



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA  
COMPETÊNCIA DURANTE O CRESCIMENTO OVOCITÁRIO EM BOVINOS**

**ISABELA REBOUÇAS BESSA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**MAIO DE 2011**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA  
COMPETÊNCIA DURANTE O CRESCIMENTO OVOCITÁRIO EM BOVINOS**

**Isabela Rebouças Bessa**

**Orientadora: Margot Alves Nunes Dode**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Animais**

**PUBLICAÇÃO 46/2011**

**BRASÍLIA/DF**  
**MAIO DE 2011**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BESSA I.R. **Perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 71p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

BESSA, Isabela Rebouças. **Perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 71p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1. Folículos. 2. Ovócitos. 3. Pré-antrais. 4. Expressão gênica

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA  
COMPETÊNCIA DURANTE O CRESCIMENTO OVOCITÁRIO EM BOVINOS**

**ISABELA REBOUÇAS BESSA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E  
BIOTECNOLOGIA)  
(ORIENTADOR)**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)**

---

**CARLOS FREDERICO MARTINS, Doutorado (EMBRAPA CERRADOS)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 27 de MAIO de 2011**

Porque a vida é feita de detalhes, porque não conseguimos controlar o inevitável, porque nunca sabemos quando aquela despedida rotineira é de fato um adeus. Pelas lembranças maravilhosas, pelo abraço mais aconchegante, pelo conselho mais oportuno, pela saudade apertada e gostosa. Ao meu eterno amigo Murilo (*in memoriam*), pelo sorriso contagiante, pelos sonhos divididos, pela receptividade calorosa, por tornar os almoços da Embrapa um evento ansiosamente esperado, por cada minuto de sua curta e inesquecível existência que foi dividida ao meu lado, DEDICO...

“... Ser feliz é encontrar esperança nas batalhas. É reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise, é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. É ter maturidade para falar "eu errei". É ter ousadia para dizer "me perdoe". É ter sensibilidade para expressar "eu preciso de você". Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário. *Pedras no caminho? Guardo todas... Um dia vou construir um castelo!*”

***Fernando Pessoa***

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelos sábios conselhos, pelo telefonema mais oportuno, por fazer da sua história e caráter, meu objetivo de vida. E ao meu pai, pela confiança depositada em mim, por me fazer ter a certeza de que heróis existem e são pessoas comuns, que choram, lutam e amam com a mesma intensidade, que estão ao meu lado incondicionalmente, eu amo vocês.

Ao meu irmão, pela confiança, pelas conversas divertidas e agradáveis, por ter me dado dois sobrinhos tão lindos e especiais, eu te amo.

Aos meus amigos Anna Carolina, Brisa, Allice, Murilo, Sidney e Thaís, pelo companheirismo, pelas ajudas concedidas, pelo simples fato de existirem.

À minha orientadora Margot, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela orientação impecável, pelas horas dedicadas a mim, pelo exemplo de profissional que é. Exemplo de caráter, justiça e ética, meu muito obrigada.

Ao pesquisador Maurício Machaim Franco, pelos ensinamentos no laboratório, pela ajuda concedida, por conseguir ser otimista em períodos de crise, obrigada.

Aos colegas de laboratório, Ana Luíza, Fernanda Rodrigues, Fernanda Paulini, José Carvalho, José Felipe, Juliana Azevedo, Karollyne, Pablo Rua, Rosana Nishimura, Thiago Braga Valquíria Lacerda, que hoje posso chamar de amigos e que direta ou indiretamente foram essenciais para conclusão do meu experimento.

Agradeço em especial ao Dr. Carlos Frederico e a Dra. Carol Lucci por fazerem parte da banca, e pelas correções e sugestões que engrandeceram este trabalho.

Aos funcionários da EMBRAPA pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e CAPES pelo suporte e pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Animais (UnB)

Agradeço à Universidade de Brasília pelo curso oferecido.



## ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVOS	03
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 DESENVOLVIMENTO OVOCITÁRIO E FOLICULAR	04
2.1.1 OVOGÊNESE	04
2.1.2 FOLICULOGÊNESE	05
2.2 MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA	07
2.3 GENES SELECIONADOS	09
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2	30
1 RESUMO	31
2 ABSTRACT	33
3 INTRODUÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 ISOLAMENTO DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	38
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO DIÂMETRO DOS OVÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM FÊMEAS NELORE	40
4.3 RECUPERAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE OVÓCITOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS E ANTRAIS	42
4.4 ARMAZENAMENTO DOS OVÓCITOS	44
4.5 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	45
4.6 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	45
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	48
5.1 RESULTADOS	48
5.2 DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>		
Figura 2.1.	Manipulação do ovário para obtenção da córtex com auxílio de bisturi.	39
Figura 2.2.	Fragmentos de córtex ovariana triturados com o auxílio do Tissue Chopper para isolamento dos folículos pré-antrais.	39
Figura 2.3.	Massa ovariana obtida após o uso do Tissue Chopper	40
Figura 2.4.	Folículo primordial (A); Folículo primário (B); Folículo secundário inicial (C); Folículo secundário final (D).	41
Figura 2.5.	Solução filtrada contendo os ovócitos com colagenase.	43
Figura 2.6.	Ovócitos isolados, lavados, medidos, separados por categoria em um microscópio invertido (20x) e prontos para o congelamento. Ovócitos de folículos primordiais (A), folículos primários (B), secundário inicial (C), secundário final (D), antral inicial (E), antral final (F).	44
Figura 2.7.	Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. $E_{alvo}$ é a eficiência do gene alvo; $E_{ref}$ é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo <i>threshold</i> ; $\Delta CP_{alvo}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo; $\Delta CP_{ref}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene referência.	47
Figura 2.8.	Nível de transcritos dos genes OOSP1, BMP-15, SLBP e H1FOO analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35 $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60 $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85 $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120 $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> . Cada grupo foi	50

analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência.

Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).

- Figura 2.9. Nível de transcritos dos genes *H2A*, *H3A* e *H4* analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência. Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ). 51
- Figura 2.10 Nível de transcritos dos genes *DNMT1*, *DNMT3B* e *SUV39H1* analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência. Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ). 52
- Figura 2.11 Nível de transcritos dos genes *HAT1* e *HDAC2* analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da 53

eficiência.

Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).

Figura 2.12 **Figura 2.12.** Soma da quantidade relativa de RNAm de todos os genes analisados (HIFOO, H2A, H3A, H4, SLBP, OOSP1, DNMT1, DNMT3B, HAT1, HDAC2, SUV39H1 e BMP-15) em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>		
Tabela 2.1.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento.	46
Tabela 2.2.	Caracterização do diâmetro de folículos e ovócitos pré-antrais de fêmeas Nelore	48

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações**

**PIV** – Produção *in vitro*

**H1** – Histona H1

**H1FOO** – Histona H1 específica do ovócito

**H2A** – Histona H2A

**H2B** – Histona H2B

**H3A** – Histona H3A

**H4** – Histona H4

**SLBP** – *Stem-loop binding protein*

**BMP-15** – Proteína Morfogênica Óssea 15

**OOSP1** – Proteína secretada pelo ovócito 1

**DNMT1** – DNA metiltransferase 1

**DNMT3A** – DNA metiltransferase 3A

**HAT1** – Histona acetiltransferase 1

**HDAC2** – Histona deacetilase 2

**SUV39H1** – Histona metiltransferase *suppressor of variegation 3-9 homologue1*

**EHMT** – Histona metiltransferase *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase*

**VG** – Vesícula Germinativa

**ZP** – Zona Pelúcida

**FSH** – Hormônio folículo estimulante

**LH** – Hormônio luteinizante

**VGBD** – Quebra da vesícula germinativa

**MI** – Metáfase I

**MII** – Metáfase II

**K9** – Lisina 9

**TCM** – *Tissue culture medium*

**SFB** – Soro fetal bovino

**BSA** – Albumina sérica bovina

**PBS** – Solução salina em tampão fosfato

**µm** – Micrômetro

**mRNA** – RNA mensageiro

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

## RESUMO

### **PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA DURANTE O CRESCIMENTO OVOCITÁRIO EM BOVINOS**

Isabela Rebouças Bessa<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O objetivo do presente estudo foi estudar o perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos utilizando ovócitos de diferentes tamanhos provenientes de várias categorias de folículos. Os genes candidatos foram selecionados por estarem possivelmente envolvidos com a aquisição da competência (BMP15, OOSP1, H1FOO, H2A, H3A, H4, SLBP, DNMT1, DNMT3B, HAT, HDAC e SUV39H1). Para determinar o tamanho dos ovócitos a serem utilizados, foi realizado um pré-experimento, em que os folículos pré-antrais foram classificados morfolologicamente, agrupados em diferentes categorias em primordial, primário, secundário inicial e secundário final. Após a classificação, os ovócitos de cada folículo foram individualmente isolados e medidos. Folículos pré-antrais e antrais foram isolados de ovários de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), por dissociação mecânica utilizando o *Tissue Chopper*. Para o isolamento dos ovócitos, os folículos foram expostos à colagenase tipo II (0,5 mg/ml) e então submetidos a sucessivas pipetagens. Os ovócitos foram medidos através do programa Motic images Plus 2.0 e classificados de acordo com seu diâmetro nas seguintes categorias: 1) ovócitos de folículos primordiais: diâmetro de até 20 µm; 2) ovócitos de folículos primários: 25 a 35 µm; 3) ovócitos de folículos secundários iniciais: 40 a 60 µm e 4) ovócitos de folículos secundários finais; 65 a 85 µm. Para a obtenção dos ovócitos oriundos de folículos antrais incompetentes e competentes, foram utilizadas as medidas de 100 a 120 µm e acima de 128 µm respectivamente. O RNA total foi extraído de 4 *pools* de 25 ovócitos, de cada categoria de folículo, e os transcritos dos genes foram quantificados por qPCR. Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo CYC A. Os resultados foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal Wallis, para

comparar os tamanhos de folículos e ovócitos e avaliar o efeito do tamanho do ovócito na quantidade de expressão gênica. O nível de significância considerado foi  $P < 0,05$ . Os resultados mostraram que os transcritos da H2A, H3, H4 e SUV39H1 não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de ovócitos de folículos antrais e pré-antrais. A expressão da OOSP1, SLBP, BMP15, H1FOO, DNMT1, DNMT3B e HAT foram menores ( $P < 0,05$ ) em ovócitos pré-antrais quando comparados com os de folículos antrais. A H3A foi o único gene em que foi detectado a expressão de RNAm em ovócito de folículo primordial. De todos os genes estudados, apenas a HDAC apresentou diferença significativa entre ovócitos de folículos antrais competentes e incompetentes. Os resultados sugerem que o acúmulo dos estoques dos genes analisados ocorre antes do estágio final da folículogênese e provavelmente não são marcadores para a competência. A HDAC foi o único gene que pode estar relacionado à competência do ovócito, pois mostrou uma diminuição ( $P < 0,05$ ) no nível de transcrito nos grupos de ovócitos competentes quando comparados com o grupo de antrais iniciais (1a 3mm).

Palavras chave: 1. Folículos. 2. Ovócitos. 3. Pré-antrais. 4. Expressão gênica



**ABSTRACT****EXPRESSION PROFILE OF CANDIDATES GENES FOR THE ACQUISITION OF COMPETENCE DURING OOCYTE GROWTH IN BOVINE**

Isabela Rebouças Bessa<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, <sup>2</sup> Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

The aim of this present study was investigate the expression profile of candidates genes for the acquisition of competence during oocyte growth in bovine using oocytes from different sizes obtained from several follicle categories. The candidate genes were selected to be possibly involved in competence (BMP15, OOSP1, H1FOO, H2A, H3A, H4, SLBP, DNMT1, DNMT3B, HAT, HDAC e SUV39H1). A pre-experiment was conducted to classify the follicles according to their categories in primordial, primary, small secondary and final secondary follicles. Then the oocytes were individually isolated and measured. Preantral and antral follicles were isolated from ovaries of Nelore (*Bos taurus indicus*) cows by mechanical dissociation using a *Tissue Chopper*. To isolate the oocytes, follicles were exposed to collagenase type II solution (0.5 mg/ml) and then submitted to successive pipetting. The oocytes were measured with Motic Images Plus 2.0 program and classified according to their diameter into the following categories: 1) oocytes from primordial follicle: diameter < 20 µm; 2) oocytes from primary follicles: 25 to 35 µm; 3) oocytes from small secondary follicles: 40 to 60 µm; 4) oocytes from final secondary follicles: 65 to 85 µm; 5) oocytes from early antral follicles: 100 to 120 µm; and 6) oocytes from final antral follicles: > 128 µm. Total RNA was extracted from 4 pools of 25 oocytes from each category of follicles using Rneasy Plus® kit, subjected to reverse transcription reaction and genes quantified by qPCR. Target gene expression was normalized using CYC A. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test for values which were not normally distributed. Level of significance was considered P<0.05. The results show that the transcripts of H2A, H3A, H4 e SUV39H1 did not differ significantly between groups, showing the same pattern from preantral to antral follicles. For OOSP1, SLBP, BMP-15, H1FOO, DNMT1, DNMT3B and HAT, the pattern of expression

was lower in oocytes from preantral follicles when compared to antral follicles. The H3A was the only gene in which expression was detected in oocytes from primordial follicles. From all the studied genes, only HDAC differed significantly between incompetent and competent oocytes. These results suggest that the stocks of transcripts of the studied genes are accumulated before the final phase of folliculogenesis. The HDAC was the only gene in which expression could be related to oocyte competence since it showed a decrease ( $P < 0.05$ ) in transcript levels from final antral oocytes (competent) compared to small antral group.

Keywords: 1. Follicles. 2. Oocytes. 3. Preantral. 4. Gene expression

## **CAPÍTULO 1**

## 1 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 & 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, esses precisam ser maturados *in vitro* e serem capazes de sofrer todos os eventos necessários para que a maturação ocorra com sucesso. Esses eventos envolvem não apenas a dinâmica correta da divisão cromossômica, mas também vários outros processos que ocorrem no citoplasma, tais como a redistribuição das organelas citoplasmáticas e a presença de estoque de RNAm e proteínas (Revisado por Ferreira et al., 2009).

Ovócitos que não adquirem a competência não completam a maturação citoplasmática e são, portanto, de qualidade inferior e incapazes de continuar o processo de desenvolvimento. A competência do ovócito é adquirida gradativamente durante a ovogênese e se refere à sua capacidade de ser fecundado e de formar um embrião viável (Lequarre et al., 2005; Mourot et al., 2006).

Existe um consenso de que a competência está relacionada à quantidade de RNAm que foi estocada durante o crescimento do ovócito e na fase final da folículo gênese. Apesar da

expressão diferencial de vários genes ter sido relacionada com a competência do ovócito em bovinos (Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Racedo et al., 2008; Caixeta et al., 2009), os mecanismos celulares envolvidos na aquisição dessa competência, assim como as características moleculares dos ovócitos competentes ainda não são conhecidos.

Considerando-se que os estoques de RNAm requeridos para o desenvolvimento posterior são acumulados durante o crescimento do ovócito e, que ovócitos incompetentes não atingem o estoque completo de RNAs, pode-se supor que o acúmulo de transcritos é ponto chave para a aquisição da competência (Chohan & Hunter, 2004; Racedo et al., 2008). Portanto, uma das alternativas para se estudar competência é caracterizar como ocorre a formação desses estoques e em que fase da ovogênese e folículogênese estes se completam. Essa caracterização molecular é importante porque fornece informações relevantes das principais mudanças relacionadas à aquisição da competência (Mourot et al., 2006).

