

GENÉTICA E EPIGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE MAMÍFEROS

Simone Cristina Méo Niciura

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, Fazenda Canchim, Caixa Postal 339, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil. Endereço eletrônico: <simone@cnpse.embrapa.br>.

Introdução

Inúmeros estudos visam à compreensão de eventos fisiológicos, celulares, bioquímicos ou moleculares, que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Em relação aos processos moleculares, neste trabalho serão descritas as estratégias genéticas e epigenéticas que controlam e regulam a expressão gênica.

Enquanto a **genética** está associada à sequência do DNA, o termo **epigenética** refere-se às informações reversíveis que são introduzidas nos cromossomos e replicadas estavelmente durante as divisões celulares, mas que não modificam as sequências de nucleotídeos e dessa forma alteram o fenótipo sem mudar o genótipo (KENDREW, 1994). Mais recentemente, a epigenética foi definida como o estudo de processos que produzem um fenótipo herdável, mas que não dependem estritamente da sequência de DNA (LIEB et al., 2006).

Diferenças nos padrões de expressão gênica que resultam no desenvolvimento de órgãos e de tecidos geralmente não ocorrem por modificações na sequência do DNA, mas sim pelo estabelecimento de marcas epigenéticas (REIK, 2007). Assim, as modificações epigenéticas participam de vários processos fisiológicos, como expressão de genes específicos de tecidos, inativação do cromossomo X, inativação do centrômero e regulação do *imprinting* genômico (YOUNG e FAIRBURN, 2000). Denomina-se *imprinting* o evento no qual a expressão de um gene é dependente de sua origem parental – materna ou paterna (WATSON et al., 1992; ALBERTS et al., 1994; JAENISCH, 1997).

Muitos processos passaram a ser melhor compreendidos após a descoberta das modificações epigenéticas que os controlam. O mais intrigante é que tais modificações podem ser influenciadas por fatores ambientais, como dieta, estresse e

agentes químicos, e dessa maneira surge oportunidade para o desenvolvimento de novos medicamentos (YOUNG, 2008). Como exemplo, todas as fêmeas de abelha desenvolvem-se a partir de larvas geneticamente idênticas, mas a dieta exclusiva com geleia real transforma uma operária infértil em uma rainha fértil (YOUNG, 2008). Em camundongos, já foi demonstrado que alimentos ricos em ginesteína e ácido fólico durante a gestação influenciam as marcas epigenéticas e o desenvolvimento até a fase adulta dos descendentes (YOUNG, 2008). Em seres humanos, a ocorrência de *diabetes mellitus* do tipo 2 e a quantidade de massa adiposa corporal de um indivíduo adulto podem ser influenciadas pelas condições nutricionais durante a vida intrauterina (TREMBLAY e HAMET, 2008). As diferenças fenotípicas entre gêmeos idênticos também podem ser atribuídas a efeitos epigenéticos (KAMINSKY et al., 2009).

Com base nessas descobertas, algumas doenças familiares sem causa genética distinta, como esquizofrenia, desordem bipolar, diabetes e câncer, passaram a ser estudadas sob a ótica da epigenética. Assim, a epigenética está envolvida tanto em processos fisiológicos, por exemplo, desenvolvimento embrionário, envelhecimento e regulação do ciclo celular, como na etiologia e na patologia de certas doenças em seres humanos e animais (BONETTA, 2008).

Neste texto, serão abordados os principais eventos genéticos e os principais eventos epigenéticos que ocorrem em momentos específicos do desenvolvimento inicial de embriões de mamíferos: gametogênese, fecundação, ativação do genoma embrionário, formação do blastocisto e inativação do cromossomo X.

Modificações epigenéticas

Dentre as modificações epigenéticas destacam-se a metilação do DNA, as modificações (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, citrulinação, sumoilação e ribosilação) na porção amino-terminal das histonas e o silenciamento associado ao RNA por meio de microRNA (GREGORY et al., 2001; EGGER et al., 2004). Neste texto, será dado destaque às duas primeiras modificações epigenéticas e às modificações mais comuns das histonas: acetilação e metilação.

