



## Ovogênese e modificações epigenéticas

*Oogenesis and epigenetic modifications*

I.R. Bessa<sup>1</sup>, M.A.N. Dode<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Correspondência: [margot@cenargen.embrapa.br](mailto:margot@cenargen.embrapa.br)

### Resumo

A reprogramação epigenética se refere a modificações programadas do genoma, que ocorrem nos períodos da gametogênese e embriogênese e que regulam a atividade dos genes sem alteração da sequência primária de DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares. Entender como ocorrem esses mecanismos proporcionará maior compreensão acerca das modificações necessárias para a melhoria do sistema de cultivo *in vitro*, viabilizando ainda mais as biotécnicas de reprodução assistida, em especial a produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** bovino, gametogênese, reprogramação epigenética.

### Abstract

*The epigenetic reprogramming refers to programmed genome modifications that occur during gametogenesis and embryogenesis and regulate gene activity without altering the primary sequence of DNA, heritable during cell divisions. Understanding how these mechanisms occur, would give us a clearer indication of the which modifications are needed to improve the in vitro systems in, enabling further assisted reproductive biotechnologies, in particular, in vitro embryo production.*

**Keywords:** bovine, gametogenesis, epigenetic reprogramming.

### Introdução

Nas últimas décadas, o uso de biotecnologias da reprodução em animais, em especial a produção *in vitro* de embriões (PIV), tem aumentado significativamente não só nas espécies de importância econômica, mas também naquelas ameaçadas de extinção. Apesar de inúmeros estudos realizados na tentativa de melhorar a eficiência dessa técnica, o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* até o estágio de blastocisto ainda é em torno de 40% (Farin et al., 2007; Lee e Teixeira, 2009), sendo que, desses, uma porcentagem ainda menor, em torno de 30%, tem capacidade de iniciar uma prenhez após a transferência (Rizos et al., 2002; Pontes et al., 2009).

O sucesso da PIV depende, principalmente, da disponibilidade de ovócitos maduros e competentes que possam ser fecundados e cultivados e que tenham desenvolvimento embrionário adequado. Entretanto, quando se utiliza essa biotécnica, os ovócitos disponíveis são, em geral, imaturos e obtidos de uma população folicular heterogênea. Portanto, eles precisam ser maturados *in vitro* e capazes de sofrer todos os eventos necessários para que a maturação ocorra com sucesso. Esses eventos envolvem não apenas a dinâmica correta da separação cromossômica, mas também vários outros processos que ocorrem no citoplasma, tais como a redistribuição das organelas citoplasmáticas e a presença de estoque de RNAm, proteínas e fatores de transcrição (revisado por Ferreira et al., 2009).

Além da formação dos estoques de RNAm, necessário para a competência do ovócito, o padrão epigenético do genoma do ovócito deve ser totalmente apagado e restabelecido para que se torne apto para a fecundação. Os mecanismos epigenéticos em ovócito e embrião inicial incluem metilação do DNA, modificação nas histonas, remodelação de cromatina e RNAs não codantes (Prather et al., 2009).

Portanto, as modificações pós-traducionais da cauda das histonas e a metilação do DNA são fatores essenciais na regulação gênica e desempenham papel importante no controle da reprogramação que ocorre durante a gametogênese e a embriogênese (Prather et al., 2009).

Esta revisão tem por objetivo discutir e atualizar o conhecimento sobre os principais mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação epigenética que acontece durante a ovogênese.

### Ovogênese

A ovogênese consiste na formação e na diferenciação das células germinativas primordiais até a



formação do ovócito haploide fecundado. Ao contrário do que acontece com a espermatogênese, em que os espermatozoides são continuamente produzidos ao longo da vida reprodutiva do macho, a fêmea tem uma população finita de ovócitos, que se encontram presentes no ovário desde o momento do seu nascimento (Fair, 2003). Apesar de a ovogênese se iniciar antes do nascimento, somente alguns ovócitos conseguem completar esse processo após a puberdade, enquanto a grande maioria deles sofre atresia (Rüsse, 1983).