Esse conhecimento contribuirá na identificação de alterações necessárias para melhorar o sistema *in vitro*, aumentando a disponibilidade de ovócitos mais competentes e melhorando os resultados e a qualidade dos embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e quantificar o padrão de expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o diâmetro folicular e ovocitário em diferentes classes de folículos pré-antrais (primordial, primário e secundário) oriundos de ovários de fêmeas Nelore.
  
- b) Quantificar a expressão dos genes histona H1 específica do ovócito (H1FOO), histona H2A (H2A), histona H3A (H3A), histona H4 (H4), *stem-loop binding protein* (SLBP), proteína morfogênica óssea 15 (BMP15), proteína secretada pelo ovócito 1 (OOSP1), DNA metiltransferase 1 (DNMT1), DNA metiltransferase 3b (DNMT3b) histona acetiltransferase (HAT1), histona desacetilase 2 (HDAC2), histona metiltransferase *suppressor of variegation 3-9 homologue 1* (SUV39H1) em ovócitos imaturos em diferentes fases de crescimento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento Ovocitário e Folicular

#### 2.1.1 Ovogênese

A ovogênese consiste na formação e na diferenciação das células germinativas primordiais até a formação do ovócito haplóide fecundado. Ao contrário do que acontece com a espermatogênese em que os espermatozóides 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 da ovogênese se iniciar antes do nascimento, somente alguns ovócitos conseguem completar este 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 e quando chegam aos cordões sexuais primários são chamados de ovogônias (Sadeu et al., 2006). Uma vez formadas, as ovogônias entram em meiose e diferenciam-se em ovócitos primários (Aerts & 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 & 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. Ao atingir o estágio de metáfase II, ocorre a segunda interrupção da meiose (Lonergan et al., 1994), sendo que o ovócito permanece assim

até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a segunda divisão meiótica e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o ovócito haplóide fecundado (Chohan & Hunter, 2004).

Durante todo o período de desenvolvimento folicular, o ovócito permanece retido no estágio de diplóteno da prófase I, no entanto seu crescimento continua, indicando um período de intensa atividade metabólica. Durante esse período, o ovócito bovino cresce em média, de 20  $\mu\text{m}$  no folículo primordial (Lucci et al., 2002), até 128  $\mu\text{m}$  no folículo antral tardio (Caixeta et al., 2009). Ocorrem também, mudanças ultraestruturais no ovócito incluindo o surgimento de novas organelas, alterações no complexo de Golgi, surgimento da zona pelúcida, entre outros (Haper, 1994).

### **2.1.2 Folículogênese**

A folículogênese 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 & Zhao, 2005).

O folículo é a unidade básica e funcional do ovário, fornecendo o microambiente necessário para o crescimento e 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 & Rodgers., 1996).

Durante o processo de folículogênese, ocorre o crescimento do folículo pré-antral, que corresponde à transição de folículo primordial para primário, a formação e crescimento de folículos secundários, logo em seguida há o crescimento basal de folículo antral com a formação do antro e desenvolvimento de folículos antrais iniciais até o estágio em que são dependentes de gonadotrofinas, e, finalmente o crescimento de folículos antrais finais, que envolve o desenvolvimento de folículos antrais pré-ovulatórios (Silva et al. 2003). Portanto, os folículos presentes no córtex ovariano se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento ou regressão.

Do total dos folículos presentes no ovário cerca de 95% são pré-antrais, (Rossetto et al., 2009), sendo que a maioria desses não são utilizados 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, 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 cubóides. 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 produzir ribossomos e conseqüentemente são maiores durante o crescimento celular, período em que ocorre a formação de grande quantidade de proteínas. O tamanho de um folículo e seu ovócito pode apresentar enorme variação. Segundo alguns autores, os folículos primordiais em bovinos apresentam em média 40  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi, 1997; Lucci et al., 2002) e seus ovócitos podendo variar entre 20 e 35  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi., 1997; Lucci et al., 2002).

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 cubóide. O tamanho do folículo primário pode variar entre 35 a 80  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi., 1997; Lucci et al., 2002), e seu ovócito de 25 a 45  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi., 1997; Lucci et al., 2002). 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 cubóides apresentando a cromatina mais condensada. Esses podem ser classificados em folículos pequenos e grandes (Kacinskis et al., 2005). Folículos secundários pequenos ou iniciais são menos desenvolvidos, é nesse estágio em 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. O tamanho do folículo secundário inicial pode variar de 70 a 130  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi., 1997; Lucci et al., 2002), com o ovócito apresentando em média 45  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Lucci et al., 2002) Já o tamanho do folículo secundário final varia em média de 130 a 250  $\mu\text{m}$ , e seus ovócitos apresentando diâmetro médio de 70  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal & Yossefi., 1997).

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 esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (Barnett et al., 2006). O diâmetro final observado em folículos antrais em bovinos foi de 10 a 12mm em *Bos taurus indicus*, e 16 a 20 em *Bos taurus taurus*, correspondente ao folículo dominante pré-ovulatório (Carvalho et al., 2008).

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 folículo estimulante (FSH). Neste momento os folículos medem entre 1 a 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 resultando no crescimento final do folículo pré-ovulatório com uma subsequente liberação do ovócito maturo na ovulação (Ginther et al., 2003).

## **2.2 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, se desenvolver 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 & Zhao, 2005). A maturação ovocitária

compreende a maturação nuclear e maturação citoplasmática, as quais envolvem mudanças morfológicas e bioquímicas (Mermillod et al., 2000; Meirelles et al. 2001).

Os eventos nucleares envolvem a 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 & 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. Observa-se uma mudança na atividade da proteína quinase, desenvolvimento dos mecanismos de liberação de  $Ca^{++}$  e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozóide (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 a transcrição, armazenamento e processamento de RNAs, que estão envolvidos tanto na maturação como nos subseqüentes eventos celulares como a 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 embriogênese inicial. Desta forma, uma apropriada quantidade de ribossomos deve estar presente durante a maturação, sendo que estes são sintetizados através da transcrição de genes de RNA ribossomais (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 RNAs.

Os altos níveis de síntese proteica observadas 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 desse parâmetro por si só não garantir a total capacidade de desenvolvimento, tem sido utilizado por vários autores para estudos de competência (Caixeta et al., 2009; Nowak-imialek et al., 2008; Racedo et al., 2009; Lodde 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 tem 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 folículos primordial até o estágio antral tardio, nos proporcionaria informações relevantes para o processo de maturação e competência ovocitária.

### **2.3 Genes Selecionados**

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). Esta síntese vai diminuindo durante o crescimento folicular e ovocitário (De La Fuente & Eppig, 2001), de forma que no momento da ovulação, o ovócito do folículo pré-ovulatório, basicamente deixa de transcrever. 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 8 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). Portanto, a capacidade de um ovócito de formar um embrião e se desenvolver a termo é o resultado de um crescimento adequado e uma correta maturação nuclear e citoplasmática.

Estudos relacionando a expressão diferencial de genes com diferentes competências em ovócitos provenientes de vários tamanhos de folículos, demonstraram que o RNAm da H2A aumentou gradualmente a partir de folículos de 5,0 mm, sendo maior nos folículos acima de 8,0 mm (Mourot et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Esses resultados sugerem que altos níveis da H2A contribuem para um maior potencial de desenvolvimento. Quando o

modelo do momento da clivagem foi utilizado para estudar competência, também foi observado que a H2A (Dode et al., 2006) e H3A (Fair et al., 2004) eram mais expressas em embriões que clivaram mais cedo, os quais eram oriundos de ovócitos mais competentes.

Em todas as células eucarióticas, o DNA é parcialmente compactado no núcleo através dos nucleossomos. O nucleossomo consiste em 146 pares de bases de DNA amarrados em um octâmero de proteínas histonas (H2A; H2B, H3 e H4) e a histona H1, que se une ao exterior do octâmero para estabilizar as fitas de DNA, sendo a unidade básica da cromatina (Furuya et al., 2007). A interação entre o DNA e as histonas, o nucleossoma e a cauda das histonas são responsáveis por influenciar a expressão ou repressão da transcrição (Allard et al., 2005).

Em células somáticas, os níveis de RNAm de histonas estão altamente relacionados com a replicação do DNA, pois essas não têm capacidade de estocar RNA. Enquanto os ovócitos estocam as histonas na forma de RNAm e de proteínas, para serem utilizadas no desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006). Portanto, o embrião no início do desenvolvimento deve conter quantidades suficientes de estoque de histonas para sustentar as replicações iniciais até que ocorra a transição materno-zigótica e o embrião se torne transcricionalmente ativo.

A *Stem-Loop Binding Protein* (SLBP) é uma proteína ligadora de RNA que tem um papel central na ativação, estabilização e tradução de RNAm de histonas durante a maturação ovocitária e após a fecundação. A SLBP está presente em ovócitos imaturos, só que em níveis mais baixos do que em ovócitos maduros (Allard et al., 2002). Em camundongos, ela exerce sua função biológica através de sua ligação na região *stem-loop* dos RNAm das histonas e controla a disponibilidade das histonas necessárias para o reempacotamento da cromatina do espermatozóide (Donnison & Pfeffer., 2004). Em bovinos, em um estudo realizado por Caixeta e colaboradores (2009) não foi encontrada uma diferença na expressão da SLBP em ovócitos provenientes de diferentes tamanhos de folículos. Esses resultados diferem dos obtidos por Donnison e Pfeffer (2004) em que maiores níveis de expressão da SBLP foram observados em ovócitos competentes do que nos incompetentes. É possível que o mecanismo de estoque das várias histonas seja diferente entre elas, pois a deficiência no acúmulo de SLBP durante a ovogênese foi associada à queda da fertilidade. De acordo com Arnold e colaboradores (2008) a manipulação da quantidade de SLBP em ovócitos afetou o acúmulo de RNAm das histonas H3 e H4, mas não das histonas H2A e H2B.

A histona específica do ovócito (H1FOO) foi identificada em ovócitos bovinos no núcleo, no estágio de vesícula germinativa, na cromatina durante o estágio de metáfase II (MII) e no primeiro corpúsculo polar (McGraw et al., 2006). Após a fecundação, a H1FOO

também foi encontrada na cabeça do espermatozóide e no segundo corpúsculo polar (Teranishi et al., 2004). Uma vez que o espermatozóide penetra no ovócito, a protamina que esta ligada na cromatina da cabeça deve ser substituída por histonas maternas, especialmente pela H1FOO (Maeda et al., 2008). Essa proteína, portanto, parece ter fundamental importância na substituição das protaminas por histonas após a fecundação. Em camundongos, sua expressão é reduzida no estágio de embrião de 2 células e desaparece em 4 células (Furuya et al., 2007). Em bovinos ainda é detectada no estágio de 8 a 16 células, porém, pouco expressa (Fair et al., 2004). Em camundongos, os transcritos da H1FOO aparecem em ovócitos de folículos primordiais, e aumentam em ovócitos de folículos primários e secundários, sendo que esses resultados sugerem que a expressão dessa proteína pode estar associada ao processo de ativação do folículo primordial (Tanaka et al., 2005). Confirmando esses resultados, Mizusawa et al. (2010) mostraram por imunohistoquímica a expressão da proteína H1FOO em ovócitos humanos durante toda a ovogênese, incluindo aqueles de folículos primordiais. Portanto, parece que a sua expressão ocorre durante o crescimento e maturação do ovócito e no desenvolvimento embrionário inicial (McGraw et al., 2006).

Produtos de vários genes específicos do ovócito são conhecidos por realizarem importantes funções durante a folículogênese, e afeta o desenvolvimento e a função das células foliculares. Fatores intraovarianos secretados pelo ovócito como a Proteína morfogênica do osso 15 (BMP15) controlam a folículogênese, através da proliferação, diferenciação e expansão do cumulus (Su et al., 2008), no crescimento folicular, na taxa de ovulação e na fertilidade em mamíferos (Zhu et al., 2008). Em camundongos, a BMP-15 é expressa desde o folículo primário até folículos antrais (Sanchez et al., 2009). Em bovinos, a expressão do gene BMP-15 não foi afetada pelo tamanho do folículo antral, momento da clivagem ou condição de maturação, apresentando uma expressão similar em ovócitos com diferentes competências (Mourot et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Portanto, apesar de ser um gene importante, parece não estar diretamente relacionado com a aquisição do potencial de desenvolvimento, quando ovócitos de folículos antrais são utilizados.

Além da BMP-15, que já foi bem caracterizada, outras proteínas secretadas pelo ovócito têm sido identificadas (Hussein et al., 2005). Dentre essas, a proteína secretada pelo ovócito 1 (OOSP1), foi detectada em ovócitos de camundongo e de bovinos, sendo que a sua função ainda não é bem conhecida (Yan et al., 2001). O RNAm da OOSP1 em camundongos está presente em níveis elevados nos ovócitos de ovários de adultos e em níveis mais baixos no baço e fígado (Yan et al., 2001). Foi observado que os níveis de RNAm em ovócitos de

camundongos, foram mais elevados no estágio de vesícula germinativa (VG) e sua expressão diminui gradualmente até desaparecer no estágio de 4 células, reaparecendo posteriormente no estágio de blastocisto (Mano et al., 2002). Em contraste, nos bovinos, a OOSP1 é expressa exclusivamente no ovócito podendo ser considerada um bom marcador ovócito-específico (Tremblay et al., 2006). Além disso, é exclusivamente de origem materna, pois os níveis de expressão são altos em ovócitos e diminuem durante o desenvolvimento sem nenhum aumento de expressão após a ativação do genoma embrionário. Em um estudo avaliando a expressão diferencial da OOSP1 em ovócito provenientes de folículos de diferentes tamanhos não foi observada diferença na expressão em ovócitos com diferentes competências. Esses resultados indicam que, os estoques da OOSP1 se acumulam antes da aquisição da competência (Caixeta et al., 2009).

Outro evento importante para o ovócito é a reprogramação epigenética. Essa 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 seqüência primária de DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (Wang et al., 2010). Os mecanismos epigenéticos em ovócito e embrião inicial incluem metilação do DNA, modificações nas histonas, RNA não codantes (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 reestabelecido durante o desenvolvimento embrionário inicial, próximo do período de implantação, determinando os padrões de metilação do embrião (Mann & 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 destes 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 & 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 hemi-metilados 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, que são a DNMT1o, que é expressa predominantemente durante a ovogênese e 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 & 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 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 & 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 & Westhusin (2003) em bovinos, foi verificado que o RNAm da DNMT2 é expresso em todos os tecidos, sendo encontrada 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 8 células, e é



responsável pela manutenção da metilação global em células tronco de camundongos (Ko et al., 2005). Lucifero e colaboradores (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 incluem principalmente acetilação, ubiquitinação, metilação, fosforilação, entre outros. Além disso, modificações em local específico e quantidade com que ela ocorre tais 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 vários processos relacionados com a transcrição e 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 está intimamente relacionada com a formação do pró-núcleo paterno e ativação do DNA genômico (Park et al., 2007). A metilação da H3K9 é uma 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 e colaboradores (2009) verificaram em bovinos, que essas modificações já estão estabelecidas no folículo antral inicial e persistem durante a maturação in vitro de ovócitos. Essa 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 catalizam a metilação da histona, foram 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 a repressão da expressão gênica (Vaute et al., 2002).

