

50° Aniversario de ALPA
XXV Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal
Recife 07 al 10 de noviembre de 2016

Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal

Maurício Machaim Franco¹

Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia, Brasília, DF. Brasil

Resumo. Epigenética pode ser definida como a área da genética que estuda mudanças herdáveis na função gênica/fenótipo e que não estão relacionadas a mudanças na estrutura primária do DNA. Os principais fatores epigenéticos são a metilação de DNA; as alterações pós-traducionais de histonas, como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, dentre outras; alguns RNAs não codantes; e remodeladores de cromatina. Dependendo da combinação dessas modificações, a cromatina se encontra numa configuração mais aberta (eucromatina) ou mais fechada (heterocromatina), estando assim relacionadas ao controle da expressão gênica. Como os padrões epigenéticos são susceptíveis a fatores externos, as técnicas de reprodução assistida (TRAs) podem afetar esses padrões e conseqüentemente a regulação da expressão gênica, porque durante os períodos críticos do desenvolvimento inicial os gametas e embriões estão sujeitos às condições in vitro de maturação, fecundação e cultivo. Além disso, trabalhos mostram que efeitos ambientais externos durante a gestação podem afetar padrões epigenéticos e como consequência a saúde e desempenho da progênie. Assim, estas informações podem ser relevantes no contexto do melhoramento animal. Finalmente, é importante o desenvolvimento e adaptação de novas tecnologias de reprodução assistida que evitem ao máximo alterações epigenéticas em gametas e embriões. No contexto da produção animal, é essencial esclarecer se e como padrões epigenéticos podem estar envolvidos na resistência a doenças e características de produção.

Palavras chaves: Cromatina, Epigenética, Expressão gênica, Melhoramento animal, Reprodução

Epigenetics in genetic improvement and animal reproduction

Abstract. Epigenetics can be defined as the study of heritable changes in genetic function not related to changes in the primary sequence of the DNA molecule. The principal epigenetic phenomena are DNA methylation; posttranslational changes in histone proteins, such as methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination and others; some classes of non-coding RNA; and chromatin remodelers. Depending on the combination of these modifications, the chromatin assumes a configuration which is either more open (euchromatin) or more closed (heterochromatin), thus being related to the control of genic expression. Since these epigenetic patterns are susceptible to external factors, assisted reproductive techniques (ARTs) can affect them and consequently the regulation of genic expression, given that during the critical initial periods of development the gametes and embryos are subjected to the conditions of in vitro maturation, fecundation and culture. Furthermore, research has shown that external environmental factors during gestation can influence epigenetic patterns and thus, the health and performance of the progeny. Therefore, this information can be relevant to animal improvement. Finally, it is important that in the development and adaptation of new ARTs, epigenetic alterations of gametes and embryos be avoided as much as possible. In the context of livestock production, it is essential to elucidate if and how epigenetic patterns may be involved in resistance to diseases and productive traits.

Key words: Animal improvement, Chromatin, Epigenetics, Genic expression, Reproduction

¹ Autor para la correspondencia: Maurício M. Franco mauricio.franco@embrapa.br
Parque Estação Biológica, avenida W5 Norte Final, Brasília-DF, Brasil, CEP 70770-917.
Tel: +55-61-3448-4693; Fax: +55-61-3340-3658

