma “memória” epigenética. Cada indivíduo tem apenas um genoma, mas quantos epigenomas necessários à formação de cada tecido que forma aquele organismo.

Aplicações e implicações da epigenética na reprodução animal

Reprogramação epigenética na gametogênese e embriogênese inicial

Para que ocorra a formação dos gametas e o desenvolvimento embrionário normais, dois ciclos de reprogramação epigenética acontecem em mamíferos. As células germinativas primordiais (CPG), originadas da massa celular interna do embrião, migram para a formação das gônadas e neste momento vão se multiplicando e perdendo a memória epigenética (Molyneaux & Wylie, 2004). Quando chegam à crista genital,



para povoar a futura gônada, sofreram um intenso processo de desmetilação do genoma, perdendo a memória de CPG (Hajkova et al., 2008). Neste momento, se o feto for fêmea, páram de se multiplicar, entram em meiose e se tornam ovogônias, fazendo parte dos folículos primordiais. Se o feto for macho, também perdem a memória epigenética de CPG, mas não entram em meiose e sim estão num intenso processo de multiplicação por mitose. No caso dos fetos machos, logo em seguida estas células começam a sofrer uma intensa reprogramação epigenética, recebendo um padrão de metilação de DNA específico que determinará que estas células serão, no futuro, espermatozoides (McLaren, 1981). Assim, quando o animal nasce, as espermatogônias já se encontram com seu padrão de metilação praticamente estabelecido e só receberão outras modificações epigenéticas, como alterações de histonas, após a puberdade quando começar o processo de espermatogênese (Bowles & Koopman, 2007). Se o feto for fêmea, as células ficam “paradas” em meiose e sem um padrão epigenético específico enquanto estão contidas nos folículos primordiais (Menke et al., 2003). Quando estes folículos são recrutados a crescerem, durante o processo de foliculogênese e ovogênese, estas células começam a crescer e receber uma reprogramação epigenética que determinará que serão ovócitos. O genoma dessas células recebe um padrão de metilação em regiões específicas e diferentes dos espermatozóides. Paralelamente à metilação do DNA, as histonas começam a ser metiladas e acetiladas e o genoma começa a transcrever genes que serão importantes para o processo de ovogênese, foliculogênese e para o desenvolvimento embrionário inicial, a chamada herança materna (Daxinger & Whitelaw, 2012). Após o crescimento total do ovócito, as histonas acetiladas começam a sofrer um intenso processo de desacetilação (Kim et al., 2003). Até que, no momento da fecundação, tanto espermatozóide quanto ovócito são células



altamente especializadas com seus genomas altamente compactados em decorrência do primeiro ciclo de reprogramação epigenética (Bestor, 2000).

Muitas regiões do genoma apresentam um padrão epigenético diferente entre os genomas do espermatozóide e do ovócito. Isto é caracterizado por um padrão de metilação diferencial entre os dois genomas. Se o alelo de um determinado gene se encontra metilado no espermatozóide, necessariamente está desmetilado no genoma do ovócito. Este evento é conhecido de *imprinting* genômico e se caracteriza pela expressão gênica monoalélica e diferencial dependendo da origem parental dos alelos (Reik & Walter, 2001), sendo a metilação do DNA um dos principais mecanismos de controle desse evento (Simonsson & Gurdon, 2004). Os genes que estão sob esse controle são conhecidos como genes *imprinted*, tendo importantes funções no desenvolvimento embrionário e fetal, formação da placenta, no processo de inativação do cromossomo X, dentre outros (Reik & Walter, 2001; Lucifero et al., 2004). A teoria mais aceita para o aparecimento do *imprinting* genômico, num contexto evolutivo, é a teoria da “Batalha dos sexos” proposta por Haig & Grahan (1991). Ela se baseia na expressão balanceada de genes que controlam o desenvolvimento da placenta e conseqüentemente do feto. Os genes *imprinted* que são expressos pelo alelo materno influenciam negativamente o desenvolvimento fetal, enquanto o contrário acontece com os genes paternalmente expressos.