Estudos tem 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 e colaboradores (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 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 desenvolvimento pré-implantacional (Wrenzycki et al., 2005).

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

O aumento na acetilação das histonas (hiperacetilação) está relacionado com uma cromatina transcricionalmente 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 impedindo 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 amino-terminal de histonas, causando uma redução na sua afinidade pelo DNA, aumentando a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA molde (Brownell & 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 & 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 através 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 significativamente homólogas a proteína da levedura RPD3 e incluem 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 e colaboradores (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 4 células, com um grande aumento na fase de blastocisto. Para a HDAC1, em ovócitos imaturos e em MII, foi encontrado um número relativamente baixo, quando comparado com as outras, no entanto, no estágio de 4 células, a HDAC1 foi mais expressa. Em bovinos, em um estudo realizado por McGraw e colaboradores (2003), foi verificado que a expressão das HDAC 1 e HAT1 em ovócitos bovinos tanto na fase de VG, quanto na de MII, foram muito pouco expressos, aumentando apenas em embriões na fase de blastocisto.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2008.

ALLARD, P., CHAMPIGNY, M. J., SKOGGARD S, ERKMANN, J. A., WHITFIELD, M.L., MARZLUFF, W. F., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. **Journal of Cell Science**, v.115, p.4577-4586, 2002.

ALLARD, P.; YANG, Q.; MARZLUFF, W. F.; CLARKE H. J. The stem-loop binding protein regulates translation of histone RNAm during mammalian oogenesis **Developmental Biology**, v. 286, p.195 – 206, 2005.

ARNOLD, D. R., FRANÇON, P., ZHANG, J., MARTIN, K., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein expressed in growing oocytes is required for accumulation of RNAs encoding histones H3 and H4 and for early embryonic development in the mouse. **Developmental Biology**, v.313, p.347-358, 2008.

BARNETT, K. R., SCHILLING, C. C. R., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.10, p.1-19, 2006.

BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, p.173-178, 2002.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BROWNELL, J.E., ALLIS, C.D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.6, p. 176-184, 1996.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on RNAm expression un cumulus cells and oocytes of *Bos taurus indicus*:an approach to identify markers genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.655-664, 2009.

CARVALHO, J.B., CARVALHO, N.A., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology** v.69, p.167–175, 2008.

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

CHOHAN, K.R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.373-380, 2004.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v.229, p.224–236, 2001.

DE LA FUENTE, R.; VIVEIROS, M.M.; BURNS, K.H.; ADASHI, E.Y.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. **Developmental Biology**, v.275, p.447–458, 2004.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 57, p. 5-20, 2002.

DODE, M.A.N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.288-297, 2006.

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

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, Gainesville, 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. **Molecular Reproduction Development**, v.71, p.123–128, 2008.

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

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

FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D., MOSS, C.; MARTIN, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Analysis of differential maternal RNAm expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.136–144, 2004.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. 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. HOSOI, Y.; SAEKI, K.; ISHIMOTO, H.; MENIGISHI, K.; IRITANI, A.; YPSHIMURA, Y. H1FOO is indispensable

for Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.895-902, 2007.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique Technique**, v.24, p.413-423, 2005.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.R. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.68, p.524-529, 2003.

GOLDING, M.C.; WESTHUSIN, M.E. Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase RNAm sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. **Gene Expression Patterns**, v.3, p.551–558, 2003.

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

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 and Development**, v.22, p.1607–1616, 2008.

HIRSHFIELD, A.N. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. **Biology of Reproduction**, v.44, p.1157–1162, 1991.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.B. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quarterly Journal of Veterinary Science**, v.16, p.78-80, 1994.

HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A.S.; JOLY, C.G, 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.

HUSSEIN, T.S., FROILAND, D.A., AMATO, F., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B., Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal Cell Science*, v. 118, p. 5257–5268, 2005

IZADYAR, F., SPIERENBERG, G.T., CREEMERS, L.B., OUDEN, D.K., ROOIJ, D.G. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. **Reproduction**, v.124, p.85-94, 2002.

JAISWAL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1244-1251, 2004.

KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A, BÁO, S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos taurus indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.45-57, 2005.

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.

KO, Y. G.; 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. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.9627–9634, 2005.

LEE, H.J.; TEIXEIRA, J. Parthenogenesis in human oocytes that were collected from resected ovarian tissue and matured In Vitro. **Stem Cells and Development**, v.18, p.941-946, 2009.

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

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, v.3, p.662–673, 2002.



LODDE, V.; MODINA, S.C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I.; LUCIANO, A. M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. **European Journal of Histochemistry**, v.53, p.199-208, 2009.

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

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

LUCCI, C.M.; RUMPF, R; FIGUEIREDO, JR, BÁO, S.N. Zebu (*Bos taurus indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.15 p.1467-1483, 2002.

LUCCIFERO, D.; LA SALLE, S.; BOURC'HIS, D.; MARTEL, J.; BESTOR, T.H.; TRASLER, J.M. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. **BMC Developmental Biology**, v.7 p.36, 2007.

MA, P.; SCHULTZ, R.M. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. **Developmental Biology**, v.319, p.110–120, 2008.

MAEDA, C.; SATO, S.; HATTORI, N.; TANAKA, S.; YAGI, S.; SHIOTA, K. DNA Hypomethylation Circuit of the Mouse Oocyte-Specific Histone H1FOO Gene in Female Germ Cell Lineage. **Biology of Reproduction**, v.78, p.816–821, 2008.

MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggles of the clones. **Genome Biology**, v.3, p.2, 2002.

MANO, H.; NAKATANI, S.; AOYAGI, R.; ISHII, R.; IWAY, Y.; SHIMODA, N.; JINCHO, Y.; HIURA, H.; HIROSE, M.; MOCHIZUKI, C.; YURI, M.; HYOCK IM, R.; FUNADA-WADA, U.; WADA, M. IF3, a novel cell-differentiation factor, highly expressed in murine liver and ovary. **Biochem Biophys Res Commun**, v.297, p.323-328, 2002.

McGRAW, S.; ROBERT, C.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantification of Histone Acetyltransferase and Histone Deacetylase Transcripts During Early Bovine Embryo Development. **Biology of Reproduction**, v.68, p.383–389, 2003.

MCGRAW, S.; VIGNEAULT, C.; TREMBLAY, K.; SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.692-699, 2006.

MEIRELLES F.V.; BORDIGNON V.; WATANABE Y.; WATANABE, M.; DAYAN, A.; LOBO, R.B.; GARCIA, J.M.; SMITH, L.C. 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.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development** v.55, p.89-95, 2000.

MIZUSAWA, Y.; KUJI, N.; TANAKA, Y.; TANAKA, M.; IKEDA, E.; KOMATSU, S.; KATO, S.; YOSHIMURA, Y. Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. **Fertility and Sterility**, v.93, p. 1134-1141, 2010.

MONTI, M.; CARAGNA, S.; REDI, C.; ZUCOTTI, M. Gonadotropins affect oct-4 gene expression during mouse oocyte grow. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p. 685-691, 2006.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal RNAm levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1367-1379, 2006.

NISHIOKA, K.; CHUIKOV, S.; SARMA, K.; ERDJUMENT- BROMAGE, H.; ALLIS, C.D.; TEMPST, P.; REINBERG, D. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. **Genes Development**, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.731–743, 2008.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v.99, p.247–257, 1999.

PARK, J.S.; JEONG, Y.S.; SHIN, S.T.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Dynamic DNAmethylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. **Developmental Dynamics**, v.236, p.2523–33, 2007.

PETERS, A.H.; 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.07, p.323–337, 2001.

PRATHER, R.S.; ROSS, J.W.; ISOM, S. C.; GREEN, J.A. Transcriptional, Post-transcriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. **Society Reproduction Fertility Supplement**, v.66, p.165-176. 2009.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHEZ, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. 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.

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

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; LEPIKHOV, K.; SALAMONE, D.; WALTER, J.; NIEMANN, H. Epigenetic modifications and related RNAm expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction Fertility and Development**, 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.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

ROBERTSON, A.K.; GEIMAN, T.M.; SANKPAL, U.T.; HAGER, G.L.; ROBERTSON, K.D. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.322, p.110-118, 2004.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F.S. FAUSTINO, L. R., ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. & BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123. 2009.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Biblioteca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

RUSSEL, D. F. & BETTS, D. H. Alternative Splicing and Expression Analysis of Bovine DNA Methyltransferase. **Developmental Dynamics**, v.237, p.1051–1059, 2008.

SADEU, J.C.; CORTVRIND, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, 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. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p.539-550, 2009.

SCHULTZ, R.M., DAVIS, W., STEIN, P., SVOBODA, P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. **Journal of Experimental Zoology**, v.285, p.276-282, 1999.

SHARMA, G.T.; DUBEY, P.K.; MEUR, S.K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livestock Science**, v.123, p.300–305, 2009.

SILVA, J.; MAK, W.; ZVETKOVA, I.; APPANAH, R.; NESTEROVA, T.B.;WEBSTER, Z.; PETERS, A.H.; JENUWEIN, T.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. **Development Cell**, v.4 p.481–495, 2003.

SIRARD, A.M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

SHOGREN-KNAAN, M.; ISHII, H.; SUN, J.M.; PAZIN, M.J.; DAVIE, J.R.; PETERSON, C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. **Science**, v.311, p.844–847, 2006.

STEWART, M.D.; LI J.; WONG, J. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, p.2525–2538, 2005.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.J.; AFFOURTIT, J.P.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development**, v. 135, p.111-121, 2008.

TANAKA, M.; HENNEBOLD, J.D.; MACFARLANE, J.; ADASHI, E.Y. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the o specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. **Development**, v.128, p.655–664, 2001.

TANAKA, M., KIHARA, M., HENNEBOLD, J.D., EPPIG, J.J., VIVEIROS, M.M., EMERY, B.R. H1FOO is coupled to the initiation of oocyte growth. **Biology Reproduction**, v. 72, p.135-142, 2005.

TCHURIKOV, N. A. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry**, v.70, p.406-423, 2005.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45, p.101-110, 1996.

TERANISHI, T.; TANAKA, M.; KIMOTO, S.; ONO, Y.; MIYAKOSHI, K.; KONO, T.; YOSHIMURA, Y. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1FOO in nuclear transfer. **Developmental Biology**, v.266, p.76–86, 2004.

TIAN, X.C.; PARK, J.; BRUNO, R.; FRENCH, R.; JIANG, L.; PRATHER, R.S. Altered gene expression in cloned piglets. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.60–6, 2009.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MORIN, G.; SIRARD, M.A. 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. **Nature structural & molecular biology**, v.4, p. 430-439, 2010.

VAUTE, O., NICOLAS, E., VANDEL, L., TROUCHE, D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 2, p.475-81, 2002.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

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, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1003–1011, 1996.

VASSENA, R.; DEE SCHRAMM, R.; LATHAM, K. E. Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferases genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.430–436, 2005.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1701–1709, 2004.

XUE, K.; SONG, J.; WEI, H.; CHEN, L.; MA, Y.; LIU, S.; LI, Y.; DAÍ, 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. **Molecular Reproduction & Development**, v.77, p.605–614, 2010.

WANG, Q.; SUN, Y.Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.

WANG, N.; FANG, L.; ZHAN, Q.; LI, L.; DONG, M.; DING, G.; XU, C.M.; JIANG, S.W.; HUANG, H.F.; JIN, F. Effects of In Vitro Maturation on Histone Acetylation in Metaphase II Oocytes and early Cleavage Embryos. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 10, p. 1-9, 2010.

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. **Biology of Reproduction**, v.65, p.309–317, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; GEBERT, C.; KORSawe, K.; LEMME, E.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v.75, p.1–9, 2005.

YAN, C.; PENDOLA, F.L.; JACOB, R.; LAU, A.L.; EPPIG, J.J.; MATZUK, M.M. Oosp1 encodes a novel mouse oocyte-secreted protein. **Genesis**, v.31, p.105–110, 2001.

ZHU, G.; GUO, B.; PAN, D.; MU, Y.; FENG, S. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus–oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.275-283, 2008.



## **CAPÍTULO 2**

## 1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi estudar o perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos utilizando ovócitos de diferentes tamanhos provenientes de várias categorias de folículos. Os genes candidatos foram selecionados por estarem possivelmente envolvidos com a aquisição da competência (BMP15, OOSP1, H1FOO, H2A, H3A, H4, SLBP, DNMT1, DNMT3B, HAT, HDAC e SUV39H1). Para determinar o tamanho dos ovócitos a serem utilizados, foi realizado um pré-experimento, em que os folículos pré-antrais foram classificados morfológicamente, agrupados em diferentes categorias em primordial, primário, secundário inicial e secundário final. Após a classificação, os ovócitos de cada folículo foram individualmente isolados e medidos. Folículos pré-antrais e antrais foram isolados de ovários de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), por dissociação mecânica utilizando o *Tissue Chopper*. Para o isolamento dos ovócitos, os folículos foram expostos à colagenase tipo II (0,5 mg/ml) e então submetidos a sucessivas pipetagens. Os ovócitos foram medidos através do programa Motic images Plus 2.0 e classificados de acordo com seu diâmetro nas seguintes categorias: 1) ovócitos de folículos primordiais: diâmetro de até 20 µm; 2) ovócitos de folículos primários: 25 a 35 µm; 3) ovócitos de folículos secundários iniciais: 40 a 60 µm e 4) ovócitos de folículos secundários finais; 65 a 85 µm. Para a obtenção dos ovócitos oriundos de folículos antrais incompetentes e competentes, foram utilizadas as medidas de 100 a 120 µm e acima de 128 µm respectivamente. O RNA total foi extraído de 4 *pools* de 25 ovócitos, de cada categoria de folículo, e os transcritos dos genes foram quantificados por qPCR. Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo CYC A. Os resultados foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal Wallis, para comparar os tamanhos de folículos e ovócitos e avaliar o efeito do tamanho do ovócito na

quantidade de expressão gênica. O nível de significância considerado foi  $P < 0,05$ . Os resultados mostraram que os transcritos da H2A, H3, H4 e SUV39H1 não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de ovócitos de folículos antrais e pré-antrais. A expressão da OOSP1, SLBP, BMP15, H1FOO, DNMT1, DNMT3B e HAT foram menores ( $P < 0,05$ ) em ovócitos pré-antrais quando comparados com os de folículos antrais. A H3A foi o único gene em que foi detectado a expressão de RNAm em ovócito de folículo primordial. De todos os genes estudados, apenas a HDAC apresentou diferença significativa entre ovócitos de folículos antrais competentes e incompetentes. Os resultados sugerem que o acúmulo dos estoques dos genes analisados ocorre antes do estágio final da folículogênese e provavelmente não são marcadores para a competência. A HDAC foi o único gene que pode estar relacionado à competência do ovócito, pois mostrou uma diminuição ( $P < 0,05$ ) no nível de transcrito nos grupos de ovócitos competentes quando comparados com o grupo de antrais iniciais (1a 3mm).