Os cromossomos eucarióticos são empacotados em estruturas condensadas da cromatina, cuja unidade primária, o nucleossomo, é composta de 147 pares de bases de DNA enoveladas em um octâmero de histonas – H (MIELE et al., 2008). Esse octâmero contém duas cópias de cada uma das proteínas H2A, H2B, H3 e H4

(IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Cada nucleossomo é separado por cerca de 50 pares de bases de DNA, que são empacotadas pela histona *linker* H1 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

O DNA é metilado por meio da ação das DNA-metiltransferases (DNMTs), que depositam um grupamento metila na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina localizada em posição 5' de um resíduo de guanina, transformando-a em 5-metilcitosina. Esse evento epigenético, na região promotora de genes, está relacionado ao silenciamento gênico (ENRIGHT et al., 2003) e, nas regiões diferencialmente metiladas, à regulação da maioria dos genes *imprinted* (FEIL e BERGER, 2007). A citosina quando próxima à guanina (dinucleotídeo CpG) é tipicamente metilada. Em mamíferos, os *clusters* (grupos) de CpG não-metilados são chamados de ilhas CpG, que tendem a se localizar em regiões regulatórias 5' de genes. Em muitos casos de câncer, as ilhas CpG tornam-se hipermetiladas, o que resulta no silenciamento herdável da transcrição dos genes *downstream* – localizados a jusante (BONETTA, 2008).

Na Tabela 1, encontra-se um sumário das possíveis modificações da cauda das histonas. Dentre essas, destacam-se a acetilação, de natureza transitória, e a metilação, marca celular de longa duração (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Tabela 1. Número dos resíduos de lisina (K), serina (S) e arginina (R) nas histonas H2A, H2B, H3 e H4, modificados por acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação.

Histona	Acetilação	Metilação	Fosforilação	Ubiquitinação
H2A	K: 5 e 9	-	S: 1	K: 119
H2B	K: 5, 12, 15 e 20	-	-	K: 123
H3	K: 9, 14, 18 e 23	K: 4, 9, 27, 36 e 79 R: 2, 17 e 26	S: 10 e 28	-
H4	K: 5, 8, 12 e 16	K: 20 R: 3	S: 1	-

Modificada de Whitelaw e Garrick (2005).

A acetilação de histonas neutraliza a carga positiva nos resíduos de lisina (K), de maneira a enfraquecer as interações eletrostáticas entre as histonas e o esqueleto de fosfato do DNA e a promover a expressão gênica. A acetilação de lisina nas histonas H3 e H4 está correlacionada com cromatina ativa ou aberta, pois permite que vários fatores de transcrição tenham acesso aos promotores gênicos (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Assim, a acetilação da lisina 5 na histona H4

(H4K5), que reflete o estado total hiperacetilado da histona H4, e a acetilação de H3K9 e H3K14 ocorrem na região promotora de genes ativos. A acetilação e a desacetilação das histonas são promovidas, respectivamente, pelas histona-acetiltransferases e pelas histona-desacetilases (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

A metilação das histonas pode promover repressão ou ativação gênica, dependendo de qual resíduo de lisina é modificado. Por exemplo, a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79 provoca ativação, enquanto a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 promove silenciamento (TALASZ et al., 2005; SEGA et al., 2007). A metilação de histonas regula a expressão gênica em parte por meio de sua associação à metilação do DNA, uma vez que muitas proteínas envolvidas na metilação do DNA também interagem diretamente com as enzimas metiladoras de histonas: as histona-metiltransferases (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Genética e epigenética da gametogênese e da foliculogênese

O processo de produção das células germinativas, ou gametogênese, é diferente entre machos (espermatogênese) e fêmeas (oogênese). Por exemplo, o suprimento de células germinativas é mantido no macho, enquanto nas fêmeas há diminuição contínua durante toda a vida reprodutiva. Além disso, o número de células germinativas é grandemente aumentado durante a espermatogênese por meio de mitose, enquanto na fêmea, a mitose cessa ao nascimento e a oogênese envolve o desenvolvimento de número limitado de células pré-formadas.

Dentre os genes específicos das células germinativas, destacam-se *ASZ1* e *NOBOX*¹ (MINAMI e TSUKAMOTO, 2006).

Nos genes *imprinted*, para que o padrão de metilação do DNA seja transmitido aos descendentes, é necessário que ele seja estabelecido nos gametas, durante a gametogênese, que é a única fase em que o genoma de origem materna e o genoma de origem paterna estão fisicamente separados (SASAKI et al., 1995). Da mesma forma, é essencial que todos os *imprints* herdados do espermatozoide e todos os *imprints* herdados do oócito sejam “apagados” nas células germinativas do embrião recém-formado, para que o indivíduo produza gametas somente com os padrões de *imprints* relativos ao seu sexo. Portanto, os genes *imprinted* sofrem

¹Nomenclatura gênica de acordo com as normas do HUGO Gene Nomenclature Committee (HUGO, 2009). *ASZ1*: ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1; *NOBOX*: NOBOX oogenesis homeobox.

desmetilação do DNA nas células germinativas primordiais, e o padrão de metilação específico da origem parental volta a ser restabelecido durante a gametogênese, no gameta maduro (RUVINSKY, 1999; REIK et al., 2001).