Em camundongos, após 4 horas da fecundação, o genoma do espermatozóide é ativamente desmetilado, enquanto que o genoma do ovócito é passivamente desmetilado durante as sucessivas clivagens devido à remoção da DNMT1 do núcleo, após o estágio de duas células até 8-16 células (Sasaki & Matsui, 2008). Em bovinos, a desmetilação também ocorre logo após a fecundação (Dean et al., 2001). Esse processo de



desmetilação do genoma no início do desenvolvimento só ocorre para regiões metiladas não *imprinted*. Os genes *imprinted* permanecem com o seu padrão de metilação advindo dos gametas, apesar do estado hipometilado em que se encontra o genoma (Reik & Walter, 2001). Em camundongos, a metilação *de novo* ocorre no estágio de blastocisto na MCI, enquanto que no trofoblasto é praticamente desprovido de metilação, sugerindo um papel importante na diferenciação das linhagens celulares (Santos et al., 2002). Em bovinos acontece no estágio de 8-16 células, concomitante com a ativação do genoma embrionário (Maalouf et al., 2008).

Inativação do cromossomo X

Todas as fêmeas de mamíferos têm um cromossomo X inativado no início do desenvolvimento embrionário. Este evento foi descrito pela primeira vez em 1961 por Mary F. Lyon (Lyon, 1961) e é conhecido como inativação do cromossomo X (ICX). Este foi um mecanismo que surgiu durante o processo evolutivo para equalizar a quantidade de expressão dos genes que estão localizados sobre o cromossomo X, pois do contrário as fêmeas teriam, teoricamente, o dobro de transcritos para cada gene ligado ao X. Por isso é conhecido como um mecanismo chamado de “compensação de dose”. Apesar de ter sido descoberto há mais de 50 anos, muitas perguntas ainda têm que ser respondidas, principalmente nas espécies domésticas de interesse comercial. Em camundongos muito já se avançou e o processo de inativação do cromossomo X já tem um padrão bem estabelecido. Já se sabe que o processo se inicia em embriões a partir de quatro células onde gradativamente o cromossomo X paterno começa a ser inativado até que no estágio de mórula o processo de inativação está completo (Ferreira et al., 2010). Em blastocistos, nas células do trofoblasto, que formarão a placenta, este padrão é mantido, mas nas células da massa celular interna, que dará origem ao feto, este



processo de inativação é revertido e imediatamente a célula escolhe aleatoriamente um dos dois cromossomos para ser inativado (Takagi & Sasaki, 1975). Portanto, há uma marcação *imprinted*, vinda dos gametas determinando a inativação preferencial do X paterno e a manutenção desse padrão no trofoblasto, enquanto ocorre uma inativação aleatória na MCI (Okamoto, 2004). Este mecanismo ainda não está bem estabelecido em outras espécies e ainda não foi encontrado um padrão *imprinted* como em camundongos. A ICX é um processo controlado e estabelecido basicamente por mecanismos epigenéticos. Inicialmente, um RNA longo não codante (lncRNA) denominado *X-inactive specific transcript* (XIST) é transcrito e cobre em *cis* o cromossomo a ser inativado (Penny et al., 1996). No outro cromossomo X, fatores de pluripotência estimulam a transcrição de um gene antisense ou XIST, denominado TSIX que é transcrito em maior quantidade impedindo a transcrição do XIST (Debrand et al., 1999). Assim, começa a inativação no cromossomo transcrevendo XIST e permanecendo ativo o cromossomo expressando maior quantidade de TSIX. Após iniciar o acúmulo de RNA XIST, outras marcas epigenéticas de inativação começam a se acumular sobre o X inativo (Xi) como a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) (Sun et al. 2006), o acúmulo do complexo proteico *polycomb* (PRC2) (Montgomery et al., 2005) e a metilação do DNA ao longo do cromossomo (Sado et al., 2004), culminando com sua inativação. Vale ressaltar que a ICX não é completa, com alguns genes escapando da inativação.