Palavras chave: 1. Folículos. 2. Ovócitos. 3. Pré-antrais. 4. Expressão gênica

## 2 ABSTRACT

The aim of this present study was investigate the expression profile of candidates genes for the acquisition of competence during oocyte growth in bovine using oocytes from different sizes obtained from several follicle categories. The candidate genes were selected to be possibly involved in competence (BMP15, OOSP1, H1FOO, H2A, H3A, H4, SLBP, DNMT1, DNMT3B, HAT, HDAC e SUV39H1). A pre-experiment was conducted to classify the follicles according to their categories in primordial, primary, small secondary and final secondary follicles. Then the oocytes were individually isolated and measured. Preantral and antral follicles were isolated from ovaries of Nelore (*Bos taurus indicus*) cows by mechanical dissociation using a *Tissue Chopper*. To isolate the oocytes, follicles were exposed to collagenase type II solution (0.5 mg/ml) and then submitted to successive pipetting. The oocytes were measured with Motic Images Plus 2.0 program and classified according to their diameter into the following categories: 1) oocytes from primordial follicle: diameter < 20 µm; 2) oocytes from primary follicles: 25 to 35 µm; 3) oocytes from small secondary follicles: 40 to 60 µm; 4) oocytes from final secondary follicles: 65 to 85 µm; 5) oocytes from early antral follicles: 100 to 120 µm; and 6) oocytes from final antral follicles: > 128 µm. Total RNA was extracted from 4 pools of 25 oocytes from each category of follicles using Rneasy Plus® kit, subjected to reverse transcription reaction and genes quantified by qPCR. Target gene expression was normalized using CYC A. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test for values which were not normally distributed. Level of significance was considered P<0.05. The results show that the transcripts of H2A, H3A, H4 e SUV39H1 did not differ significantly between groups, showing the same pattern from preantral to antral follicles. For OOSP1, SLBP, BMP-15, H1FOO, DNMT1, DNMT3B and HAT, the pattern of expression was lower in oocytes from preantral follicles when compared to antral follicles. The H3A was the only gene in which expression was detected in oocytes from primordial follicles. From all the studied genes, only HDAC differed significantly between incompetent and competent oocytes. These results suggest that the stocks of transcripts of the studied genes are accumulated before the final phase of folliculogenesis. The HDAC was the only gene in

which expression could be related to oocyte competence since it showed a decrease ( $P < 0.05$ ) in transcript levels from final antral oocytes (competent) compared to small antral group.

Keywords: 1. Follicles. 2. Oocytes. 3. Preantral. 4. Gene expression

### 3 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos têm mostrado que a competência ovocitária está determinada, em parte, pela composição e quantidade de transcritos maternos estocados durante o crescimento do ovócito e na fase final da folículogênese (Sirard et al., 2006; Lonergan et al., 2003; Gandolfi et al., 2005). Ovócitos recuperados de folículos pequenos (1-3 mm), por exemplo, mostram uma limitada capacidade de desenvolvimento, e progridem ao estágio de blastocisto em uma proporção muito menor do que aqueles derivados de folículos maiores que 6 mm (Lequarre et al., 2005; Caixeta et al., 2009). Esses dados indicam que ovócitos de folículos pequenos não possuem todos os componentes essenciais para sustentar o desenvolvimento.

Considerando que o acúmulo de transcritos é ponto chave para a aquisição da competência (Chohan & Hunter, 2004; Racedo et al., 2008), uma das alternativas para se estudar esse processo é caracterizar como ocorre a formação desses estoques. Essa caracterização seria o primeiro passo para a compreensão das bases moleculares envolvidas na formação de um ovócito de qualidade. Entender a complexidade desse processo seria útil na tentativa de proporcionar as condições necessárias para que ovócitos imaturos, obtidos de folículos antrais, adquiram a competência aumentando assim, a disponibilidade de ovócitos de qualidade para as técnicas de reprodução assistida.

Apesar da expressão diferencial de alguns genes terem sido relacionadas com a competência do ovócito em bovinos (Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Racedo et al., 2008; Caixeta et al., 2009), os mecanismos envolvidos e as características moleculares dos ovócitos competentes ainda não são conhecidos. Desta forma, os genes selecionados para esse estudo foram BMP15, OOSP1, H1FOO, H2A, H3A, H4, SLBP, HAT1, HDAC2, SUV39H1, DNMT1a, e DNMT3b, participam de atividades críticas que ocorrem durante a gametogênese ou já foram citados na literatura como possíveis candidatos para a competência.

A proteína específica de ovócito (OOSP1), e a *bone morphogenetic protein 15* (BMP15) são fatores secretados pelo ovócito. Apesar da função da OOSP1 ainda não estar definida (Tremblay et al., 2006), o fato de ser secretada especificamente pelo ovócito sugere que, semelhante à BMP15, tenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento folicular, controlando a folículo-gênese (Gilchrist et al., 2004a; Hussein et al., 2005).

As proteínas histonas além de serem proteínas estruturais da cromatina formando o nucleossoma, atuam no controle da expressão gênica (McGraw et al., 2006), ativação do genoma embrionário, metilação do DNA e inativação do cromossomo X (Fair et al., 2004). Já a *SLBP* é uma proteína que se liga ao RNA das histonas e age na sua estabilização e tradução (Allard et al., 2002). A histona específica do ovócito (H1FOO) é uma histona materna que afeta a compactação da cromatina em ovócitos e embriões em estágio inicial de desenvolvimento (McGraw et al. 2006; Tanaka et al., 2005). Ademais, maior expressão dos genes da histona H2A (Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Caixeta et al., 2009), da H3 (Fair et al., 2004) e da *SLBP* (Donnison & Pefefffer, 2004) foi observada em ovócitos com maior competência para o desenvolvimento.

Durante a gametogênese, além da formação dos estoques de RNAm o padrão epigenético do genoma do ovócito deve ser totalmente apagado e restabelecido para que o mesmo se torne apto para a fecundação. As DNA metiltransferases (DMNTs) são as enzimas responsáveis pelo estabelecimento (DNMT 3a e 3b) e manutenção (DNMT1) dos padrões de metilação. A expressão dessas enzimas também está correlacionada com o diâmetro do ovócito em camundongos (Lucifero et al., 2007), indicando que, atingir determinado tamanho é necessário para que as modificações epigenéticas sejam totalmente estabelecidas no ovócito (Hiura et al., 2006; Lucifero et al., 2007).

As modificações pós-traducionais da cauda das histonas, juntamente com a metilação do DNA, são fatores essenciais na regulação gênica e desempenham papel importante no controle da reprogramação que ocorre durante a gametogênese e embriogênese (Prather et al., 2009). O nível de acetilação de histonas é controlado pelas enzimas HAT1, e pela HDAC2, sendo que, a hipoacetilação em geral está correlacionada com a repressão transcricional (Nowak-imialek et al., 2008; Gu et al., 2010). Já as HMTs metilam os resíduos de lisina das histonas em diferentes regiões da cromatina. Dentre as várias HMTs, a SUV39H1 metila especificamente a lisina 9 da H3, sendo que essa modificação tem papel importante na formação da heterocromatina que leva a repressão transcricional.

Transcritos de todos esses genes estão presentes em ovócitos totalmente crescidos em estágio de VG, entretanto, como e em que momento da folículo-gênese esse acúmulo ocorreu,

ainda não foi descrito em bovinos. Estudos avaliando a expressão de alguns desses genes em bovinos tem se limitado ao uso de ovócitos imaturos obtidos de folículos antrais (Nowak-imialek et al., 2008; Racedo et al., 2009; Lodde et al., 2009) e, mais raramente, de folículos secundários finais (Sanchez et al., 2009), sendo que não existem relatos em que ovócitos isolados de folículos primordiais e primários tenham sido utilizados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar, em bovinos, o padrão de expressão de genes relacionados às proteínas histonas, genes específicos do ovócito e genes relacionados com alterações epigenéticas durante o crescimento ovocitário desde o estágio de folículos primordial até o estágio de antral tardio.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

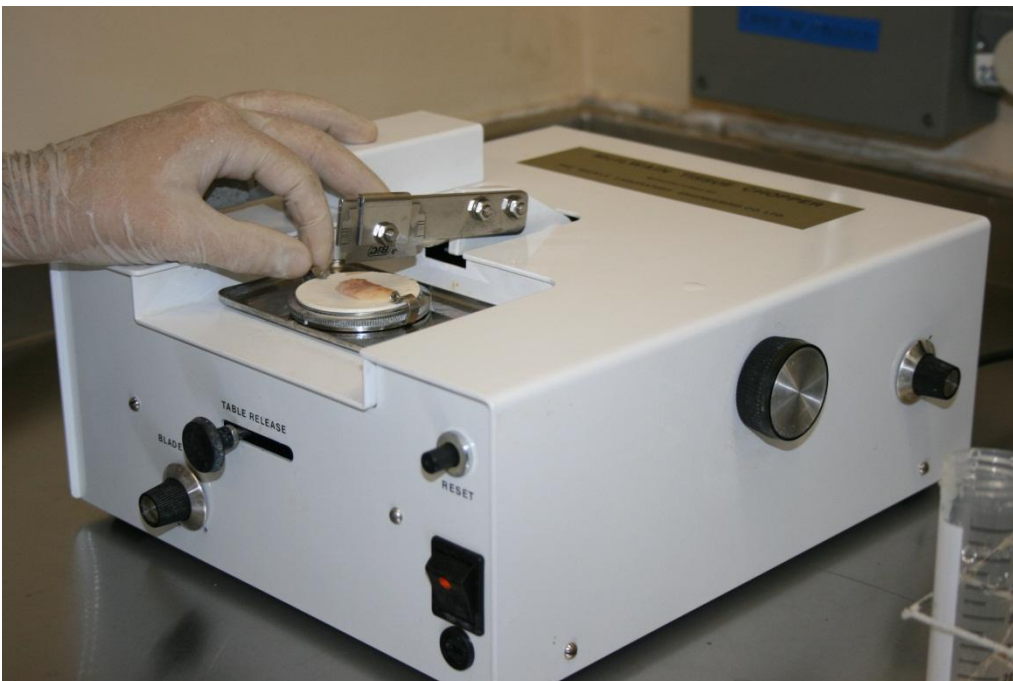
### 4.1 Isolamento dos Folículos Pré-antrais

Ovários de fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com 100 UI/ml de penicilina G e 100 µg/ml estreptomicina (Sigma, Sto Louis MO, USA), à temperatura de 35 a 37°C.

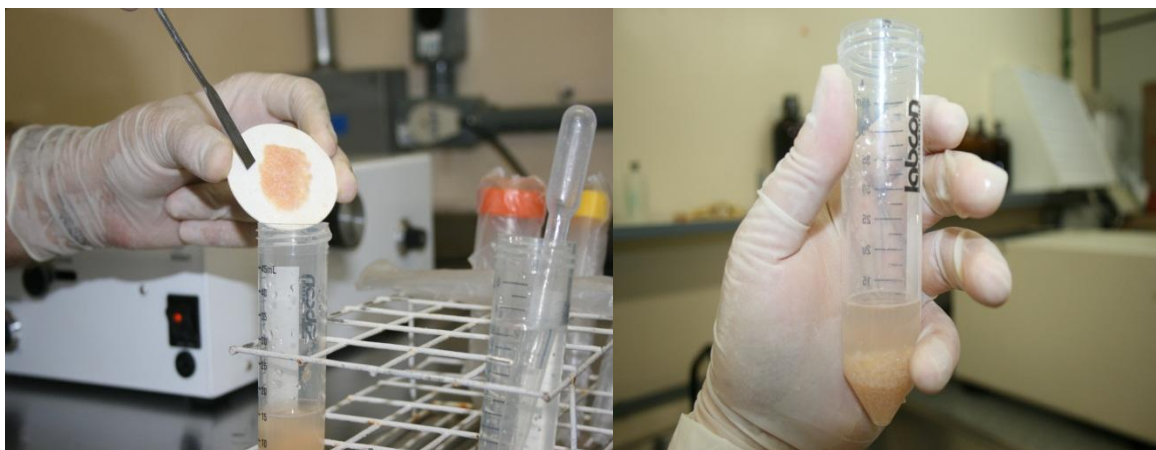
Para o isolamento dos folículos pré-antrais foi utilizado o método descrito por Lucci e colaboradores (2002), com modificações nos tamanhos dos cortes. Foram utilizados quatro ovários por manipulação os quais foram mantidos em solução salina sobre placa aquecedora à 36°C durante todo o processo. Os ovários eram cortados ao meio, e a medula retirada com o auxílio de bisturi e pinça (Figura 2.1), e a cortex ovariana resultante, era levada ao *Tissue Chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, Gomshall, Surrey, ENGLAND) em que cortes de 200; 250; 300 e 350µm foram feitos em três sentidos: longitudinal, transversal e oblíquo (Figura 4.2), para que se obtivesse maiores tamanhos de folículos e ovócitos. A massa ovariana obtida foi depositada em um tubo (50 ml) contendo PBS sem soro e foi feita uma dissociação mecânica por repetidas pipetagens (40x) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur (Figura 2.3). A solução contendo os folículos isolados foi filtrada em filtro de 500µm e deixada para decantar por 3 minutos. Após a decantação, 1 ml do pellet foi retirado da solução e utilizado para a recuperação dos folículos pré-antrais ou para o isolamento dos ovócitos das diversas categoriais de folículos antrais e pré-antrais.



**Figura 2.1.** Manipulação do ovário para obtenção da córtex com auxílio de bisturi.



**Figura 2.2.** Fragmentos de córtex ovariana triturados com o auxílio do *Tissue Chopper* para isolamento dos folículos pré-antrais.



**Figura 2.3.** Massa ovariana obtida após o uso do *Tissue Chopper*

#### **4.2 Caracterização do diâmetro dos ovócitos oriundos de folículos pré-antrais em fêmeas Nelore**

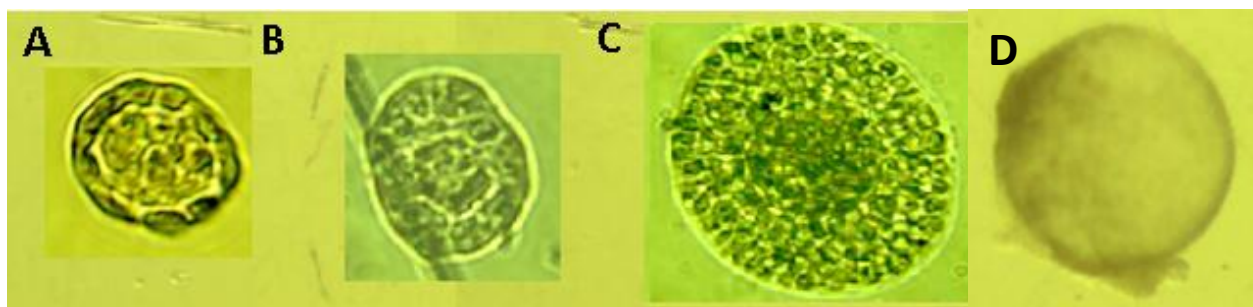
Para caracterizar o diâmetro dos ovócitos provenientes das diferentes classes de folículo pré-antrais (primordial, primário, secundário inicial e secundário final) em ovários obtidos de fêmeas Nelore, um primeiro experimento foi realizado. Para isso, folículos primordiais, primários e secundários iniciais, foram isolados com auxílio do *Tissue Chopper*, conforme descrito no tópico anterior. Após o procedimento, a solução contendo os folículos isolados foi levada ao microscópio invertido para análise e busca.

Os folículos encontrados foram classificados morfológicamente considerando o tamanho, formato e quantidade das células que circundam o ovócito, de acordo com Kacinkis (2005). Após a classificação por categoria os folículos foram transferidos separadamente para uma gota de 200  $\mu$ l de TCM-199 com sais de Hank's, acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB). Então, os mesmos foram fotografados e mensurados individualmente utilizando o programa Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China).

