



Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos

Methylation of histones in mammalian oocytes and embryos

Mirela Brochado Souza-Cáceres¹, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{2,3,4}

¹Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

²Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil.

³Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil.

⁴Correspondência: fabiana.sterza@uem.br

Resumo

A epigenética consiste no estudo de mudanças na função gênica que não dependem de mudanças na estrutura primária do DNA e que podem ser hereditárias. As mudanças epigenéticas desempenham um importante papel no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características estáveis diferentes, apesar de conterem o mesmo material genético. As histonas possuem uma importante função na estrutura do DNA, e alterações bioquímicas em sua cauda aminoterminal, alteram a estrutura da cromatina e suas funções. Dessa forma são fundamentais para o controle da expressão gênica, ativação do genoma embrionário, metilação do DNA e inativação do cromossomo X. O desenvolvimento oocitário e embrionário envolvem uma série de modificações epigenéticas importantes, incluindo as modificações pós-traducionais das histonas, que são imprescindíveis para o desenvolvimento normal do embrião. O melhor entendimento a respeito do epigenoma e sua influência sobre a oogênese e embriogênese podem permitir a otimização das biotecnologias da reprodução.

Palavras-chave: epigenética, gametas, embriogênese, modificações pós-traducionais.

Abstract

Epigenetic is the study of changes in genetic function which do not depend on change in the primary structure of DNA, and can be heritable. Epigenetic changes play an important role in cellular differentiation process, allowing the cells to keep different stable characteristics, though they contain the same genomic material. Histones are not only structural proteins, but are also critical to the control of gene expression, embryonic genome activation, DNA methylation and inactivation of the X chromosome. The histones have an important function in the structure of the DNA, consequently histone methylation can alter its structure and its functions. The oocyte and embryo development involve several important epigenetic modifications, including post-translation modifications of histones, which are essential for normal development of the embryo. The best understanding of the epigenome and its influence on oogenesis and embryogenesis may allow the optimization of reproduction biotechnologies.

Keywords: epigenetics, gametes, embryogenesis, post-translation modifications.

Introdução

O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, o qual é composto de 147 pares de base de DNA super-helicoidal, enrolado em 1,75 voltas em torno de um octâmero composto por duas moléculas de quatro diferentes proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (Kronberg et al., 1999; Mellor, 2006).

Há diferentes mecanismos que podem modular a cromatina e consequentemente a função gênica, tais como: metilação do DNA, modificações covalentes nas histonas e fatores remodeladores da cromatina.

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil à base citosina na fita de DNA, fato que geralmente promove a repressão da transcrição (Bird, 2007).

A regulação da transcrição também pode ser realizada por meio de modificações nas regiões amino terminais das histonas, tais como metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação (Mellor, 2006; Strahl e Allis, 2000). Essas modificações pós-traducionais das histonas, que estão relacionadas a alterações na conformação da cromatina, formam uma verdadeira linguagem molecular, conhecida como “Código das Histonas” (Ferreira e Franco, 2012).

A metilação do DNA é a mais bem estabelecida marca epigenética envolvida na determinação da expressão alelo-específica dos genes *imprinted* (Weaver et al, 2004) e sua relação com a reprodução foi revisada por Ferreira e Franco (2012).

As proteínas histonas desempenham papéis importantes na estrutura da cromatina (Huang et al., 2007). As metilações dessas proteínas são consideradas marcas epigenéticas, as quais são caracterizadas pela ligação de um, dois ou três radicais metil à cauda amino terminal da histona. Essas marcas podem ter significado biológico



diferente (Bottomley, 2004), e estão associadas a uma maior compactação dos nucleossomos, a heterocromatina, ou a sua menor compactação, eucromatina. Quando as alterações pós-traducionais das histonas favorecem a uma maior compactação da cromatina, deixam inacessíveis os sítios de ligação dos fatores de transcrição. Dessa forma, os genes são geralmente silenciados na heterocromatina e ativos na eucromatina (Mellor, 2006; Mistelli, 2007).

Considerando o impacto que as modificações epigenéticas podem exercer sobre a gametogênese e a embriogênese, o melhor entendimento dessa ciência pode nos auxiliar na busca da melhor eficiência das biotecnologias da reprodução de mamíferos.

O objetivo dessa revisão é descrever o perfil da metilação de histonas em oócitos e embriões de mamíferos.