Vários trabalhos já mostraram que se os eventos de reprogramação epigenética na gametogênese e embriogênese e o processo de ICX não ocorrem de maneira correta, não há produção de gametas viáveis e/ou desenvolvimento embrionário (Dean et al., 2001; Reik & Walter, 2001; Lucifero et al., 2004). Por serem eventos controlados por



fatores epigenéticos, podem ser susceptíveis a fatores ambientais, como nutrição de doadoras de ovócitos e embriões, superestimulação hormonal, doenças e condições de maturação e cultivo *in vitro* de embriões (Sinclair et al., 2007; Jirtle & Skinner, 2007; Katari et al., 2009; Chu et al., 2012). Portanto, conhecer os mecanismos que regem os ciclos de reprogramação epigenética e o processo de ICX em gametas e embriões é essencial quando se almeja melhores resultados no desenvolvimento e aprimoramento das diversas biotécnicas de reprodução assistida, principalmente da produção *in vitro* de embriões e a clonagem por transferência nuclear.

Células tronco

As células tronco são caracterizadas pela sua habilidade de auto-renovação e de gerar tipos celulares com funções diferenciadas (Jaenisch & Yong, 2008). São derivadas de diferentes tipos celulares de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Hanna et al., 2010) e classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (Jaenisch & Yong, 2008).

Três principais fases no desenvolvimento de camundongos permitem a derivação de linhagens de células pluripotentes *in vitro*. Estes estágios de desenvolvimento incluem as células germinativas primordiais (CGP) iniciais, entre os dias 8,5 e 12,5 de desenvolvimento, que podem gerar as células germinativas embrionárias (CGE); o estágio de mórula a blastocisto, no qual as células tronco embrionárias (CTE) são derivadas; e entre os dias 5,5 e 6,5 de desenvolvimento – após a implantação embrionária – com a utilização do epiblasto (Epi) para a produção de células tronco epiblasticas (CTEpi) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

CTE foram as primeiras células pluripotentes isoladas a partir de embriões normais. Em função de serem originadas a partir de células da massa celular interna



(MCI), expressam genes chaves para a pluripotência, como o OCT4, SOX2 e NANOG (Nichols & Smith, 2009). No entanto, diferentes características biológicas e moleculares distinguem as CTE das suas homologas *in vivo*. Por exemplo, as células da MCI, não possuem capacidade de auto-renovação e são caracterizadas por terem seu genoma quase que em sua totalidade hipometilado (Santos et al., 2002). Em contraste, as CTE possuem potencial de proliferação ilimitado e seu genoma é altamente metilado (Meissner et al., 2008).

Linhagens de CTEpi expressam marcadores moleculares para pluripotência e são assim consideradas por inúmeros critérios, como a diferenciação de várias linhagens celulares em corpos embrionários e teratomas. Apesar da denominação de pluripotentes, as CTEpi possuem um potencial de desenvolvimento muito mais limitado que as CTE, pois são muito ineficientes quanto à formação de quimeras. Isso porque já sofreram a inativação do cromossomo X, por apresentar baixos níveis de fatores de transcrição (NANOG, REX1 e KLF) e terem genes marcadores de diferenciação como FGF5 e genes da classe I do complexo de histocompatibilidade maior, prontamente expressos (Tesar et al., 2007).

Além de células da MCI e do Epi, células de linhagens germinativas também podem gerar células potencialmente pluripotentes, que são as CGE (Surani, 1999). As células tronco espermatogoniais, derivadas das gônadas de indivíduos recém-nascidos ou adultos do sexo masculino, podem gerar células parecidas com as CTE, porém com baixa eficiência e sendo necessário um longo período de cultivo *in vitro*, após serem coletadas do seu tecido de origem (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Estas células possuem um padrão imprinted específico masculino, e podem induzir teratomas e contribuem para a formação de quimeras (Ko et al., 2010).



Além da expressão de fatores de transcrição, a organização da cromatina e as modificações epigenéticas são elementos fundamentais para o controle da expressão gênica durante a auto-renovação e diferenciação das CTE. Complexos de remodelamento de cromatina dependentes de ATP regulam interações entre octâmeros de histonas e a hélice do DNA, modulando a acessibilidade dos fatores de transcrição e outros fatores associados a cromatina ao DNA (Ho & Crabtree, 2010).