Durante a gametogênese ocorrem substituições em série da histona *linker* H1. A ligação frouxa da histona H1 à cromatina ocorre nas fases de meiose, enquanto a ligação forte ocorre nas fases de mitose (GODDE e URA, 2009).

Espermatogênese

O processo da espermatogênese consiste na transformação das células germinativas masculinas de espermatogônia a espermatozoide. As células-tronco ou espermatogônias dividem-se várias vezes por mitose e formam os espermatócitos, que sofrem divisão de meiose e resultam nas espermátides. As espermátides passam por modificações estruturais e dão origem aos espermatozoides.

Após a meiose, ocorre aumento da transcrição gênica nas espermátides. Posteriormente, para que ocorra a condensação cromossômica no espermatozoide, as histonas têm de ser substituídas por protaminas. Esse evento é controlado por processos de fosforilação e de desfosforilação – participação do gene *CAMK4*² – e de ativação do sistema de ubiquitinação – gene *UBE2B*³ (SASSONE-CORSI, 2002). Muitos genes expressos durante a espermatogênese utilizam promotores alternativos nas células germinativas masculinas, que também possuem genes homólogos de expressão específica para esse tipo celular (SASSONE-CORSI, 2002).

No espermatozoide, há metilação de DNA no acrossomo, mas ausência de acetilação de histonas, provavelmente devido à condensação cromossômica por protaminas (MAALOUF et al., 2008). A ligação forte da histona H1 à cromatina está associada ao maior nível de condensação cromossômica encontrado no espermatozoide (GODDE e URA, 2009).

Oogênese

A produção de gametas femininos ocorre pela divisão mitótica das células germinativas primordiais, no ovário embrionário, e pela formação das oogônias. Ainda durante o desenvolvimento fetal, a primeira divisão da meiose (meiose I) tem

²*CAMK4*: calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV.

³*UBE2B*: ubiquitin-conjugating enzyme E2B.

início, mas ela é interrompida na fase de dictiatio, e o oócito permanece no estágio de vesícula germinativa por vários meses ou até anos. Assim, ao nascimento, já existe o número máximo de folículos que pode chegar à ovulação. A meiose I, que só é retomada na puberdade após o estímulo pré-ovulatório do hormônio luteinizante, consiste na progressão do estágio de prófase I a metáfase II, ou na maturação, e resulta na ovulação do gameta feminino (oócito). A segunda divisão da meiose no oócito só ocorre após a fecundação.

Durante a maturação, os principais transcritos produzidos no oócito são os receptores de gonadotrofinas – receptor do hormônio folículo-estimulante (*FSHR*) e receptor do hormônio luteinizante e coriogonadotrofina (*LHCGR*), o receptor de conexina 43 (*CX43R*) e os reguladores do ciclo celular, tais como o fator promotor de maturação e suas subunidades de ciclina B e p34^{cdc2}, o *c-mos* pro-oncogene e a proteína-quinase ativada por mitógenos (FERREIRA et al., 2009).

O oócito maduro (em metáfase II) possui a habilidade de reprogramar a cromatina do espermatozoide após a fecundação e de dar suporte ao desenvolvimento até a fase da ativação do genoma embrionário. No oócito em metáfase II destaca-se a expressão de genes associados à pluripotência (*LIN28* e *TDGF1*⁴), à remodelação da cromatina (*CBX1*, *CBX5*, *DNMT3B*, *JARID2*, *SMARCA5* e *TOP2A*⁵), aos fatores de transcrição *zinc finger* (*ZNF84*⁶) e às cascatas de ubiquitinação e de proteossomo (ASSOU et al., 2009). Os genes descritos a seguir também codificam transcritos e proteínas durante a oogênese: *DNMT1o*, *DPPA3*, *HSF1*, *NLRP5*, *NPM2*, *PMS2*, *ZAR1*, *ZFP36L2*⁷ (MINAMI e TSUKAMOTO, 2006), *CPA1*, *CST6*, *PGF*, *POLR2J2* e *RAD52*⁸ (KUES et al., 2008).

Após avaliação da expressão de 86 genes envolvidos na reprogramação epigenética nos oócitos em metáfase II, em comparação à vesícula germinativa, foi detectada diminuição da expressão da DNMT específica de oócito (*DNMT1o*) e

⁴*LIN28*: lin-28 homolog; *TDGF1*: teratocarcinoma-derived growth factor 1.

⁵*CBX1*: chromobox homolog 1; *CBX5*: chromobox homolog 5; *DNMT3B*: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta; *JARID2*: jumonji, AT rich interactive domain 2; *SMARCA5*: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5; *TOP2A*: topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa.