Os folículos caracterizados e medidos foram transferidos para outra gota de 200  $\mu$ l de TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) contendo 0,5 mg/ml de colagenase tipo II (Sigma, Sto Louis MO, USA), onde permaneceram por 20 minutos sobre

placa aquecedora à 37°C. Cada folículo foi individualmente transferido para uma gota de 50 µl de TCM 199 e pipetado sucessivas vezes, até que o ovócito ficasse completamente isolado, com a ausência completa de células. Uma vez isolados, os ovócitos individuais eram mensurados excluindo a zona pelúcida através do programa Motic Images Plus 2.0.

Dada a dificuldade de obtenção de folículos secundários finais com o procedimento descrito acima, outro protocolo foi utilizado para o isolamento dessa categoria de folículo. A cortéx ovariana foi cortada no *Tissue Chopper* em dois sentidos (longitudinal e transversal) com um intervalo de corte de 1mm. Os cortes de ovário foram transferidos para uma placa de Petri contendo PBS e os folículos isolados e dissecados com a ajuda de lâmina de bisturi (número 20) e agulhas através do método de microdissecção (Telfer., 1996; Sharma et al., 2009). Todo o procedimento foi feito com o auxílio de um estereomicroscópio. Os folículos mensurados eram individualmente transferidos para uma gota de collagenase, onde permaneciam por 20 minutos sobre placa aquecedora à 37°C. Logo após cada folículo foi transferido para uma gota de 50 µl de TCM 199 e gentilmente dissecado até que o ovócito ficasse completamente à mostra, com ausência completa de células. Uma vez isolados, os ovócitos foram mensurados excluindo a zona pelúcida através do programa Motic Images Plus 2.0. (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Folículo primordial (A); Folículo primário (B); Folículo secundário inicial (C); Folículo secundário final (D).

### 4.3 Recuperação, classificação e mensuração de ovócitos de folículos pré-antrais e antrais

Os folículos pré-antrais foram isolados com auxílio do *Tissue Chopper*, conforme descrito na seção anterior. A separação dos ovócitos inclusos nos folículos pré-antrais isolados foi realizada conforme o protocolo descrito por Monti et al. (2006), com pequenas modificações. Após o período de decantação da solução contendo os folículos pré-antrais, 1 ml do pellet foi retirado e transferido para outro tubo de 15 ml. Imediatamente, 1 ml de solução contendo 1 mg de colagenase tipo II (Sigma, Sto Louis MO, USA) diluída em 1ml de TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) foi adicionada ao tubo, de forma a se obter uma concentração final de 0,5 mg/ml de colagenase (Figura 2.5). Essa solução de colagenase foi incubada em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após o período de incubação, foi acrescentada ao conteúdo do tubo, uma solução de BSA (25mg de albumina sérica bovina diluída em 500 µl TCM-Hanks) a uma concentração final de 1% e o mesmo foi centrifugado a 190 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando 500 µl do pellet, que foi ressuspensionado com 40 µl de EDTA (2,4 mM) e 460 µl de TCM-199 com sais de Hank's. A solução final (1 ml) foi levada ao banho-maria à temperatura de 37°C por 3 minutos e, posteriormente, submetida à pipetagens sucessivas (40 vezes) utilizando uma pipeta graduada de 200 µl.

A solução final foi levada ao microscópio invertido para a procura dos ovócitos. Os ovócitos encontrados eram então transferidos para uma gota de 200 µl de TCM-199 com sais de Hank's, acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB), e lavados sucessivas vezes, até que os mesmos estivessem livres das células foliculares e impurezas. Somente os ovócitos totalmente liberados dos folículos e de aparência normal (sem danos estruturais na membrana plasmática, zona pelúcida e citoplasma homogêneo) foram utilizados.

Os ovócitos isolados eram então fotografados e mensurados utilizando o programa Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China). A medida do diâmetro foi realizada excluindo a zona pelúcida (ZP) e, os ovócitos foram classificados nas categorias determinadas no experimento anterior: 1) ovócitos de folículos primordiais: diâmetro de até 20 µm; 2) ovócitos de folículos primários: diâmetro de 25 a 35 µm; 3) ovócitos de folículos

secundários iniciais: diâmetro de 40 a 60  $\mu\text{m}$  e 4) ovócitos de folículos secundários finais: 65 a 85  $\mu\text{m}$ .

Para a obtenção de ovócitos oriundos de folículos antrais competentes e incompetentes, o diâmetro dos ovócitos utilizados para sua classificação foi aquele descrito por Caixeta et al., (2009). Sendo que ovócitos com a medida de 100 a 120  $\mu\text{m}$  foram classificados como provenientes de folículos de 1-3 mm e ovócito com o diâmetro acima de 128  $\mu\text{m}$ , maiores que 6 mm. Apenas ovócitos com citoplasma homogêneo e com ausência de células na zona pelúcida foram utilizados.

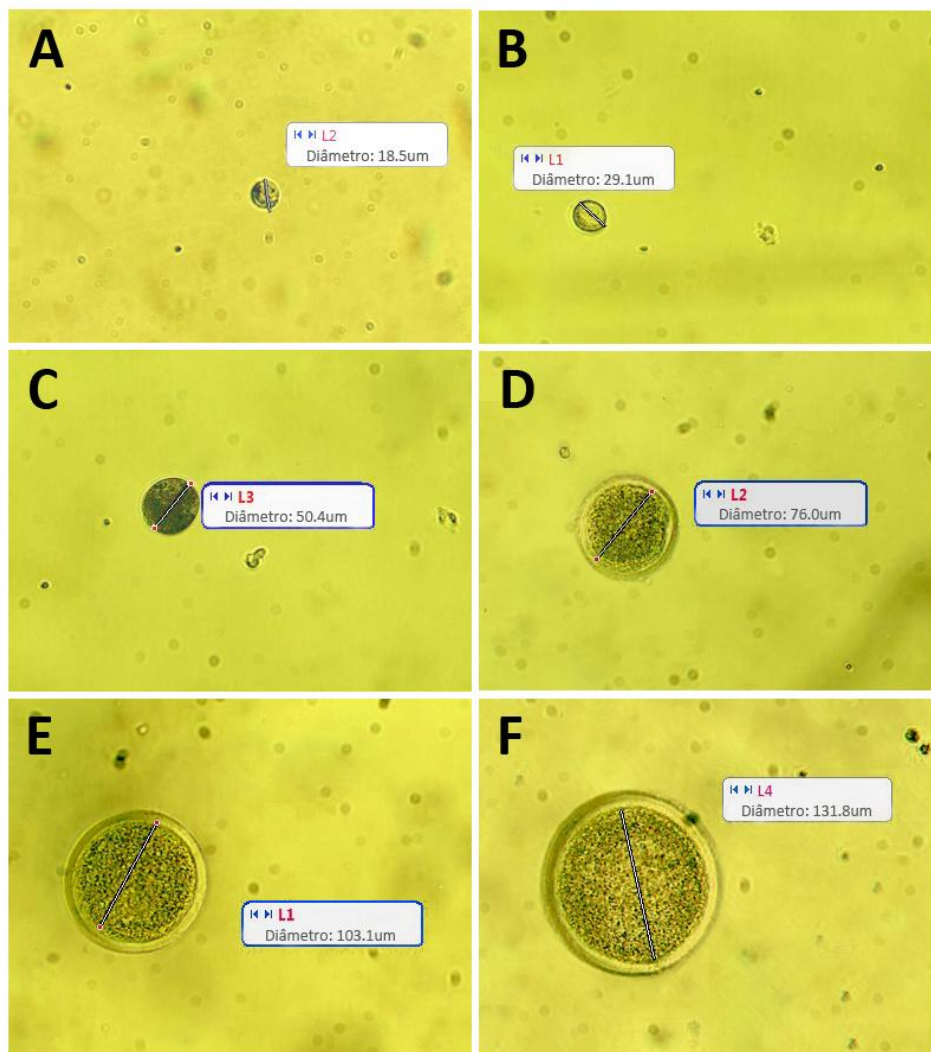


**Figura 2.5.** Solução filtrada contendo os ovócitos com collagenase.



#### 4.4 Armazenamento dos Ovócitos

Os ovócitos dos diferentes grupos ou categorias obtidos de folículos pré-antrais e antrais foram lavados em PBS sem cálcio e magnésio (4 banhos) e transferidos em 2  $\mu$ l para um tubo de 0,2 ml com auxílio de uma pipeta graduada. Posteriormente, foi adicionado ao conteúdo do tubo 4  $\mu$ l de RNA later. Os tubos contendo as estruturas foram então, mantidas a 4°C durante 24 horas e, posteriormente, transferidas para o freezer à -20 °C, onde foram estocadas até a análise. Para cada categoria foram armazenados 4 *pools* de 25 ovócitos (figura 2.6)



**Figura 2.6.** Ovócitos isolados, lavados, medidos, separados por categoria em um microscópio invertido (20x) e prontos para o congelamento. Ovócitos de folículos primordiais (A), folículos primários (B), secundário inicial (C), secundário final (D), antral inicial (E), antral final (F).

#### 4.5 Extração de RNA e transcrição reversa (RT)

O RNA total foi extraído de *pools* de 25 ovócitos para cada categoria utilizando o kit RNeasy Plus<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi submetido à uma reação de transcrição reversa contendo 1 µl de SuperScript III (200U/µl; Invitrogen), 1 µl de primer Oligo-dT (500µg/ml), dNTPs (2.0mM de cada), 1 µl DTT (0.1mM), 1 µl RNaseOUT<sup>®</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl; Invitrogen) e tampão 1X first strand. As reações foram realizadas a 65°C por 5 min, 50°C por 60 min e finalmente, 70°C por 15 min para a inativação da enzima.

#### 4.6 PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a análise relativa através do PCR em Tempo Real utilizou-se o protocolo de amplificação do “kit” Power Syber Green Master Mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com um volume final de 25 µl e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 5 min, 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 15 seg; temperatura de anelamento por 1 minuto), seguido de curva de dissociação padrão. A seqüência dos primers, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene estão apresentados na tabela 1. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo *CYC A*. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  com correção da eficiência (Pfaffl, 2001; Figura 2.7). A eficiência para cada gene foi calculada através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).



**Tabela 2.1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento

<b>Genes</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
CYC-A	F: GCC ATG GAG CGC TTT GG R: CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T	65	60
H4	F: TGC GCG ACA ATA TCC AGG GTA TCA R: AAC CAC GTC CAT AGC GGT TAC AGT	197	60
H2A	F: GAG GAG CTG AAC AAG CTG TTG R: TTG TGG TGG CTC TCA GTC TTC	104	60
H1FOO	F: AGT CGA AGG TCA AAG AAA GAG GGA GC R: TGA ACT CTG ACT TCC AGG CTG TGT	80	60
H3A	F: GTA CAA AGC AGA CTG CCC GCA AAT R: ACC AGG CCT GTA ACG ATG AGG TTT	128	60
SLBP	F: CAG TCT TGC CAC AAC TTC AAT C R: ATG GAG CCG ATT ATG AGA ACA C	208	53
DNMT1	F: TTG GCT TTA GCA CCT CAT TTG CCG R: TCC TGC ATC ACG CTG AAT AGT GGT	82	57
DNMT3B	F: AGC AAC CAG AGA ATA AGA CGC GGA R: AAT TTG TCT TGA GGC GCT TGG GTG	90	57
BMP15	F: GTC AGC AGC CAA GAG GTA GTG R: CCC GAG GAC ATA CTC CCT TAC	360	59
HAT1	F: AAT TGA GAG ACT TTG TGC TTG TGA R: TTC AAT GAC ACG TCG ATA ATC TTC	392	60
SUV39H1	F: GGA CTG AAT CCT GCC GCA AAT ACC T R: GGC CAT GAA TCC CAA CTG CAG AAA G	307	62
HDAC	F: TTA TTT GAA AAT TTA CGC ATG TT R: TTG CTC CTT TCT TAT GAT CAG TC	229	56

F= primer forward; R= primer reverse

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

**Figura 2.7.** Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em Tempo Real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle.  $E_{\text{alvo}}$  é a eficiência do gene alvo;  $E_{\text{ref}}$  é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*;  $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$  é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo;  $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$  é desvio de CP do controle – amostra do gene referência.

#### 4.7 Análise Estatística

Para comparar os grupos quanto ao tamanho dos ovócitos, folículos e expressão gênica foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prophet versão 5.0 (BBN System Technologies, 1996).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados

Considerando que os ovócitos das diferentes categorias de folículos pré- antrais foram coletadas de acordo com o tamanho do ovócito, e não com tamanho e/ou morfologia do folículo, um pré-experimento foi realizado. Esse teve por objetivo caracterizar o tamanho dos ovócitos isolados das diferentes categorias de folículos pré-antrais de fêmeas Nelore. Para isso, os folículos pré-antrais foram classificados morfologicamente, agrupados de acordo com sua categoria em primordial, primário, secundário inicial e secundário final. Após a classificação morfológica, os ovócitos de cada folículo foram individualmente isolados e medidos. Os tamanhos dos folículos de cada categoria e de seus respectivos ovócitos são apresentados na tabela 2.2. Houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) no tamanho dos folículos e ovócitos entre todas as categorias estudadas. Da mesma forma, todas as categorias apresentaram uma grande variação entre o maior e o menor diâmetro de ovócitos e folículos.

**Tabela 2.2.** Caracterização do diâmetro de folículos e ovócitos obtidos de folículos pré-antrais em ovários de fêmeas Nelore (média  $\pm$  Erro Padrão).

Estágio Folicular	N	Diâmetro Folicular ( $\mu\text{m}$ ) (variação)	Diâmetro Ovocitário ( $\mu\text{m}$ ) (variação)
Primordial	50	$38,8 \pm 0,64^a$ (29,5 – 53,0)	$22,34 \pm 0,45^a$ (16,2 – 30,0)
Primário	50	$54,5 \pm 0,89^b$ (43,7 – 72,2)	$27,86 \pm 0,37^b$ (23,7 – 33,3)
Secundário Inicial	50	$88,9 \pm 2,55^c$ (53,1 – 125,1)	$44,17 \pm 1,37^c$ (28,8 – 63,3)
Secundário Final	50	$192,84 \pm 6,71^d$ (129,8 – 334)	$74,4 \pm 1,28^d$ (61,1 – 93,8)

a, b, c, d Diferentes letras indicam valores diferentes ( $P < 0,01$ )

A análise da quantidade relativa de RNAm dos genes estudados individualmente mostra que a expressão dos genes OOSP1, SLBP, BMP-15, e H1FOO aumentaram de acordo

com o tamanho do ovócito, sendo maior em ovócitos obtidos de folículos antrais do que folículos pré-antrais. Para o gene BMP-15 e H1FOO, os ovócitos obtidos de folículo secundários finais aparecem como um grupo que apresenta expressão intermediária entre ovócitos pré-antrais e antrais. A OOSP1 só começou a ser expressa a partir de folículo secundário inicial (Figura 2.8).