A repressão gênica, mediada por proteínas do complexo Polycomb e pela H3K27me3 agregam plasticidade e pluripotencialidade às células tronco embrionárias durante o desenvolvimento embrionário (Liang et al., 2008; Rodda et al., 2005). Estudos com imunoprecipitação de cromatina têm mostrado que genes que estão reprimidos nas CTE, mas são necessários para uma posterior diferenciação, são marcados por domínios bivalentes nas H3K27me3 e H3K4me3 o que confere a estes genes um estado eminente de ativação (Azuara et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Na verdade, as marcas H3K27me3 e H3K4me3 podem efetivamente discriminar genes que são expressos (H3K4me3), preparados para a expressão (H3K4me3 e H3K27me3) ou estavelmente reprimidos (H3K27me3), refletindo assim o estado celular e sua potencial linhagem (Mikkelsen et al., 2007).

Aproximadamente um terço dos genes, no entanto, não é marcado nem por H3K4me3 ou por H3K27me3, e ainda sim são muito reprimidos nas CTE. Esses genes tendem a ser marcados por metilação de DNA, que é um mecanismo complementar a modificação das histonas que assegura uma apropriada expressão gênica e herdabilidade de repressão de alguns genes simultaneamente (Hemberger et al., 2009).

Aplicações e implicações da epigenética no melhoramento animal



As metodologias de avaliação genética se baseiam na identificação de animais melhoradores utilizando as informações de desempenho dos animais, de sua progênie e suas interações com o ambiente. Os melhores animais são aqueles que transmitem maior capacidade de desempenho para sua progênie. Portanto, isso está de acordo com a premissa clássica de que o fenótipo é o resultado da interação do genótipo (DNA) com o ambiente. Mais recentemente, com o avanço da genética molecular e genômica, o uso de marcadores moleculares para a identificação dos melhores animais se tornou possível. Hoje já se fala em diferença esperada na progênie genômica ou DEP genômica. Com isso, a possibilidade de se identificar os melhores animais pelo seu genótipo pode acelerar os processos de avaliações a um custo mais baixo.

Com os avanços do conhecimento na área da epigenética novos conceitos surgiram, podendo ter algum impacto nos programas de melhoramento no futuro. Por exemplo, Dominguez-Salas et al. (2012), propõe o seguinte modelo: Fenótipo = Genoma + Epigenoma + Meio ambiente (ancestral, passado e atual). O epigenoma, diferente do genoma, pode ser mais facilmente modificado em resposta a interações com o ambiente durante a vida de um indivíduo (Dominguez-Salas et al., 2012). Uma vez estabelecido, o epigenoma é menos sensível a estímulos externos, mas durante o desenvolvimento embrionário inicial, quando os padrões epigenéticos tecido-específicos estão sendo estabelecidos, o epigenoma é sensível a mudanças. Vários fatores externos podem afetar o estabelecimento de um padrão epigenômico, como doenças, medicamentos, nutrição, estresse oxidativo, envelhecimento, dentre outros. A nutrição maternal deficiente ou em excesso, durante a gestação, pode resultar em alterações permanentes no padrão de metilação do DNA da progênie (Kwong et al., 2007; Skinner et al., 2010), afetando a expressão gênica (Waterland, 2006), pois ocorre em dois



períodos críticos, na reprogramação epigenética que acontece no desenvolvimento embrionário inicial quando do início da formação dos tecidos e na formação da linhagem germinativa do feto. Isto poderá ter um impacto sobre o desempenho futuro do animal, principalmente sua fertilidade. Portanto, fatores ambientais podem alterar padrões epigenéticos do embrião e/ou feto durante a gestação comprometendo seu fenótipo futuro. E mais importante ainda, especula-se que essas alterações podem ser transmitidas a outras gerações (VerMilyea et al., 2009; Ashworth, 2009). Este fato pode ter algum impacto importante no contexto do melhoramento animal, pois se trata da transmissão de informações epigenéticas adquiridas, entre gerações. Pode-se citar aqui alguns exemplos importantes. Waterland & Jirtle (2003), trabalhando com uma linhagem de camundongos agouti, mostraram que quando o promotor do *locus* agouti está hipometilado os animais são amarelos e por efeitos pleiotrópicos do gene, obesos. Quando o gene é silenciado por metilação, os animais são pseudoagouti. Dolinoy et al. (2006), utilizando genisteína, um fitoestrógeno da soja, durante a gestação de camundongos, conseguiram mudar a pelagem da progênie de amarelo agouti para pseudoagouti, protegendo os animais da obesidade. Esses autores concluíram que a dieta com genisteína afeta o padrão de expressão gênica e a susceptibilidade à obesidade em adultos, por alteração permanente do seu epigenoma. Dolinoy et al. (2007), utilizando bisphenol A, um produto utilizado na fabricação de plástico policarbonato, mostraram que a exposição ao bisphenol A durante o desenvolvimento inicial pode mudar o fenótipo da progênie por alteração estável do seu epigenoma. Sinclair et al. (2007), trabalhando com dietas deficientes em grupos metil durante o período periconcepcional e após a fecundação em ovelhas, mostraram que a progênie, principalmente os machos, apresentaram menor peso ao nascimento e maior peso e