Metilação de histonas

A metilação covalente das histonas ocorre nos resíduos de arginina e lisina. Resíduos de lisina podem estar mono-, di- ou trimetilados, enquanto os de arginina podem estar monometilados (Bottomley, 2004). As duas modificações da H3 mais associadas com metilação do DNA são a metilação da lisina 4 e a da lisina 9 (H3K4me e H3K9me). Estes dois sítios de modificações da histona parecem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e na diferenciação celular em mamíferos. Especificamente, a metilação do DNA está associada com a ausência de metilação da H3K4 e a presença de metilação na H3K9 (Eissenberg et al., 2010).

Em geral, a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20, são associadas a condensação da cromatina e repressão da transcrição, enquanto a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79, são correlacionadas com a descondensação e o estímulo da transcrição (Ciccone e Chen, 2009). As regiões da cromatina ativamente transcritas são ricas em H3K4 mono-, di- ou trimetilada e em H3K36 trimetilada, sendo a distribuição destas marcas ao longo das regiões dos genes transcritos, desigual, com a extremidade 5' destes, enriquecida em H3K4 trimetilada, enquanto a extremidade 3' é rica em H3K36 metilada (Jeppesen e Tuner, 1993).

As modificações covalentes nas histonas são mediadas por enzimas e consistem na adição ou remoção de grupos químicos (Waggoner, 2007; Weidman et al., 2007) capazes de interferir na coesão do DNA com as histonas, basicamente por modificações de cargas elétricas (Seneda e Bordignon, 2007).

Histonas acetiltransferases (HATs) e histonas metiltransferases (HMTs) adicionam grupos acetil e metil, respectivamente. Já as histonas desacetilases (HDACs) e as histonas desmetilases (HDMs) atuam removendo esses grupos (Shi, 2007; Haberland et al., 2009). Apesar de não ser foco dessa revisão, é importante enfatizar que acetilação de histonas é uma marca epigenética associada a permissão da transcrição, e portanto participa ativamente na regulação da transcrição gênica (Costa e Pacheco, 2013).

Existem fortes evidências de que as modificações de histonas são herdadas durante as divisões celulares, porém essa transmissão é muito mais complexa que a vista para a metilação do DNA, principalmente devido à replicação independente das moléculas de histonas. Já foi demonstrado que grupos proteicos importantes para a transmissão de estados de cromatina silenciada (grupo Polycomb) ou ativa (grupo Trithorax), durante o desenvolvimento embrionário, podem estar relacionados com a manutenção das modificações em H3K27 e H3K4. Porém pouco se sabe sobre os mecanismos de herança das modificações de histonas (Schuettengruber et al., 2009; Kim et al., 2009).

A literatura sugere três modelos da interdependência entre a metilação das histonas e a metilação do DNA. O primeiro modelo relata que as DNMTs ao metilarem o DNA, recrutam proteínas ligantes à metil-CpG, e logo as histonas são desacetiladas por enzimas histonas desacetilases (HDAC), e podem ser metiladas por histonas metiltransferases (HMT). O segundo modelo sugere que a metilação das histonas (metilação na lisina 9 da histona H3) ligadas a proteínas de heterocromatina podem recrutar DNMTs e metilar o DNA (Jackson et al., 2002; Bannister e Kouzarides, 2011). O terceiro modelo sugere que as proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP e da atividade de DNA helicase aumentem o acesso da estrutura do nucleossomo e facilitem a metilação do DNA e as modificações das histonas por ação das DNMTs, HDACs e HMTs (Li, 2002; Allis et al., 2007).

Metilação das histonas em oócitos de mamíferos

Durante a oogênese os oócitos aumentam significativamente de volume, passando de aproximadamente 20 µm de diâmetro no folículo primordial para 120 µm no folículo pré-ovulatório (Salha et al., 1998), esse crescimento está associado a um intenso acúmulo de macromoléculas, como RNAs e proteínas, essenciais para que o oócito possa adquirir competência (Crozet, 1989, Fair et al., 2007) e para estabelecer uma reserva de componentes maternos necessários para o desenvolvimento embrionário precoce (Andreu-Vieyra et al, 2010). Nesse sentido, a transcrição gênica específica para a demanda de cada etapa de desenvolvimento do oócito é essencial.