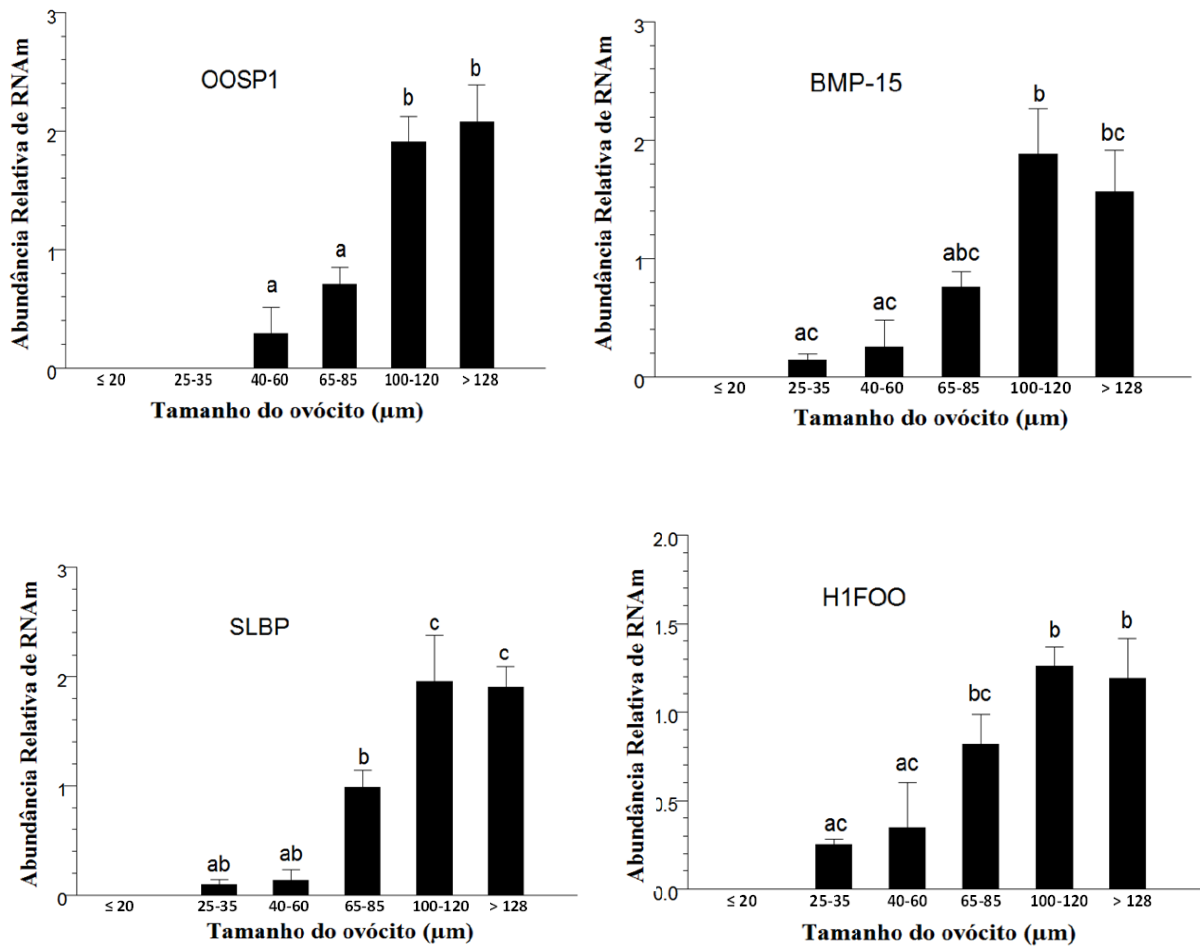
Para os genes H3A e H2A, a abundância relativa de transcritos não diferiu estatisticamente entre ovócitos de vários estágios de crescimento, incluindo desde os de folículo primário até os de folículo antral final. A H3A foi o único gene em que foi detectada expressão em ovócitos obtidos de folículos primordiais. Os transcritos da H4 não variaram significativamente entre os grupos, ocorrendo variação apenas entre ovócitos de folículos primários e antral inicial (Figura 2.9).

A expressão da DNMT3B foi diferente entre os grupos pré-antrais e antrais, sendo que, nas categorias dos pré-antrais, só foi detectada expressão no grupo de ovócitos obtidos de folículo secundário final. Um padrão semelhante de expressão foi observado para a DNMT1, no entanto, o grupo correspondente à categoria de ovócitos obtidos de folículo secundário final, aparece como um grupo de expressão intermediária entre os ovócitos pré-antrais e antrais (Figura 2.10).

Os transcritos da enzima SUV39H1 só começaram a aparecer no estágio de folículo secundário inicial, sendo este grupo, estatisticamente semelhantes aos grupos de folículos antrais. No entanto, no grupo de ovócitos obtidos de folículos secundários finais, a expressão foi semelhante apenas à categoria de folículos secundário inicial (Figura 2.10).

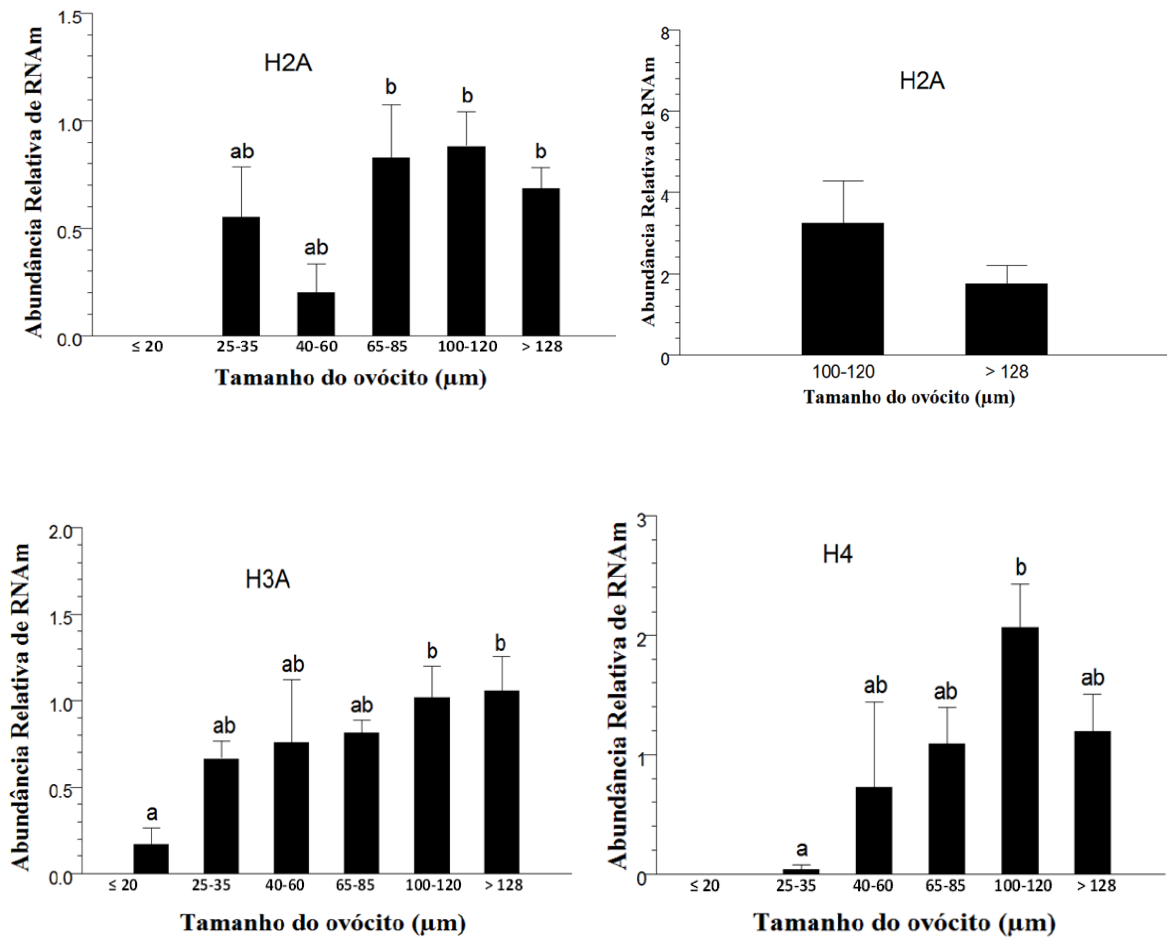
Para o gene HDAC2 os grupos de folículo primário, secundário final e antral inicial foram semelhantes, variando na categoria correspondente aos ovócitos provenientes de folículos antrais, ocorrendo uma diminuição da expressão no grupo de antrais finais. A abundância relativa de transcritos da HAT foi semelhante entre os grupos de ovócitos de folículos primários, secundário final, e antral inicial e final. Diferença significativa ocorreu apenas entre o grupo de folículos secundário inicial e antral inicial (Figura 2.11.).

Foi feita uma avaliação da expressão global (Figura 2.12) para caracterizar o padrão geral de expressão durante o crescimento do ovócito incluindo todos os genes analisados. Nessa análise pode-se observar que o padrão de expressão aumenta de acordo com o crescimento do ovócito, sendo possível identificar três grupos distintos, os pré-antrais iniciais (primordial, primário e secundário inicial), com menor expressão, os secundários finais com expressão intermediária, aparecendo como um grupo de transição entre pré-antrais e antrais, e finalmente os antrais, com maior expressão.



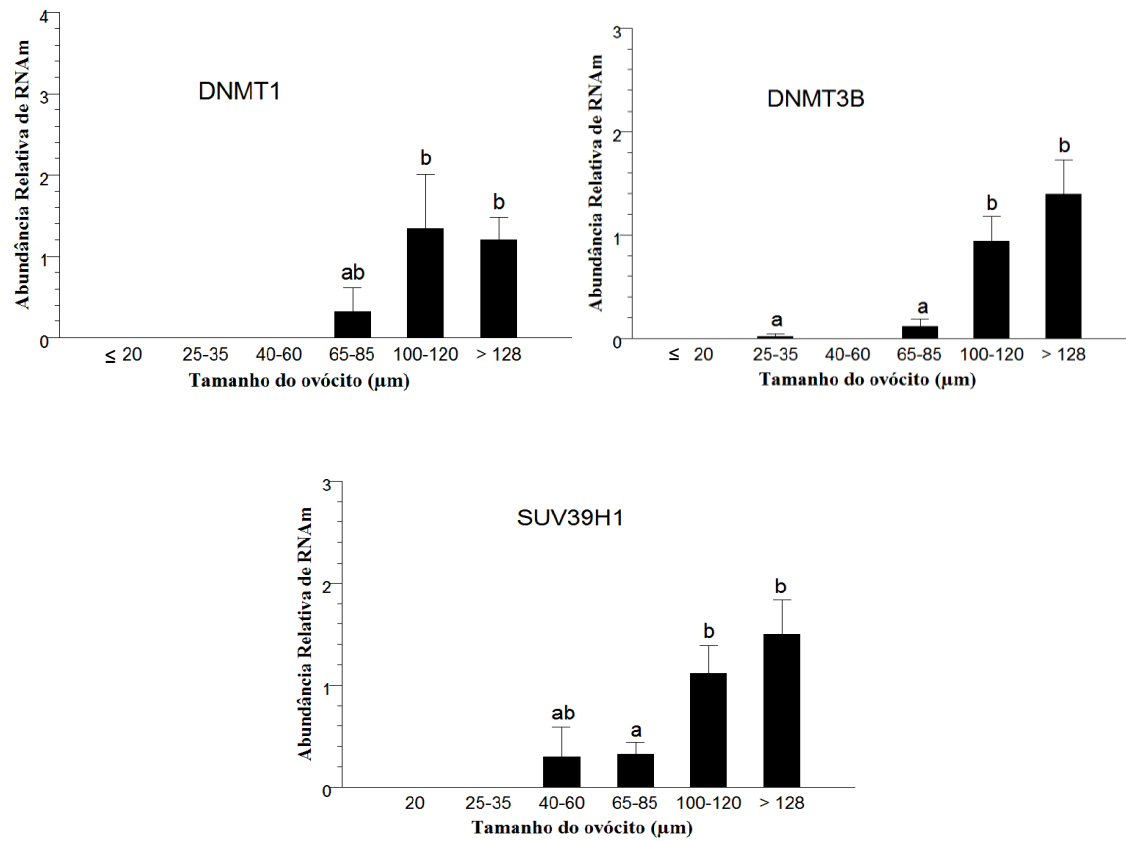
**Figura 2.8.** Nível de transcritos dos genes OOSP1, BMP-15, SLBP e H1FOO analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência.

Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).



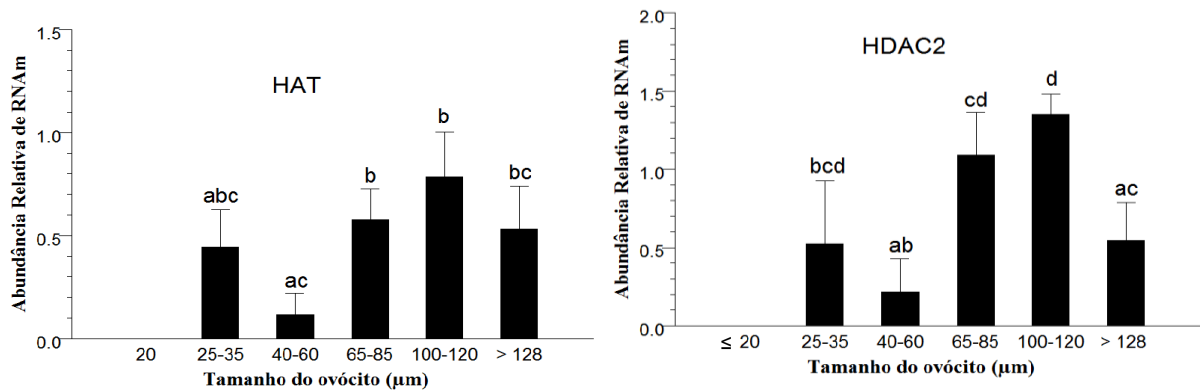
**Figura 2.9.** Nível de transcritos dos genes H2A, H3A e H4 analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência.

Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.10.** Nível de transcritos dos genes DNMT1, DNMT3B e SUV39H1 analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência.

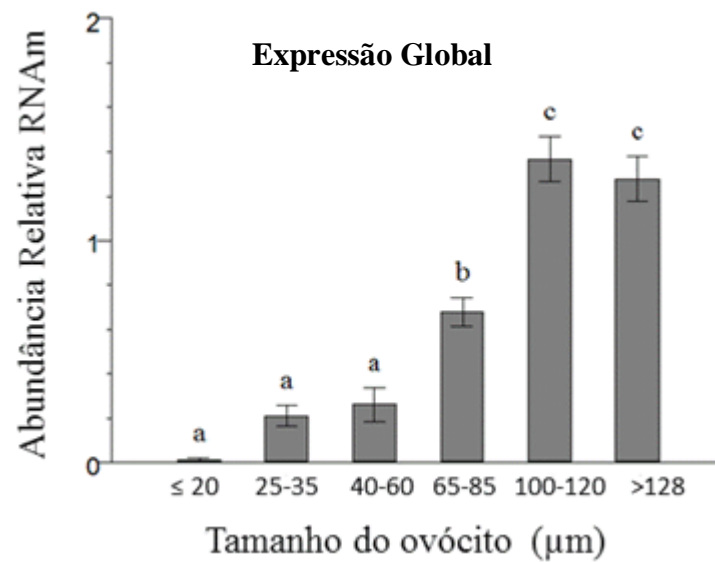
Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.11.** Nível de transcritos dos genes HAT1 e HDAC2 analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Cada grupo foi analisado utilizando-se quatro *pools* de diferentes réplicas. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelo gene *CYC-A* e expressos em relação à amostra controle, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência.

Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).





