

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA TRICOSTATINA A DURANTE O CULTIVO PRÉ-
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O PADRÃO DA
CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA E ATIVIDADE
TRANSCRICIONAL DE OÓCITOS RECUPERADOS DE
FOLÍCULOS ANTRAIS INICIAIS**

**Cíntia Rodrigues da Silva
Médica Veterinária**

**D
I
S
S.**

/

**S
I
L
V
A**

**C.
R.**

**2
0
2
2**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA TRICOSTATINA A DURANTE O CULTIVO PRÉ-
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O PADRÃO DA
CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA E ATIVIDADE
TRANSCRICIONAL DE OÓCITOS RECUPERADOS DE
FOLÍCULOS ANTRAIS INICIAIS**

Discente: Cíntia Rodrigues da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária.

S586e Silva, Cíntia Rodrigues da
Efeito da Tricostatina A durante o cultivo pré-maturação in vitro sobre o padrão da configuração da cromatina e atividade transcricional de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais / Cíntia Rodrigues da Silva. -- Jaboticabal, 2023
55 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

1. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 2. Epigenética. 3. Embriões. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

REGISTRO DE IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE
PORTARIA UNESP N° 117, DE 21 DE DEZEMBRO DE 2022

O presente trabalho está inserido no âmbito da ciência básica, com contribuição para o melhor entendimento da fisiologia reprodutiva de mamíferos, podendo servir de base para resolver questões da reprodução assistida em humanos.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

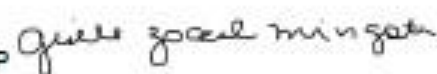
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA TRICOSTATINA A DURANTE O CULTIVO PRÉ-MATURAÇÃO IN VITRO SOBRE O PADRÃO DA CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA E ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DE OÓCITOS RECUPERADOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS INICIAIS

AUTORA: CÍNTIA RODRIGUES DA SILVA

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA UNESP Araçatuba/SP



Profa. Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA USP Pirassununga/SP



Profa. Dra. CLARA SLADE OLIVEIRA (Participação Virtual)
EMBRAPA Gado de Leite-Campus Experimental Santa Mônica / Valença/RJ



Jaboticabal, 07 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Cíntia Rodrigues da Silva, filha de Maria Eunice Rodrigues da Silva e Sinval Rodrigues da Silva, nascida em Araçatuba-SP, no dia 25 de março de 1997. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2015 e concluiu no dia 20 de janeiro de 2020, pelo Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – UniSALESIANO/Araçatuba-SP. Durante a graduação participou de eventos como palestras, cursos e simpósios relacionados em sua maioria na área de reprodução animal. Foi estagiária de treinamento técnico no período de 2016 a 2017 e aluna bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) entre os anos de 2017 a 2018 no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (FMVA/UNESP). Membro da Liga de Estudos em Reprodução Animal (LERA) no período de 2016 a 2018 e Presidente da mesma no período de 2018 a 2019 no Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – UniSALESIANO/Araçatuba-SP. Atualmente, cursa Mestrado em Medicina Veterinária com ênfase em Reprodução Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP).

DEDICO

Dedico este trabalho à minha mãe, Eunice por todo seu esforço, amor e carinho. Ao meu pai, Sinval (*in memoriam*), por todos ensinamentos, amor e carinho ao longo da sua vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti pela orientação, confiança, ensinamento e paciência.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório, Giovana Barros Nunes, Priscila Chediek Dall'Acqua e Lukas Mendes de Abreu, por todos os ensinamentos e amizade.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Teixeira, pelo auxílio necessário para realização do experimento, assim como seus sábios conselhos.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para realização do experimento.

Às estagiárias que acompanharam e ajudaram na execução do experimento: Beatriz Mendes, Bianca Ávila e Gabriela Vechi.

Às professoras componentes da banca examinadora Profa. Dra. Clara Slade Oliveira e Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal pelos ensinamentos e contribuições durante a defesa.

À minha mãe Eunice, meu pai Sinval (*in memoriam*) e minha irmã Natália por todo amor e cuidado.

Ao meu namorado Jonathan Cavalcante, por todo companheirismo e amor ao meu lado, assim como a minha sogra Cleonice, meu sogro Jonias e minha cunhada Janaina por todo acolhimento sempre.

Aos meus grandes amigos da vida, Marina Barreto, Francieli Yamasaki, Carla Andrade, Tainá Torrezan, Rodrigo Farias, Adriane e Murilo Nogaroto, Taís Otoboni, Larissa Marchiori e Ronerio Bach, pela amizade e apoio.

À CAPES pela bolsa de estudo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações oferecidas para a realização dos experimentos.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep) que já passou e pode contribuir de alguma forma para esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento: 88887.514543/2020-00.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
Palavras-chave	iv
ABSTRACT	v
Keywords	v
Lista de Figuras	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Maturação oocitária	2
2.2 Papel da histonas na maturação oocitária	4
2.3 Inibidores da histona desacetilase	6
REFERÊNCIAS	7

CAPÍTULO 2 – Efeito da Tricostatina A durante o cultivo pré-maturação *in vitro* sobre o padrão da configuração da cromatina e atividade transcricional de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais

.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Obtenção e seleção dos oócitos	12
2.2 Pré-maturação e maturação <i>in vitro</i>	13
2.3 Fecundação <i>in vitro</i> e cultivo dos embriões	13
2.4 Avaliação da viabilidade celular	14
2.5 Avaliação do diâmetro oocitário e da configuração da cromatina	14
2.6 Avaliação da atividade transcricional global	15
2.7 Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio	15
2.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	16
2.9 Avaliação da taxa de apoptose	16
2.10 Delineamento experimental	17
2.10.1. Experimento I: Atividade de transcrição e aquisição da competência meiótica e de desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos derivados de folículos antrais iniciais e pré-maturados na presença de tricostatina A	17
2.10.2. Experimento II: Atividade de transcrição e aquisição da competência meiótica e de desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos derivados de folículos antrais iniciais e pré-maturados em meio enriquecido na presença de tricostatina A	17
2.11 Análise Estatística	18
3. RESULTADOS	18
3.1 Experimento I	18
3.2 Experimento II	24
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da Tricostatina A durante o cultivo e pré-maturação in vitro sobre o padrão da configuração da cromatina e atividade transcricional de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais", Processo FOA nº 0096-2021, sob responsabilidade de Gisele Zoccal Mingoti apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 29 de Abril de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 29 de Janeiro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Trichostatin effects during in vitro prematuration culture on chromatin remodeling and transcriptional activity of oocytes from initial antral follicles", Protocol FOA nº 0096-2021, under the supervision of Gisele Zoccal Mingoti presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 29, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 29, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 01, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-080 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

EFEITO DA TRICOSTATINA A DURANTE O CULTIVO PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O PADRÃO DA CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA E ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DE OÓCITOS RECUPERADOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS INICIAIS

RESUMO – A população heterogênea de folículos ovarianos pode afetar de maneira significativa a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos, uma vez que oócitos de folículos menores que 2 mm de diâmetro, não possuem competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Sendo assim, como ferramenta para melhorar a competência desses oócitos, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um sistema de cultivo de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV) com uso do bloqueador NPPC suplementado com tricostatina A (TSA), substância que promove hiperacetilação de histonas, a fim de aumentar a atividade transcricional oocitária para que os mesmos tivessem maior competência para o desenvolvimento. Os experimentos foram divididos em duas partes, sendo o primeiro momento feita a avaliação de oócitos bovinos em cultivo de pré-MIV simples, e no segundo, utilizou-se cultivo de pré-MIV enriquecido com substâncias estimuladoras. Os resultados foram obtidos através das comparações entre as médias dos grupos, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, sendo $P < 0,05$. Com isso, os resultados demonstraram que o cultivo de pré-MIV simples e enriquecido não foram capazes estimular o crescimento oocitário até o tamanho esperado da espécie bovina (102-109 microns de diâmetro), no entanto a TSA demonstrou nos dois experimentos um possível efeito protetor contra danos oxidativos nos oócitos tratados quando comparados ao grupo controle, assim como melhorou a atividade transcricional dos mesmos. Ainda que com alta transcrição, nossos resultados não apresentaram melhores taxas no desenvolvimento embrionário, uma vez que as taxas de blastocistos foram menores que 5% de embriões em meio simples e 2% em meio enriquecido. A partir destes resultados, concluímos que o cultivo de pré-MIV acrescido da TSA, proporcionou maior atividade transcricional e proteção à estresse oxidativo, embora não tenha melhorado o crescimento oocitário, assim como a produção de embriões. Sendo assim, nossos resultados demonstram possíveis ferramentas de como melhorar a qualidade de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais, e futuramente, melhorar os índices de produção de embriões *in vitro*.

Palavras-chave: acetilação, oócito bovino, pré-maturação, tricostatina A

EFFECT OF TRICHOSTATIN A DURING IN VITRO PREMATURATION CULTURE ON CHROMATIN CONFIGURATION PATTERN AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF OOCYTES RECOVERED FROM EARLY ANTRAL FOLLICLES

ABSTRACT – The heterogeneous population of ovarian follicles can significantly affect the efficiency of in vitro production of bovine embryos, since oocytes from follicles smaller than 2 mm in diameter do not have competence for in vitro embryonic development. Therefore, as a tool to improve the competence of these oocytes, the present work aimed to establish an in vitro pre-maturation culture system (pre-IVM) using the NPPC blocker supplemented with trichostatin A (TSA), a substance that promotes histone hyperacetylation, in order to increase oocyte transcriptional activity so that they have greater competence for development. The experiments were divided into two parts, with the first moment evaluating bovine oocytes in simple pre-IVM culture, and the second, using pre-IVM culture enriched with stimulating substances. The results were obtained through comparisons between the means of the groups, using the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, with $P < 0.05$. Thus, the results showed that the cultivation of simple and enriched pre-IVM were not able to stimulate oocyte growth to the expected size of the bovine species (102-109 microns in diameter), however TSA showed a possible effect in both experiments. protective against oxidative damage in treated oocytes when compared to the control group, as well as improved their transcriptional activity. Although with high transcription, our results did not show better rates in embryonic development, since blastocyst rates were lower than 5% of embryos in plain medium and 2% in enriched medium. Based on these results, we conclude that pre-IVM culture plus TSA provided greater transcriptional activity and protection against oxidative stress, although it did not improve oocyte growth or embryo production. Therefore, our results demonstrate possible tools on how to improve the quality of oocytes recovered from early antral follicles, and in the future, improve in vitro embryo production rates.