⁶*ZNF84*: zinc finger protein 84.

⁷*DNMT1o*: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1, oocyte-specific; *DPPA3*: developmental pluripotency associated 3; *HSF1*: heat shock transcription factor 1; *NLRP5*: NLR family, pyrin domain containing 5; *NPM2*: nucleophosmin/nucleoplasmin, 2; *PMS2*: PMS2 postmeiotic segregation increased 2; *ZAR1*: zygote arrest 1; *ZFP36L2*: zinc finger protein 36, C3H type-like 2.

⁸*CPA1*: carboxypeptidase A1; *CST6*: cystatin E/M; *PGF*: placental growth factor; *POLR2J2*: polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2; *RAD52*: RAD52 homolog.

aumento de histona-acetiltransferases e de genes de proteínas de ligação de CpG metiladas, que controlam o efeito repressivo da metilação do DNA (OLIVERI et al., 2007).

Quanto às modificações epigenéticas, os oócitos em vesícula germinativa apresentam acetilação em vários resíduos de lisina da histona H4. Após a retomada da meiose I, ocorre diminuição da acetilação simultaneamente à condensação dos cromossomos em metáfase e, no estágio de metáfase II, a acetilação está ausente. Ao mesmo tempo, a metilação do DNA é mantida na região centromérica do oócito em vesícula germinativa e aumenta à medida que os cromossomos se condensam no estágio de metáfase II (MAALOUF et al., 2008). Dessa maneira, a desacetilação de histonas e a metilação do DNA são processos concomitantes à maturação dos oócitos (MAALOUF et al., 2008).

Foliculogênese

O crescimento folicular ocorre de maneira ordenada. A partir do terço inicial do desenvolvimento fetal, há formação dos folículos primordiais por meio de mitose sucessiva das células germinativas. A passagem do estágio de folículo primordial para primário compreende o crescimento e a multiplicação das células da granulosa. A retomada do desenvolvimento folicular para que ocorra a ovulação envolve síntese de RNA, proliferação das células da granulosa, aumento do tamanho do oócito e envolvimento do folículo pelas células da teca. Nessa fase, o hormônio folículo-estimulante atua em sinergismo com o estradiol e, após o pico do hormônio luteinizante, ocorre a ovulação do folículo dominante.

O gene do *helix-loop-helix* básico específico da foliculogênese (*FIGLA*) contribui para o início da foliculogênese no ovário pós-natal; o *NOBOX* participa no desenvolvimento além do estágio de folículo primordial; e os genes do fator 9 de diferenciação do crescimento (*GDF9*) e da proteína 15 morfogênica óssea (*BMP15*), além do estágio de folículo primário (MINAMI e TSUKAMOTO, 2006; BONNET et al., 2008).

Genética e epigenética da fecundação

A penetração do espermatozoide no oócito induz alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular, que culmina em reação cortical, exocitose dos grânulos

corticais, endurecimento da zona pelúcida, bloqueio à polispermia, retomada da meiose, singamia dos pronúcleos e início das divisões mitóticas.

Na fecundação, o espermatozoide liga-se ao receptor ZP3 da zona pelúcida e sofre reação acrossomal. Ao mesmo tempo, a interação com os receptores ZP1 e ZP2 facilita a fusão entre o espermatozoide e o oócito. A reação acrossomal consiste na liberação do conteúdo do acrossoma, composto por diversas enzimas. Dentre essas, a hialuronidase dissolve as células do *cumulus* que circundam o oócito, e a pró-acrosina, convertida em acrosina, digere a zona pelúcida e facilita a penetração do espermatozoide.

Ao mesmo tempo em que o núcleo do oócito retoma a segunda divisão da meiose e se transforma em pronúcleo feminino, a cabeça do espermatozoide sofre descondensação e forma o pronúcleo masculino. O pronúcleo masculino e o pronúcleo feminino migram para o centro do citoplasma, as membranas nucleares se fundem e ocorre a singamia, que recompõe a constituição diplóide do embrião. A seguir, as divisões mitóticas têm início e o número de células no embrião aumenta em progressão geométrica do estágio de duas células até mórula e blastocisto.

Os genomas parentais são altamente assimétricos em modificações epigenéticas do DNA e da cromatina associada. Em relação à metilação do DNA, após a fecundação, ambos os genomas parentais são desmetilados. No desenvolvimento normal de mamíferos, o genoma masculino é rapidamente desmetilado por um mecanismo ativo, que depende de expressão gênica e de síntese proteica, enquanto o feminino sofre desmetilação passiva nas divisões celulares subsequentes (LIU et al., 2004; DING et al., 2008). Essa desmetilação ativa do genoma paterno pode ser importante para iniciar o controle transcricional ou para reduzir os efeitos epigenéticos acumulados pelas células germinativas masculinas (LEPIKHOV et al., 2008).