**Figura 2.12.** Soma da quantidade relativa de RNAm de todos os genes analisados (HIFOO, H2A, H3A, H4, SLBP, OOSP1, DNMT1, DNMT3B, HAT1, HDAC2, SUV39H1 e BMP-15) em ovócitos imaturos obtidos de folículos primordiais ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ), primários (25-35  $\mu\text{m}$ ), secundários iniciais (40-60  $\mu\text{m}$ ), secundários finais (65-85  $\mu\text{m}$ ), antrais iniciais (100-120  $\mu\text{m}$ ) e antrais finais ( $> 128 \mu\text{m}$ ) de fêmeas *Bos taurus indicus*. Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Discussão

No presente estudo foi analisado o perfil de expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário, utilizando ovócitos provenientes de folículos primordiais até folículos antrais. Essa caracterização molecular é importante, pois fornece informações relevantes das principais mudanças que ocorrem durante a ovogênese e que estão relacionadas com a aquisição da competência para o desenvolvimento.

Considerando que os ovócitos das diferentes categorias de folículos pré- antrais foram coletadas de acordo com o seu tamanho, e não com tamanho e/ou morfologia do folículo, um pré-experimento foi realizado. Esse teve por objetivo caracterizar o tamanho dos ovócitos isolados das diferentes categorias de folículos pré-antrais e assim confirmar o tamanho de ovócitos a serem coletado para cada categoria. Isso foi necessário, pois os relatos encontrados na literatura apresentam medidas realizadas em cortes histológicos e não em ovócitos isolados.

Como esperado, o crescimento do tamanho dos ovócitos acompanhou o desenvolvimento folicular. Apesar de estatisticamente diferente, o incremento observado no tamanho do folículo entre o estágio primordial e o primário foi superior ao aumento observado no tamanho do ovócito para essas duas categorias de folículos. A média encontrada para folículos e ovócitos de todos os grupos foram semelhantes aos relatados em outros estudos (Braw-Tal & Yossefi., 1997; Lucci et al., 2002; Kacinkis et al., 2005), que avaliaram folículos e ovócitos primordial, primário e secundário inicial. A diferença entre os resultados no que se refere a variação entre o valor mínimo e máximo de folículos e ovócitos, com uma tendência a ser menor no presente trabalho pode ser explicada pelo método de obtenção dos mesmos. Todos os resultados relatados na literatura foram obtidos a partir de cortes histológicos que envolvem fixação do material, processamento de corte e avaliação *in situ* dos folículos. Em contraste, os dados apresentados nesse trabalho foram obtidos por isolamento do folículo e seu respectivo ovócito, ou seja, a retirada do folículo do tecido ovariano faz com que ocorra uma acomodação tridimensional, permitindo uma avaliação correta do seu tamanho.

Para a caracterização do perfil molecular foi avaliada a expressão de doze genes (OOSP1, BMP15, H3A, H4, H2A, H1FOO SLBP, DNMT1, DNMT3A, SUV39H1, HAT1 e HDAC) nos ovócitos em crescimentos que foram selecionados devido a sua participação em

atividades críticas que ocorrem durante a gametogênese ou foram citados na literatura como genes candidatos à competência.

Apesar da expressão diferencial de vários genes ter sido relacionada com a competência do ovócito em bovinos (Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Racedo et al., 2008; Caixeta et al., 2009), os mecanismos celulares envolvidos na aquisição dessa competência, assim como as características moleculares dos ovócitos competentes ainda não são conhecidos. Portanto, uma das alternativas para se estudar competência é caracterizar como ocorre a formação desses estoques e em que fase da ovogênese e folículogênese estes se completam.

Fatores intraovarianos como a OOSP1 e a BMP15 foram avaliados quanto ao seu perfil de expressão durante o crescimento do mesmo (Yan et al., 2001). Estudos mostraram que nos bovinos, a OOSP1 é expressa exclusivamente no ovócito podendo ser considerada um bom marcador ovócito-específico (Tremblay et al., 2006). Portanto, é possível que essa proteína tenha alguma função importante durante a maturação e/ou no início do desenvolvimento embrionário, o que justificaria o seu acúmulo de RNA e a formação de estoques nos ovócitos.

Neste estudo a expressão da OOSP1, só foi detectada em ovócitos a partir de folículos secundários, apresentando aumento significativo em ovócitos de folículos antrais. Em contraste, em camundongos, Yan e colaboradores (2001) e Mano e colaboradores (2002) encontraram expressão da OOSP1 já a partir de ovócitos de folículos primários, aumentando de acordo com o crescimento do ovócito e diminuindo a partir da maturação. Analisando o nível de transcritos em ovócitos de folículos antrais, a expressão da OOSP1 se manteve estável não sendo observada diferença na quantidade de transcritos entre ovócitos de folículos pequenos e grandes. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Caixeta e colaboradores (2009), que avaliando a expressão diferencial da OOSP1 em ovócito provenientes de folículos antrais de diferentes tamanhos, não detectaram diferença. Esses resultados em conjunto indicam que, os estoques da OOSP1 se acumulam antes do período de aquisição da competência em bovinos.

Outra substância secretada pelo ovócito é a proteína morfogênica do osso (BMP) que pertence à superfamília dos fatores de transformação do crescimento (TGF $\beta$ ) e participa de eventos regulatórios de proliferação celular e diferenciação em vários órgãos, principalmente no ovário. Várias BMPs, estão envolvidos na folículogênese, crescimento e diferenciação folicular, expansão do cumulus, ovulação e luteinização (Hunter et al., 2005). Dentre essas

BMPs, a BMP-15, foi considerada como um fator expresso pelo ovócito, mas com papel essencial nas células da granulosa (Wu et al., 2002).

Os resultados do presente estudo, mostraram a presença de RNAm para a BMP15 em ovócitos desde folículos primários até folículos antrais finais, com aumento significativo da expressão nas categorias de folículos antrais. Da mesma forma, em camundongos, a BMP-15 é expressa desde o folículo primário até folículos antrais (Sanchez et al., 2009). Além disso, observamos que a expressão manteve-se estável entre as categorias antrais, corroborando com os resultados de Mourot e colaboradores (2006) e Caixeta e colaboradores (2009). Esses autores verificaram que a expressão do gene BMP-15 não foi afetada pelo tamanho do folículo antral, momento da clivagem ou condição de maturação, sendo similar em ovócitos com diferentes competências. Apesar das células da granulosa fornecer nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento do ovócito, este afeta o desenvolvimento e a função folicular, começando com a formação do folículo primordial até os folículos pré-ovulatórios (Su et al., 2004). Isso justifica o aparecimento de transcritos já no estágio de folículo primário, momento em que começa o maior incremento no crescimento do ovócito, sendo essencial que esse secrete proteínas que estimulem o crescimento folicular.

Em todas as células eucarióticas, as informações genéticas são parcialmente compactadas no núcleo através dos nucleossomas. O nucleossoma consiste em 146 pares de bases de DNA amarrados em um octâmero de proteínas histonas (H2A; H2B, H3 e H4) e a histona H1, que se une ao exterior do octâmero para estabilizar as fitas de DNA, sendo a unidade básica da cromatina (Furuya et al., 2007). Em células somáticas, os níveis de RNAm de histonas estão altamente relacionados com a replicação do DNA, pois essas não têm capacidade de estocar essa proteína, enquanto os ovócitos estocam as histonas na forma de RNAm e de proteínas, para serem utilizadas no desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006). Estudos tem relatado a relação entre os estoques de histonas à competência dos ovócitos em bovinos. Entretanto, não existe consistência nos resultados, sendo que em alguns estudos a H2A (Caixeta et al., 2009; Mourot et al., 2006) e em outros a H3 (Fair et al., 2004) foram identificadas como marcadores de competência. Daí a importância de se avaliar mais profundamente o perfil de expressão dessas proteínas durante a ovogênese.

Além da H2A, H3A e H4, também foi avaliada neste trabalho a expressão da H1FOO. A H1FOO é a histona H1 específica de ovócito (McGraw et al., 2006), a qual está envolvida no controle da expressão gênica durante a ovogênese e embriogênese inicial (Tanaka et al.,

2003; Tanaka et al., 2005; McGraw et al., 2006) e na substituição das protaminas do espermatozóide por histonas após a fecundação (Misusawa et al., 2010).

No presente estudo foi verificado que os transcritos da H1FOO aumentaram de acordo com o tamanho do ovócito, sendo maior em ovócitos obtidos de folículos antrais do que folículos pré-antrais primário e secundário inicial. De todas as histonas avaliadas a H1FOO foi a que mostrou um perfil com aumento mais gradativo da expressão durante o crescimento do ovócito. Assim como as demais histonas, os estoques de RNA dessa proteína já estão completos no estágio de folículo secundário final antes da fase antral, pois se mantém estável a partir desse estágio. Os resultados desse trabalho corroboram os de Caixeta e colaboradores (2009), em que a quantidade de transcritos permaneceu inalterada entre ovócitos de folículos antrais pequenos e grandes. Em camundongos, os transcritos da H1FOO foram detectados em ovócitos de folículos primordiais, e aumentaram em ovócitos de folículos primários e secundários. A presença da proteína avaliada por imunohistoquímica também foi demonstrada em ovócitos humanos durante toda a ovogênese, incluindo aqueles de folículos primordiais (Misusawa et al., 2010). Esses resultados sugerem que a expressão dessa proteína pode estar associada ao processo de ativação do folículo primordial (Tanaka et al., 2005). Entretanto, o mesmo não foi observado no presente estudo, pois a presença de transcritos não foi detectada em ovócitos de folículos primordiais. O motivo da diferença encontrada entre os resultados é difícil de ser identificada até pela inexistência de outros trabalhos que relatem esse tipo de avaliação em ovócitos bovinos. Entretanto, é bem possível que a diferença entre as espécies estudadas possa ser a responsável pela variação observada entre os trabalhos.

A H3A foi o único gene cuja expressão já foi detectada em ovócitos obtidos de folículos primordiais. Além disso, a abundância de transcritos para esse gene não diferiu entre ovócitos de vários estágios de crescimento sendo que seus estoques já estavam estabelecidos no estágio de folículo primário. Considerando somente a fase antral, esses resultados são similares aos de Caixeta e colaboradores (2009), que observaram que no estágio de folículo antral pequeno a quantidade de transcritos já estava estável. Entretanto, diferem dos resultados encontrados por Fair e colaboradores (2004), em que altos níveis de expressão da H3A foram relacionados com a competência do ovócito, ou seja, ovócitos antrais competentes e incompetentes apresentaram diferença na quantidade de transcritos para essa histona. Um outro fator intrigante é a razão pela qual a detecção da expressão assim como o acúmulo de transcritos para essa histona ocorre mais cedo na ovogênese do que para as outras histonas.

O perfil de expressão da H4, não foi detectado nos ovócitos de folículos primordiais e a estabilização na quantidade de transcritos ocorreu a partir dos de folículo secundário inicial.

A formação de estoques antes da fase antral pode ser confirmada em estudos que avaliaram a expressão desse gene em folículos antrais de vários tamanhos (Caixeta et al., 2009).

A histona H2A, assim como a H3, apresentou o mesmo padrão de expressão entre os ovócitos das categorias de folículos primários à antral final, coincidindo com o padrão de expressão encontrado nas demais histonas avaliadas nesse trabalho. Surpreendentemente, não foi observado um aumento da expressão entre os ovócitos de folículos antrais pequenos e grandes, já que estudos tem mostrado expressão diferencial da H2A quando ovócitos competentes e incompetentes foram avaliados (Mourot et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Foi levantada a possibilidade de que o método utilizado para a coleta dos ovócitos tenha influenciado o resultado. Isso porque os ovócitos coletados neste estudo foram isolados após um processo mecânico e posteriormente enzimático, diferente dos demais estudos em que os folículos foram isolados por dissecação e posteriormente com o seu ovócito retirado. Para eliminar essa possibilidade, outro grupo de ovócitos obtidos de folículos isolados por dissecação (Caixeta et al. 2009), foi analisado quanto à expressão do gene da H2A, mas o resultado foi igual. Considerando que a H2A tem pelo menos três variantes (Vigneault et al., 2006) uma outra possibilidade para explicar a discrepância nos resultados seria a utilização de variantes distintas, entretanto no presente trabalho e no de Caixeta et al. (2009) foram utilizados “primers” para a mesma isoforma da proteína (H2A.z.), o que não justifica as diferenças encontradas.

Dada a importância das histonas, este estudo também avaliou o padrão de expressão da *Stem-Loop Binding Protein* (SLBP) que é uma proteína que se liga na região de stem-loop de RNAm de histonas protegendo-o da degradação. Portanto, possui um papel central na ativação, estabilização e tradução de RNAs de histona (Allard et al., 2002). O nível de transcritos da SLBP, neste trabalho, aumentou de acordo com o tamanho do ovócito, sendo mais expressos entre os grupos de ovócitos provenientes de folículos antrais inicial e final do que nos ovócitos correspondentes à categoria de folículos pré antrais. Portanto, o comportamento desse gene foi diferente do das histonas, pois apresentou incremento na passagem da fase pré-antral para a antral. Considerando-se que a SLBP é um gene importante para o estoque das histonas, poderia-se esperar que acompanhasse o perfil de expressão dessas proteínas. É possível que nos estágios iniciais em que está ocorrendo a formação dos estoques de histonas uma maior atividade dessa proteína seja necessária e, portanto maior taxa de tradução. Desta forma, dificultando a formação de um estoque de RNAm. Outro fator que deve ser levado em conta é que o mecanismo de estoque das várias histonas pode ser diferente entre elas. Essa hipótese é baseada em estudo utilizando camundongos transgênicos que foram

manipulados para alterar a quantidade de SLBP em ovócitos, e isso afetou o acúmulo de RNAm das histonas H3 e H4, mas não das histonas H2A e H2B (Arnold et al., 2008).

Estudos têm indicado que modificações epigenéticas são as principais responsáveis pelas modificações na dinâmica da estrutura da cromatina e na consequente regulação da expressão gênica (Xue et al., 2010). Essas modificações epigenéticas envolvem dois principais eventos, a metilação do DNA e as modificações nas histonas. Todas essas modificações são catalizadas pelas mais diversas enzimas, como as DNMTs, HMTs, HATs e HDACs (Bernstein et al., 2007).

Os padrões de metilação são estabelecidos durante a gametogênese e esse processo é fundamental para o desenvolvimento. Portanto, o conhecimento do perfil de expressão de enzimas responsáveis por esse evento é essencial para o entendimento da formação de gametas de qualidade. No presente estudo foi avaliada expressão da DNMT3b, que catalisa a metilação “de novo” e a DNMT1 responsável pela metilação de manutenção.

Os resultados mostraram que apesar da presença de transcritos para DNMT3b terem sido detectada em ovócitos de folículos primários e secundários finais, o maior acúmulo ocorreu na transição da fase pré-antral e antral. Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos por Lucifero et al. (2007), que avaliando a expressão da DNMT3b em ovócitos de folículos primordiais, secundários e antrais observaram um aumento significativo na expressão nos de folículos antrais. Quando esses mesmos autores comparam somente dois tamanho de ovócitos pequenos (20-50  $\mu\text{m}$ ) e grandes (60-80  $\mu\text{m}$ ) observaram um aumento significativo na expressão de acordo com o diâmetro do ovócito.