Descrição e Importância da Epigenética

Conceitos básicos

A epigenética pode ser definida como a área da genética que estuda mudanças herdáveis na função gênica/fenótipo que não estão relacionadas a mudanças na estrutura primária do DNA. Dentre os fatores epigenéticos estão a metilação de DNA, as modificações pós-traducionais das histonas (código de histonas), algumas classes de RNAs não codantes e remodeladores de cromatina. Em mamíferos, a metilação de DNA ocorre na base nitrogenada citosina antecedendo uma guanina, nos chamados sítios CpG. Mais recentemente, foi mostrado que em alguns tecidos a metilação do DNA também poderia ocorrer, em uma menor frequência, nas citosinas em sequências CHG e CHH, onde H pode ser uma adenina, uma timina ou uma citosina. A fonte de grupamentos metil (CH₃) para que as enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) metilem o DNA vem do ciclo da metionina (ciclo de um Carbono), onde a metionina é metabolizada em S-adenosilmetionina (SAM), o qual fornece o grupo metil para a metilação de DNA, RNA e proteínas. Regiões do genoma ricas em sítios CpG são conhecidas como ilhas CpG e normalmente quando presentes em regiões promotoras de genes, se encontram desmetiladas e em regiões fora dos promotores gênicos e com menor concentração de sítios CpGs, normalmente se encontram metiladas. Via de regra, uma ilha CpG hipermetilada e dentro de um promotor gênico se relaciona com um estado de heterocromatina (maior compactação do DNA) e como consequência com bloqueio da transcrição gênica, o que não necessariamente acontece se a metilação se encontra dentro do gene. As histonas são proteínas básicas que se associam ao DNA formando estruturas conhecidas como nucleossomos, os quais estão associados a uma maior compactação da cromatina. Além da metilação do DNA, dentre os fatores epigenéticos estão as modificações pós-traducionais das histonas as quais são metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, sumoilação, dentre outras, constituindo o chamado código das histonas. Dependendo da combinação dessas modificações, a cromatina se encontra numa configuração mais aberta (eucromatina) ou mais fechada (hetero-cromatina), configurações estas relacionadas também ao controle da expressão gênica. Apenas como um exemplo, se um gene qualquer, em uma determinada região do genoma, se encontra com sua região promotora com o DNA hipermetilado e “enriquecida” com trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), este gene estará “desligado”. Por outro lado, se um determinado gene se encontra com

sua região promotora com o DNA desmetilado e “enriquecida” com trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3), provavelmente este gene estará transcricionalmente ativo. Portanto, todas estas possíveis combinações de estados epigenéticos, tanto de DNA, como de histonas determinam o estado de compactação da cromatina e conseqüentemente seu perfil global de expressão gênica. Isto determina porque um mesmo genoma de um indivíduo apresenta diferentes epigenomas, determinando cada tipo celular e/ou tecido diferente do corpo. Assim, podemos definir o epigenoma como o conjunto de marcas epigenéticas sobre o genoma que regulam a estrutura da cromatina e a acessibilidade da maquinaria de transcrição ao DNA (Heijmans *et al.*, 2009). Um mecanismo essencialmente epigenético de regulação da expressão gênica é o *imprinting* genômico que pode ser definido como um mecanismo epigenético de controle da expressão monoalélica de um gene dependente da origem parental do alelo. Alguns genes *imprinted* já estão bem caracterizados, principalmente em camundongos e humanos e muitos deles estão relacionados ao desenvolvimento embrionário, fetal e placentação. Um padrão específico de metilação de DNA e modificações de histonas ocorrem diferencialmente nos dois alelos de um mesmo gene *imprinted*. Assim, um alelo se encontra em um estado transcricionalmente ativo e o outro, necessariamente em um estado transcricionalmente inativo. Como exemplo clássico, pode-se citar o gene *insulin-like growth factor 2* (IGF2), para o qual apenas o alelo paterno é expresso. Um exemplo prático onde diferenças fenotípicas e comportamentais podem ser, pelos menos parcialmente explicadas pelo *imprinting* genômico, é no caso da produção de híbridos oriundos do cruzamento entre equinos e muas. As mulas ou burros são produtos híbridos oriundos do cruzamento de um jumento com uma égua e os bardotos são produtos do cruzamento de um cavalo com uma jumenta. Neste caso específico, os mesmos alelos (paternais ou maternais) de genes *imprinted* que são expressos nestes diferentes híbridos são oriundos de espécies diferentes (*Equus caballus* e *Equus asinus*) e assim a possibilidade de diferenças fenotípicas e comportamentais terem a contribuição do *imprinting* genômico pode ser significativa. Apesar de especialistas em equideo-cultura terem experiência para identificar se o animal é um muar ou um bardoto, em alguns casos isso se torna difícil e testes moleculares baseados em DNA podem contribuir para a identificação desses híbridos (Franco *et al.*, 2016). Num contexto de melhoramento genético,

Meyer e Tier (2012), estimaram que a variância devido ao *imprinting* genômico é de até 10% da variância fenotípica para peso em gado de corte.