Em relação à metilação das histonas, na fusão dos gametas, o genoma materno apresenta padrão de metilação herdado do oócito: trimetilação de H3K9 e de H4K20 (PUSCHENDORF et al., 2008). Já no genoma paterno, após a fecundação, ocorre a troca das protaminas por histonas acetiladas que, logo em seguida, tornam-se metiladas em H3K4 (LEPIKHOV et al., 2008).

Quanto à acetilação de resíduos de lisina, após a fecundação há intensa acetilação da histona H4 no pronúcleo masculino e aumento gradativo da acetilação no feminino, pois, nas primeiras horas após a fecundação a cromatina paterna

parece competir com a materna pelo estoque de H4 acetiladas e torna-se mais transcricionalmente ativa (ADENOT et al., 1997; MAALOUF et al., 2008). O nível global de acetilação de histona no gameta masculino e no gameta feminino cai drasticamente após a fecundação, mas aumenta logo em seguida (DING et al., 2008).

A desmetilação do genoma paterno após a fecundação é simultânea ao aumento da acetilação em H4 (MAALOUF et al., 2008). A presença de dimetilação em H3K9 exclusivamente no genoma materno pode protegê-lo contra a desmetilação do DNA imediatamente após a fecundação, assim como a hiperacetilação pode favorecer a desmetilação do genoma paterno (LEPIKHOV et al., 2008).

Genética e epigenética da transição materno-zigótica e da ativação do genoma embrionário

O citoplasma do oócito é o responsável pelo suprimento de RNA mensageiro e de proteínas necessários para manutenção do embrião até a ativação principal do genoma, fase chamada de transição materno-zigótica, na qual o embrião passa a depender da transcrição de seu próprio RNA mensageiro para continuar a se desenvolver (KNIJN et al., 2002; FAVETTA et al., 2004; MEIRELLES et al., 2004). O estágio de ativação do genoma embrionário é variável entre as espécies e ocorre no segundo ciclo celular (estádio de duas células), em camundongos; terceiro a quarto (quatro a oito células), em seres humanos; quarto (oito células), em bovinos e gatos; e quinto (dezesseis células), em coelhos (MEIRELLES et al., 2004).

Apesar de a ativação principal do genoma embrionário bovino ocorrer no estágio de oito células, há centenas de genes que são transcritos antes dessa fase (KUES et al., 2008). Mesmo assim, o perfil de expressão gênica observado entre a fase de oócito e o estágio de quatro células é bem diferente do perfil de expressão observado entre o estágio de oito células e a fase de blastocisto, o que reflete a transição materno-zigótica (KUES et al., 2008). No estágio de duas células, destaca-se a expressão do gene indutor angiogênico 61 rico em cisteína (*CYR61*) e do gene da carboxipeptidase E (*CPE*); e no de oito células, os genes *CLDN4*, *ID2*, *TJP3* e *TP53*⁹ (KUES et al., 2008). Em camundongos, o gene oogenesina – *OOG1* (MINAMI

⁹*CLDN4*: claudin 4; *ID2*: inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein; *TJP3*: tight junction protein 3; *TP53*: tumor protein p53.

e TSUKAMOTO, 2006) e o gene associado à ativação do genoma zigótico 1 – *ZAG1* (MATSUOKA et al., 2008) aparecem no momento da ativação do genoma embrionário. Em outras espécies, já foi descrita a expressão de *EIF1*, *HSPA1A*, *MuERV-L*, *XIST* e *ZRSR1*¹⁰ nessa fase do desenvolvimento (MINAMI et al., 2007).

A assimetria epigenética parental, observada nos pronúcleos e nos cromossomos em clivagem, cessa ao final do estágio de oito células, simultaneamente com a polarização dos blastômeros, e marca o fim da transição materno-zigótica (PUSCHENDORF et al., 2008). O aumento da acetilação de H4 é gradual até o estágio de oito células e, simultaneamente, ocorre a desmetilação do DNA de ambos os genomas parentais (MAALOUF et al., 2008). Portanto, entre a fecundação e o estágio de oito a dezesseis células, em bovinos, e de blastocisto, em camundongos, ocorre a desmetilação global do genoma, exceto nos genes *imprinted* (REIK et al., 2001), conforme descrito anteriormente.