Desde o nascimento até o momento em que o oócito de uma fêmea púbere é submetido ao pico pré-

ovulatório de LH, este permanece estacionado em diplóteno da profase I (VG) e é caracterizado por apresentar cromatina de aspecto difuso e um padrão relativamente constante de expressão gênica (Brown, 1999). Como apenas 0,01% dos oócitos chegam a ovulação durante a vida útil de mamíferos e portanto sofrem a maturação final após o pico de LH, a grande maioria dos oócitos da fêmea permanecem a vida toda nesse estágio de desenvolvimento meiótico (Griffiths, 1998).

Fair et al. (2007) relataram que genes de efeito materno são de extrema importância para a precisa coordenação de processos que ocorrem durante as primeiras divisões celulares do embrião. Como exemplo cita-se o gene *MATER*, cujo nocaute em camundongos inviabilizou o desenvolvimento embrionário a partir de 2 células, período de ativação do genoma embrionário nessa espécie mamífera (Tong et al., 2000). Corroborando com esse fato, a metilação da H3K4 e a acetilação global de histonas, relacionadas a permissão da transcrição, são encontradas em grande quantidade nas fases iniciais da oogênese bovina (Fig. 1). Confirmando a sugestão de Schultz (2002) de que as modificações epigenéticas estão associadas com a aquisição de competência para o desenvolvimento do oócito.

O desenvolvimento do oócito VG até a metáfase II (MII), período denominado maturação oocitária final, é caracterizado pela capacidade de reinício da divisão meiótica, de garantir a fecundação monoespermática, de descondensar a cabeça do espermatozóide, de transportar a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio et al., 2004). No período pré-ovulatório, a transcrição dos oócitos MII praticamente cessa (Wrenzycki et al., 2007), fenômeno acompanhado por alteração das MPT's (De La Fuente et al., 2004; Bouniol-Baly et al., 1999), como a metilação da H3K9 (Chen et al., 2016) e uma queda considerável no grau de metilação da H3K4 e acetilação de histonas (Fig. 1).

As alterações citadas acima são acompanhadas por alteração da configuração da cromatina ao longo da oogênese. Já foi descrito que quando o complexo de DNA está altamente condensado e concentrado ao redor do nucléolo (configuração SN), há geralmente o silenciamento da transcrição. Ao passo que quando a cromatina está menos condensada e distante do nucléolo (configuração NSN), a transcrição é ativada. Inicialmente, todos os oócitos têm a configuração de tipo NSN (Mattson e Albertini 1990; Debey et al., 1993) e a alteração da configuração altera de acordo com o crescimento dos oócitos (Wickramasinghe et al., 1991; Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 1995).