Durante o desenvolvimento fetal, as células germinativas primordiais migram para as gônadas em desenvolvimento e sofrem extensiva proliferação celular. Quando chegam aos cordões sexuais primários são chamadas de ovogônias (Sadeu et al., 2006). Uma vez formadas, as ovogônias entram em meiose e diferenciam-se em ovócitos primários (Aerts e Bols, 2008), que ficam retidos no estágio de diplóteno (prófase I) da primeira divisão meiótica ou vesícula germinativa (VG). Estes permanecem assim até pouco antes da ovulação, quando, por ação hormonal, são estimulados a retomar a meiose (Wang e Sun, 2007).

Quando o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) induz a retomada da meiose, o núcleo em vesícula germinativa é rompido, prosseguindo a meiose até a metáfase II, após a expulsão do primeiro corpúsculo polar. Na metáfase II, ocorre a segunda interrupção da meiose (Lonergan et al., 1994), sendo que o ovócito permanece assim até ser fecundado pelo espermatozoide, quando, então, completa a segunda divisão meiótica e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o ovócito haploide fecundado (Chohan e Hunter, 2004).

Durante a ovogênese, as informações necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial são transcritas e armazenadas sob a forma de RNAm ou traduzidas e armazenadas sob a forma de proteína (Allard et al., 2005). Essa síntese vai diminuindo durante os crescimentos folicular e ovocitário (De La Fuente e Eppig, 2001), de forma que, no momento da ovulação, o ovócito do folículo pré-ovulatório basicamente deixa de transcreever. Após a quebra da vesícula germinativa (GVBD), essa transcrição cessa e a maturação nuclear avança até o estágio de metáfase II da segunda divisão meiótica (Prather et al., 2009).

Uma vez que ocorre pouca ou nenhuma transcrição entre a GVBD e o estágio embrionário de oito a 16 células no bovino (Lonergan et al., 2003), é possível afirmar que o ovócito controla o desenvolvimento até a transição materno-zigótica, quando o genoma do embrião é ativado (De La Fuente., 2004; Tian et al., 2009).

### Foliculogênese

A foliculogênese em bovinos também começa durante a vida fetal. Ela pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia durante a vida fetal, começando com a formação do folículo primordial e culminando com a ovulação (Van den Hurk e Zhao, 2005).

O folículo é a unidade básica e funcional do ovário, fornecendo o microambiente necessário para o crescimento e a maturação ovocitária (Sharma et al., 2009). É constituído por um ovócito circundado por células somáticas, as células da granulosa, e é reponsável pela função gametogênica e esteroidogênica do ovário (Van Wezel e Rodgers, 1996).

Durante o processo de foliculogênese, ocorre o crescimento do folículo pré-antral, que inclui a transição de folículo primordial para primário e a formação e crescimento de folículos secundários, logo em seguida ocorre a formação do antro e o desenvolvimento de folículos antrais até o estágio pré-ovulatório (Silva et al., 2003). Portanto, os folículos presentes no córtex ovariano se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento ou atresia.

Do total dos folículos presentes no ovário cerca de 95% são pré-antrais (Rossetto et al., 2009), sendo que a maioria desses não é utilizada na vida reprodutiva dos animais (Telfer, 1996; Sharma et al., 2009). Os folículos pré-antrais abrangem os folículos primordiais, primários e secundários, enquanto os folículos antrais compreendem os folículos terciários e o de *De Graaf* ou pré-ovulatório (Hulshof et al., 1994).

O folículo primordial consiste em um ovócito circundado por uma camada de células da granulosa achatadas ou achatadas e cuboides. Seu ovócito quiescente possui formato esférico com citoplasma homogêneo. A cromatina é descondensada e um ou dois nucléolos podem ser observados (Kacinskis et al., 2005). Os nucléolos são responsáveis por produzirem ribossomos e conseqüentemente são maiores durante o crescimento celular, período em que ocorre a formação de grande quantidade de proteínas.

Quando o folículo primordial é ativado, entra no *pool* de folículos em crescimento, sendo que a ativação do crescimento folicular resulta na multiplicação das células foliculares (Hulshof et al., 1994). O folículo primário, portanto, consiste em um ovócito cercado por uma camada completa de células da granulosa em formato cuboide. Durante o crescimento do folículo primário, o número de células da granulosa continua aumentando e ocorre o início do crescimento do ovócito, evidenciado pelo aumento no seu diâmetro (Fair, 2003).