Key words: acetylation, bovine oocyte, prematuration, trichostatin A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diâmetro de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de tricostatina (TSA)	17
Figura 2. Viabilidade de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de tricostatina (TSA)	18
Figura 3. Padrão de compactação da cromatina de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de tricostatina (TSA)	19
Figura 4. Atividade transcricional de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> por 8 horas com diferentes concentrações de tricostatina (TSA)	20
Figura 5. Progressão da meiose e parâmetros de avaliação da qualidade ao término do cultivo de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM)	21
Figura 6. Desenvolvimento e indicadores de qualidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM)	22
Figura 7. Diâmetro de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM)	24
Figura 8. Padrão de compactação da cromatina de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM)	25
Figura 9. Atividade transcricional de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM)	26

Figura 10. Indicadores de qualidade de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM) durante 24 horas	27
Figura 11. Progressão da meiose e indicadores de qualidade ao término do cultivo de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM)	28
Figura 12. Desenvolvimento e indicadores de qualidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados <i>in vitro</i> com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM)	29

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotecnologia de reprodução assistida que consiste na obtenção de oócitos imaturos para submetê-los às etapas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (MIV, FIV e CIV, respectivamente). No entanto, embriões produzidos *in vitro* ainda apresentam taxas inferiores quando comparados *in vivo*, uma vez que a população de oócitos recuperados durante a aspiração é heterogênea, ou seja, de origem de folículos com diferentes diâmetros. Dessa forma, os oócitos estarão em diferentes fases de desenvolvimento e ao serem submetidos às etapas da PIVE, muitos não possuem capacidade para o desenvolvimento *in vitro* (Lonergan e Fair, 2008).

Para este propósito, os oócitos são recuperados de folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm, uma vez que este intervalo compreende oócitos competentes para continuarem o desenvolvimento no ambiente *in vitro*. Em contrapartida, oócitos derivados de folículos menores que 2 mm são considerados inapropriados, uma vez que ainda não são capazes de retomar a meiose e se desenvolver até o estágio de blastocisto (Pavlok et al., 1992).

O processo de aquisição de competência oocitária está intimamente ligado ao crescimento e desenvolvimento folicular, sabendo-se que folículos de tamanhos médios (entre 3 e 6 mm de diâmetro) já possuem oócitos mais competentes para o cultivo em ambiente *in vitro* (Tseng et al., 2004). Porém, o oócito incluso no ambiente folicular é considerado imaturo, pois permanece em bloqueio meiótico, caracterizado pela presença vesícula germinativa (VG) (Mehlmann, 2005). Quando em VG, a cromatina do oócito, sofre modificações químicas nas histonas (acetilação) resultando em condensação progressiva da cromatina, sendo esta considerada um marco no início da aquisição de competência meiótica (Dall'Acqua et al., 2017). A remodelação da cromatina é dividida em diferentes graus de condensação que vão da menos para a mais condensada, sendo: VG0, VG1, VG2 e VG3, respectivamente. Folículos menores do que 2 mm de diâmetro possuem oócitos quase que em sua totalidade com padrão VG0, havendo poucos gametas em VG1 (Luciano et al., 2011). Mesmo ainda incompetentes para o desenvolvimento quando cultivados no ambiente *in vitro*, oócitos nestes estágios são caracterizados por intensa atividade transcricional. Por

outro lado, conforme o folículo cresce além dos 2 mm de diâmetro, os oócitos adquirem gradualmente maior competência para o desenvolvimento, ao passo que a cromatina assume maior padrão de condensação, como VG2 e, por fim, o grau de condensação total em VG3 (Luciano et al., 2014). Esses eventos se devem à reprogramações epigenéticas, como modificações nas histonas e que por ações enzimáticas regulam o padrão de condensação da cromatina. A acetilação de histonas está relacionada ao momento em que o oócito não apresenta ou apresenta baixa condensação da cromatina e, assim, exibe alta atividade transcricional. Sendo assim, quando o padrão de condensação está mais elevado, a transcrição diminui ou cessa (Bannister e Kouzarides, 2011).

Pelo fato da população de oócitos submetidos à produção *in vitro* de embriões bovinos ser heterogênea (recuperados folículos de diferentes diâmetros), diversos sistemas de cultivo de pré-maturação (pré-MIV) de oócitos tem sido propostos como etapa prévia à maturação *in vitro*, na tentativa de fornecer tempo e ambiente favorável para que estes gametas adquiram competência para o desenvolvimento (Albuz et al., 2010; Luciano et al., 2011). A mesma estratégia pode ser utilizada numa população de oócitos derivados de folículos menores do que 2 mm, que não tem capacidade para continuar o desenvolvimento *in vitro*.

A tricostatina A (TSA), uma droga que promove hiperacetilação de histonas, se mostrou efetiva em prolongar o tempo de MIV, impedindo o envelhecimento oocitário em suínos e melhorando taxas de desenvolvimento embrionário (Jin et al., 2014). No entanto, de acordo com a literatura disponível, não foram encontrados relatos prévios acerca do uso da tricostatina A em sistema de pré-MIV de oócitos bovinos com o intuito de melhorar a aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer um sistema de pré-MIV de oócitos bovinos a fim de que oócitos não competentes (provenientes de folículos antrais iniciais com diâmetros menores do que 2 mm) possam adquirir competência meiótica e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

2. Revisão de literatura

2.1 Maturação oocitária

A maturação oocitária compreende eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares, a fim de tornar os oócitos aptos à fertilização e desenvolvimento

embrionário (Ferreira et al., 2009). A maturação nuclear refere-se à retomada da divisão meiótica do estágio de diplóteno da prófase I, oócito imaturo e sua progressão até metáfase II, oócito maturo. Uma vez em metáfase II, o oócito encontra-se apto, do ponto de vista nuclear, para ser ovulado e fertilizado (Mehlmann, 2005). O oócito quando imaturo é caracterizado pela presença da vesícula germinativa (VG), que indica descondensação da cromatina, demonstrado por padrões do seu remodelamento, onde vão da menor para a maior condensação, sendo: VG0, VG1, VG2 e VG3 (Luciano et al., 2014).

Os eventos envolvidos na maturação oocitária, citoplasmático e molecular, ocorrem de forma sincrônicas, mas independentes da maturação nuclear, ao passo que o oócito adquire a maturação citoplasmática e molecular, por meio da redistribuição de organelas e armazenamento de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), assim como produção de proteínas e fatores de transcrição. Com isso, será possível suportar o processo de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial até o momento da ativação do genoma embrionário (Ferreira et al., 2009).

A maturação oocitária é controlada pelos níveis intraoocitários de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que são segundos mensageiros produzidos pelas células foliculares e passados para o interior do oócito por meio das junções *gap*, regulando a retomada e progressão meiótica (Mehlmann, 2005).

As altas concentrações de AMPc intraoocitário promovem diversas reações que mantêm o bloqueio meiótico como a ativação da proteína cinase A (PKA) que inativa a ação do fator promotor de maturação (MPF). Além disso, a enzima fosfodiesterase 3A (PDE3A) que promove degradação específica do AMPc, tem sua ação inibida pela presença do GMPc (Gilchrist, 2011). No momento em que ocorre a quebra da vesícula germinativa (QVG) e consequentemente a retomada da meiose, os níveis intraoocitários de AMPc caem, promovendo a desfosforilação da ciclina dependente de cinase 1 (CDK1) e ativação do MPF (Bilodeau-Goeseels, 2011), ao passo que essa resulta na fosforilação de proteínas da vesícula germinativa, remodelamento da cromatina e reorganização de organelas, culminando na progressão da meiose até metáfase II (Gilchrist, 2011).

In vivo, a retomada da meiose ocorre pouco antes da ovulação por estímulo do hormônio luteinizante (LH), que sua ligação aos seus receptores (LHR) estimulam a

produção de fatores de crescimento semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-*like*) e sua ligação aos seus receptores (EGFR) culmina na QVG, expansão das células do cumulus e o fechamento das junções *gap* (Reizel et al., 2010).

In vitro, quando o oócito é removido do ambiente folicular, ocorre a retomada espontânea da meiose, alterando os eventos fisiológicos da maturação nuclear, molecular e citoplasmática, resultando na queda da qualidade oocitária, impedido que o oócito suporte as fases subsequentes do desenvolvimento embrionário (Bilodeau-Goeseels, 2011).

A maturação citoplasmática caracteriza-se pela reorganização de organelas no citoplasma ao longo das diferentes fases do desenvolvimento oocitário (Ferreira et al., 2009). Os microtúbulos e microfilamentos auxiliam na divisão meiótica (maturação nuclear) com a formação do fuso meiótico e na extrusão do corpúsculo polar, dispondo-se na região cortical do oócito (Li et al., 2005). Já as mitocôndrias apresentam-se em regiões diferentes em determinados momentos, umas na periferia e outras centrais, no oócito imaturo e maduro, respectivamente (Stojkovic et al., 2001).