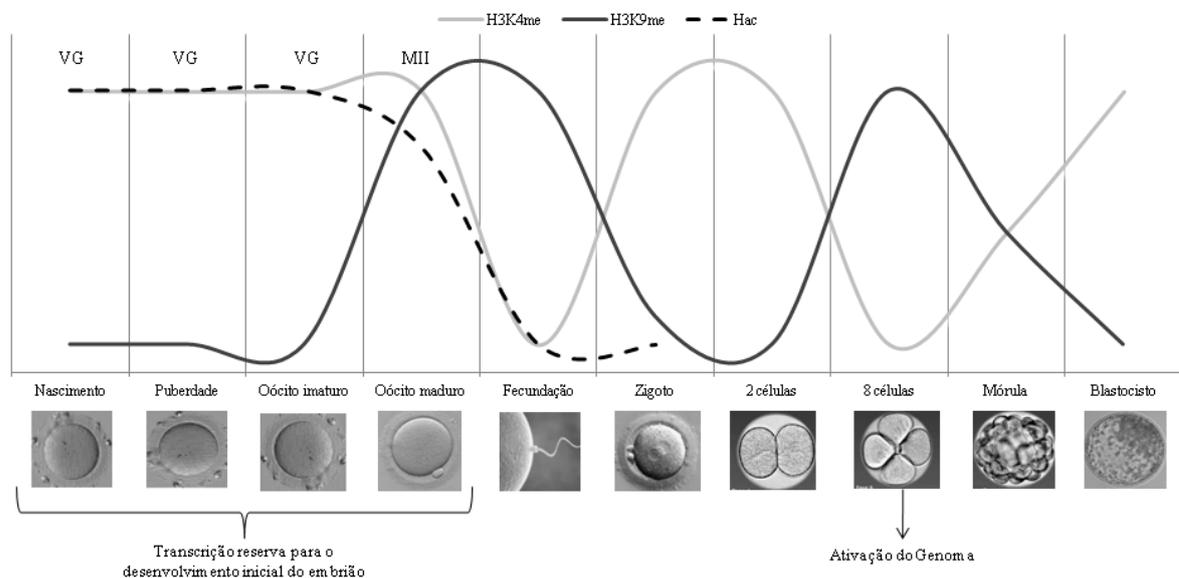


Figura 1. Representação esquemática da metilação global da H3K4 e H3K9, e acetilação global de histonas em oócitos e embriões bovinos de diferentes fases de desenvolvimento (Adaptado de Chen et al., 2016; Gaspar et al., 2015; Heras et al., 2016; Kang et al., 2002; Lepikhov et al., 2008; Maalouf et al., 2008; Maldonado et al., 2015; Racedo et al., 2009; Ross et al., 2008).

No período de maturação oocitária os mRNA maternos e as proteínas são direcionados para os processos que culminarão com a finalização da maturação, fertilização e clivagens iniciais até a ativação do genoma embrionário (Wrenzycki et al., 2007). Acredita-se que a queda acentuada da transcrição em oócitos de MII até o momento da fecundação (Fig. 1) seja necessária para que a meiose seja reiniciada e finalizada após a fecundação. O silenciamento da transcrição ocorre paralelamente a condensação da cromatina em larga escala e o seu rearranjo ao redor do nucléolo (De La Fuente et al., 2004; Bouniol-Baly et al., 1999). Em bovinos foi observado um processo de remodelamento gradual da cromatina em oócitos VG. Análise do transcriptoma permitiu identificar uma modulação dinâmica do conteúdo de mRNA, de modo que à medida que aumentava a

compactação da cromatina, ocorria redução do número de transcritos. Muitos transcritos acumulados nesse período codificaram histonas. Acredita-se que presença constante de SBPL2 no período de menor transcrição (maior compactação da cromatina), é necessária para proteção dos mRNAs de histonas de passarem por translação precoce ou degradação, permitindo assim sua utilização quando necessário durante as primeiras divisões embrionárias (Labrecque et al., 2015).

Murata et al. (2010) injetaram núcleo de células somáticas em oócitos em fase de VG com o objetivo de avaliar a reprogramação nuclear. Algumas modificações, como o aumento da fosforilação e a redução da acetilação de histonas, demonstraram estar relacionadas com características de ativação geral da transcrição de oócitos em VG.

Está claro que a mudança na estrutura da cromatina desempenha um papel essencial na alteração da expressão gênica durante o crescimento do oócito e parece estar envolvida na remodelação do genoma global, no entanto o controle das modificações epigenéticas nessa fase ainda precisa ser melhor elucidado (Kageyama et al., 2007).

Metilação das histonas em embriões de mamíferos

Durante todo o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos produzidos *in vivo* observa-se expressão gênica (Jiang et al., 2014), o que indica que em nenhum momento ocorre um silenciamento global da transcrição, como acreditava-se anteriormente (Kageyama et al., 2007). Foi demonstrado, no entanto, que alguns momentos do desenvolvimento embrionário se destacam pelo número de genes transcritos identificados por RNA-Seq, momentos caracterizados em 4 ondas de mudanças transcricionais, assim caracterizadas: até a fase de duas células, os genes expressos (166 down-regulated + 158 up-regulated) foram correlacionados com a degradação do RNA materno; entre 4 e 8 células, o grande número de genes expressos (1086 down-regulated + 945 up-regulated) foi correlacionado com a ativação do genoma do zigoto (AGZ); entre 16 células e mórula inicial, os genes expressos (325 down-regulated + 88 up-regulated) foram correlacionados com o fenômeno de compactação dos blastômeros e entre mórula compacta e blastocisto, os genes expressos (354 down-regulated + 475 up-regulated) foram correlacionados com a blastulação, ou seja, a diferenciação dos blastômeros em embrioblasto e trofoblasto (Jiang et al., 2014). A forma dinâmica em que os genes são expressos durante o desenvolvimento embrionário, é controlada por modificações epigenéticas importantes, porém ainda pouco conhecidas. Sabe-se no entanto, que o remodelamento das histonas é imprescindível para o desenvolvimento normal do embrião.