O folículo secundário consiste em um ovócito cercado por duas ou mais camadas de células cuboides com a cromatina mais condensada. Pode ser classificado em folículos pequenos e grandes (Kacinkis et al., 2005). Folículos secundários pequenos ou iniciais são menos desenvolvidos; é nesse estágio que a zona pelúcida começa a se formar em volta do ovócito e as células da teca podem ser visualizadas em torno da lâmina basal (Fair et al., 1995). Folículos secundários grandes ou finais são mais desenvolvidos, possuem a zona pelúcida



completa, formando uma grossa camada em volta do ovócito (Kacinskis et al., 2005) e a teca interna já está formada.

Na transição do folículo secundário para o folículo terciário ou antral, é observada a diferenciação das células da teca em interna e externa (Driancourt, 1991) e a fase final da folículo gênese é caracterizada pela organização das células da granulosa, com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular entre elas, denominada de antro. O fluido folicular que preenche essa cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (Barnett et al., 2006).

O período final do desenvolvimento folicular antral é caracterizado por três fases distintas, conhecidas como recrutamento, seleção e dominância. A fase de recrutamento refere-se ao início da elevação das concentrações do hormônio folicular estimulante (FSH). Nesse momento, os folículos medem entre 1 e 3 mm (Jaiswal et al., 2004), com o ovócito correspondente a uma média de 110  $\mu\text{m}$  (Fair et al., 1995). Apenas um folículo é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais, suprimindo o crescimento destes e inibindo o recrutamento de novos folículos (Fair, 2003). Se durante o período de dominância o corpo lúteo estiver presente no ovário, os altos níveis de progesterona impedirão o aumento da frequência dos pulsos do hormônio luteinizante (LH), e o folículo dominante entra em atresia. Se ocorrer a luteólise, ocorrerá uma diminuição das concentrações de progesterona, permitindo um aumento da pulsatilidade do LH, o que resultará no crescimento final do folículo pré-ovulatório com uma subsequente liberação do ovócito maturo na ovulação (Ginther et al., 2003).

### Maturação e competência ovocitária

A competência ovocitária é adquirida gradativamente e compreende a capacidade do ovócito em retomar a meiose, de clivar após a fecundação, desenvolver-se a estágio de blastocisto e levar a gestação a termo (Sirard et al., 2006; Farin et al., 2007).

Durante a ovogênese em mamíferos, a retomada da meiose pode ocorrer mediante a retirada do ovócito do folículo, ou por um estímulo hormonal *in vivo*. *In vivo*, a retomada da meiose é iniciada no momento do pico pré-ovulatório do LH em ovócitos oriundos de folículos dominantes (pré-ovulatórios), totalmente crescidos e meioticamente competentes.

No intervalo entre o período do pico de LH e a ovulação, o ovócito sofre uma série de alterações não somente no seu núcleo, mas também no seu citoplasma, num processo conhecido como maturação ovocitária (Van den Hurk e Zhao, 2005). Esse processo compreende a maturação nuclear e a citoplasmática, as quais envolvem mudanças morfológicas e bioquímicas (Meirelles et al., 2001).

Os eventos nucleares abrangem reorganização da rede de microtúbulos para o deslocamento dos cromossomos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos, progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (Cha e Chian, 1998).

Quanto às mudanças citoplasmáticas, sua descrição inicial é baseada em observações ultraestruturais antes do pico de LH, que é quando o ovócito espera o sinal para ovulação. Observam-se mudança na atividade da proteína quinase, desenvolvimento dos mecanismos de liberação de  $\text{Ca}^{++}$  e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozoide (Dieleman et al., 2002). No aspecto ultraestrutural, há um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios, modificação do aparelho de Golgi, aparecimento de vários ribossomos adjacentes aos cromossomos, rearranjo das mitocôndrias e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (Humblot et al., 2005).

Os eventos moleculares envolvem transcrição, armazenamento e processamento de RNAs, que estão envolvidos tanto na maturação como nos subsequentes eventos celulares, como fecundação, formação do pró-núcleo e desenvolvimento embrionário inicial. Além do RNA, as proteínas que são traduzidas também podem ser estocadas até o momento apropriado para sua utilização (Sirard et al., 2006).