A competência oocitária é necessária para garantir que o oócito possa retomar e progredir a meiose e, assim suportar o desenvolvimento embrionário inicial. Contudo é necessário que esses oócitos sejam provenientes de folículos de tamanho adequado, uma vez que oócitos obtidos de folículos pequenos (menores que 2 mm de diâmetro) não possuem o maquinário necessário para o ambiente *in vitro* quando estes são comparados a folículos médios (3 a 8 mm de diâmetro), pois não alcançaram o desenvolvimento e crescimento completo (Pavlok et al., 1992).

2.2 Papel das histonas na maturação oocitária

Os mecanismos epigenéticos tem sido alvo de estudos atualmente pois tem sido correlacionados com eventos envolvidos na maturação oocitária como as modificações nas histonas, tendo como principais a acetilação que caracteriza-se como um processo reversível, e a metilação que compreende marcas celulares de longa duração. As histonas que demonstram maiores alterações epigenéticas de resíduos de lisina na sua cauda aminoterminal são as H3 e H4 (Wade et al., 1999; Iacobuzio-Donahue, 2009).

A estrutura da cromatina é constituída pelos nucleossomos, sendo este composto por cerca de 147 pares de bases de DNA envoltos em um octâmero de histonas, na qual possui duas cópias de cada uma das proteínas histonas (H2A, H2B,

H3 e H4) (Ferreira e Franco, 2012). As histonas, além de promover suporte estrutural no DNA, possui funções no controle da expressão gênica, ativação do genoma embrionário, metilação do DNA e inativação do cromossomo X. O maior grau de compactação dos nucleossomos (heterocromatina) promove menor acesso aos sítios de ligação dos fatores de transcrição, sendo a cromatina menos compacta (eucromatina) aberta para a atividade transcricional (Simonsson e Gurdon, 2004).

A metilação de histonas está relacionada na manutenção da configuração da cromatina e também em processos como na formação do pró-núcleo paterno e ativação do genoma embrionário, sendo observada na espécie bovina algumas modificações em folículos antrais iniciais e em todo seu processo de maturação. Esse processo ocorre por meio das enzimas histonas metil-transferases (HMTs) e estas podem reprimir ou suprimir a ação de um gene. Os sítios mais comuns de metilação de histonas são nas lisinas (K) 4 e 9 que estão relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação celular em mamíferos (Leonhardt et al., 1992).

A acetilação de histonas configura fatores epigenéticos por meio do enrolamento ou relaxamento da estrutura DNA-nucleossomo nas caudas das histonas, permitindo o acesso dos fatores de transcrição e assim, regulando a transcrição gênica. Os principais sítios de acetilação compreendem nos resíduos de lisinas 5, 8, 12 e 16 na cauda da histona 4 (H4) e, 9, 14, 18 e 27 na cauda histona 3 (De Ruijter et al., 2003). Essa modificação é responsável para competência oocitária, uma vez que a condensação da cromatina culmina na retomada da meiose (Wang et al., 2006).

Embora a maioria das acetilações de resíduos de lisina em H3 e H4 possua relação com permissão da atividade transcricional (H3K9 e H4K8) (Pogo et al., 1966), a metilação de resíduos de lisinas pode estar associada a repressão (H3K9 e H4K20) ou permissão (H3K4) da transcrição (Sims et al., 2003).

Em bovinos, folículos menores do que 2mm de diâmetro possuem oócitos quase que em sua totalidade com padrão VG0 (padrão filamentoso e difuso por todo o núcleo), havendo poucos gametas em VG1 (aparecimento de pequenos focos de condensação da cromatina). Apesar de serem incompetentes para continuarem o desenvolvimento quando cultivados no ambiente *in vitro*, estes estágios iniciais da remodelação são marcados por intensa atividade transcricional, já que as enzimas acetiltransferases (HATs) permitem a adição de um grupo acetil a um resíduo de lisina das histonas. Desta forma, a ligação histona-DNA é enfraquecida e o maquinário

proteico (fatores de transcrição) responsável pela transcrição gênica passa a ter acesso ao DNA (Luciano et al., 2014; Bannister e Kouzarides, 2011).

Por outro lado, conforme o folículo cresce além dos 2 mm de diâmetro, os oócitos adquirem gradualmente maior competência para o desenvolvimento e a cromatina assume padrões cada vez mais condensados, como VG2 e, por fim, o grau de condensação total em VG3 (Luciano et al., 2014). Esta condensação que a cromatina dos oócitos assume se dá pela ação das enzimas desacetilases (HDACs), as quais exercem papel contrário às HATs, ou seja, as HDACs promovem a remoção do grupo acetil, fortalecendo a ligação histona-DNA. Como resultado, a cromatina se condensa e os fatores de transcrição não tem mais acesso ao DNA (Bannister e Kouzarides, 2011). No entanto, esses mecanismos podem sofrer alterações no padrão de acetilação ou desacetilação e afetar diretamente a qualidade oocitária e, consequentemente, a produção de embriões.

2.3 Inibidores da histona desacetilase

Para o controle da acetilação e desacetilação, tem sido estudado cultivos com uso substâncias inibidoras das HDACs que possam regular a expressão gênica, uma vez que nos oócitos, este controle é crucial para que o mesmo possa produzir e armazenar moléculas necessárias para sobreviver e atingir o desenvolvimento embrionário inicial (Bannister & Kouzarides, 2011).

A tricotatina A (TSA), uma droga que promove hiperacetilação de histonas por meio da inibição das HDACs, tem sido estudada no âmbito da reprogramação celular e nos cultivos *in vitro* de gametas e embriões (Silva et al., 2019). Em suínos, a TSA mostrou-se efetiva em prolongar o tempo de MIV, impedindo o envelhecimento oocitário. Adicionalmente, já foi também demonstrado que oócitos cultivados com TSA apresentaram maior taxa de desenvolvimento embrionário, se comparado ao grupo controle (Jin et al., 2014).

Os inibidores das HDACs não possuem seus efeitos amplamente esclarecidos, pois podem variar de acordo com sua ação farmacológica em diferentes estruturas (Zhang et al., 2009). Além da TSA, temos como principais inibidores o ácido suberoilânido hidroxâmico (SAHA) que é composto pela classe dos ácidos hidroxâmicos ligados ao zinco, e disputam pelo sítio catalítico das HDACs, inibindo sua atividade (Monneret, 2005). O ácido valpróico (AVP), uma droga antieplética formada por ácidos graxos e muito utilizado em retardar tumores de mama em

humanos, também atua por meio da inibição das HDACs (Gottlicher, 2001). Deve-se lembrar que os efeitos dos inibidores podem variar de acordo com diferentes concentrações ao meio de cultivo empregado, portanto, é necessário estabelecer métodos adequados para cada sistema.

REFERÊNCIAS

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010) Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction** 25: 2999-3011.

Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research** 21: 381-395.

Bilodeau-Goeseels S (2011) Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: Does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals** 47: 687-693.

Dall'Acqua PC, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Gottardi FP, Mingoti GZ (2017) Delaying meiotic resumption during transportation of bovine cumulus–oocyte complexes: effects on development, apoptosis and caspases activity of *in vitro*-produced embryos. **Zygote** 25: 740-750.

De-Ruijter AJM, Van-Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van-Kuilenburg ABP (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal** 370: 737-749.

Ferreira AR, Franco MM (2012) Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 36: 3-9.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA (2009) Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after *in vitro* maturation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 145: 76-80.

Gilchrist RB (2011) Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development** 23: 23-31.

Gottlicher M, Minucci S et al. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO Journal** 20: 6969-6979.

Iacobuzio-Donahue CA (2001) Epigenetic Changes in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease** 4:229-249.

Ikeda S, Tatemizo A, Iwamoto D, Taniguchi S, Hochino Y, Amano T, Matsumoto K, Hosoi Y, Iritani A, Saeki K (2009) Enhancement of histone acetylation by trichostatin A during in vitro fertilization of bovine oocytes affects cell number of the inner cell mass of the resulting blastocysts. **Zygote** 17: 209-215.

Jin YX, Zhao MH, Zheng Z, Kwon JS, Lee SK, Cui XS, Kim NH (2014) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A affects porcine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development** 26: 806-816.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. **Cell** 71: 865-873.

Li GP, Liu Y, Bunch TD, White BK, Aston K (2005) Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Molecular Reproduction and Development** 71: 220-226.

Lonergan P, Fair T (2008) *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology** 69: 17-22.

Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V (2011) Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism (s). **Biology of Reproduction** 85: 1252-1259.

Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V (2014) Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. **Animal Reproduction Science** 149: 3-10.

Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction** 130: 791-799.

Monneret C (2005) Histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry** 40:1-13.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Nemann H (1992) Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development** 31: 63-67.

Pogo BGT, Allfrey VG, Mirsky AE (1966) Rna synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 55: 805-812.

Reizel Y, Elbaz J, Dekel N (2010) Sustained activity of the EGF Receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. **Molecular Endocrinology** 24:402-411.

Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Nogueira E, Accorsi MF, Mingoti GZ (2014) Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated

with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development** 26: 797-805.

Silva, CG, Martins CF et al. (2019) Use of trichostatin A alters the expression of HDAC3 and KAT2 and improves *in vitro* development of bovine embryos cloned using less methylated mesenchymal stem cells. **Reprod Domest Anim** 54:289-299.

Simonson S, Gurdon J (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Cell Nature Biology** 6:984-990.

Sims RJ, Nishioka K, Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. **Trends in Genetics** 19: 629-639.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hurzler P, Gonçalves PB, Wolf E (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction** 64:904-909.

Tseng JK, Chen CH, Chou PC, Yeh SP, Ju JC (2004) Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction Domestic Animals** 39:146-153.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. **Nature Genetics** 23: 62-66.

Wang Q, Yin S, Ai JS, Liang CG, Hou Y, Schatten H, Sun QY (2006) Histone deacetylation is required for orderly meiosis. **Cell Cycle** 5: 766-774.

Zhang L, Fang H, Xu W (2009) Strategies in developing promising histone deacetylase inhibitors. **Medicinal Research Reviews** 30: 585-602.