Em relação a DNMT1, o padrão de expressão foi semelhante a da DNMT3b, entretanto nenhum transcrito foi detectado nos ovócitos de folículos primários. Apesar da DNMT1 ser uma enzima responsável pela manutenção da metilação atuando na fita hemimetilada após a replicação, esses resultados mostraram que ela também está envolvida no processo de metilação do genoma do ovócito durante a gametogênese. Esses resultados corroboram os de Lodde et al., (2009), que avaliaram ovócitos provenientes de folículos pré-antrais final, antral inicial e antral médio em bovinos e observaram a presença de transcrito nos ovócitos de todas as categorias.

Portanto, este estudo mostrou expressão semelhante da DNMT3a e DNMT1 atingindo o máximo no estágio de folículo de 1-3mm, e permanecendo estável em ovócitos de folículos maiores e, desta forma mais competentes. Sabe-se que nas células germinativas, o padrão de metilação é apagado no início do desenvolvimento e que durante a gametogênese esse deve ser reestabelecido. Sendo assim, os baixos níveis de expressão dessas enzimas no

período pré-antral podem ser devido a que todo o RNA transcrito esteja sendo traduzido para permitir que a metilação ocorra. E, somente no estágio antral é que começa a ocorrer um maior acúmulo desses transcritos. Isso levanta a possibilidade de que essas enzimas devem ser estocadas como RNAs maternos que terão um papel importante na metilação de novo ou de manutenção durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Uma outra explicação para a expressão tardia das *DNMT1* e *DNMT3B* pode estar relacionada ao fato de que os ovócitos precisam ativar a transcrição de alguns genes durante o crescimento, para que num estágio mais avançado as enzimas responsáveis pela metilação ou por estrutura de heterocromatina iniciem o processo de compactação de certas regiões do genoma. Esse fato pode ser comprovado por resultados de nosso laboratório que mostraram que ovócitos obtidos de folículos de 1 a 3 mm, diferente dos de > 8 mm ainda não completaram seu padrão de metilação (Fagundes et al., 2011).

Durante o crescimento do ovócito, vários eventos epigenéticos devem ocorrer simultaneamente. Além do reestabelecimento do padrão de metilação do DNA, as várias modificações nas histonas como a acetilação e metilação e, posteriormente desmetilação, devem ocorrer. Essas modificações envolvem as enzimas HMTs e o balanço entre HATs e HDAC e a dinâmica epigenética funcional, onde a HDAC desacetila as caudas das histonas, as quais se aproximam da fita de DNA com carga negativa, para que as *DNMTs* possam metilar o DNA e aumentar a compactação do material genético e reprimir a transcrição local (Lugre et al, 1997).

As HATs, acetilam resíduos de aminoácidos na cauda amino-terminal de histonas, causando uma redução na sua afinidade pelo DNA, aumentando a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA molde (Brownell & Allis., 1996). A expressão dessa enzima, neste estudo, foi detectada a partir do grupo de ovócitos provenientes de folículos primários e manteve a expressão até folículo antral, havendo variação entre ovócitos de folículos secundário inicial e os de folículos secundário final e antral inicial. O mesmo padrão não foi observado em ovócitos de camundongos em que os níveis de transcrito foram semelhantes em ovócitos de diferentes fases de crescimento (Kageyara et al., 2007). Considerando que normalmente, quando a histona encontra-se acetilada, o DNA está mais acessível aos fatores de transcrição (Segev et al., 2001) era esperado que durante o período de crescimento ovocitário, em que ocorre grande atividade transcricional, as histonas sejam acetiladas requerendo atividade da HAT. A acetilação é um processo reversível e a histona desacetilase (HDAC) é responsável pela reação oposta que geralmente resulta em repressão transcricional



(Ma & Schultz., 2008). Portanto, o nível de acetilação das histonas é controlado pelo balanço entre a atividade da HAT e da HDAC.

A análise da expressão da HDAC em ovócitos de diferentes fases de crescimento mostrou um perfil similar ao da HAT, com excessão do estágio de antral final em que uma diminuição na expressão da HDAC foi observada. Se o balanço entre a atividade dessas duas enzimas é necessario para que as histonas sejam mantidas acetiladas, é compreensível que o padrão de expressão seja similar. De fato, Endo e colaboradores (2008) sugerem que as proteínas HAT1 e HDAC podem também possuir um padrão de expressão similar. A medida que o ovócito adquire a competência e se aproxima da retomada da meiose as histonas começam a ser desacetiladas, pelo aumento da atividade das HDAC, e, assim ocorre a repressão da transcrição. Os ovócitos de folículos antrais maiores estão mais proximos da ovulação e são mais competentes do que os de folículos menores, portanto a diminuição na expressão da HDAC observada nessa categoria pode ser devido justamente a um aumento na tradução, visto que a atividade dessa enzima é necessária para que o ovócito pare de transcrever e se prepare para a retomar a meiose. Desta forma, esse é o unico gene estudado que apresentou uma relação entre mudança da expressão e competência.

A metilação de histonas também está relacionada à configuração da cromatina e influencia vários processos relacionados com a transcrição e reparo do DNA. A metilação da H3/K9, por ação da histona lisina metiltransferase *SUV39H1*, por exemplo, está relacionada à repressão da cromatina e é suficiente para induzir a repressão da transcrição. Neste experimento, a expressão da *SUV39H1* em ovócitos de bovinos, ocorreu a partir de folículo secundário inicial, sendo que um aumento significativo no nível de transcritos foi observado entre ovócitos de folículo secundário final e aqueles de folículos antrais. Esses resultados discordam dos obtidos por Racedo e colaboradores (2009), onde a quantidade de RNAm de *SUV39H1* de bovinos foi significativamente maior no grupo de ovócitos provenientes de folículos de 2-8 mm do que no de folículos menores do que 2mm. Convém ressaltar, entretanto, que em nosso estudo as populações de ovócitos foram bem definidas, ou seja, oriundos de folículos de 1-3mm e de folículos de acima 6mm. Além disso, no estudo de Racedo e colaboradores (2009), os ovócitos foram puncionados e não isolados, o que muitas vezes pode levar à erro, pois o tamanho do folículo na superfície do ovário pode não representar o seu tamanho real.

A histona lisina metiltransferase *SUV39H1* estabelece a trimetilação da H3K9 em regiões pericêntricas dos cromossomos (Schotta et al, 2002). Acredita-se que HDACs podem recrutar a *SUV39H1* para os nucleossomos (Vaute et al. 2002), ou seja, a HDAC desacetila as

histona e recruta *SUV39H1*, para que metile o resíduo de lisina das histonas tornando a cromatina inativa. Portanto, as modificações das histonas e a metilação do DNA são processos interdependentes (Li, 2002), de forma que as DNMTs interagem com as histonas desacetilases (HDACs) e metilam o DNA, estabelecendo assim uma estrutura de cromatina mais condensada. O DNA hipermetilado e as histonas desacetiladas em determinadas localizações do genoma então, reprimem a transcrição.

Na tentativa de ter uma visão geral do perfil de expressão de genes durante o crescimento do ovócito foi feita uma análise utilizando a soma da expressão de todos os genes estudados em cada grupo de ovócitos. Essa análise mostrou que a quantidade de transcritos total foi aumentando de acordo com o crescimento do ovócito, podendo se identificar três grupos distintos, os grupos correspondentes aos pré-antrais iniciais (primordial, primário e secundário inicial), um grupo intermediário, correspondente aos ovócitos de folículos secundário finais, e o grupo de antrais, que incluem os antrais iniciais e finais. Essa análise mostrou que a formação de estoques de RNAm ocorre antes do ovócito adquirir competência. Esse modelo reflete o resultado obtido para a maioria dos genes estudados, com exceção das histonas que apresentaram nível de transcritos estável já na fase pré-antral. É importante ressaltar que os níveis de transcritos fornecem uma medida da quantidade de RNA, que pode ser afetado não só pelos níveis de transcrição, mas também pelo processamento e degradação do RNAm. Portanto, como nenhuma análise da presença de proteínas foi realizado, é difícil traçar um modelo do mecanismo de acúmulo e utilização de transcritos durante a ovogênese.

Ficou claro que o nível de expressão da HDAC é um indicativo de competência ovocitária, o que é facilmente explicado considerando que ovócitos competentes completam o seu crescimento e cessam a transcrição em preparação para a maturação e fecundação.

## **6 CONCLUSÕES**

Em conclusão, para os doze genes analisados, pode se afirmar que todos os transcritos se acumulam antes da aquisição da competência e que apenas a HDAC pode ser considerada como marcador para a competência ovocitária. Entretanto, para se obter um perfil completo do padrão de expressão gênica e melhor entender como ocorre a formação de estoques de transcritos durante a ovogênese, seriam necessários mais estudos avaliando também a expressão das proteínas codificadas pelos genes estudados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, P., CHAMPIGNY, M. J., SKOGGARD S, ERKMANN, J. A., WHITFIELD, M.L., MARZLUFF, W. F., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. **Journal of Cell Science**, v.115, p.4577-4586, 2002.

ARNOLD, D. R., FRANÇON, P., ZHANG, J., MARTIN, K., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein expressed in growing oocytes is required for accumulation of RNAs encoding histones H3 and H4 and for early embryonic development in the mouse. **Developmental Biology**, v.313, p.347-358, 2008.

BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The Mammalian Epigenome. **Cell Review**, v. 128, p. 669–681, 2007.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BROWNELL, J.E., ALLIS, C.D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.6, p. 176-184, 1996.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on RNAm expression un cumulus cells and oocytes of *Bos taurus indicus*:an approach to identify markers genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.655-664, 2009.

CHOHAN, K.R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.373-380, 2004.

DODE, M.A.N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.288-297, 2006.

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

ENDO, T.; NAITO, K.; AOKI, F.; KUME, S.; TOJO, H. Changes in histone modifications during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.71, p.123–128, 2008.

FAGUNDES N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA V.A.; CAIXETA E.S. MACHADO G.M.; RODRIGUES F.C.; MELO E.O.; DODE M.A.N.; FRANCO M.M. **Molecular Human Reproduction**, vol. 17. p.85-91, 2011.

FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D., MOSS, C.; MARTIN, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Analysis of differential maternal RNAm expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.136–144, 2004.

FURUYA, M.; TANAKA, M.; TERANISHI, T.; MATSUMOTO, K. HOSOI, Y.; SAEKI, K.; ISHIMOTO, H.; MENIGISHI, K.; IRITANI, A.; YPSHIMURA, Y. H1foo is indispensable for Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.895-902, 2007.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique Technique**, v.24, p.413-423, 2005.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GU, L.; WANG, Q.; SUN, Q.; Histone modifications during mammalian oocyte maturation. Dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle**, v.9, p.1942-1950, 2010.

HIURA, H.; OBATA, Y.; KOMIYAMA, J.; SHIRAI, M.; KONO, T. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. **Genes to Cells**, v.11, p.353-361, 2006.

HUNTER, M.G., BRAKIN, V., QUINN, R.L., FERGUSON, E.M., EDWARDS, S.A., ASHWORTH, C.J., Oocyte-somatic cell-endocrine interactions in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 371-384, 2005.

HUSSEIN, T.S., FROILAND, D.A., AMATO, F., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B., Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal Cell Science*, v. 118, p. 5257-5268, 2005.

KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A, BÁO, S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos taurus indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.45-57, 2005.

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.

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

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, v.3, p.662-673, 2002.

LODDE, V.; MODINA, S.C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I.; LUCIANO, A. M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. **European Journal of Histochemistry**, v.53, p.199-208, 2009.

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

LUCCI, C.M.; RUMPF, R; FIGUEIREDO, JR, BÁO, S.N. Zebu (*Bos taurus indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.15 p.1467-1483, 2002.

LUCCIFERO, D.; LA SALLE, S.; BOURC'HIS, D.; MARTEL, J.; BESTOR, T.H.; TRASLER, J.M. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. **BMC Developmental Biology**, v.7 p.36, 2007.

LUGRE, K, MADER AW, RICHMOND RK, SARGENT DF, RICHMOND TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389,p. 251-260, 1997.

MA, P.; SCHULTZ, R.M. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. **Developmental Biology**, v.319, p.110–120, 2008.

MANO, H.; NAKATANI, S.; AOYAGI, R.; ISHII, R.; IWAY, Y.; SHIMODA, N.; JINCHO, Y.; HIURA, H.; HIROSE, M.; MOCHIZUKI, C.; YURI, M.; HYOCK, IM R.; FUNADA-WADA, U.; WADA, M. IF3, a novel cell-differentiation factor, highly expressed in murine liver and ovary. **Biochem Biophys Res Commun**, v.297, p.323-328, 2002.

MCGRAW, S.; VIGNEAULT, C.; TREMBLAY, K.; SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.692-699, 2006.

MIZUSAWA, Y.; KUJI, N.; TANAKA, Y.; TANAKA, M.; IKEDA, E.; KOMATSU, S.; KATO, S.; YOSHIMURA, Y. Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. **Fertility and Sterility**, v.93, p. 1134-1141, 2010.

MONTI, M.; CARAGNA, S.; REDI, C.; ZUCOTTI, M. Gonadotropins affect oct-4 gene expression during mouse oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p. 685-691, 2006.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal RNAm levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1367-1379, 2006.

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. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.731-743, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.2002-2007, 2001.

PRATHER, R.S.; ROSS, J.W.; ISOM, S. C.; GREEN, J.A. Transcriptional, Post-transcriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. **Society Reproduction Fertility Supplement**, v.66, p.165-176. 2009.

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

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; LEPIKHOV, K.; SALAMONE, D.; WALTER, J.; NIEMANN, H. Epigenetic modifications and related RNAm expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.738-748, 2009.



RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, v.339, p.62-66, 2003.

SANCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p.539-550, 2009.

SHARMA, G.T.; DUBEY, P.K.; MEUR, S.K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livestock Science**, v.123, p.300–305, 2009.

SIRARD, A.M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

SCHOTTA, G., EBERT, A., KRAUSS, V., FISCHER, A., HOFFMANN, J., REA, S., JENUWEIN, T., DORN, R., REUTER, G. Central role of drosophila SU(VAR)3–9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. **EMBO Journal**, v. 21, p. 1121–1131, 2002.

SU, Y.Q.; WU, X.; BRIEN, M.J.O.; PENDOLA, F.L.; DENEGRE, J.N.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. **Developmental Biology**, v.276, p.64-73, 2004.

TANAKA, M., KIHARA, M., HENNEBOLD, J.D., EPPIG, J.J., VIVEIROS, M.M., EMERY, B.R. H1FOO is coupled to the initiation of oocyte growth. **Biology Reproduction**, v. 72, p.135-142, 2005.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45, p.101-110, 1996.

- TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MORIN, G.; SIRARD, M.A.  
Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. **Gene**, v.375, p.44-53, 2006.
- VAUTE, O., NICOLAS, E., VANDEL, L., TROUCHE, D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 2, p.475-81, 2002.
- VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1701–1709, 2006.
- XUE, K.; SONG, J.; WEI, H.; CHEN, L.; MA, Y.; LIU, S.; LI, Y.; DAÍ, 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. **Molecular Reproduction & Development**, v.77, p.605–614, 2010.
- WU, X.; MATZUK, M.M. GDF-9 and BMP-15: Oocyte organizers. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v.3, p.27-32, 2002.
- YAN, C.; PENDOLA, F.L.; JACOB, R.; LAU, A.L.; EPPIG, J.J.; MATZUK, M.M. Oosp1 encodes a novel mouse oocyte-secreted protein. **Genesis**, v.31, p.105–110, 2001.