

Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos em foliculogênese

Epigenetic and neo-oogenesis: new concepts on folliculogenesis

M.M. Seneda¹, K.C.F. Silva

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

¹Correspondência: mseneda@uel.br

Resumo

Novas teorias têm sido propostas sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos, desafiando conceitos de mais de 150 anos. A possibilidade de formação contínua de folículos e ovócitos apresenta-se como hipótese extremamente interessante, mas requer ainda novos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente. O estudo da epigenética surge como grande possibilidade para uma melhor compreensão dessas teorias. As variações epigenéticas são dinâmicas, transmitidas entre gerações e guardam relação com o ambiente. O estoque finito de oócitos, a renovação contínua, ou a coexistência de ambos são discutidos neste artigo.

Palavras chave: folículo, meiose, ovócito.

Abstract

New theories have been proposed for the origin and growth of female gametes, challenging concepts of more than 150 years. The possibility of continue formation of follicles and oocytes appears to be very interesting hypothesis, but it still need further works, either to definitely prove or refute its existence. The study of epigenetic comes as a remarkable possibility for a better understanding of these theories. The epigenetic changes are dynamic, passed down between generations and are related with environment. The finite stock of oocytes, the continuous renewal, or co-existence of both are discussed in this paper.

Keywords: follicle, meiosis, oocyte.

Introdução

Para uma expansão sólida de todo o universo tecnológico vinculado à reprodução, a base fundamental de toda a fisiologia feminina é a foliculogênese. Por esta razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. As crescentes aplicações, bem como os múltiplos desafios das biotécnicas de colheita e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, inseminação artificial em tempo fixo e a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), além de técnicas associadas, como a medicina regenerativa, por exemplo, justificam a necessidade do contínuo aprimoramento do conhecimento da fisiologia das fêmeas, envolvendo ovogênese, foliculogênese e desenvolvimento embrionário.

As biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. O Brasil apresenta-se como segundo país em embriões bovinos produzidos *in vivo* e líder mundial dos produzidos *in vitro*, e isto certamente tem relação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional. Para fêmeas Nelore, pode-se admitir maior quantidade de embriões por procedimento com a produção *in vitro* de embriões, quando comparada à colheita e transferência de embriões (Nonato Jr et al., 2004). Além disso, vacas Nelore produzem, em média, 25 ovócitos por sessão de aspiração folicular, valor aproximadamente quatro vezes maior do que a média obtida de vacas de raças europeias. Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas Nelore capazes de produzir centenas de ovócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de até 564 ovócitos obtidos em um único procedimento (Santos et al., 2005).

Igualmente em franco desenvolvimento encontra-se a epigenética, a área do conhecimento que estuda as interações dinâmicas do DNA com as proteínas e grupos químicos presentes no núcleo da célula. Embora as possibilidades de variação da expressão gênica sejam conhecidas há alguns anos, apenas recentemente as interações epigenéticas passaram a ser mais bem compreendidas. No contexto da reprodução, vários aspectos do conhecimento fisiológico, da eficiência de produção e da aplicabilidade do modelo animal nas ciências biomédicas, seriam extremamente beneficiados com um maior conhecimento da epigenética.

Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante. No contexto do estabelecimento da população folicular ovariana, novas teorias têm sido propostas, desafiando conceitos de mais de 150 anos sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos. A neofoliculogênese apresenta-se como hipótese a requerer profundos e sólidos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente.

Neste trabalho, apresentam-se uma revisão dos conceitos clássicos e hipóteses inéditas em foliculogênese. O estoque finito de ovócitos, a renovação contínua, ou a coexistência de ambos são discutidos neste artigo.

Conceitos básicos da foliculogênese

Admite-se que o início da foliculogênese em fêmeas mamíferas ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oogônias. Estas se diferenciam em ovócitos, os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais. Os ovócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I (Soto-Suazo e Zorn, 2005; Van den Hurk e Zhao, 2005). Somente após a ativação folicular, há continuidade do desenvolvimento do folículo primordial e posterior retomada da meiose, no estágio final de desenvolvimento do folículo antral (Eppig et al., 1992). Apesar da importância da ativação folicular para o entendimento da foliculogênese, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda permanecem desconhecidos.