Apesar de fatores ambientais terem pouca influência direta sobre o genoma propriamente dito, é sabido que fatores externos podem influenciar na forma com que o genoma se expressa. Já está relativamente bem estabelecido na literatura que os padrões epigenéticos são susceptíveis a “agressões” externas durante toda a vida de um indivíduo, às vezes de forma cumulativa. Isto não significa que os padrões epigenéticos estão mudando ou se alterando o tempo todo. Padrões epigenéticos de células somáticas são relativamente estáveis e transmitidos de uma forma fiel às células filhas no processo mitótico, mantendo seu padrão de diferenciação celular. Mas existe uma “janela do desenvolvimento” onde esses padrões estão sendo estabelecidos e por isso são altamente susceptíveis a influências ambientais. Este período compreende a fase do desenvolvimento embrionário e fetal até a formação de todos os tecidos do organismo, e dentro desta “janela”, a fase de formação das gônadas e da diferenciação das células germinativas primordiais nas células precursoras dos gametas. Neste período, dentro do primeiro terço da gestação, o genoma das células embrionárias sofre uma ampla reprogramação epigenética, inicialmente se desdiferenciando de uma cromatina de gametas para se tornarem células tronco pluripotentes e num segundo momento se reprogramando para iniciarem o processo de diferenciação celular para formação dos diferentes tecidos de um novo organismo. No caso das células germinativas primordiais, estas são epigeneticamente “desprogramadas” para então se diferenciarem em células precursoras dos gametas. Toda a dinâmica de reprogramação, especificamente do padrão de metilação de DNA, durante esse período específico do desenvolvimento está mostrado na Figura 1 e detalhado na sua legenda.

Epigenética e as técnicas de reprodução assistida

Como mostrado na Figura 1, as técnicas de reprodução assistida (TRAs) podem afetar os padrões epigenéticos e conseqüentemente a regulação da expressão gênica, principalmente porque no contexto das TRAs os períodos críticos do desenvolvimento inicial estão sujeitos às condições *in vitro* de maturação, fecundação e/ou cultivo, além do uso de hormônios e outras substâncias (Urrego *et al.*, 2014). Estes mesmos autores citam que há a necessidade de buscar alternativas para melhorar as TRAs para evitar desordens epigenéticas quando do uso dessas técnicas. Dentre as TRAs que provavelmente mais podem afetar os padrões epigenéticos está a clonagem por transferência nuclear de células somáticas

(TNCS). Isto porque uma célula somática, portanto já diferenciada, é utilizada como doadora de núcleo e o ovócito enucleado deve ser capaz de desprogramar todo o padrão epigenético já estabelecido para a geração de um embrião. Yang *et al.* (2007) mostraram que o embrião clone apresenta um padrão de reprogramação da metilação de DNA incorreto, exibindo um processo de desmetilação de DNA incompleto e o início da remetilação precocemente. É sabido que esta incorreta reprogramação epigenética no início do desenvolvimento embrionário pode acarretar conseqüências adversas durante todo o processo de clonagem que vai desde a produção de um embrião de pior qualidade até perdas em todos os períodos da gestação e maior mortalidade perinatal. Mundim *et al.* (2009), avaliando a expressão de genes candidatos em embriões bovinos, mostraram que embriões produzidos *in vitro* apresentaram maior expressão do gene *imprinted Growth Factor Receptor Bound Protein 10* (GRB10) e de genes relacionados a estresse oxidativo comparados com embriões produzidos naturalmente, mostrando o efeito das TRAs sobre a regulação da expressão gênica. Por outro lado, Carvalho *et al.* (2012) mostraram que a utilização da citometria de fluxo para a sexagem de sêmen bovino não afetou os padrões de metilação de DNA em genes *imprinted*.