CAPÍTULO 2 – Efeito da tricostatina A durante o cultivo pré-maturação *in vitro* sobre o padrão da configuração da cromatina e atividade transcricional de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais

RESUMO – A população heterogênea de folículos ovarianos pode afetar de maneira significativa a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos, uma vez que oócitos de folículos menores que 2 mm de diâmetro, não possuem competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Sendo assim, como ferramenta para melhorar a competência desses oócitos, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um sistema de cultivo de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV) com uso do bloqueador NPPC suplementado com tricostatina A (TSA), substância que promove hiperacetilação de histonas, a fim de aumentar a atividade transcricional oocitária para que os mesmos tivessem maior competência para o desenvolvimento. Os experimentos foram divididos em duas partes, sendo o primeiro momento feita a avaliação de oócitos bovinos em cultivo de pré-MIV simples, e no segundo, utilizou-se cultivo de pré-MIV enriquecido com substâncias estimuladoras. Os resultados foram obtidos através das comparações entre as médias dos grupos, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, sendo $P < 0,05$. Com isso, os resultados demonstraram que o cultivo de pré-MIV simples e enriquecido não foram capazes estimular o crescimento oocitário até o tamanho esperado da espécie bovina (102-109 microns de diâmetro), no entanto a TSA demonstrou nos dois experimentos um possível efeito protetor contra danos oxidativos nos oócitos tratados quando comparados ao grupo controle, assim como melhorou a atividade transcricional dos mesmos. Ainda que com alta transcrição, nossos resultados não apresentaram melhores taxas no desenvolvimento embrionário, uma vez que as taxas de blastocistos foram menores que 5% de embriões em meio simples e 2% em meio enriquecido. A partir destes resultados, concluímos que o cultivo de pré-MIV acrescido da TSA, proporcionou maior atividade transcricional e proteção à estresse oxidativo, embora não tenha melhorado o crescimento oocitário, assim como a produção de embriões. Sendo assim, nossos resultados demonstram possíveis ferramentas de como melhorar a qualidade de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais, e futuramente, melhorar os índices de produção de embriões *in vitro*.

Palavras-chave: oócito bovino, tricostatina A, pré-maturação, acetilação

1. INTRODUÇÃO

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) é amplamente utilizada em escala comercial para multiplicação de rebanhos na espécie bovina. No entanto, as taxas de desenvolvimento de embriões produzidos por esta biotécnica são inferiores quando comparadas aos resultados de produção *in vivo*. Um dos fatores que explicam esta discrepância é a heterogeneidade da população de oócitos utilizados nos procedimentos *in vitro*, já que são recuperados de folículos com diferentes diâmetros e que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento.

Como é sabido, óocitos recuperados de folículos com diâmetro entre 3 a 6 mm são mais competentes do que os recuperados de folículos com diâmetro abaixo de 2 mm, pois estes últimos ainda não concluíram o crescimento e possuem capacidade limitada para retomada da meiose e para o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Tseng et al., 2004; Lonergan e Fair, 2008). Assim, o processo de aquisição de competência oocitária está intimamente ligado ao tamanho e fase do desenvolvimento folicular.

Óocitos inclusos no ambiente folicular permanecem em bloqueio meiótico, caracterizado pela presença vesícula germinativa (VG) (Mehlmann, 2005). Neste estadio da meiose, a condensação da cromatina do óocito, está associada à eventos epigenéticos, como a acetilação de histonas, que são modificações que causam relaxamento na estrutura da cromatina e permite maior acesso para transcrição gênica (Re et al., 2021). A remodelação da cromatina é dividida em diferentes padrões de condensação que vão da menos para a mais condensada, sendo classificadas de VG0 a VG3, respectivamente. Folículos menores do que 2 mm de diâmetro possuem óocitos quase que em sua totalidade com padrão VG0, havendo poucos gametas em VG1 (Luciano et al., 2011). Embora incompetentes para o desenvolvimento quando cultivados no ambiente *in vitro*, óocitos nestes estágios exibem intensa atividade transcricional. Por outro lado, conforme o folículo cresce além dos 2 mm de diâmetro, os óocitos adquirem gradualmente maior competência para o desenvolvimento, ao passo que a cromatina assume maior padrão de condensação, como VG2 e, por fim, o grau de condensação total em VG3 (Luciano et al., 2014). Esses eventos se devem à reprogramações epigenéticas, como modificações nas histonas e por meio de enzimas, regulam o padrão de condensação da cromatina. A acetilação de histonas ocorre quando o óocito não apresenta ou apresenta baixa condensação da cromatina e, assim, exibe alta atividade transcricional. Sendo assim, quando o padrão de condensação está mais elevado, a transcrição diminui ou cessa (Bannister e Kouzarides, 2011).

Pelo fato da população de óocitos submetidos à produção *in vitro* de embriões bovinos ser heterogênea, foi anteriormente proposto o cultivo de pré-maturação (pré-MIV) como etapa prévia à MIV, na tentativa de fornecer tempo e ambiente favorável para que estes gametas adquiram competência para o desenvolvimento (Albuz et al., 2010; Luciano et al., 2011). Esta estratégia poderia ser otimizada para ser utilizada na população de óocitos derivados de folículos menores do que 2 mm, que não tem

capacidade para continuar o desenvolvimento *in vitro*. Neste raciocínio, seria interessante acrescentar moléculas favoráveis à aquisição da competência do oócito. A tricostatina A (TSA) é uma droga que promove hiperacetilação de histonas por meio da inibição das enzimas desacetilases (HDACs) e tem sido muito estudada no âmbito da reprogramação celular e nos cultivos *in vitro* de gametas e embriões (Silva et al., 2019). Em suínos, a TSA mostrou-se efetiva em prolongar o tempo de MIV, impedindo o envelhecimento oocitário. Adicionalmente, já foi também demonstrado que oócitos cultivados com TSA apresentaram maior taxa de desenvolvimento embrionário, se comparado ao grupo controle (Jin et al., 2014).

No entanto, de acordo com a literatura disponível, não foram encontrados relatos prévios acerca do uso da TSA em sistema de pré-MIV de oócitos bovinos com o intuito de melhorar a aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento. Nossa hipótese foi que a adição de TSA ao sistema de cultivo de pré-MIV de oócitos bovinos recuperados de folículos menores do que 2 mm de diâmetro, aumentasse a atividade transcricional destes gametas através da sua ação inibitória sobre as HDACs nas histonas, permitindo maior acesso ao DNA pelos fatores de transcrição, culminando na maior produção de transcritos pelo oócito, garantindo maior competência para conclusão da meiose e consequentemente, para o desenvolvimento embrionário, aumentando as taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um sistema de pré-MIV de oócitos bovinos a fim de que oócitos não competentes (provenientes de folículos menores do que 2 mm) pudessem adquirir competência meiótica e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Ovários de fêmeas bovinas mestiças, predominantemente zebuínas, foram obtidos em abatedouros comerciais e transportados para o laboratório em temperatura de 30-35°C. Para recuperação de complexos cumulus-oócito (CCOs) incluídos em folículos antrais iniciais com diâmetros menores do que 2 mm diâmetro foi realizado o fatiamento na região cortical ovariana com auxílio de um cabo de bisturi acoplado a lâmina número 23. Os folículos presentes nas fatias foram avaliados e mensurados

sob lupa estereoscópica, sendo então rompidos com auxílio da lâmina de bisturi em placas de cultivo contendo meio de lavagem (TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 5 mM de bicarbonato de sódio, 5 mM de hepes ácido, 5 mM de hepes sódico, 75 µg/mL de amicacina, 0,3% de BSA e 100 nM do precursor do peptídeo natriurético tipo C - NPPC). Somente CCOs com pelo menos três camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma de granulação homogênea foram selecionados para os experimentos.

2.2. Pré-maturação e maturação *in vitro*

Os oócitos selecionados (15 CCOs por microgota) foram submetidos ao cultivo de pré-maturação em microgotas contendo 100 µL de meio pré-MIV simples [TCM-199 com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,3% de BSA, 1×10^{-4} UI/mL rFSH (Gonal-F; Alfafolitropina, Merck Serono, Itália) e 100 nM de NPPC. No segundo experimento, o meio foi enriquecido com 100 nM de cisteamina, 1% de insulina-transferrina-selênio (ITS) e 100 ng de *insulin growth-factor* (IGF). O meio de pré-MIV foi ainda suplementado com diferentes concentrações de tricostatina A (TSA: 2,5 nM, 5 nM e 10 nM ou sem suplementação com TSA (grupo controle). As microgotas foram cultivadas sob óleo mineral, durante 24 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade.

Ao final da pré-MIV, os oócitos foram lavados várias vezes para completa remoção do inibidor da meiose, TSA e demais suplementos, sendo então transferidos para microgotas de 100 µL de meio de maturação [TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 1×10^{-1} UI/mL de rFSH), 100 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de soro fetal bovino (FCS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)], sob óleo mineral. O cultivo de MIV foi realizado em temperatura de 38,5°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade, por 24 horas.

2.3. Fecundação *in vitro* e cultivo dos embriões

Foi utilizado sêmen congelado de um único touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e da mesma partida. Após descongelação das palhetas, o sêmen foi centrifugado em gradiente de densidade descontínua (45% e 90%) de Percoll (GE, Healthcare, Uppsala, Sweden) por 7 minutos a 2.500 g em temperatura ambiente. A concentração espermática foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides/mL de meio de

fecundação (TALP) suplementado com 20 μ M penicilamina, 10 μ M hipotaurina, 2 μ M epinefrina e 10 μ g/mL heparina. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 μ L meio de fecundação com 15 oócitos/gota, onde permaneceram co-incubados por 18 a 22 horas. Ao final, os prováveis zigotos foram lavados e transferidos para microgotas de 90 μ L de meio “*Synthetic Oviduct Fluid*” modificado (mSOF) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB. A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados, respectivamente, no 3º dia do cultivo (D3: 72 horas pós-inseminação e no 7º dia (D7: 168 horas pós-inseminação). O cultivo dos embriões foi realizado sob as mesmas condições estipuladas para os cultivos de MIV e de fecundação.