Uma vez recrutado, o folículo primordial passa a folículo primário, cujas células da granulosa apresentam formato cuboide. Uma característica marcante dessa fase é o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do ovócito mantida por todo o desenvolvimento folicular.

Com o aumento do ovócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca e pelo menos duas camadas de células da granulosa de morfologia cúbica, o folículo secundário encontra-se constituído. Ao fim deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada, sendo então iniciados os efeitos amplos do FSH e LH (Van den Hurk et al., 2000).

A etapa seguinte do desenvolvimento consiste no folículo terciário, cuja distinção do anterior ocorre pela multiplicação das camadas de células da granulosa, além da organização completa das células da teca. O FSH tem se revelado como agente fundamental nesta etapa devido à sua ação endócrina e ao seu envolvimento na ação parácrina de fatores de crescimento, como relatado para membros da família FGF, como o FGF-8 (Buratini et al., 2005). Outro grande evento fisiológico que ocorre nesta fase é a formação do antro, que representa um marco importante no estudo do crescimento folicular, pois é precursor dos processos de desvio e dominância folicular.

Além de representar a fase de mais intensa ação gonadotrófica, a presença do líquido folicular viabiliza os estudos ultrassonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* até o destino final do folículo: atresia ou ovulação. A repetição desse processo ao longo da vida pós-natal leva ao declínio progressivo do número de ovócitos, sendo aceita a ausência de células germinativas nos ovários na senilidade (Waldeyer, 1870).

Novos conceitos em foliculogênese

Apesar do conceito sobre o estoque finito e não renovável de células germinativas ser considerado uma premissa básica da fisiologia da reprodução há mais de 150 anos (Bukovsky et al., 2005), Johnson et al. (2004, 2005) apresentaram evidências para propor a revisão deste paradigma, mostrando indícios da continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, pela atuação de células-tronco.

Existem várias populações de células-tronco na medula óssea, com evidências promissoras de potencial de plasticidade, isto é, habilidade de gerar células de outros tecidos, independente do folheto embrionário de origem. Este potencial de plasticidade da célula-tronco parece favorecer a hipótese de neo-oogênese/foliculogênese formulada por Johnson et al. (2004). Esses autores demonstraram a ocorrência de proteínas específicas do início da meiose em ovários de camundongas adultas, o que somente deveria ocorrer durante a fase fetal, de acordo com o conceito atual. No mesmo trabalho, os autores mencionam a reduzida observação de folículos atrésicos como um indicativo de uma expressiva atividade hemodinâmica na gônada feminina, sugerindo um maior dinamismo de trânsito celular nos ovários. Em 2005, Johnson et al. submeteram um grupo de camundongas à esterilização química, relatando ausência de folículos após o tratamento. Em seguida, os animais receberam transfusão de medula óssea e sangue periférico e, uma semana após, folículos viáveis em crescimento foram identificados nos ovários.

A hipótese de Johnson et al. (2004, 2005) tem promovido acirrados debates, sendo contrariada por outros pesquisadores. Nos aspectos clínicos, a ocorrência da menopausa e a inatividade ovariana em fêmeas senis apresentam-se como fenômenos amplamente aceitos. Outras críticas referem-se à ausência de sinais de início e término da primeira prófase meiótica e subsequente fase de diplóteno nos supostos ovócitos derivados de células-tronco. Além disso, o curto período para crescimento dos novos folículos permitiu o questionamento da eficácia da esterilização química. Outro importante aspecto criticado refere-se à estratégia utilizada para avaliação e classificação dos folículos e oócitos. Em um trabalho dessa magnitude, há uma expectativa em relação a técnicas mais elaboradas além da utilização de histologia clássica.

Em um experimento especificamente delineado para aferir a hipótese de Johnson et al. (2004, 2005), Eggen et al. (2006) pesquisaram a renovação folicular por células difundidas pelo sangue em camundongas parabióticas, animais isogênicos unidos cirurgicamente pela lateral do corpo, para uma circulação sanguínea

partilhada. Uma vez que uma das fêmeas era transgênica para uma proteína fluorescente, esperava-se a expressão desta proteína nos ovócitos da outra fêmea, não transgênica. No entanto, mesmo após seis meses testando diversos ensaios experimentais nas camundongas parabióticas, os autores não obtiveram ovulação de nenhum ovócito expressando a proteína fluorescente, contrariando a teoria apresentada por Johnson et al. (2004, 2005).