A síntese proteica é indispensável não somente para a maturação ovocitária como também para a formação do zigoto e a embriogênese inicial. Desta forma, uma apropriada quantidade de ribossomos deve estar presente durante a maturação, sendo que estes são sintetizados por meio da transcrição do gene do RNA ribossomal (Humblot et al., 2005). Na primeira divisão meiótica, a síntese proteica no ovócito no estágio de metáfase I é aproximadamente três vezes maior do que durante a quebra da vesícula germinativa (GVBD). Quando a célula atinge a metáfase II, o ovócito atinge um nível basal de tradução de RNAm.

Os altos níveis de síntese proteica observados em MI, ao contrário do que acontece em MII no ovócito, podem ser devido ao grande estoque de ribossomos. Como consequência da alta utilização dessas organelas durante o processo de maturação antes de MII, o estoque de proteínas é reduzido e a quantidade de ribossomos e a síntese proteica são comparativamente menores. Essa evidência confirma a hipótese de que a presença de ribossomos é diretamente relacionada à síntese proteica durante períodos cruciais do desenvolvimento (revisado por Ferreira et al., 2009).

A aquisição da competência meiótica está associada ao tamanho do folículo no qual o ovócito está inserido. Apesar de esse parâmetro, por si só, não garantir a total capacidade de desenvolvimento, tem sido utilizado por vários autores para estudos de competência (Nowak-Imialek et al., 2008; Caixeta et al., 2009;



Lodde et al., 2009; Racedo et al., 2009; Sanchez et al., 2009). A utilização desse modelo tem proporcionado a identificação de genes envolvidos na competência ovocitária (Sirard et al., 2006). No entanto, em bovinos, os estudos têm se limitado ao uso de ovócitos imaturos obtidos de folículos antrais e, mais raramente, de folículos secundários finais. Portanto, estudos que avaliem o padrão de expressão de genes relacionados à competência durante o crescimento ovocitário, desde o estágio de folículo primordial até o estágio antral tardio, proporcionariam informações relevantes para o processo de maturação e competência ovocitária.

### Modificações epigenéticas nos ovócitos

A reprogramação epigenética se refere a modificações programadas do genoma, que ocorrem nos períodos da gametogênese e da embriogênese e que regulam a atividade dos genes sem alteração da sequência primária de DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (Wang et al., 2010). Em todas as células eucarióticas, o DNA é parcialmente compactado no núcleo por meio dos nucleossomos. O nucleossomo, unidade básica da cromatina, consiste em 146 pares de bases de DNA amarrados em um octâmero de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e na histona H1, que se une ao exterior do octâmero para estabilizar as fitas de DNA (Furuya et al., 2007). A interação entre o DNA e as histonas, o nucleossomo e a cauda das histonas são responsáveis por influenciar a expressão ou repressão da transcrição (Allard et al., 2005).

Os mecanismos epigenéticos em ovócito e embrião inicial incluem metilação do DNA, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, nitrilação, glicosilação entre outras modificações pós-traducionais que as histonas sofrem (Prather et al., 2009).

Em mamíferos, a metilação do DNA constitui uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas e é a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (Tchurikov, 2005). O estabelecimento e a manutenção dos padrões de metilação do DNA desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e no desenvolvimento embrionário normal (Reik et al., 2001).

Essas modificações epigenéticas ocorrem em dois períodos críticos, na formação do gameta e no desenvolvimento embrionário (Tremblay et al., 2006). Nas células germinativas, os padrões de metilação são apagados no início do desenvolvimento e um aumento global de metilação do DNA ocorre durante o crescimento do ovócito (Kageyama et al., 2007). Após a fecundação, o zigoto passa por extensa desmetilação e apaga praticamente todo o padrão de metilação parental herdado, com exceção dos genes *imprinted*. A metilação *de novo* do genoma é restabelecida durante o desenvolvimento embrionário inicial, próximo do período de implantação, determinando os padrões de metilação do embrião (Mann e Bartolomei, 2002).