obesidade na vida adulta. Esses animais apresentaram também alterações no sistema imune, na resistência à insulina e na pressão sanguínea. Além disso, apresentaram alterações do padrão de metilação do DNA no fígado. Fraga et al. (2005), estudando gêmeos monozigóticos, observaram que os padrões de metilação do DNA eram iguais ao nascimento, mas divergiam ao longo da vida dos indivíduos. Heijmans et al. (2008), estudaram o padrão de metilação do DNA para o *locus* IGF2, seis décadas mais tarde, em indivíduos cujas mães sofreram severa restrição alimentar durante a segunda guerra mundial, comparando o período periconcepcional e o final da gestação. Os resultados mostraram hipometilação do DNA, mas somente quando a exposição foi no período periconcepcional. Adkins et al. (2011), em um estudo em humanos, avaliaram a correlação entre a idade dos pais e padrões de metilação do DNA em recém-nascidos. Estudando 27.578 sítios CpG no genoma, encontraram correlação nos níveis de metilação do DNA em 144 CpGs de 142 genes com idade maternal, mas uma baixa correlação com idade paternal. Estes autores concluem que há diferenças nos níveis de metilação do DNA ao nascimento e que estão correlacionados com idade parental, podendo influenciar no risco de doenças na infância e durante a vida dos indivíduos. Alguns estudos sugerem que há efeito da metilação do DNA sobre a regulação da expressão gênica de algumas proteínas existentes no leite de bovinos por meio da atividade histona acetil transferase, envolvida na remodelação da cromatina (Vanselow et al., 2006; Singh et al., 2010).

Apesar de poucos estudos em animais de interesse zootécnico, sendo a maioria em camundongos e humanos, fica claro a influência de fatores ambientais alterando padrões epigenéticos sobre o genoma e a possibilidade de manipulação desses padrões com conseqüente alteração do fenótipo dos animais. Mais importante ainda é considerar



a possibilidade de que alterações epigenéticas, provocadas por fatores externos como a nutrição e doenças, durante períodos específicos do desenvolvimento como no período periconcepcional, no desenvolvimento embrionário inicial e durante a formação das células germinativas podem ser transmitidas a gerações futuras (Kevin & Singht, 2007; Jirtle & Skinner, 2007; Meyer et al., 2010). Pouco ainda se sabe sobre este tema, mas poderá ter um impacto importante no contexto do melhoramento animal num futuro próximo. O processo final de melhoramento genético acontece principalmente no momento da decisão de qual acasalamento deve ser realizado, levando-se em consideração os valores genéticos dos pais. Se se considerar a possibilidade de que uma alteração epigenética adquirida durante a gestação possa mudar o fenótipo futuro do indivíduo e principalmente que essa alteração seja herdável ao longo de outras gerações, talvez um acompanhamento mais detalhado e prolongado das progênes seria importante para melhor compreender esses processos. Seguindo esse raciocínio, para a seleção de animais baseada apenas em informações genômicas, há que se considerar que o funcionamento do genoma pode se alterar durante a vida do indivíduo (Jirtle & Skinner, 2007). Se por algum efeito ambiental, padrões epigenéticos forem alterados nas células germinativas de um indivíduo ao longo de sua vida e esse padrão for passado para a geração seguinte, o mesmo indivíduo poderá gerar filhos com diferentes performances ao longo de sua vida. Dentro desse mesmo raciocínio, outro aspecto que deve ser discutido é a possível influência da idade dos pais sobre a qualidade epigenética dos seus gametas e as consequências para o desempenho futuro de suas progênes. Esses são pontos importantes a serem considerados, porque não é rara a utilização de animais com dietas desbalanceadas, geralmente em excesso, e animais



velhos como doadores de gametas e embriões em programas de reprodução assistida no Brasil, principalmente em rebanhos de elite.