Apesar da conclusão de Eggan et al. (2006) mencionada acima, alguns detalhes comparativos entre os trabalhos merecem atenção. Enquanto o grupo liderado por Tilly (Johnson et al. 2004, 2005) descreveu a “renovação folicular”, Eggan et al. (2006) declararam a ausência de “ovócitos ovulados”. Ou seja, permanece uma lacuna, referente ao intervalo existente entre a formação e o crescimento de um folículo – aspectos inicial e intermediário – e a presença de um ovócito maduro no oviduto – produto final.

Apesar das oposições à teoria de renovação folicular pós-natal, outros grupos, utilizando diferentes estratégias experimentais, realizaram descobertas bastante promissoras, indiretamente em favor da mesma. Após indução de diferenciação de uma cultura de células-tronco de epiderme de fetos suínos, Dyce et al. (2006) verificaram que algumas dessas células apresentaram marcadores típicos de células germinativas em formação. Posteriormente, foram identificadas estruturas semelhantes a folículos em crescimento, capazes de produzir estrógeno, progesterona e responsivas a estímulos de FSH e LH. Além disso, os autores relataram partenogênese espontânea, com formação de estruturas semelhantes a embriões. O mérito dos resultados de Dyce et al. (2006) refere-se à obtenção da diferenciação a partir de células-tronco fetais, pois células-tronco embrionárias já haviam sido diferenciadas em células germinativas a partir de cultivo de células embrionárias humanas (Clark et al., 2004).

Mais recentemente, Liu et al. (2007) utilizaram ovários de mulheres adultas obtidos cirurgicamente por razões extraovarianas, como anomalias uterinas. Por meio de técnicas de RT-PCR, *Western Blot* e imunohistoquímica, os autores pesquisaram a expressão de alguns dos principais genes envolvidos com a meiose (SCP3, Oct3, Oct4, c-KIT, SCP3, PCNA e KI-67), concluindo não haver indícios da ocorrência de meiose, contrariando, dessa forma, a hipótese de renovação folicular pós-natal.

Tilly e Johnson (2007) prontamente contra-argumentaram a conclusão de Liu et al. (2007), alegando ser a “ausência da evidência” argumento científico insuficiente para refutar a nova hipótese. Segundo os pesquisadores de Harvard, para refutar a nova hipótese, experimentos mais sólidos do que ausência de expressão gênica seriam necessários, especialmente depois de transcorridos quatro anos desde o primeiro artigo apresentando a neofoliculogênese (Johnson et al. 2004).

A partir dos trabalhos de Johnson et al. (2004, 2005), sugerindo a participação de células-tronco provenientes da medula óssea na neo-oogênese/foliculogênese, algumas especulações podem ser feitas. Seria possível ocorrer alguma alteração folicular ou ovariana após autotransferência de medula óssea ou retirada da mesma e reinjeção no mesmo organismo? Quando submetidas a um estímulo, camundongas jovens que sofreram esterilização química apresentariam resposta diferente de camundongas que tiveram esgotamento natural de suas reservas foliculares? Seguindo esse raciocínio, seria a esterilização química um agente para a neofoliculogênese? Sabe-se que mulheres jovens que sofreram esterilização química, quando submetidas a um estímulo, voltaram a produzir folículos.

A Tab. 1 apresenta um resumo de alguns dos principais estudos sobre neo-oogênese em ordem cronológica.

Tabela 1. Cronologia dos principais estudos relacionados à neo-oogênese.