Epigenética e o melhoramento animal

Fazendo-se um breve histórico sobre o melhoramento animal, podemos dizer que este se iniciou quando da domesticação dos animais pelo homem. Os animais eram selecionados apenas por observação visual, escolhendo-se para se reproduzir apenas aqueles que apresentavam algum fenótipo desejável. Como ciência, as bases para o melhoramento se iniciaram com as descobertas das leis da herança por Gregor Mendel em 1865 e o melhor entendimento dessas leis no início do século XX. Com o desenvolvimento de métodos estatísticos, os conhecimentos da herança, o desenvolvimento da inseminação artificial, o advento dos computadores, e o desenvolvimento de metodologias analíticas, surgem os programas de avaliação genética/melhoramento propriamente ditos. Assim, com informações de pedigree e dados fenotípicos coletados em testes de desempenho e progênie se torna possível prever o valor genético dos animais e temos hoje as diferenças esperadas nas progênies (DEPs) para animais avaliados. Com o rápido desenvolvimento da genética molecular e genômica, hoje já está se tornando possível calcular as chamadas DEPs genômicas, através da análise direta do DNA dos indivíduos, onde centenas ou milhares de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são avaliados,

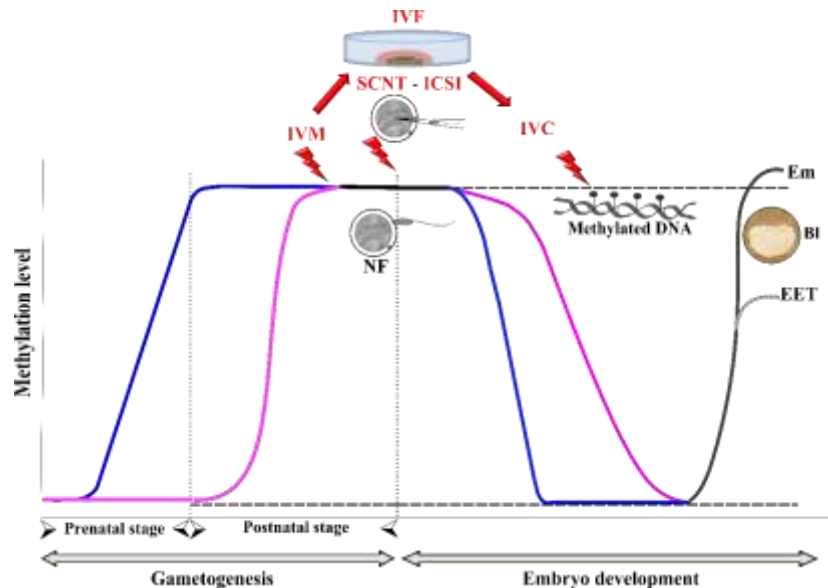


Figura 1. A Figura mostra os dois ciclos de reprogramação de metilação do DNA, durante a gametogênese e a embriogênese inicial. A linha azul representa essa reprogramação durante a gametogênese masculina (*Prenatal e Postnatal stages*) e do pronúcleo masculino, após a fecundação (*Embryo development*). A linha rosa representa os mesmos eventos, mas na gametogênese feminina e pronúcleo feminino. Ao nascimento ($\leftarrow\right)$), as células germinativas masculinas já se encontram com um alto padrão de metilação, sendo que os ovócitos só recebem e completam seu padrão de metilação após os animais atingirem a puberdade (*Postnatal stage*). Após a fecundação (NF), ocorre a segunda onda de reprogramação, onde o pronúcleo masculino é submetido a um processo de desmetilação ativa (mais rápida) e o pronúcleo feminino um processo de desmetilação passiva dependente de divisão celular, portanto mais lenta. Em bovinos, o processo de metilação *de novo* se inicia quando o embrião atinge o estágio de 8-16 células, sendo que a primeira diferenciação celular, na fase de blastocisto (BI), gera as células do trofoblasto (EET), que originarão a placenta e sendo menos metiladas que as células da massa celular interna (Em), as quais originarão o feto. As linhas horizontais pretas pontilhadas representam os genes *imprinted*, sendo que a linha superior representa os alelos metilados e a inferior, os alelos não metilados. Na parte superior da Figura, em vermelho, estão representadas as principais tecnologias de produção *in vitro* de embriões, que são a produção *in vitro* de embriões com suas diferentes etapas (IVM: maturação *in vitro*; IVF: fecundação *in vitro*; IVC: cultivo *in vitro*), a clonagem por transferência nuclear (SCNT) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) mostrando seu potencial efeito deletério (⚡) durante a gametogênese e a embriogênese inicial.