Conclusões

A epigenética é uma área da genética muito recente e a maioria dos modelos de estudos utiliza animais de laboratório e humanos, mas muitos resultados já obtidos nestes modelos podem e devem ser testados em animais de interesse zootécnico.

A importância da epigenética para a reprodução animal, principalmente no desenvolvimento das biotécnicas de reprodução, é incontestável, e que no contexto do melhoramento genético animal pouco ainda se sabe sobre suas implicações. De qualquer forma, a possibilidade de manipulação de padrões epigenéticos por fatores ambientais como, por exemplo, a nutrição, alterando o fenótipo da progênie e quem sabe de futuras gerações, pode-se apresentar como uma poderosa ferramenta para a reprodução e o melhoramento genético animal.



Referências

- ADKINS, R.M.; THOMAS, F.; TYLAVSKY, F.A. et al. Parental ages and levels of DNA methylation in the newborn are correlated. **BMC Medical Genetics**, v.12, n.47, 2011.
- ASHWORTH, C.J.; TOMA; L.M.; HUNTER; M.G. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science**, v.364, p.3351-3361, 2009.
- AZUARA, V.; PERRY, P.; SAUER, S. et al. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. **Nature Cell Biology**, v.8, p.532-538, 2006.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v.9, p.2395-2402, 2000.
- BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. **Development**, v.134, p.3401-3411, 2007.
- BRONS, G.M.; SMITHERS, L.E.; TROTTER, M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. **Nature**, v.448, p.191-195, 2007.
- CHU, T.; DUFORT, I., SIRARD, M.-A. Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. **Theriogenology**, v.77, p.1928-1938, 2012.
- DAXINGER, L.; WHITELAW, E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. **Nature Review Genetics**, v.13, p.153-162, 2012.
- DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.13734-38, 2001.
- DEBRAND, E.; CHUREAU, C., ARNAUD, D. et al. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of XIST expression. **Molecular Cell Biology**, v.19, p.8513-8525, 1999.
- DOLINOY, D.C.; HUANG, D.; JIRTLE, R.L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.32, p.13056-13061, 2007.



DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; WATERLAND, R.A. et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. **Environ Health Perspective**, v.114, n.4, p.567-572, 2006.

DOMINGUEZ-SALAS, P.; COX, S.E.; PRENTICE, A.M. (2012). Maternal nutritional status, C1 metabolism and offspring DNA methylation: a review of current evidence in human subjects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.71, p.154-165, 2012.

EISSENBERG, J.C., SHILATIFARD, A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. **Developmental Biology**, v.339, p.240-249, 2010.

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotency cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, p.154-156, 1981.

FERREIRA A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O. et al. Allele-Specific Expression of the MAOA Gene and X Chromosome Inactivation in In Vitro Produced Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.77, p.615-621, 2010.

FRAGA M.F.; BALLESTAR, E., PAZ, M.F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.10604-10609, 2005.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. **Cell**, v.64, p.1045-46, 1991.

HANNA, J.H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v.143, p.508-525, 2010.

HEIJMANS, B.T.; TOBI, E.W.; STEIN, A.D. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.105, n.44, p.17046-17049, 2008.

HEMBERGER, M.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic dynamics of stem lineage commitment: digging Waddington's canal. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, p.526-537, 2009.

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

HO, L.; CRABTREE, G.R. Chromatin remodeling during development. **Nature**, v.463, p.474-484, 2010.

JIRTLE, R.L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Review Genetics**, v.8; n.253-262, 2007.



JOENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cell, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v.132, p.567-582, 2008.

KANATSU-SHINOHARA, M.; INOUE, K.; LEE, J. et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. **Cell**, v.119, p.1001-1012, 2004.

KATARI, S.; TURAN, N.; BIBIKOVA, M. et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. **Human Molecular Genetics**, v. 18, p.3769-78, 2009.