Descrição	Espécie	Autor	Ano
Obtenção de ovócitos a partir de cultura de células-tronco embrionárias	Humana	Clark et al.	2004
Aparecimento de folículos após esterilização química	Murina	Johnson et al.	2004
Surgimento de folículos a partir de células-tronco da medula óssea	Murina	Johnson et al.	2005
Insucesso em gerar novos folículos a partir de camundongas parabióticas	Murina	Eggan et al.	2006
Produção de ovócitos e embriões partenogenéticos a partir de células-tronco de epiderme fetal	Suína	Dyce et al.	2006
Insucesso na identificação de oogênese	Humana	Liu et al.	2007

A teoria da neo-oogênese/foliculogênese é polêmica, afinal, trata-se de um questionamento sobre um conceito amplamente aceito por mais de 150 anos. Os trabalhos atualmente em andamento deverão contribuir para esclarecer melhor a questão.

Epigenética e foliculogênese

A “epigenética” estuda as modificações fenotípicas herdáveis sem alterações na sequência do DNA, ou seja, informações carregadas pelo código genético não vinculadas ao DNA (Cosgrove e Wolberger, 2005). Embora conceitos clássicos sobre epigenética já existam há mais de duas décadas, somente em passado mais recente esta ciência assumiu maiores proporções, graças ao avanço de técnicas moleculares.

Nos eucariotos, a informação genética é armazenada na cromatina, um polímero composto pela associação do DNA com 4 proteínas histonas - H2A, H2B, H3 e H4 - mais uma histona de conexão – H1 (Trotter e Archer, 2007). O conjunto de 147 pares de base do DNA arranjadas ao redor de um octâmero de proteínas histonas constitui o nucleossomo (Fig. 1). Por muito tempo, acreditou-se que o nucleossomo tivesse função apenas estrutural, permitindo a condensação e a organização do DNA no núcleo da célula (Cosgrove e Wolberger, 2005).

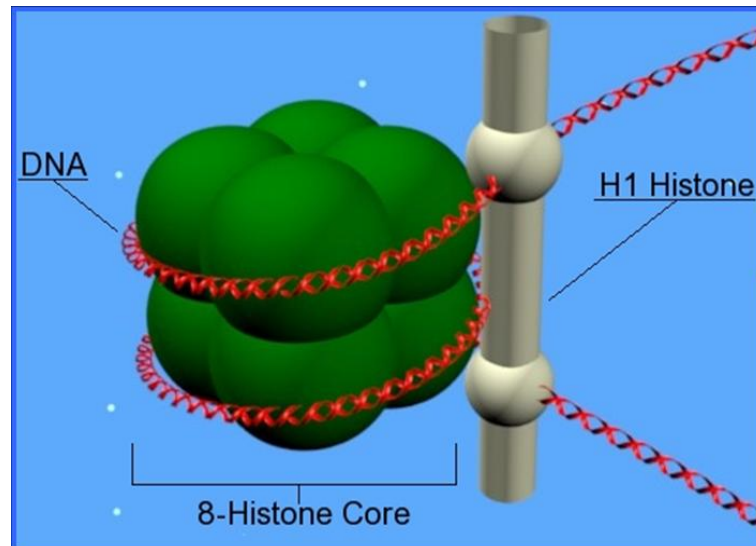


Figura 1. Estrutura esquemática do nucleossomo. DNA (vermelho) envolto no octâmero (verde) de histonas H2A, H2B, H3 e H4. H1: histona de conexão. DNA- Ácido desoxirribonucléico, H1 histone- Histona H1, 8-Histone core- Octâmero de histonas.

Fonte: <http://tr.pandapedia.com/wiki/N%C3%BCKleozom>

Recentemente, descobriu-se o papel crucial e dinâmico do nucleossomo no controle da expressão gênica. Conforme a maior ou menor interação do DNA com as proteínas que compõem o nucleossomo, a expressão dos genes pode ser alterada. Em outras palavras, o controle transcricional depende da acessibilidade do DNA, sendo este aspecto regulado por modificações nas histonas (Narlikar et al., 2002). Essas modificações bioquímicas podem ocorrer por fatores endógenos ou exógenos, sendo normalmente de natureza reversível. As principais alterações bioquímicas, como metilação, fosforilação e acetilação, são capazes de interferir na interação do DNA com as histonas, causando modificações na capacidade de expressão do código genético. Essas reações são predominantemente reversíveis, constituindo, assim, uma maneira muito dinâmica de facilitar ou reprimir a ação do DNA (Mellor, 2006).