Assim, no estágio de oito células, ocorre pico de acetilação em H4 e redução da metilação do DNA, características epigenéticas de genes ativos, coincidentes com a ativação do genoma embrionário (MAALOUF et al., 2008).

Genética e epigenética da formação do blastocisto

Os oócitos fecundados e em clivagem são transportados pela tuba uterina ao útero, onde atingem o estágio de blastocisto. O blastocisto é o primeiro estágio do desenvolvimento em que há diferenciação celular: a camada externa de células constitui o trofoblasto e a interna, o embrioblasto ou massa celular interna. O trofoblasto dá origem às membranas fetais e ao saco vitelino, enquanto a massa celular interna forma o embrião propriamente dito.

As principais proteínas que participam da polarização e da compactação são os componentes das junções adesivas e firmes, os complexos de divisão (*PAR1*, *PARD3* e *PARD6A*¹¹) e as proteína-quinases atípicas (DURANTHON et al., 2008). Assim, no estágio de mórula, há aumento da expressão de genes do citoesqueleto, da adesão celular e de proteínas de junção celular (CUI et al., 2007). No estágio de blastocisto, há aumento da expressão de genes envolvidos em canais de íons,

¹⁰*EIF1*: eukaryotic translation initiation factor 1; *HSPA1A*: heat shock 70kDa protein 1A; *MuERV-L*: murine endogenous retrovirus-like; *XIST*: X (inactive)-specific transcript; *ZRSR1*: zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 1.

¹¹*PAR1*: partitioning complex 1; *PARD3*: par-3 partitioning defective 3 homolog; *PARD6A*: par-6 partitioning defective 6 homolog alpha.

tráfego de membranas, proteínas carreadoras ou de transferência e metabolismo de lipídeos, provavelmente envolvidos na formação da blastocèle (CUI et al., 2007), e dos genes *FN1*, *KRT18* e *MYL6*¹² (GOOSSENS et al., 2007). A diferenciação entre o trofoblasto e a massa celular interna é marcada pela expressão de fatores de transcrição específicos de linhagem celular: *CDX2*¹³ fica restrito ao trofoblasto, enquanto *NANOG* e *POU5F1*¹⁴ restringem-se à massa celular interna (DURANTHON et al., 2008).

A partir do estágio de oito células, ocorre desacetilação de histona H4 até que no estágio de blastocisto seja observada acetilação diferencial entre os dois tipos celulares: intensa acetilação no trofoblasto e fraca acetilação na massa celular interna, o que sugere maior atividade transcricional no primeiro tipo celular (MAALOUF et al., 2008). Ao mesmo tempo, há aumento da metilação do DNA a partir do estágio de oito células e, no blastocisto, a massa celular interna apresenta maior metilação do DNA do que o trofoblasto (MAALOUF et al., 2008).

Genética e epigenética da inativação do cromossomo X

A inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas ocorre no estágio final de blastocisto e é um mecanismo de compensação de dosagem que equilibra o número de genes entre machos e fêmeas (XUE et al., 2002). Enquanto a inativação do cromossomo X é aleatória nos tecidos embrionários, ela ocorre de maneira *imprinted* nos tecidos extra-embrionários, nos quais somente o cromossomo X de origem paterna é inativado (VERONA et al., 2003).

A inativação do cromossomo X é um processo altamente complexo, fortemente controlado e regulado durante o desenvolvimento (THORVALDESEN et al., 2006). O centro de inativação do cromossomo X contém os genes *XIST* e *TSIX*¹⁵, que atuam na cascata de silenciamento. No cromossomo X ativo, o *TSIX* é expresso na forma de transcrito *antisense* que impede a transcrição do *XIST*, enquanto no cromossomo X inativo, o *XIST* é expresso na forma de RNA não-codificante que se dispersa e cobre o cromossomo inteiro (VERONA et al., 2003; THORVALDESEN et al., 2006). Após o acúmulo de genes *XIST* no cromossomo X

¹²*FN1*: fibronectin 1; *KRT18*: keratin 18; *MYL6*: myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle.

¹³*CDX2*: caudal type homeobox 2.

¹⁴*NANOG*: Nanog homeobox; *POU5F1*: POU class 5 homeobox 1.

¹⁵*TSIX*: *XIST* antisense RNA; *XIST*: X (inactive)-specific transcript.

inativo, há incorporação de histona H2A1.2 no DNA e metilação de H3K27 e H3K9. Todos esses eventos resultam na formação de heterocromatina e no silenciamento transcricional (VERONA et al., 2003; THORVALDESEN et al., 2006).