O genoma materno e paterno de zigotos de camundongo exibe distribuições assimétricas das formas di e tri-metiladas de H3K9, H3K4, H3K27 e H3K20 (Andreu-Vieyra et al, 2010). Alguns autores sugerem que antes da ativação do genoma não existe transcrição, sendo a mesma bloqueada pelas metilações na histona 3 em diferentes lisinas (K9, K27, K20) (Eissenberg et al., 2010). Por outro lado, a presença de metilações na H3K4 já indicava a possibilidade de transcrição basal nessa fase (Andreu-Vieyra et al, 2010).

Já foi demonstrada uma íntima associação da metilação do DNA e a metilação da H3K9 em embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIVE), marcas essas relacionadas ao potencial de desenvolvimento do embrião clone (Santos et al., 2003). Em embriões PIVE a H3K9me reduziu entre os estádios embrionários de 2 e 4 células e uma metilação de novo foi observada no estágio de 8 células (Fig. 1). No estágio de blastocisto foi identificada maior metilação de H3K9 e DNA nas células da massa celular interna e menor metilação das mesmas no trofoblasto (Santos et al., 2003).

Uma queda acentuada da metilação da H3K4 no estágio de 8 células combinado com a subida nos próximos estágios de desenvolvimento (Fig. 1), pode estar relacionada com a ativação do genoma do zigoto (AGZ), que ocorre precocemente nos mamíferos (Schultz, 2002). Existem relatos de que AGZ ocorra entre o desenvolvimento embrionário de 1 a 2 células em camundongos (Schultz, 2002) e entre 4 a 8 em humanos (Niakan e Eggan, 2013). Em bovinos, por muito tempo foi aceita a afirmação de que AGZ ocorreria entre 8 a 16 células (Memili e First, 2000; Maalouf et al., 2008). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que AGZ ocorre entre 4 a 8 células em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Jiang et al, 2014; Graf et al, 2014).

A finalização da AGZ é essencial para que cada blastômero assumira sua característica de totipotência, perfil indispensável para continuação do desenvolvimento do embrião, em especial da organogênese (Bultman et al., 2006). A partir de oito células foi observado um aumento linear no sinal da metilação da H3K4 e queda linear da metilação da H3K9, sendo este fato correlacionado com a ativação principal do genoma embrionário e aumento da atividade transcricional do embrião bovino (Fig.1).

A tri-metilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) ocorre em grande quantidade em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, mas diminui significativamente no estágio de 8 células, voltando a aumentar gradativamente nos estádios de mórula e blastocisto em camundongos (Wu et al., 2012). A dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me2), uma modificação associada a repressão da transcrição, é baixa em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, e começa a aumentar no estágio de 8-16 células em bovinos (Fig. 1; Santos et al., 2003).

Em embriões de oito células de camundongos, ocorre a hipometilação de H3K4 e a hipoacetilação de H3K9, enquanto a metilação da histona H3K27 e a associação da macro-histona H2A aparecem posteriormente, entre os estádios de 16 células e mórula inicial (Okamoto et al., 2004). A metilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9) ocorre mais tarde, entre o estádio de 32 células e a fase de blastocisto (Okamoto et al., 2004).

Segundo Ciccone e Chen (2009), os genes *imprinted* integram o mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Embora esses genes representem um pequeno conjunto no genoma mamífero, eles são essenciais para o desenvolvimento normal do indivíduo, pois estão envolvidos no desenvolvimento e no crescimento fetal (Delaval e Feil, 2004; Bressan et al., 2009).

No gene IGF2 o alelo expresso é o paterno, o qual codifica um fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin Like Growth Factor II), um dos principais reguladores do crescimento fetal e pós-natal (Delaval e Feil, 2004). Outro exemplo é o gene H19, no qual apenas o alelo materno é ativo, por isso desmetilado (Sasaki et al., 2000). O H19, que produz um RNA não codificante, é fortemente expresso em tecidos embrionários e extraembrionários durante o desenvolvimento, e sua transcrição é expressamente diminuída após o nascimento (Ideraabdullah et al., 2008).

Atualmente, cerca de 200 genes são conhecidamente *imprinted* no genoma dos mamíferos. É possível dizer que aproximadamente 100 genes são *imprinted* em humanos, 120 em camundongos e 20 em bovinos. No entanto, ainda o número exato de genes *imprinted* está sendo discutido ([www.geneimprint.org](http://igc.otago.ac.nz); <http://igc.otago.ac.nz>) (Martucci et al., 2015).