KIM, J.M.; LIU, H, TAZAKI, M. et al. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. **Journal of Cell Biology**, v.162, p.37-46, 2003.

KO, K.; ARÚZO-BRAVO, M. J.; TAPIA, N. et al. Human adult germline stem cells in question. **Nature**, v.465, p.344-349, 2008.

KWONG, W.Y.; MILLER D.J.; WILKINS, A.P. et al. Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rat fetuses. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.48-56, 2007.

LIANG, J.; WAN, M.; ZHANG, Y. et al. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v.10, p.731-739, 2008.

LUCIFERO, D.; CHAILLET, J.R.; TRASLER J.M. Potential significance of genomic *imprinting* defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v.10, p.3-18, 2004.

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

MAALOUF, W.E.; ALBERIO, R.; CAMPBELL, K.H. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. **Epigenetics**, v.3, p.199-209, 2008.

McLAREN, A. The fate of germ cells in the testis of fetal sex reversed mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.61, p.461-467, 1981.

MEISSNER, A.; MIKKELSEN, T.; GU, H. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. **Nature**, v.454, p.766-770, 2008.

MENKE, D.B.; KOUBOVA, J.; PAGE, D.C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. **Developmental Biology**, v.262, p.303-312, 2003.



MEYER, A.M., REED, J.J., NEVILLE, T.L. et al. Effects of plane of nutrition and selenium supply during gestation on ewe and neonatal offspring performance, body composition, and serum selenium. **Journal of Animal Science**, v.88, n.5, p.1786-1800, 2010.

MIKKELSEN, T.; KU, M.; JAFFE, D.B. et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. **Nature**, v.448, p.553-560, 2007.

MOLYNEAUX K., WYLIE, C. Primordial germ cell migration. **International Journal of Developmental Biology**, v.48, p.537-544, 2004.

MONTGOMERY, N.D.; YEE, D.; CHEN, A. et al. (2005) The murine polycomb group protein EED is required for global histone H3 lysine-27 methylation. **Current Biology**, v.15, p.942-947, 2005.

NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and primed pluripotent states. **Cell Stem Cell**, v.4, p.487-492, 2009.

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

PENNY, G.D.; KAY, G.F.; SHEARDOWN, S.A. et al. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. **Nature**, v.379, p.131-137, 1996.

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

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.24, p.425-32, 2007.

RODDA, D.J.; CHEW, J.L.; LIM, L.H. et al. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.24731-24737, 2005.

SADO, T.; OKANO, M.; LI, E. et al. *De novo* DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. **Development**, v.131, p.975-982, 2004.

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

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

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature Cell Biology**, v.6, p.984-90, 2004.



SINCLAIR, K.D.; SINGH, R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. **Theriogenology**, v.67, p.43-53, 2007.

SINCLAIR, K.D.; ALLEGRUCCI, C.; SINGH, R. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n.49, p.19351-19356, 2007.

SINGH, K.R.A.; ERDMAN, K.M. SWANSON, A.J. et al. 2010. Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.15, p.101-112, 2010.

SKINNER, M.K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v. 21, n.4, p.214-222, 2010.

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

SUN, B.K.; DEATON, A.M., LEE, J.T. A transient heterochromatic state in XIST preempts X inactivation choice without RNA stabilization. **Molecular Cell**, v.21, p.617-628, 2006.

SURANI, M, A. Reprogramming a somatic nucleus by trans-modification activity in germ cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.10, p.273-277, 1999.

TAKAGI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. **Nature**, v.256, p.640-642, 1975.

TESAR, P.J.; CHENOWETH, J.G.; BROOK, F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature**, v.448, p.196-199, 2007.

VANSELOW, J.; YANG, W.; HERRMANN, J. 2006. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the far distal alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shut-down of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.37, p.463-477, 2006.

VERMILYEA, M.D.; O'NEILL, L.P.; TURNER, B.M. Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. **PLoS ONE**; v.4, p.e6086, 2009.

WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Molecular Cell Biology**, v.23, p.5293-5300. 2003.



WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **Journal of Nutrition**, v.136, p.1706S-1710S, 2006.

WHITELAW, N.C.; WHITELAW, E. Transgene rational epigenetic inheritance in health and disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.18, p.273-279, 2008.