2.4. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade dos oócitos foi avaliada através da coloração com *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide* (MTT), como descrito por Casas et al. (2010). Este marcador de viabilidade marca a proliferação celular, produzindo uma solução amarelada que, em contato com desidrogenases mitocondriais de células vivas, se torna azul escura ou arroxeadada, portanto é uma avaliação colorimétrica (MTT, Sigma, bula do reagente). Os oócitos foram desnudados por agitação em *vórtex* e foram então incubados com 5 mg/mL de MTT durante 2 horas em temperatura de 38,5°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade. Em seguida, foram lavados duas vezes em PBS e montados entre lâmina e lamínula. As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz (Olympus, Tokyo, Japan) e os oócitos corados em cor púrpura/arroxeadada foram classificados como viáveis (MTT-positivos).

2.5. Avaliação do diâmetro oocitário e da configuração da cromatina

Os oócitos foram desnudados por agitação em *vórtex*. Imagens de campo claro dos oócitos desnudos foram obtidas para determinação do diâmetro (excluindo a zona pelúcida), utilizando o software ImageJ.(1.49v).

Os oócitos foram então fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos e permeabilizados em solução 0,5% Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% por 5

minutos. Foram então corados com Hoechst 33342 (1 ug/mL) por 15 minutos em temperatura ambiente e colocados entre lâmina e lamínula para imediata análise em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 404 nm e emissão 526 nm). Oócitos que apresentaram a configuração nuclear de vesícula germinativa (VG) foram considerados imaturos e classificados de acordo com o grau de compactação da cromatina, que variou a partir de um padrão filamentoso difuso em toda a área nuclear (GV0) até o nível máximo de condensação da cromatina, organizada em um único ponto (GV3), conforme proposto (Lodde et al., 2007). Oócitos que apresentaram a presença da placa metafásica e do primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (metáfase II – MII). Por fim oócitos cuja configuração da cromatina estivesse entre as fases de quebra da VG até a metáfase I foram considerados como intermediários e aqueles cuja cromatina não se enquadrou em nenhum destes estágios foram considerados degenerados.

2.6. Avaliação da atividade transcricional global

A transcrição dos oócitos foi avaliada a partir da coloração das estruturas com o kit Click-it® RNA Imaging Kits (Invitrogen, Molecular Probes, Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Ao final da pré-MIV de 8 e 24 horas, os oócitos foram incubados por 1 hora com 0,5mM de 5-*ethynyl uridine* (EU) a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Após a incubação, os oócitos foram desnudados por agitação em vórtex e então fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos, seguido pela permeabilização em solução 0,5% Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% por 15 minutos. Posteriormente, os oócitos foram incubados no Coquetel de Reação *Click-it*® que contém o corante Alexa Fluor® 488 *azide*, durante 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, e então contra-corados com Hoechst 33342 (1 ug/mL) por 15 minutos para marcação do DNA. As estruturas foram colocadas entre lâmina e lamínula para imediata análise em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51) sob excitação 404 nm e emissão 526 nm (Hoechst) e excitação 495 nm e emissão 519 nm (Alexa fluor). As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

2.7. Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio

Os níveis intracelulares de ROS nos oócitos foram quantificados mediante a coloração com a sonda fluorescente CellROX® Green Reagent (Thermo Scientific - Molecular Probes, Life Technologies). Após o desnudamento por agitação em vórtex, os oócitos foram incubados com 5 μ M de CellROX® durante 30 minutos no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

2.8. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Oócitos e blastocistos expandidos obtidos no D7 foram corados com a sonda fluorescente MitoTracker Red (CMXROs, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as informações do fabricante. As estruturas foram incubadas com 500 nM de MitoTracker Red no escuro por 30 minutos, em temperatura de 38,5°C. Posteriormente, foram lavadas três vezes em PBS, montadas em lâminas e avaliadas imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 579 nm e emissão de 599 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, expressa em UAF.

2.9. Avaliação da taxa de apoptose

A taxa de apoptose foi avaliada nos blastocistos expandidos obtidos no D7 através da coloração com o kit *In Situ* Cell Death Detection Kit with Fluorescein (TUNEL; Roche Applied Science, IN, USA), de acordo com as indicações do fabricante. Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 60 minutos e então permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5% v/v) em citrato de sódio (0,1%) por 30 minutos. Na sequência, foram incubados em câmara úmida no escuro à 37°C por 1 hora com 15 μ L da mistura de enzima e tampão (1:9). Os embriões foram subsequentemente contra-corados com Hoechst 33342 (1 μ g/mL) por 30 minutos no escuro, lavados em PBS-PVA e montados entre lâmina e lamínula. As lâminas foram imediatamente avaliadas em microscópio

invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 510-550nm e emissão 590nm), sendo quantificado o número de células com fragmentação de DNA (TUNEL-positivas = fluorescência verde) em relação ao número de células vivas (fluorescência azul).

2.10. Delineamento experimental

2.10.1. Experimento I: Atividade de transcrição e aquisição da competência meiótica e de desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos derivados de folículos antrais iniciais e pré-maturados na presença de tricostatina A

CCOs recuperados de folículos antrais iniciais com diâmetros menores do que 2 mm foram selecionados para o cultivo de pré-maturação *in vitro* em meio pré-MIV simples (como acima descrito), na presença do inibidor da meiose NPPC e de diferentes concentrações de tricostatina A (TSA: 2,5 nM, 5 nM e 10 nM) ou sem suplementação com TSA (grupo controle). Ao final do cultivo de pré-maturação, os oócitos foram lavados para completa remoção do inibidor da meiose e submetidos ao cultivo de maturação *in vitro*. O diâmetro, a viabilidade e qualidade dos oócitos foram determinados imediatamente após a remoção do ambiente folicular (controle imaturo – 0h) e ao término dos cultivos de pré-MIV e MIV. Os parâmetros utilizados para avaliação da qualidade foram: avaliação da compactação da cromatina e progressão da meiose, avaliação da viabilidade celular, avaliação da atividade transcricional, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e quantificação do níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outra parcela dos oócitos maturados foi fecundada e foram avaliados o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões produzidos.

2.10.2. Experimento II: Atividade de transcrição e aquisição da competência meiótica e de desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos derivados de folículos antrais iniciais e pré-maturados em meio enriquecido na presença de tricostatina A

CCOs recuperados de folículos antrais iniciais com diâmetros menores do que 2 mm foram selecionados para o cultivo de pré-maturação *in vitro* em meio pré-MIV enriquecido com 100 nM de cisteamina, 1% de insulina-transferrina-selênio (ITS) e 100 ng de *insulin growth-factor* (IGF), na presença do inibidor da meiose NPPC e de

diferentes concentrações de tricostatina A (TSA: 2,5 nM e 5 nM) ou sem suplementação com TSA (grupo controle). Ao final do cultivo de pré-maturação, os oócitos foram maturados e fecundados *in vitro*, sendo que os oócitos e embriões produzidos foram avaliados pelos mesmos parâmetros definidos para o Experimento I.

2.11. Análise Estatística

Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata, uma microgota contendo 15 CCOs ou zigotos foi considerada a unidade experimental para as variáveis fase da meiose e desenvolvimento embrionário, respectivamente. Os dados de taxas de maturação (progressão meiótica) e de desenvolvimento embrionário foram analisados pela fração de oócitos cultivados atingindo os estágios determinados de desenvolvimento, reportada em termos de porcentagem. Quando necessário, as porcentagens foram transformadas em arco seno. As comparações entre as médias dos grupos foram feitas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Student's t. A variação do diâmetro dos oócitos foi avaliada por Regressão Polinomial. As análises foram realizadas pelo programa JMP versão 5.0.1a (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Diferenças com probabilidades menores que 0,05 foram consideradas significativas.

3. Resultados

3.1 Experimento I

O diâmetro médio dos oócitos determinado imediatamente após a remoção do folículo foi de 102,6 μm (Figura 1). Ao término do cultivo de pré-MIV, o diâmetro dos oócitos variou entre 101,9 μm a 104,3 μm , sem diferença entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Da mesma forma, não foi observada diferença na comparação entre os grupos ao término do cultivo de MIV (diâmetro com variação entre 106,9 μm a 109,1 μm ; $P > 0,05$). Apesar de não ter sido observada diferença no diâmetro dos oócitos entre os grupos em cada momento avaliado, a análise ao longo do tempo, dentro cada grupo específico, demonstrou que houve crescimento dos

oócitos ao término do cultivo de MIV em todos os grupos experimentais em comparação ao diâmetro inicial ($P < 0,05$).