Os mecanismos regulatórios que promovem o *imprinting* são complexos e tem sido objetos de muitas investigações. A maioria, se não todos, os genes *imprinted* estão associados com uma ou mais regiões diferentemente metiladas nas histonas em alelos maternos ou paternos. Em embriões em fase de pró-núcleo, o genoma materno e o paterno sofrem uma onda de desmetilações, o que apaga a maioria das marcas de metilação herdadas dos pais (Kageyama et al., 2007). Essas informações demonstram a importante relação da metilação de histonas com processos de estabelecimento e manutenção do *imprinting* genômico.

Estudos têm demonstrado que modificações de histonas são afetadas pela manipulação dos embriões e pelo cultivo *in vitro* (Santos et al., 2003). Os referidos autores demonstraram que embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) apresentam hipermetilação de H3K9. Outro estudo relatou que a acetilação da lisina 5 na histona H4 (H4K5ac) parece ser alterada dramaticamente durante o desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vitro*, mas permanece constantemente elevada em embriões bovinos produzidos por TNCS (Kang et al., 2002). Estas alterações poderiam contribuir para a explicação a respeito da expressão alterada de genes vitais ao desenvolvimento. Células bovinas cultivadas também apresentam padrão epigenético alterado, como a elevação da metilação de histonas (H3K9me2) e da acetilação de H3K9 no trofotoderma (Enright et al., 2003; Santos et al., 2003).

A trimetilação de H3K4 está associada com situações críticas, tais como a diferenciação e ativação do genoma embrionário e isto foi demonstrado em suínos (Gao et al., 2010), humanos (Zhang et al., 2012) e bovinos (Ross et al., 2008).

Foram observadas diferenças nos padrões globais de H3K27 durante o desenvolvimento do embrião. A acetilação da H3K27 foi identificada na fase de VG e MII em oócitos, assim como em embriões nos estágios de 2 e 4 células. Houve marcada redução desta marca no estádio de 8 células, voltando a ser observada em blastocistos de suínos produzidos *in vitro*. H3K27 mono-, di- e trimetilada foram identificadas nas fases de VG, MII e em um dos pró-núcleos (PN), porém não foram identificadas em embriões em estágios de 2, 4 e 8 células, voltando a ser observada em blastocistos de suínos produzidos *in vitro* (Marinho et al., 2015a).

Marinho et al. (2015b) utilizaram um inibidor da trimetilação da H3K27 (DZNep - degrada a proteína PRC2), durante a cultivo de embriões bovinos *in vitro* por 3 a 8 dias. Os autores observaram diminuição da taxa de blastocistos, do número de células e atraso do desenvolvimento embrionário. Tais resultados demonstram a importância de PRC2 e H3K27me3 no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

Lepikhov et al. (2008) observaram grande desmetilação do DNA em pró-núcleo paterno durante a maturação pronuclear de coelhos. Os mesmos autores, observaram que a dinâmica das modificações da cromatina são conservadas em zigotos de camundongos, bovinos e coelhos.

Souza-Cáceres et al. (2016), observaram alta intensidade de H3K4me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo*, sendo esta maior em mórula do que em blastocisto. Acredita-se que essa marca epigenética esteja relacionada com o fenômeno de compactação dos blastômeros e preparação para a diferenciação celular. Esse resultado corrobora com a maior expressão gênica observada em mórulas em relação a blastocistos bovinos produzidos *in vivo* (Jiang et al., 2014).

Já foi demonstrado que o padrão da H3K4me3 não varia em função da utilização de sêmen sexado e o processo de criopreservação lenta tradicional, demonstrando que os embriões que sobreviveram ao estresse dessas técnicas mantiveram o padrão de metilação esperado (Souza-Cáceres et al., 2016). Por outro lado, Maldonado et al. (2015) observaram que blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e submetidos a congelamento lento apresentam uma redução nos níveis de H3K4me3 e um aumento nos níveis de H3K27me3 quando comparados aos embriões frescos. A diferença do estado de metilação da H3K4 entre embriões bovinos



produzidos *in vivo* (Souza-Cáceres et al., 2016) e *in vitro* submetidos a criopreservação (Maldonado et al., 2015), nos permite especular que o cultivo de embriões *in vitro* altere a conformação da cromatina, mediada por alteração das histonas e isso pode estar relacionado com as diferenças entre a criotolerância desses embriões. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser estudada.