Os processos epigenéticos são naturais e essenciais para muitas funções do organismo, porém, se ocorrerem inadequadamente, podem ter efeitos adversos na saúde e no comportamento. Agentes como metais pesados, pesticidas, hormônios, vírus, bactérias entre outros podem gerar alterações bioquímicas na cromatina, interferindo na expressão de certos genes, podendo levar a disfunções respiratórias, reprodutivas e a vários tipos de câncer. Essas modificações epigenéticas podem ser transmitidas por até quatro gerações, evidenciando, assim, a importância da epigenética no processo evolutivo (Weinhold, 2006).

Diversos fatores, internos e externos, são capazes de atuar em modificações no nucleossomo e interferir na expressão final do código genético (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005). Portanto, a epigenética poderia ser considerada uma ponte entre o genótipo e o fenótipo (Goldberg et al., 2007), apresentando-se como um mecanismo essencial para o processo evolutivo, já que estímulos externos podem variar a expressão do genoma. Tais aspectos apresentam acréscimo de importância para as células germinativas, considerando a propagação de informações para as próximas gerações (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005).

A ativação ou repressão da transcrição também está relacionada com a ação de remodeladores da cromatina. Os remodeladores são complexos proteicos que alteram a mobilidade do nucleossomo, permitindo uma espécie de “deslizamento” entre as proteínas histonas e a dupla hélice do DNA. Com essa movimentação, ocorre também uma modificação na possibilidade de expressão do DNA (Cosgrove et al., 2004). Os eucariotos contêm pelo menos cinco famílias de remodeladores de cromatina: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2, INO80 e SWR1 (Saha et al., 2006). O complexo SWI/SNF, um dos mais estudados, regula a expressão gênica por meio de elementos promotores e regulatórios (Knott et al., 2006). Trata-se de um complexo proteico ATP-dependente que está envolvido em aspectos críticos do crescimento celular e na estabilidade do genoma (Kadam e Emerson, 2003). Este complexo foi primeiramente identificado em leveduras, sendo altamente conservado entre os

eucariotos (Peterson e Workman, 2000).

A BRG1 (*brahma related gene*) é uma importante subunidade proteica do complexo SWI/SNF e parece apresentar uma importância crucial nos eventos da reprodução. A expressão da BRG1 em ovócitos (Bultman et al., 2000) e embriões (Bultman et al., 2006) de camundongos evidenciam a participação desta proteína na foliculogênese e embriogênese. Ovócitos nulos para a expressão da BRG1 completaram a meiose e foram fecundados, porém, os embriões concebidos tiveram seu desenvolvimento interrompido no estágio de 2 a 4 células, com a atividade transcricional reduzida em 30% dos genes, o que sugere o envolvimento desta proteína na ativação do genoma embrionário e como marcador da qualidade oocitária e embrionária (Bultman et al., 2006). A ausência da expressão da BRG1 também foi associada à letalidade embrionária precoce (Bultman et al., 2000).

Admite-se que o complexo processo da foliculogênese em ovários mamíferos é regulado por um coordenado programa entre elementos genômicos e epigenéticos (Ruiz-Cortés et al., 2005). Relacionando a epigenética com o processo de foliculogênese, um estudo mostrou que a fosforilação do aminoácido de número 10, uma serina da histona H3, foi relacionada com atividade transcricional favorável ao processo de divisão celular (Hans e Dimitrov, 2001). Por sua vez, esta modificação da H3 apresentou-se vinculada à ação tanto do FSH quanto do estradiol, durante o período pré-ovulatório, comprovando a estreita relação desta alteração na cromatina com a regulação do crescimento folicular (Ruiz-Cortés et al., 2005).

Além da serina 10 da H3, o aminoácido de número 4 da H3, uma lisina (K), tem despertado o interesse dos pesquisadores. A H3K4 e a enzima reguladora da sua metilação – *Lysine Specific Demethylase 1* (LSD1) – parecem exercer um papel central no comando da expressão gênica, não só na meiose das células germinativas, mas também nas células de suporte, como demonstrado recentemente na espermatogênese em camundongos (Godmann et al., dados não publicados) e na ovogênese para *Drosophila* (Di Stefano et al., 2007).