A inibição da transcrição e o silenciamento gênico, por exemplo, estão associados à metilação do DNA e ocorrem devido à inibição direta da ligação dos fatores de transcrição, em sequências específicas do DNA. Isso ocorre em regiões onde existe uma grande concentração de sequências de citosina e guanina enlaçados por fosfatos (CpGs), onde se encontram os sítios de reconhecimento e ligação desses fatores (Robertson et al., 2004). Em células de mamíferos, a metilação do DNA ocorre predominantemente nessas citosinas presentes nos dinucleotídeos CpG, sendo catalisada por uma classe importante de enzimas. As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), portanto, são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos padrões de metilação. É uma complexa família de enzimas que incluem pelo menos quatro membros: DNMT1, 2, 3a e 3b e múltiplas isoformas (Russel e Betts, 2008).

A DNMT1 é a DNA metiltransferase mais conhecida e abundante e está relacionada com a manutenção dos padrões de metilação de células embrionárias e adultas. Isso porque é responsável por copiar esses padrões após a síntese de DNA (Wrenzycki et al., 2001), ou seja, tem alta afinidade por dinucleotídeos CpG hemimetilados na fita nova de DNA após a replicação (Lodde et al., 2009). Em várias espécies de mamíferos, existem duas formas de DNMT1 expressas em ovócitos e embriões: a DNMT1o, que é expressa predominantemente durante a ovogênese e o início do desenvolvimento embrionário, e a forma somática DNMT1s, que substitui a forma do ovócito após a implantação (Vassena et al., 2005). Entretanto, em bovinos, a expressão da isoforma específica do ovócito (DNMT1o) não foi detectada em ovócitos e embriões (Russel e Betts, 2008).

Em camundongos, a DNMT1 está presente na associação com a cromatina no estágio de metáfase II (MII) de ovócitos e embriões no estágio de pré-implantação e, sozinha, é suficiente para manter as marcas de metilação dos genes *imprinted* (Hirasawa et al., 2008). A inativação do gene DNMT1 em camundongos leva à perda global de metilação e à expressão bialélica ou silenciamento dos genes *imprinted* (Ko et al., 2005). Em bovinos foram encontradas duas isoformas da DNMT1: DNMT1a e DNMT1b, no entanto diferenças quanto as suas funções biológicas ainda não foram evidenciadas (Russel e Betts, 2008).

A enzima DNMT2 parece conter todos os domínios específicos para realizar a metilação do DNA, mas sua capacidade de metilar tem sido questionada (Okano et al., 1999). Em um estudo realizado por Golding e Westhusin (2003) em bovinos, foi verificado que o RNAm da DNMT2 é expresso em todos os tecidos, sendo encontrado até mesmo nos ovários e testículos de animais adultos.

Já as enzimas DNMT3a e DNMT3b têm atividade de *de novo* metiltransferase e a ausência de uma delas causa perturbações nos padrões de metilação do DNA e, conseqüentemente, letalidade prematura em



camundongos (Wrenzycki et al., 2001). A expressão da DNMT3a em ovócitos vai diminuindo até o estágio embrionário de oito células, e é responsável pela manutenção da metilação global em células-tronco de camundongos (Ko et al., 2005). Lucifero et al. (2007) determinaram a dinâmica de expressão das DNMTs em ovócitos em cinco períodos de crescimento pós-natal, desde ovócitos obtidos de folículos primordiais até ovócitos completamente crescidos no estágio de VG, além de ovócitos maduros no estágio de metáfase II. Esses autores verificaram que a expressão das DNMTs 3a e 3b foi aumentada de acordo com o crescimento ovocitário, diminuindo após o estágio de MII. Essa diminuição coincide com a perda de transcritos que ocorre em ovócitos após a maturação meiótica.

Além da metilação do DNA, as modificações das histonas também servem como marcas epigenéticas para ativar e desativar a cromatina (Li, 2002). As modificações pós-traducionais das histonas ocorrem nas caudas, e algumas modificações em local específico. A quantidade em que ela ocorre, como mono, di ou trimetilação de um aminoácido, pode ter significado biológico diferente (Nishioka et al., 2002).