Considerações Finais

Eventos importantes da oogênese e do desenvolvimento embrionário pré-implantacional são mediados pela metilação de histonas. Essa importância é revelada pelo comportamento dinâmico da transcrição gênica nas diferentes etapas de desenvolvimento oocitário e embrionário, as quais exigem uma modulação também dinâmica da cromatina. Novos estudos são necessários para esclarecer melhor como as modificações nas caudas terminais das histonas, podem afetar o desenvolvimento embrionário, e também sobre a possibilidade de manipular tais variações, de forma a melhorar a eficiência das biotecnologias da reprodução de mamíferos.

Agradecimentos

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS) pela Bolsa concedida.

Referências

- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros MLE. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor, 2007. 502p.
- Andreu-Vieyra CV, Chen R., Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF, Matzuk MM. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *Plos Biol*, DOI: 10.1371/journal.pbio.1000453, 2010.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, v.21, n.3, p.381-395, 2011.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, v.7, p.396-398, 2007.
- Bottomley MJ. Structures of protein domains that create or recognize histones modifications. *EMBO Rep*, v.5, p.464-469, 2004.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod*, v.60, p.580-587, 1999.
- Bressan FF, De Bem THC, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV, Miglino MA. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta*, v.30, p.823-834, 2009.
- Brown TA. Genética: um enfoque molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 1999. 336 p.
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev*, v.20, p.1744-1754, 2006.
- Chen H, Zhang L, Deng T, Zou P, Wang Y, Quan F, Zhang Y. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology*, v.86, p.868-878, 2016.
- Ciccone DN, Chen T. Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics*, v.4, p.216-220, 2009.
- Costa EBO, Pacheco C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.34, n.2, p.125-136, 2013.
- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality. *Ann N Y Acad Sci*, v.1034, p.132-44, 2004.
- Crozet N. Nuclear structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. *Reprod Fertil Suppl*, v.38, p.9-16, 1989.
- 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.
- Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Grousse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev*, v.36, p.59-74, 1993.
- Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev*, v.14, p.188-195, 2004.
- Eissenberg JC, Shilatfard A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*, v.339, p.240-249, 2010.
- Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: Levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, v.69, n.5, p.1525-30, 2003.
- Fair T, Carter F, Park S, Evans ACO, Lonergan P. Global genes expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Theriogenology*, v.68, p.91-97, 2007.