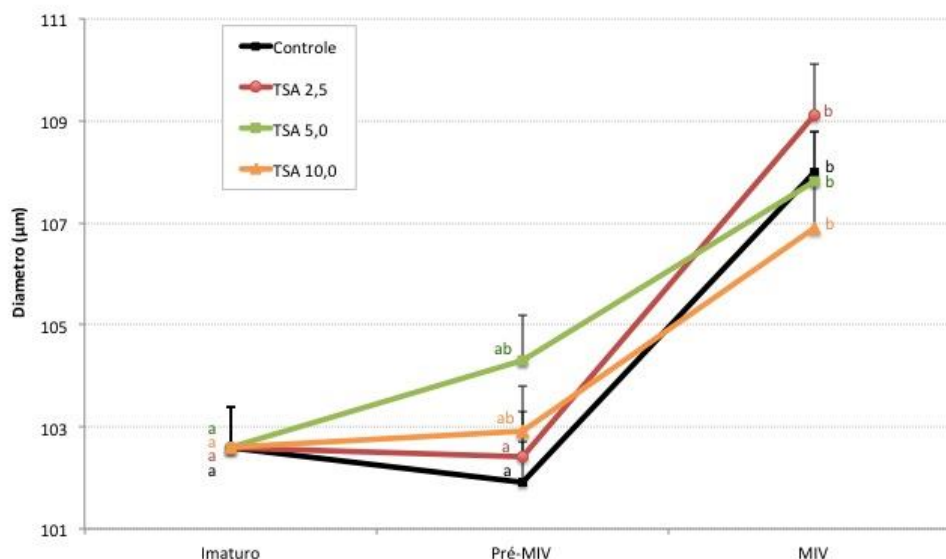


Figura 1. Diâmetro de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com diferentes concentrações de tricostatina (TSA). Os oócitos do grupo imaturo foram avaliados imediatamente após a remoção do ambiente folicular; após o cultivo de pré-maturação *in vitro* durante 24 horas em TCM199 suplementado com 0,3% BSA, 100 nM NPPC e 1×10^{-4} rFSH (controle), com diferentes concentrações de TSA (0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM); e após o cultivo de maturação *in vitro*.
^{ab}Letras distintas indicam diferença dentro de cada grupo experimental ao longo do tempo. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais quando comparados em cada momento específico (término da pré-MIV e término da MIV); todavia, houve diferença no diâmetro oocitário dentro de cada grupo específico quando analisado ao longo do tempo.

A viabilidade dos oócitos foi avaliada ao final da pré-MIV para investigação de algum possível efeito tóxico ou adverso da TSA nas diferentes concentrações testadas (Figura 2). Observou-se viabilidade na totalidade dos oócitos recém-removidos do folículo (imaturos) e a alta viabilidade foi mantida após o cultivo de pré-MIV no grupo controle (imaturo vs controle: $P > 0,05$). No entanto, a viabilidade dos oócitos pré-maturados na presença de TSA caiu em relação aos oócitos imaturos ($P < 0,05$), independentemente da concentração de TSA testada. Todavia, não houve diferença

entre os grupos pré-maturados na presença de TSA em comparação ao controle ($P>0,05$).

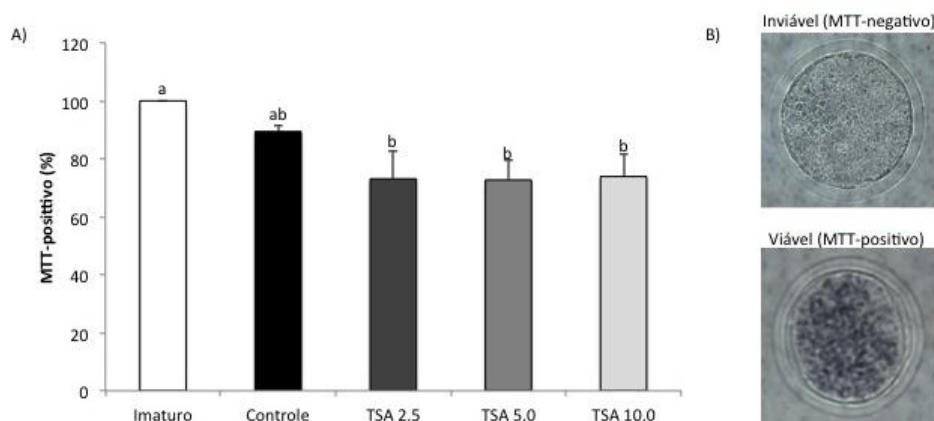


Figura 2. Viabilidade de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com diferentes concentrações de tricostatina (TSA). **A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM; 4 replicatas) de oócitos viáveis, determinada pela atividade mitocondrial de células vivas pela coloração com MTT. Os oócitos do grupo imaturo foram avaliados imediatamente após a remoção do ambiente folicular e os oócitos pré-maturados *in vitro* foram cultivados durante 24 horas em TCM199 suplementado com 0,3% BSA, 100 nM NPPC e 1×10^{-4} rFSH (controle), com diferentes concentrações de TSA (0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM). ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais. **B)** Imagens representativas mostrando o padrão de coloração com MTT em oócitos inviáveis (MTT-negativos: marcação ausente da coloração) e viáveis (MTT-positivos: marcação do citoplasma em cor arroxeada).

Ao final do cultivo de pré-MIV de 8 horas, observou-se que a maior parte dos oócitos estavam na categoria de GV0 (médias variando de 40,0 a 60,0%), no entanto não houve diferença entre os grupos nas diferentes estádios da meiose avaliados ($P>0,05$). Ao final das 24 horas do cultivo de pré-MIV, observou-se que houve aumento da compactação da cromatina dos oócitos cultivados em relação aos imaturos, independentemente da presença ou não de TSA. Ou seja, haviam menos estruturas com a cromatina difusa no estágio de GV0 em comparação com os imaturos.

(($P < 0,05$). Apesar disso, a maioria dos oócitos ainda estava com a meiose bloqueada em alguma das fases de GV. Os dados estão sumarizados na Figura 3.

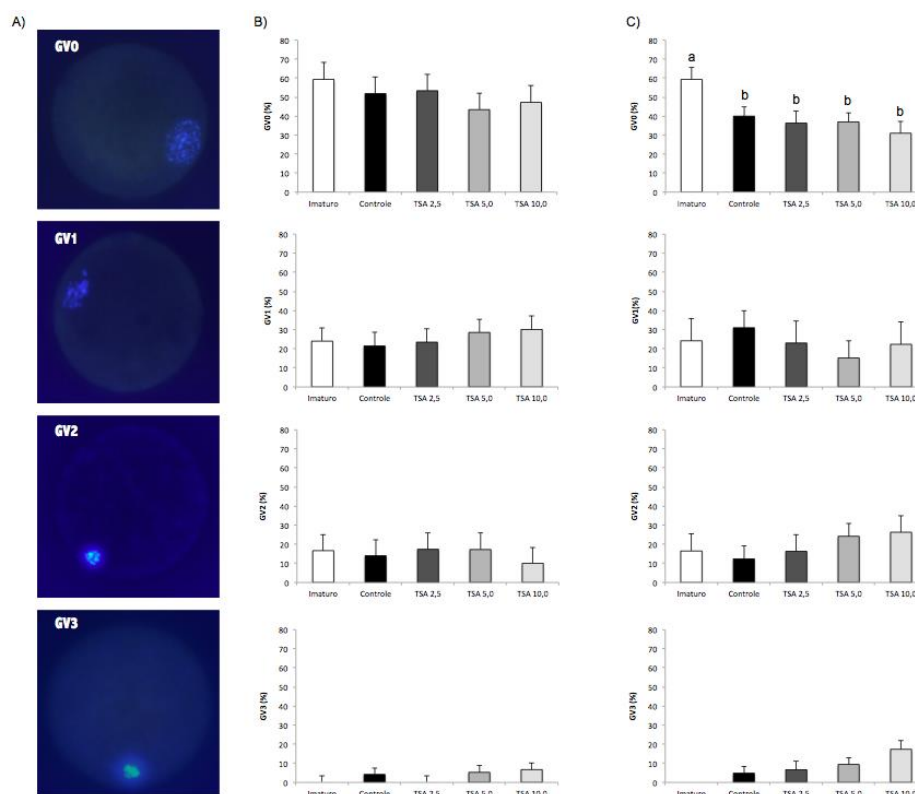


Figura 3. Padrão de compactação da cromatina de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com diferentes concentrações de tricostatina (TSA). **(A)** Imagens representativas da classificação dos estádios de GV (aumento de 20×). Os oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo ovariano (imaturos) ou após a pré-maturação durante 8 **(B)** ou 24 horas **(C)** na presença de NPPC e com diferentes concentrações de TSA (0 nM - controle, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM). Os gráficos representam a porcentagem (média $\pm$ EPM; 4 replicatas) de oócitos em cada configuração de GV em cada momento avaliado. ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais.

A atividade transcricional dos oócitos mensurada após 8 horas de cultivo de pré-MIV foi maior no grupo TSA 2,5 em relação ao controle e TSA 10,0 ($P < 0,05$; Figura 4). O grupo TSA 5,0 não diferiu dos demais tratamentos ($P > 0,05$).

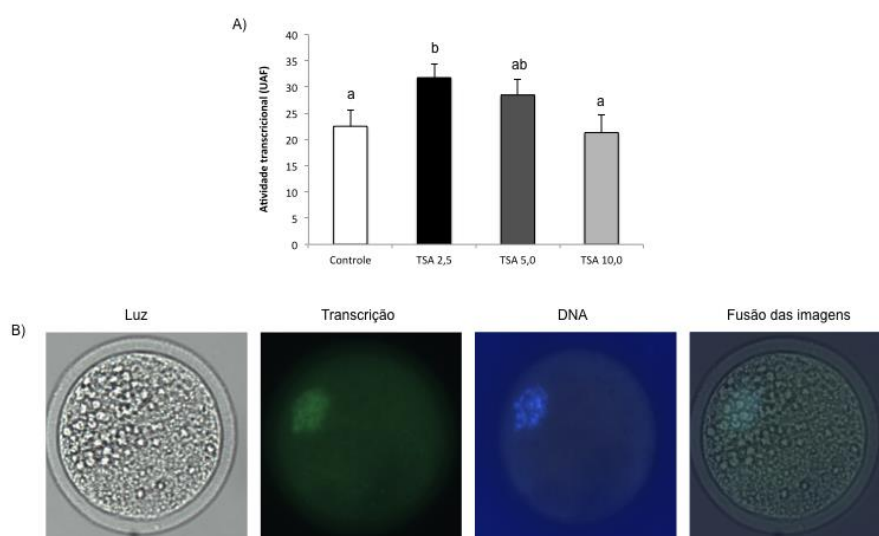


Figura 4. Atividade transcricional de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* por 8 horas com diferentes concentrações de tricostatina (TSA). **(A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM; 4 replicatas) de oócitos transcricionalmente ativos, determinados pela coloração do Click-it RNA, que identifica novos RNAs. Os oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo ovariano (imaturos) ou após a pré-maturação durante 8 horas. **(B)** Imagens representativas de oócitos na categoria de GV0 (aumento de 20 $\times$). Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais.