permitindo assim prever o valor genético de um animal ainda quando jovem ou até mesmo quando ainda é um embrião, antes da transferência deste para uma receptora. Isso permite diminuir intervalo de gerações, acelerando assim o ganho genético no tempo. Como o avanço rápido do conhecimento na área da epigenética, principalmente nos estudos com modelos animais (camundongos e ratos) e humanos, muitos trabalhos começaram a focar nos potenciais efeitos de fatores ambientais, como nutrição, estresse, substâncias químicas, dentre outros, durante a gestação, sobre a saúde e desempenho da prole na infância e vida adulta. E alguns trabalhos começaram a especular a possibilidade de que efeitos ambientais externos durante a gestação poderiam afetar não só a geração F1, mas outras gerações. Assim, estas

informações poderiam ser relevantes no contexto do melhoramento animal.

Pode-se citar alguns exemplos importantes sobre diferentes efeitos externos sobre padrões epigenéticos e sua influência sobre diferentes fenótipos. Trabalhos utilizando linhagens de camundongos Agouti portando a inserção de um retrotransposon nesse gene, mostraram que alimentando fêmeas gestantes com dietas suplementadas com colina, ácido fólico, betaína e vitamina B12, suas progêneses nasceram saudáveis e com pelagem marrom (Dolinoy *et al.*, 2006; 2007). Estas mudanças no fenótipo estão associadas a mudanças, provocadas pela dieta rica em substâncias relacionadas a fontes de grupamentos metil, no padrão de metilação do DNA de um retrotransposon presente no gene Agouti dessa

linhagem de camundongos. A grande questão é se essas alterações permanecem apenas na geração F1 ou se mantêm em outras gerações. Diferentes grupos de pesquisa trabalhando com esse modelo encontraram resultados controversos neste sentido (Cropley *et al.*, 2006; Waterland *et al.*, 2007). Um outro estudo muito interessante mostrou que indivíduos expostos a fome durante a vida pré-natal, apresentaram, 6 décadas mais tarde, menos metilação de DNA no gene *imprinted* IGF2 (Heijmans *et al.*, 2008). Esses achados mostram que a exposição a determinados fatores ambientais, neste caso a restrição alimentar, no início do desenvolvimento pré-natal pode causar alterações epigenéticas que persistem durante toda a vida do indivíduo. Um outro estudo, avaliando gêmeos monozigóticos, mostrou que diferenças nos padrões epigenéticos vão aumentando durante a vida dos indivíduos (Fraga *et al.*, 2005). Além disso,

Adkins *et al.* (2011) mostraram que há uma correlação entre a idade parental e os níveis de metilação em recém-nascidos. Considerando estes resultados, e focando o melhoramento e a produção animal, uma questão relevante a ser levantada é se estas mudanças epigenéticas que vão surgindo ao longo da vida dos indivíduos também ocorrem nos gametas e se sim, será que há alguma diferença de desempenho e saúde da progênie de um animal quando este é utilizado ainda jovem ou mais velho para se reproduzir?