Em mamíferos, os primeiros resultados indicam intensa atividade da H3K4 no ovócito, desde o estágio de folículo primordial até os grandes folículos antrais. Para as células da granulosa e da teca, diferentes padrões foram identificados, conforme o número de metilações. Enquanto a mono e a dimetilação da H3K4 aparentemente restringem suas atividades aos folículos antrais, a H3K4 trimetilada foi identificada mais precocemente, em folículos primários e secundários, possivelmente exercendo um papel na regulação dos vários fatores locais envolvidos com o crescimento folicular nesta fase. A LSD1 não foi identificada em nenhuma etapa pré-ovulatória, sugerindo uma atividade ampla e ininterrupta da H3K4 ao longo de todo o crescimento folicular (Seneda et al., 2008).

Um aspecto particularmente interessante é o papel da epigenética no controle da pluripotência de células-tronco (Surani et al., 2007), e especialmente a atuação da H3K4 no restabelecimento da pluripotência em células somáticas, ou transdiferenciação (Kimura et al., 2004; Lin e Dent 2006).

Na Tab. 2, estão descritos alguns dos principais trabalhos referentes à epigenética e que estão relacionados direta ou indiretamente com a gametogênese.

Tabela 2. Relação de trabalhos com vínculos diretos ou indiretos à compreensão de mecanismos epigenéticos presentes na gametogênese.

Descrição	Espécie	Autor	Ano
Expressão de BRG1 em ovócitos	Murina	Bultman et al.	2000
Expressão de BRG1 em embriões	Murina	Bultman et al.	2006
Participação da histona H3K4 na espermatogênese	Murina	Godmann et al.	2007
Controle da diferenciação de células-tronco pluripotentes por mecanismos epigenéticos	Murina	Surani et al.	2007
Participação da histona H3K4 no controle do crescimento folicular	Suína	Seneda et al.	2008

Concluindo, o conceito do estoque finito de gametas femininos é um fato bem estabelecido e foi comprovado diversas vezes nas últimas décadas. Mas a capacidade de diferenciação de células-tronco tem sido cada vez mais surpreendente e células complexas, como neurônios e hepatócitos, já foram obtidas a partir de células-tronco adultas. Considerando a recente constatação de como a epigenética pode interferir na capacidade de expressão gênica, a possibilidade de diferenciação de células-tronco em ovócitos por mecanismos epigenéticos parece ser cada vez mais evidente. Neste cenário inédito e promissor, outra pergunta se apresenta: seria compatível a coexistência de ambos os modelos, ou seja, a produção de ovócitos na fase fetal e, sob condições específicas, a neoformação folicular?

Bovinos da raça Nelore podem ser excelentes modelos biológicos para a elucidação de algumas dessas questões. De acordo a literatura (Lucci et al., 2002; Diniz et al., 2005), as fêmeas Nelore possuem população folicular em número semelhante às fêmeas de raças europeias (Erickson, 1966). Embora outras hipóteses ainda não tenham sido testadas com essa raça, a neo-oogênese é uma das possíveis explicações para esta extraordinária produção de ovócitos a partir de doadoras Nelore.

As evidências sugerem algo novo, porém mais investigações são necessárias. A ciência requer sempre o

espírito crítico e isento de investigação, sem ceticismo gratuito ou impulsividade. Pode-se estar diante de uma modificação extraordinária do conceito de foliculogênese, com potenciais reflexos na TE, FIV e IATF e todo o segmento da reprodução. Cabe buscar a constante atualização e a análise crítica dos artigos, para que novos paradigmas sejam encontrados.