A metilação do DNA em dinucleotídeos CpG é um sinal epigenético importante que controla a inativação do cromossomo X, pois a metilação na região CpG do gene *TSIX* impede sua transcrição e desencadeia a expressão do gene *XIST* (VERONA et al., 2003; LEPIKHOV et al., 2008). A trimetilação do resíduo de lisina 27 na histona H3 (H3K27me3) é uma modificação envolvida na regulação das etapas iniciais da inativação do cromossomo X, enquanto os eventos tardios incluem redução de metilação em H3K4, desacetilação global, acúmulo de histona H2A e metilação de DNA (WHITELAW e GARRICK, 2005; KONDO et al., 2008). Em comparação ao cromossomo X inativo, o ativo possui maior acetilação das histonas H3 e H4 (KIM et al., 2003).

Conclusão

Os estudos que envolvem a epigenética, evento molecular sob intensa e crescente investigação, podem auxiliar na compreensão de mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos e em vários outros processos fisiológicos. Além disso, podem servir como ferramentas para a elucidação e até para o tratamento ou a prevenção de diversas patologias que ocorrem em seres humanos e em animais.

Referências bibliográficas

- ADENOT, P. G.; MERCIER, Y.; RENARD, J. P.; THOMPSON, E. M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryo. **Development**, v. 124, n. 22, p. 4615-4625, 1997.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1352 p.
- ASSOU, S.; CERECEDO, D.; TONDEUR, S.; PANTESCO, V.; HOVATTA, O.; KLEIN, B.; HAMAMAH, S.; DE VOS, J. A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells. **BMC Genomics**, v. 10, p. 10, 2009.

BONETTA, L. Epigenomics: detailed analysis. **Nature**, v. 454, n. 7205, p. 795-798, 2008.

BONNET, A.; DALBIÈS-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 119-128, 2008.

CUI, X. S.; LI, X. Y.; SHEN, X. H.; BAE, Y. J.; KANG, J. J.; KIM, N. H. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: genes implicated in compaction and blastocoel formation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 2, p. 133-143, 2007.

DING, X.; WANG, Y.; ZHANG, D.; WANG, Y.; GUO, Z.; ZHANG, Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 622-630, 2008.

DURANTHON, V.; WATSON, A. J.; LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 141-150, 2008.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-463, 2004.

ENRIGHT, B. P.; JEONG, B. S.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1525-1530, 2003.

FAVETTA, L. A.; ROBERT, C.; St. JOHN, E. J.; BETTS, D. H.; KING, W. A. p66^{shc}, but not p53, is involved in early arrest of *in vitro*-produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 6, p. 383-392, 2004.

FEIL, R.; BERGER, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 192-199, 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, n. 5, p. 836-848, 2009.

GODDE, J. S.; URA, K. Dynamic alterations of linker histone variants during development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 2-3, p. 215-224, 2009.

GOOSSENS, K.; VAN SOOM, K.; VAN POUCKE, M.; VANDAELE, L.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 64, 2007.

GREGORY, R. I.; RANDALL, T. E.; JOHNSON, C. A.; KHOSLA, S.; HATADA, I.; O'NEILL, L. P.; TURNER, B. M.; FEIL, R. DNA methylation is linked to deacetylation

of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 5426-5436, 2001.

HUGO gene nomenclature committee. Disponível em:
<<http://www.genenames.org/index.html>>. Acesso em: 5 mar 2009.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 229-249, 2009.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends Genet.**, v. 13, n. 8, p. 323-329, 1997.

KAMINSKY, Z. A.; TANG, T.; WANG, S. C.; PTAK, C.; OH, G. H. T.; WONG, A. H. C.; FELDCAMP, L. A.; VIRTANEN, C.; HALFVARSON, J.; TYSK, C.; MCRAE, A. F.; VISSCHER, P. M.; MONTGOMERY, G. W.; GOTTESMAN, I. I.; MARTIN, N. G.; PETRONIS, A. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. **Nature Genetics**, v. 41, n. 2, p. 240-245, 2009.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. 1159 p.

KIM, J. M.; LIU, H.; TAZAKI, M.; NAGATA, M.; AOKI, F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 1, p. 37-46, 2003.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; HERRMANN, D.; van der WEIJDEN, G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v. 124, n. 3, p. 365-375, 2002.

KONDO, Y.; SHEN, L.; CHENG, A. S.; AHMED, S.; BOUMBER, Y.; CHARO, C.; YAMOCHI, T.; URANO, T.; FURUKAWA, K.; KWABI-ADDU, B.; GOLD, D. L.; SEKIDO, Y.; HUANG, T. H. M.; ISSA, J. P. J. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. **Nature Genetics**, v. 40, n. 6, p. 741-750, 2008.