A metilação de histonas está relacionada à configuração da cromatina e influencia diversos processos relacionados com a transcrição e o reparo do DNA. Vários sítios das histonas podem ser metilados, em especial na histona H3, e incluem a lisina (K) 4, 9, 27, 36, 79 ou a arginina 17 (Stewart et al., 2005). A metilação da H3K9, por exemplo, está relacionada à repressão da cromatina e é suficiente para induzir a repressão da transcrição. Estudos indicam também que ela está intimamente relacionada com a formação do pró-núcleo paterno e a ativação do DNA genômico (Park et al., 2007). A metilação da H3K9 é marca epigenética constante na maturação de ovócitos suínos (Endo et al., 2008). Sua presença foi encontrada em ovócitos recuperados de folículos antrais iniciais, mas não em suas fases anteriores. Racedo et al. (2009) verificaram em bovinos que essas modificações já estão estabelecidas no folículo antral inicial e persistem durante a maturação *in vitro* de ovócitos. Tal persistência indica que essa metilação está envolvida na manutenção de um perfil de expressão definida durante a fase final de crescimento do ovócito e do processo de maturação (Xue et al., 2010).

Foi observado que a expressão das enzimas que catalisam a metilação da histona foi aumentando durante o crescimento do ovócito, com as maiores alterações observadas no ovócito completamente crescido, na fase de VG. As enzimas histona metiltransferase *supressor of variegation 3-9 homologue 1* (SUV39H1) e *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2* (EHMT2) metilam especificamente a lisina 9 da histona H3. Essa modificação inativa a cromatina, levando à repressão da expressão gênica (Vaute et al., 2002). Estudos têm mostrado que os níveis de RNAm para EHMT2 e SUV39H1 aumentam durante o crescimento do ovócito em bovinos (Nowak-Imialek et al., 2008; Racedo et al., 2009). Além disso, Racedo et al. (2009) avaliaram a expressão de RNAm das histonas metiltransferases EHMT2 e SUV39H1 durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos, recuperados de folículos menores do que 2 mm e de 2 a 8 mm de diâmetro. Esses autores verificaram que ovócitos obtidos de folículos maiores apresentavam maior quantidade de transcritos desses genes do que os de folículos menores.

A ausência da SUV39H1 levou a uma viabilidade prejudicada e à instabilidade cromossômica em embriões de camundongos (Peters et al., 2001). Foi verificado que a histona metiltransferase EHMT2 é indicativa de modificação crítica na reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário inicial, transição materno-zigótica e o desenvolvimento pré-implantacional (Wrenzycki et al., 2005).

Tanto quanto a metilação, a acetilação de histonas é essencial para a regulação da expressão gênica e ambas desempenham papel importante na reprogramação epigenética. As alterações na atividade transcricional promovida pela acetilação das histonas podem estar ligadas a mudanças na estrutura da cromatina (Shogren-Knaak et al., 2006).

O aumento na acetilação das histonas (hiperacetilação) está relacionado com uma cromatina transcionalmente permissiva, enquanto níveis reduzidos de acetilação (hipoacetilação) estão associados com a repressão da expressão gênica. A repressão decorrente da hipoacetilação é causada pelo fechamento da cromatina, o que impede a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (Unnikrishnan et al., 2010). A estabilidade da acetilação das histonas é controlada pelas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (McGraw et al., 2003).

As HATs acetilam resíduos específicos de lisina (K) na cauda aminoterminal de histonas, causando uma redução na sua afinidade pelo DNA e, conseqüentemente, aumentando a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA molde (Brownell e Allis, 1996). Podem ser separadas nos tipos A e B, dependendo de sua localização subcelular, origem e função. As HATs do tipo A são encontradas no núcleo, onde desempenham um papel importante na regulação da expressão do gene, funcionando como coativador transcricional. Já as HATs do tipo B principalmente acetilam histonas que nascem no citoplasma e podem funcionar em conjunto com a cromatina (McGraw et al., 2003).

A acetilação é um processo reversível e a histona desacetilase (HDAC) é responsável pela reação oposta que, geralmente, resulta em repressão transcricional (Ma e Schultz, 2008). Em ovócitos de mamíferos, as histonas H3 e H4 possuem um alto nível de acetilação durante o período de VG, e a desacetilação da histona acontece por meio da HDAC (Endo et al., 2008).

As HDACs podem ser divididas em duas classes de acordo com o tamanho, sua homologia e interação proteína-proteína. A primeira classe é composta por enzimas homólogas à proteína da levedura RPD3 e inclui



HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8. Já a segunda classe deriva da enzima HDAC1 e inclui a HDAC 4, 5, 6, 9 e 10.