Referências bibliográficas

- Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR.** Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3, p.17, 2005. Resumo.
- Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, Randazzo F, Metzger D, Chambon P, Crabtree G.** A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, v.6, p.1287-1295, 2000.
- Bultman S, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda T, Schultz RM, Magnuson T.** Maternal BRG1 regulates zygote genome activation in the mouse. *Gene Dev*, v.20, p.1744-1754, 2006.
- Buratini Jr J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA.** Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, v.130, p.343-350, 2005.
- Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY.** Eggs forever? *Differentiation*, v.73, p.438-446, 2005.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA.** Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*, v.13, p.727-739, 2004.
- Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C.** Regulated nucleosome mobility and histone code. *Nature*, v.11, p.1037-1043, 2004.
- Cosgrove MS, Wolberger C.** How does the histone code work? *Biochem Cell Biol*, v.83, p.468-476, 2005.
- Di Stefano L, Ji JY, Monn NS, Herr A, Dyson N.** Mutation of drosophila LSD1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Curr Biol*, v.17, p.808-812, 2007.
- Diniz EG, Esper CR, Jacomini JO, Vieira RC.** Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.57, p.70-76, 2005.
- Dyce PW, Lihua W, Li J.** In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol*, v.8, p.384-390, 2006.
- Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ.** Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, v.441, p.1109-1114, 2006.
- Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ** Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fertil*, v.95, p.119-127, 1992.
- Erickson BH.** Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, v.25, p.800-805, 1966.
- Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguiar V, Di Sauro A, Sette C, Behr R, Kimmins S.** Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod*, v.77, p.754-764, 2007.
- Goldeberg AD, Allis CD, Bernstein E.** Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, v.128, p.635-638, 2007.
- Hans F, Dimitrov S.** Histone H3 phosphorylation and cell division. *Nature*, v.20, p.3021-3027, 2001.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL.** Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 2004.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H, Adams G, Niikura Y, Tschudy K, Tilly J, Cortes M, Forkert R.** Oocyte Generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v.122, p.303-315, 2005.
- Kadam S, Emerson BM.** Transcriptional Specificity of Human SWI/SNF BRG1 and BRM Chromatin Remodeling Complexes. *Mol Cell*, v.11, p.377-389, 2003.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P.** Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, v.434, p.583-589, 2005.
- Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T.** Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol Cell Biol*, v.24, p.5710-5720, 2004.
- Knott JG, Palmer S, De Matos DG.** P-226 Search for epigenetic markers of oocyte and embryo quality: Elucidation of role of Brg1 (*brahma-related gene 1*) in embryo development in mouse. *Fertil Steril*, v.86, suppl.1, p.S217-S218 J, 2006.
- Lin W, Dent SYR.** Functions of histone-modifying enzymes in development. *Curr Opin Genet Dev*, v.16, p.137-142, 2006.
- Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L.** Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, v.306, p.112-20, 2007.
- Lucci CM, Rumpf R, Figueiredo JR, Bão SN.** Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, v.57, p.1467-1483, 2002.
- Mellor J.** Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet*, v.22, p.320-329, 2006.
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE.** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, v.108, p.475-487, 2002.

- Nonato Jr I, Rufino FA, Sanches BV, Pontes JHF, Uvo S, Ereno Jr JC, Seneda MM.** Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scient. Vet.*, v.32, supl., p.95, 2004. Resumo.
- Peterson CL, Workman JL.** Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, v.10, p.187-192, 2000.
- Ruiz-Cortés TZ, Kimmins S, Monaco L, Burns KH, Sassone-Corsi P, Murphy BD.** Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, aurora B. *Mol Endocrinol*, v.19, p.2991-3000, 2005.
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR.** Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature*, v.7, p.437-447, 2006.
- Santos RG, Soto MAB, Lourenço RX, Stranieri P, Bishop W, Accorsi MF, Watanabe MR, Dayan A, Watanabe YF.** Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. p.79. CD-ROM.
- Seneda MM, Godmann M, Murphy BD, Kimmins S, Bordignon V.** Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction*, v.135, p.829-838, 2008.
- Soto-Suazo M, Zorn TM.** Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim Reprod*, v.3, p.147-160, 2005.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P.** Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, v.128, p.747-762, 2007.
- Tilly JL, Johnson J.** Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? *Cell Cycle*, v.6, p.879-883, 2007.
- Trotter KW, Archer TK.** Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol Cell Endocrinol, Review*, v. xx, p.162167, 2007.
- Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.457-474, 2000.
- 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.
- Waldeyer W.** Eierstock und Ei, Leipzig: Engelmann, 1870.
- Weinhold B.** Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*, v.114, p.160-167, 2006.
-