KUES, W. A.; SUDHEER, S.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; LEHRACH, H.; ADJAYE, J.; NIEMANN, H. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19768-19773, 2008.

LEPIKHOV, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAO, R.; YANG, F.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; WOLF, E.; WALTER, J. Evidence of conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. **Epigenetics and Chromatin**, v. 1, n.1, p. 8, 2008.

LIEB, J. D.; BECK, S.; BULYK, M. L.; FARNHAM, P.; HATTORI, N.; HENIKOFF, S.; LIU, X. S.; OKUMURA, K.; SHIOTA, K.; USHIJIMA, T.; GREALLY, J. M. Applying

whole genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, n. 1, p. 1-15, 2006.

LIU, H.; KIM, J. M.; AOKI, F. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. **Development**, v. 131, n. 10, p. 2269-2280, 2004.

MAALOUF, W. E.; ALBERIO, R.; CAMPBELL, K. H. S. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. **Epigenetics**, v. 3, n. 4, p. 199-209, 2008.

MATSUOKA, T.; SATO, M.; TOKORO, M.; SHIN, S. W.; UENOYAMA, A.; ITO, K.; HITOMI, S.; AMANO, T.; ANZAI, M.; KATO, H.; MITANI, T.; SAEKI, K.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MATSUMOTO, K. Identification of ZAG1, a novel protein expressed in mouse preimplantation, and its putative roles in zygotic genome activation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 3, p. 192-197, 2008.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MIELE, V.; VAILLANT, C.; D'AUBENTON-CARAFI, Y.; THERMES, C.; GRANGE T. DNA physical properties determine nucleosome occupancy from yeast to fly. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 11, p. 3746-3756, 2008.

MINAMI, N.; SUZUKI, T.; TSUKAMOTO, S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 4, p. 707-715, 2007.

MINAMI, N.; TSUKAMOTO, S. Role of oocyte-specific genes in the development of mammalian embryos. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 5, n. 3, p. 175-182, 2006.

OLIVERI, R. S.; KALISZ, M.; SCJERLING, C. K.; ANDERSEN, C. Y.; BORUP, R.; BYSKOV, A. G. Evaluation in mammalian oocytes of gene transcripts linked to epigenetic reprogramming. **Reproduction**, v. 134, n. 4, p. 549-558, 2007.

PUSCHENDORF, M.; TERRANOVA, R.; BOUTSMA, E.; MAO, X.; ISONO, K.; BRYCKSZYNSKA, U.; KOLB, C.; OTTE, A. P.; KOSEKI, H.; ORKIN, S. H.; VAN LOHUIZEN, M.; PETERS, A. H. F. M. PCR1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. **Nature Genetics**, v. 40, n. 4, p. 411-420, 2008.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-432, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p.1089-1093, 2001.

RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **Journal of Animal Science**, v. 77, (supl. 2), p. 228-237, 1999.

SASAKI, H.; FERGUSON-SMITH, A. C.; SHUM, A. S.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. Temporal and spatial regulation of *H19* imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development**, v. 121, n. 12, p. 4195-4202, 1995.

SASSONE-CORSI, P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2176-2178, 2002.

SEGA, M. F.; LEE, K.; MACHATY, Z.; CABOT, R. Pronuclear stage porcine embryos do not possess a strict asymmetric distribution of lysine 9 dimethylation of histone H3 based solely on parental origin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 1, p. 2-7, 2007.

TALASZ, H.; LINDNER, H. H.; SARG, B.; HELLIGER, W. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38814-38822, 2005.

THORVALDESEN, J. L.; VERONA, R. I.; BARTOLOMEI, M. S. X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome. **Developmental Biology**, v. 298, n. 2, p. 344-353, 2006.

TREMBLAY, J.; HAMET, P. Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, (suppl. 2), p. S27-S31, 2008.

VERONA, R. I.; MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 237-259, 2003.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. A.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1992. 626 p.

WHITELOW, E.; GARRICK, D. The epigenome: epigenetic regulation of gene expression in mammalian species. In: RUVINSKY, A.; GRAVES, J. A. M. (Ed.). **Mammalian genomics**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 179-200.

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAÍ, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, n.2, p. 216-220, 2002.

YOUNG, E. Strange inheritance. **NewScientist**, v. 199, n. 2664, p. 28-33, 12 jul 2008.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 627-648, 2000.

Literatura consultada

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 2. ed. Wallingford: CABI, 2003. 548 p.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 8. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.

JOHNSON, L.; MCGOWEN, T. A.; KEILLOR, G. E. Testis, overview. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. Academic Press, 1999. v. 4, p. 769-783.