Ao término do cultivo de pré-MIV, os oócitos foram maturados *in vitro* por 22 horas, tendo sido avaliada a progressão da meiose e a qualidade dos oócitos maturados, com base na determinação dos níveis intracelulares de ROS e potencial de membrana mitocondrial. A maioria dos oócitos permaneceu com a meiose bloqueada na fase de GV (Figura 5A), sem diferença entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). A taxa de oócitos que concluíram a meiose variou entre 11,8% a 18,0%, sem diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (Figura 5B) foram menores ($P < 0,05$) nos grupos TSA 5.0 (3,5%) e TSA 10.0 (3,4%) em comparação ao controle (4,4%). No entanto, todos estes grupos foram similares ($P > 0,05$) ao grupo TSA 2.5 (3,9%).

O potencial de membrana mitocondrial (Figura 5C) não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos controle (58,2%), TSA 2.5 (62,5%) e TSA 5.0 (56,5%). Porém, foi observado menor potencial no grupo TSA 10.0 (50,2%) quando comparado ao controle ($P<0,05$).

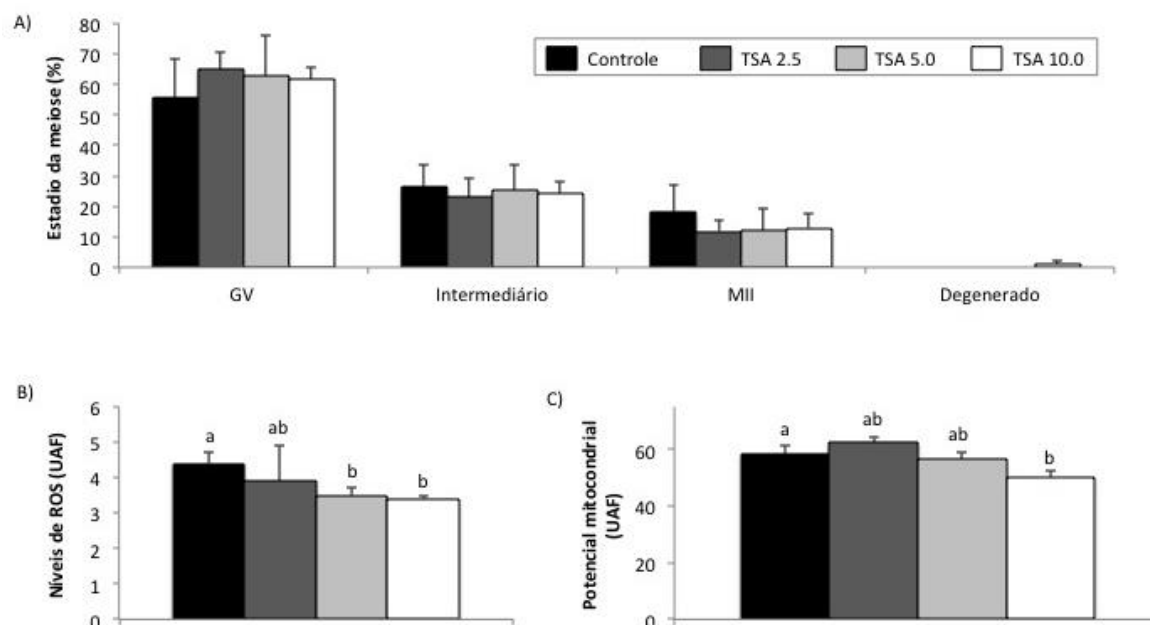


Figura 5. Progressão da meiose e parâmetros de avaliação da qualidade ao término do cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados *in vitro* com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM). **A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM) das fases da meiose. **B)** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). **C)** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em UAF). ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais, avaliados em 4 réplicas independentes.

Ao término dos cultivos de pré-maturação e de maturação *in vitro*, os oócitos foram fecundados para avaliação dos efeitos da TSA durante a pré-MIV sobre a aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário (Figura 6A). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais com relação às taxas de clivagem (variação entre 16,0% a 30,5%; $P>0,05$) e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (variação entre 1,0% a 4,0%; $P>0,05$).

Os blastocistos obtidos no D7 foram avaliados por alguns indicadores de qualidade, não tendo sido observada diferença entre os grupos ($P>0.05$) com relação ao número de blastômeros (Figura 6B), taxa de células apoptóticas (Figura 6C) e potencial de membrana mitocondrial (Figura 6D). Note-se que estas análises não foram feitas no grupo TSA 10.0, pois apenas 1 blastocisto foi produzido neste grupo.

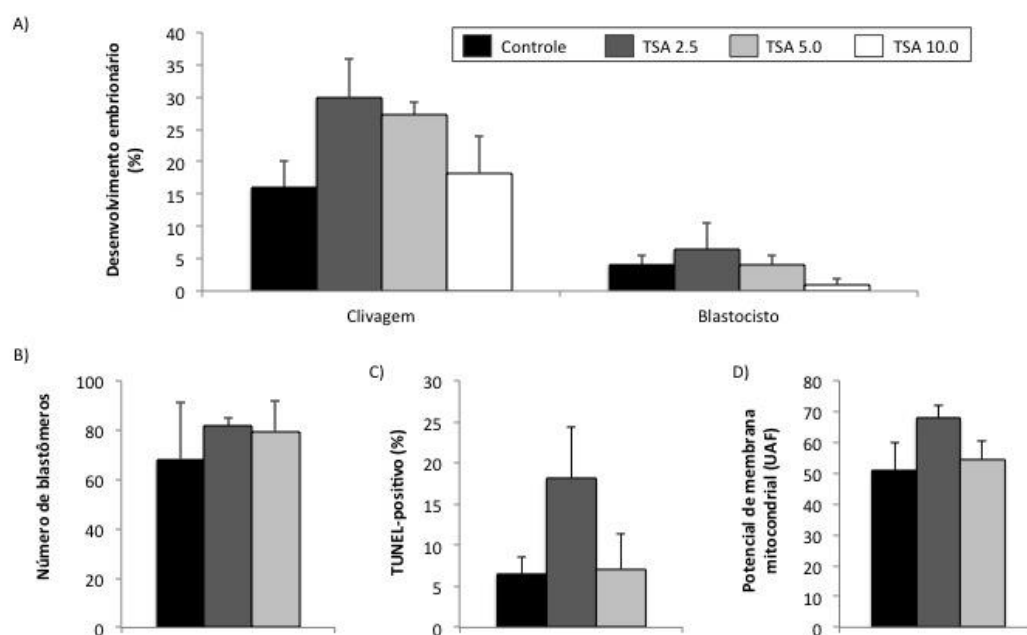


Figura 6. Desenvolvimento e indicadores de qualidade de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados *in vitro* com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM). **A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM) das fases de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto. Os blastocistos produzidos em D7 foram avaliados quanto ao: **B)** Número de blastômeros; **C)** Taxa de apoptose (percentual de células TUNEL-positivas em relação ao número total de blastômeros); e **D)** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). ^{ab} Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais, avaliados em réplicas independentes.

3.2 Experimento II

Nesta série de experimentos, oócitos recuperados de folículos antrais iniciais com diâmetros menores do que 2 mm foram pré-maturados *in vitro* na presença de

NPPC em meio pré-MIV enriquecido com cisteamina, ITS e IGF. De acordo com os resultados obtidos no Experimento I, determinou-se a utilização de TSA nas concentrações de 0 nM, 2,5 nM e 5 nM durante o cultivo de pré-MIV.

O diâmetro oocitário foi determinado em momentos específicos, visando avaliar a efetividade das condições de cultivo para permitir o crescimento final dos oócitos (Figura 7). O diâmetro médio dos oócitos mensurado imediatamente após a remoção do folículo ovariano foi de 102,5 μm . O diâmetro dos oócitos foi semelhante entre os grupos experimentais ao término da pré-MIV ($P>0,05$), sendo que também não foi observada diferença do diâmetro dos oócitos pré-maturados em comparação ao diâmetro dos oócitos imaturos ($P>0,05$). Ao término do cultivo de maturação não foi observada diferença ($P>0,05$) no diâmetro dos oócitos do grupo controle (104,2 μm) em comparação aos pré-maturados com TSA (2,5: 106,5 μm e 5,0: 105,9 μm); todavia, os oócitos cultivados com TSA exibiram maior diâmetro em comparação aos oócitos imaturos, independentemente da concentração de TSA utilizada no cultivo ($P<0,05$).

Também foi analisado o crescimento dos oócitos ao longo do tempo, dentro de cada grupo específico. Observou-se que o diâmetro dos oócitos do grupo controle não diferiu entre os momentos avaliados, ou seja, não houve crescimento ao término do cultivo de MIV em comparação aos imaturos ($P>0,05$). Em contrapartida, oócitos dos grupos tratados com TSA exibiram maior diâmetro ao término da maturação quando comparado aos imaturos ($P<0,05$).