Em camundongos, Schultz et al. (1999) verificaram a expressão das HDACs 1, 2 e 3 em ovócitos e embriões até o estágio de blastocisto. As HDACs 2 e 3 apresentaram maior nível de expressão nos ovócitos e foram diminuindo até o estágio de quatro células, com um grande aumento na fase de blastocisto. Para a HDAC1, em ovócitos imaturos e em MII, foi encontrado uma expressão relativamente baixa, quando comparada com as outras HDACs, no entanto, no estágio de quatro células, a HDAC1 foi mais expressa que as demais. Em bovinos, em um estudo realizado por McGraw et al. (2003), foi verificado uma baixa expressão das HDAC 1 e HAT1 em ovócitos bovinos, tanto na fase de VG quanto na de MII, i, aumentando apenas em embriões na fase de blastocisto.

### Considerações finais

Entender como ocorrem os mecanismos moleculares que controlam a reprogramação epigenética durante o período de formação e crescimento folicular e ovocitário em mamíferos, especialmente em bovinos, proporcionará maior compreensão acerca das modificações necessárias para a melhoria do sistema de cultivo *in vitro*, viabilizando ainda mais as biotécnicas de reprodução assistida, em especial a produção de embriões.

### Referências

- Aerts JMJ, Bols PEJ.** Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.171-179, 2008.
- Allard P, Yang Q, Marzluff WF, Clarke HJ.** The stem-loop binding protein regulates translation of histone RNAm during mammalian oogenesis. *Dev Biol*, v.286, p.195-206, 2005.
- Barnett KR, Schilling CCR, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.10, p.1-19, 2006.
- Brownell JE, Allis CD.** Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, v.6, p.176-184, 1996.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MAN.** Effect of follicle size on RNAm expression in cumulus cells and oocytes of *Bos taurus indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.655-664, 2009.
- Cha KY, Chian RC.** Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod*, v.4, p.103-120, 1998.
- Chohan KR, Hunter AG.** *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.373-380, 2004.
- De La Fuente R, Eppig JJ.** Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol*, v.229, p.224-236, 2001.
- De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ.** Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol*, v.275, p.447-458, 2004.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD.** Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p.5-20, 2002.
- Driancourt MA.** Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v.35, p.55-68, 1991.
- Endo T, Naito K, Aoki F, Kume S, Tojo H.** Changes in histone modifications during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.71, p.123-128, 2008.
- Fair T, Hyttel P, Greve T.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.437-442, 1995.
- Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.
- Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR, Kennedy-Stoskopf S.** The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.97-112, 2007.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS.** Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, p.836-848, 2009.
- Furuya M, Tanaka M, Teranishi T, Matsumoto K, Hosol Y, Saeki K, Ishimoto H, Menigishi K.** H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. *J Reprod Dev*, v.53, p.895-902, 2007.
- Ginther OJ, Beg MA, Kot K, Meira C, Bergfelt DR.** Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biol Reprod*, v.68, p.524-529, 2003.
- Golding MC, Westhusin ME.** Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase RNAm sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Patterns*, v.3, p.551-558, 2003.
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S; Li E, Jaenisch R, Sasaki H.** Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development.