- Ferreira AR, Franco MM.** Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, n.1, p.3-9, 2012.
- Gao Y, Hyttel P, Hall VJ.** Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.540-549, 2010.
- Gaspar RC, Arnold DR, Corrêa CAP, Rocha Jr CV, Penteado JCT, Collado M, Vantini R, Garcia JM, Lopes FL.** Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro-produced embryos in a bovine model. *Theriogenology*, v.83, p.1408-1415, 2015.
- Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E.** Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*, v.111, n.11, p.4139-4144, 2014.
- Griffiths AJF.** Introdução à genética. 6. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856p.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN.** The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, v.10, p.32-42, 2009.
- Heras S, Vandenberghe L, Soom AV.** Determination of the parental pronuclear origin in bovine zygotes: H3K9me3 versus H3K27me2-3. *Anal Biochem*, v.510, p.76-78, 2016.
- Huang JC, Lei ZL, Shi LH, Miao YL, Yang JW, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY.** Comparison of histone modifications in in vivo and in vitro fertilization mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, v.354, p.77-83, 2007.
- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS.** Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res*, v.647, p.77-85, 2008.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE.** Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, v.416, p.556-560, 2002.
- Jeppesen P, Turner B.** The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, v.74, p.281-289, 1993.
- Jiang Z, Sun J, Dong H, Luo O, Zheng X, Oberfell C, Tang Y, Bi J, O'neil R, Ruan Y, Chen J, Tian X.** Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics*, v.15, p.756, 2014.
- Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F.** Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85-94, 2007.
- Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM.** Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J*, v.21, n.5, p.1092-100, 2002.
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S.** Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*, v.66, n.4, p.596-612, 2009.
- Kronenberg MF, Menzel HJ, Ebersbach G, Wenning GK, Luginer E, Gollner M, Ransmayr G, Utermann G, Poewe W, Kronenberg F.** Dopamine D4 receptor polymorphism and idiopathic Parkinson's disease. *Nature*, v. 7, p.397-400. 1999.
- Labrecque R, Lodde V, Dieci C, Tessaro I, Luciano AM, Sirard MA.** Chromatin Remodelling and Histone mRNA Accumulation in Bovine Germinal Vesicle Oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.82, p.450-462, 2015.
- Lepikhov K, Zakhartchenko V, Hao R, Yang F, Wrenzycki C, Niemann H, Wolf E, Walter J.** Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin*, p.1-8, 2008.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, v.3, p.662-673, 2002.
- Maalouf WE, Alberio R, Campbell KH.** 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.
- Maldonado MBC, Penteado JCT, Faccio BMC, Lopes FL, Arnold DR.** Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. *Cryobiology*, v.71, p.481-485, 2015.
- Marinho LSR, Rissi VB, Seneda MM, Bordignon V.** Acetylation and methylation profiles of H3K27 during IVP porcine embryo development. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Ciência Animal, Londrina, PR, 147p, 2015a.
- Marinho LSR, Rissi VB, Seneda MM, Bordignon V.** Pharmacological disruption of H3K27 trimethylation by DZNepalters mRNA expression of Polycomb enzymes and impairs development of IVP bovine embryos. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Ciência Animal, Londrina, PR, 147p, 2015b.
- Martucci MF, Bressan FF, Sangalli JR, Silveira JC, Meirelles FV, Smith LC, Perecin F.** Impactos das técnicas reprodutivas no controle epigenético de genes imprintados. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, n.2, p.255-262, 2015.
- Mattson BA, Albertini DF.** Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev*, v.25, p.374-383, 1990.
- Mellor, J.** Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics*, v.22, p.320-329, 2006.
- Memili E, First NL.** Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with other species. *Zygote*, v.8, p.87-96, 2000.



- Misteli T.** Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, v.128, p.787-800, 2007.
- Murata K, Kouzarides T, Bannister AJ, Gurdon JB.** Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin*, v.3, n.4, 2010.
- Niakan KK, Eggan K.** Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Devel Biol*, v.375, n.1, p.54-64, 2013.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, v.303, p.644-649, 2004
- Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H.** Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.738-48, 2009.
- Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, et al.** Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*, v.136, p.777-785, 2008.
- Salha O, Abusheika N, Sharma V.** Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Hum Reprod Update*, v.4, p.816-832, 1998.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W.** Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology*, v.13, p.1116-1121, 2003.
- Sasaki H, Ishihara K, Kato R.** Mechanisms of Igf2/H19 imprinting: DNA methylation, chromatin and longdistance gene regulation. *J Biochem*, v.127, p.711-715, 2000.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G.** Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*, v.128, p.735-745, 2007.
- Schultz RM.** The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*, v.8, p.323-331, 2002.
- Seneda MM, Bordignon V.** Novos conceitos em foliculogênese. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.857-868, 2007.
- Shi Y.** Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet*, v.8, p.829-833, 2007.
- Souza-Cáceres MB, Silva WAL, Lima ACB, Oliveira Junior JS, Cardoso CJT, Santos JV, Andrade ER, Franco MM, Poehland R, Melo-Sterza FA.** Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in vivo with sexed semen. *Theriogenology*, v.86, p.1944-1952, 2016.
- Strahl B, Allis CD.** The language of covalent histone modification. *Nature*, v.403, p.41-45, 2000.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM.** Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet*, v.26, p.267-268, 2000.
- Waggoner, D.** Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol*, v.14, p.7-14, 2007.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney M.J.** Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, v.7, n.8, p.847-854, 2004.
- Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL.** Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer J*, v.13, n.1, p.9-16, 2007.
- Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF.** Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol*, v.143, p.162-172, 1991.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H.** Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v.68S, p.77-83, 2007.
- Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, Wang R, Li WY.** Differences in H3K4 trimethylation in in vivo and in vitro fertilization mouse preimplantation embryos. *Genet Mol Res*, v.11, n.2, p.1099-1108, 2012.
- Zhang A, Xu B, Sun Y, et al.** Dynamic changes of histone H3 trimethylated at positions K4 and K27 in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril*, v.98, p.1009-1016, 2012.
- Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA.** Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.479-485, 1995.
-