Finalmente, é importante o desenvolvimento e adaptação de novas TRAs que evitem ao máximo alterações epigenéticas em gametas e embriões. No contexto da produção animal, é essencial esclarecer se e como padrões epigenéticos podem estar envolvidos na resistência a doenças e características de produção.

Conclusões

A epigenética é um tema recente e a maioria dos estudos utiliza animais de laboratório. A importância da epigenética no contexto das TRAs está bem estabelecida e para o melhoramento genético animal pouco ainda se sabe. Há poucas evidências sobre herança epigenética transgeracional (através das células germinativas) em mamíferos que persistem por mais do que tres gerações--este é um tema cientificamente relevante (Lamarckismo).

Epigenoma-cada tecido/idade/estado fisiológico tem um epigenoma específico (qual avaliar depende

da característica de interesse)--o custo da técnica ainda é limitante. Necessidade de desenvolvimento de métodos estatísticos para incorporar dados epigenômicos em programas de melhoramento. A possibilidade de manipulação de padrões epigenéticos por fatores externos como por exemplo nutrição e manejo pode-se apresentar como uma ferramenta para a produção animal, favorecendo determinados epigenótipos relacionados a resistência a doenças, longevidade, produção, etc.

Literatura Citada

- Adkins, R. M., F. Thomas, F. A. Tylavsky, and J. Krushkal. 2011. Parental ages and levels of DNA methylation in the newborn are correlated. *BMC Med. Genet.* 12:47.
- Carvalho, J. O., V. A. Michalczechen-Lacerda, R. Sartori, F. C. Rodrigues, O. Bravim, M. M. Franco, and M. A. Dode. 2012. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. *Mol. Reprod. Dev.* 79(2):77-84.
- Cropley, J. E., C. M. Suter, K. B. Beckman, and D. I. Martin. 2006. Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(46):17308-17312.
- Dolinoy, D. C., J. R. Weidman, R. A. Waterland, and R. L. Jirtle. 2006. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ. Health Perspect.* 114(4):567-72.
- Dolinoy, D. C., D. Huang, and R. L. Jirtle. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(32):13056-13061.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, M. F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suñer, J. C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T. D. Spector, Y. Z. Wu, C. Plass, and M. Esteller. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(30):10604-10609.
- Franco, M. M., J. B. Santos, A. S. Mendonça, T. C. Silva, R. C. Antunes, and E. O. Melo. 2016. Quick method for identifying horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) hybrids. *Genet. Mol. Res.* 15(3): 1-7.
- Heijmans, B. T., E. W. Tobi, A. D. Stein, H. Putter, G. J. Blauw, E. S. Susser, P. S. Slagboom, and L. H. Lumey. 2008. Persistent epigenetic differences

- associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(44):17046-17049.
- Heijmans, B. T., E. W. Tobi, L. H. Lumey, and P. E. Slagboom. 2009. The epigenome: archive of the prenatal environment. *Epigenetics.* 4(8):526-531.
- Meyer, K., and B. Tier. (2012). Estimates of variances due to parent of origin effects for weights of Australian beef cattle. *Anim. Prod. Sci.* 52(4): 215-224.
- Mundim, T. C., A. F. Ramos, R. Sartori, M. A. Dode, E. O. Melo, L. F. Gomes, R., Rumpf, and M. M. Franco. 2009. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genet. Mol. Res.* 8(4):1398-1407.
- Urrego, R., N. Rodriguez-Osorio, and H. Niemann. 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics.* 9(6):803-815.
- Waterland, R. A., M. Travisano, and K. G. Tahiliani. 2007. Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J.* 21(12):3380-3385.
- Yang, X., S. L. Smith, X. C. Tian, H. A. Lewin, J. P. Renard, and T. Wakayama. 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39(3):295-302..