- Genes Dev, v.22, p.1607-1616, 2008.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JB.** Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Quart J Vet Sci*, v.16, p.78-80, 1994.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Hermann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H.** Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1149-1166, 2005.
- Jaiswal RS, Singh J, Adams GP.** Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*, v.71, p.1244-1251, 2004.
- Kacinkis MA, Lucci CM, Luque MCA, Bão SN.** Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos taurus indicus* preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.45-57, 2005.
- Kageyama S, Liu H, Kaneki N, Ooga M, Nagata M, Aoki F.** Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85-94, 2007.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K.** Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*, v.280, p.9627-9634, 2005.
- Lee HJ, Teixeira J.** Parthenogenesis in human oocytes that were collected from resected ovarian tissue and matured in vitro. *Stem Cells Dev*, v.18, p.941-946, 2009.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, v.3, p.662-673, 2002.
- Lodde V, Modina SC, Franciosi F, Zuccari E, Tessaro I, Luciano AM.** Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. *Eur J Histochem*, v.53, p.199-208, 2009.
- Lonergan P, Monaghan, P, Rizos D, Boland MP, Gordon I.** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.48-53, 1994.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.259-267, 2003.
- Lucifero D, La Salle S, Bourc'his D, Martel J, Bestor TH, Trasler JM.** Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev Biol*, v.7, p.36, 2007.
- Ma P, Schultz RM.** Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, v.319, p.110-120, 2008.
- Mann MR, Bartolomei MS.** Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol*, v.3, n.2, rev.1003, 2002.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA.** Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod*, v.68, p.383-389, 2003.
- Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC.** Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, v.158, p.351-356, 2001.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D.** Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*, v.16, p.479-489, 2002.
- Nowak-Imialek M, Wrenzycki C, Hermann D, Lucas-Hahn A, Lagutina I, Lemme E, Lazzari G, Galli C, Niemann H.** Messenger RNA expression patterns of histone associated genes in bovine preimplantation embryos derived of different origins. *Mol Reprod Dev*, v.75, p.731-743, 2008.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, v.99, p.247-257, 1999.
- Park JS, Jeong YS, Shin ST, Lee KK, Kang YK.** Dynamic DNAmethylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Dev Dyn*, v.236, p.2523-2533, 2007.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T.** Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, v.107, p.323-337, 2001.
- Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- Prather RS, Ross JW, Isom SC, Green JA.** Transcriptional, Post-transcriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.66, p.165-176, 2009.
- Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H.** Epigenetic modifications and related RNAm expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.738-748, 2009.
- Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization



- or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.
- Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL, Robertson KD.** Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v.322, p.110-118, 2004.
- Rossetto R, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CMG, Name KPO, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H.** Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Domest Anim Endocrinol*, v.37, p.112-123, 2009.
- Russel DF, Betts DH.** Alternative splicing and expression analysis of bovine DNA methyltransferase. *Dev Dyn*, v.237, p.1051-1059, 2008.
- Russe I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Sadeu JC, Cortvrind R, Ron-El R, Kastertein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.85, p.1130-1141, 2006.
- Sanchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J.** Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. *Mol Hum Reprod*, v.15, p.539-550, 2009.
- Schultz RM, Davis W, Stein P, Svoboda P.** Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool*, v.285, p.276-282, 1999.
- Sharma GT, Dubey PK, Meur SK.** Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livest Sci*, v.123, p.300-305, 2009.
- Shogren-Knaan M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL.** Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, v.311, p.844-847, 2006.
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N.** Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, v.4 p.481-495, 2003.
- Sirard AM, Richard F, Blondin P, Robert C.** Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.
- Stewart MD, Li J, Wong J.** Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, v.25, p.2525-2538, 2005.
- Tchurikov NA.** Molecular mechanisms of epigenetics. *Biochemistry*, v.70, p.406-423, 2005.
- Telfer EE.** The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.
- Tian XC, Park J, Bruno R, French R, Jiang L, Prather RS.** Altered gene expression in cloned piglets. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.60-66, 2009.
- Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Morin G, Sirard MA.** Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. *Gene*, v.375, p.44-53, 2006.
- Unnikrishnan, A, Gafken, P. R, Tsukyama, T.** Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol*, v.4, p.430-439, 2010.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Van Wezel IL, Rodgers RJ.** Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod*, v.55, p.1003-1011, 1996.
- Vassena R, Dee Schramm R, Latham KE.** Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.430-436, 2005.
- Vaute O, Nicolas E, Vandel L, Trouche D.** Functional and physical interaction between the histone methyltransferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, v.30, p.475-481, 2002.
- Wang N, Fang L, Zhan Q, Li L, Dong M, Ding G, Xu CM, Jiang SW, Huang HF, Jin F.** Effects of in vitro maturation on histone acetylation in Metaphase II oocytes and early cleavage embryos. *Obstetr Gynecol Int*, v.10, p.1-9, 2010.
- Wang Q, Sun YQ.** Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.1-12, 2007.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H.** Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev*, v.17, p.23-35, 2005.
- Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H.** Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, v.65, p.309-317, 2001.
- Xue K, Song J, Wei H, Chen L, Ma Y, Liu S, Li Y, Dai Y, Zhao Y, Li N.** Synchronous behaviors of CBP and Acetylations of Lysine 18 and Lysine 23 on Histone H3 during porcine oocyte first meiotic division. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.605-614, 2010.