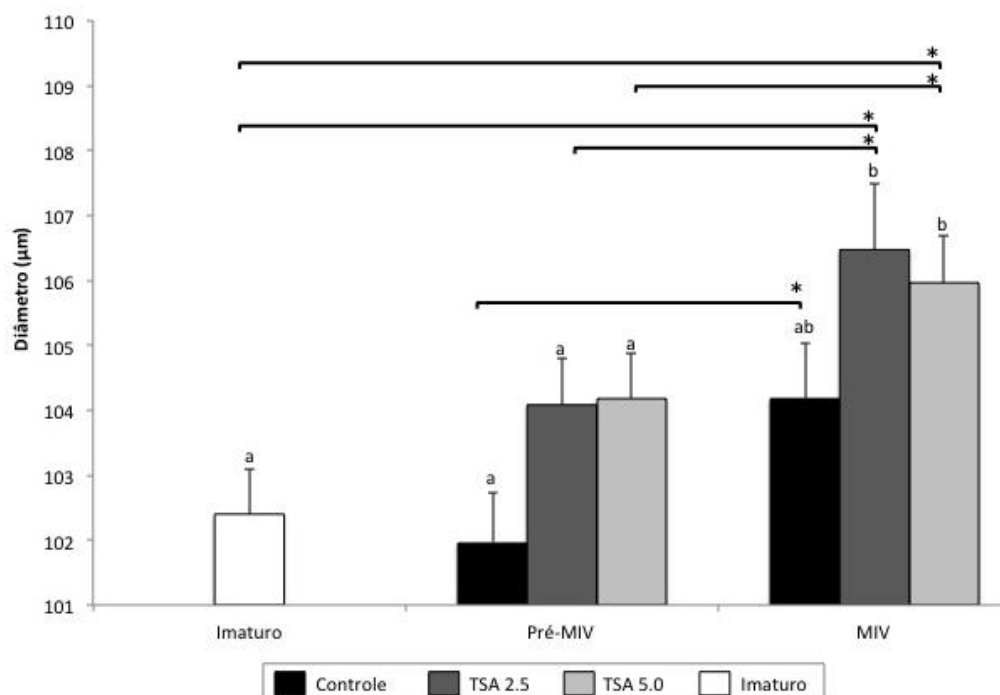


Figura 7. Diâmetro de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM). Os oócitos do grupo imaturo foram avaliados: imediatamente após a remoção do ambiente folicular; após o cultivo de pré-maturação *in vitro* durante 24 horas em TCM199 suplementado com 0,3% BSA, 100 nM NPPC e 1×10^{-4} rFSH (controle), com diferentes concentrações de TSA (0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM); e após o cultivo de maturação *in vitro*. ^{ab}Letras distintas sobre as barras indicam diferença entre os grupos experimentais dentro de cada momento específico do cultivo e também em comparação aos oócitos imaturos. *Asteriscos sobre as linhas conectando as barras dos diferentes momentos de cultivo indicam diferença dentro de cada grupo específico ao longo do tempo.

Foi avaliado o estadiamento da meiose a fim de verificar a eficácia da pré-MIV pelo bloqueio meiótico do NPPC nos oócitos em meio enriquecido (Figura 8). Os resultados mostraram que após ao final da pré-MIV por 8 horas, não houve diferença entre os grupos para as diferentes categorias de GV's ($P > 0.05$), sendo que a maior parte dos oócitos estava distribuído dentro destas categorias. Em contrapartida, quando foram avaliados ao término das 24 horas do cultivo de pré-MIV, observou-se maior compactação da cromatina nos oócitos cultivados em comparação aos oócitos imaturos, independentemente do cultivo ter sido realizado na presença de TSA ou

não. Desta forma, foram observadas menores taxas de oócitos cultivados na categoria de GV0 (médias entre 10,0 a 15,0% para oócitos cultivados vs 37,0% para o grupo Imaturo; $P < 0.05$). Resultados semelhantes foram observados para a categoria de GV1 (médias entre 10,0 a 15,0% para oócitos cultivados vs 40,0% para o grupo Imaturo; $P < 0.05$). Nas categorias de estadiamento da meiose GV2 e GV3, não houve diferença entre os grupos avaliados ($P > 0.05$).

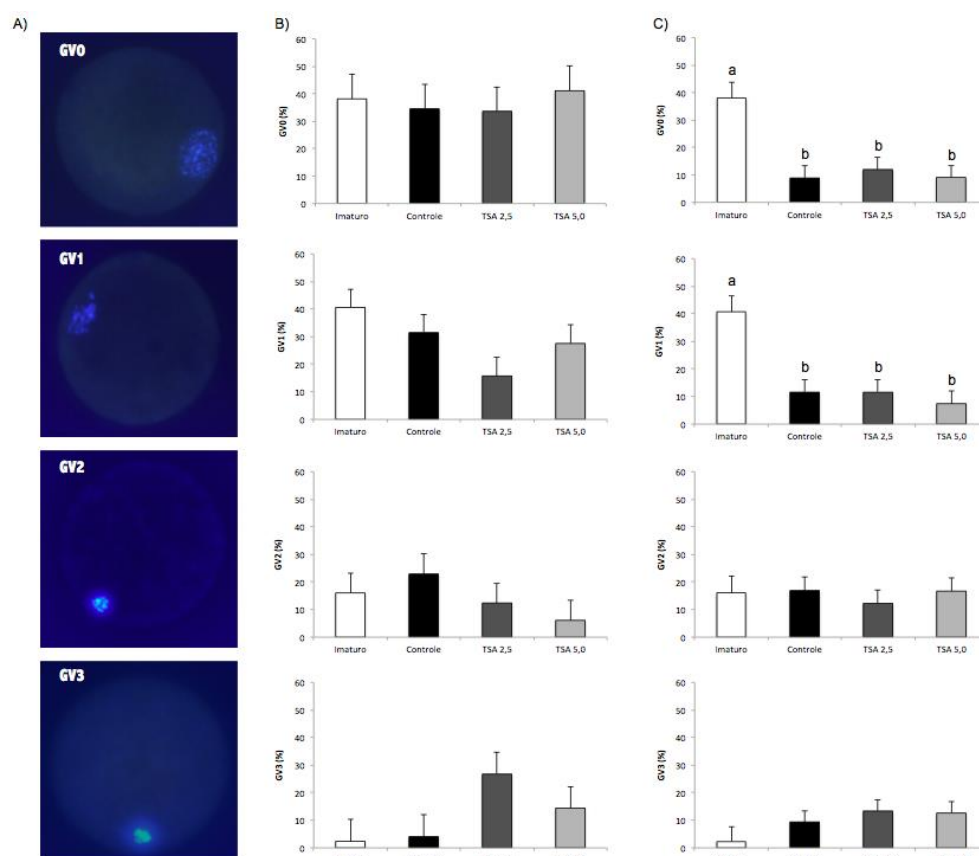


Figura 8. Padrão de compactação da cromatina de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM). **(A)** Imagens representativas da classificação dos estádios de GV (aumento de 20×). Os gráficos representam a porcentagem (média $\pm$ EPM; 4 replicatas) de oócitos classificados nas fases de GV imediatamente após a remoção do folículo ovariano (imaturos) e após a pré-maturação durante 8 **(B)** ou 24 horas **(C)**. ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais.

Ao final de 8 horas de cultivo de pré-MIV em meio enriquecido, os oócitos em GV0 foram avaliados quando à sua atividade transcricional (Figura 9).. Observou-se menor taxa de atividade nos oócitos do grupo Controle quando comparado ao grupos tratados com TSA (TSA 2,5 e TSA 5,0; $P < 0.05$). Quando os oócitos foram avaliados ao final de 24 horas de cultivo de pré-MIV, a atividade transcricional em oócitos do grupo TSA 5,0 foi maior quando comparada ao grupo TSA 2,5 ($P < 0.05$); no entanto, ambos não diferiram do grupo controle ($P > 0.05$).

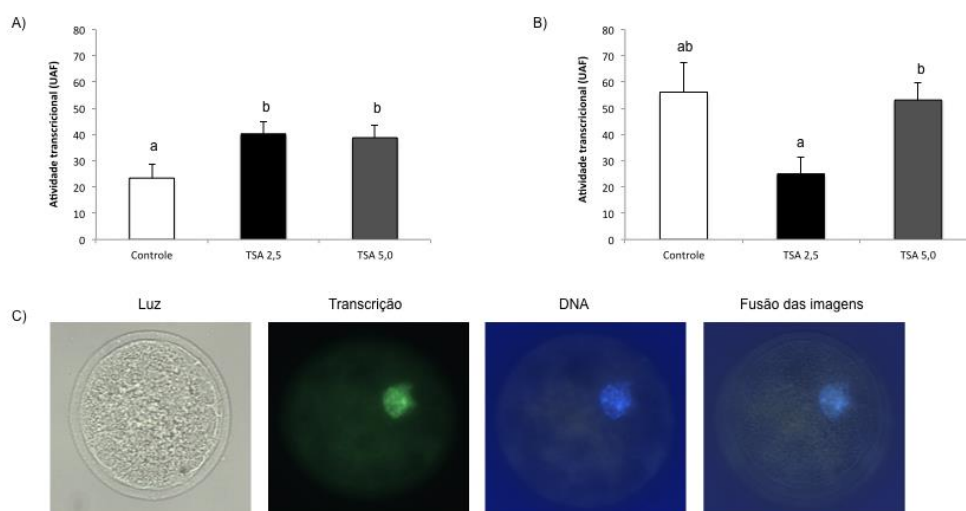


Figura 9. Atividade transcricional de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM). O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM; 4 replicatas) de oócitos transcricionalmente ativos, determinados pela coloração do Click-it RNA, que identifica novos RNAs. Os oócitos foram avaliados após a pré-maturação durante 8 **(A)** e por 24 horas **(B)**. **(C)** Imagens representativas de oócitos na categoria de GV0 (aumento de 20 $\times$).
^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais.

A qualidade dos oócitos foi avaliada ao término da pré-MIV. Observou-se que oócitos cultivados na presença de TSA exibiram menor conteúdo intracelular de ROS (Figura 10A) em comparação aos oócitos imaturos (imaturos: 4,6 UAF vs TSA 2,5: 3,6 UAF e TSA 5,0: 3,4 UAF; $P < 0.05$). O grupo controle (4,0 UAF), no entanto, foi semelhante a todos os grupos ($P > 0.05$). Por outro lado, não houve efeito do TSA sobre o potencial de membrana mitocondrial, não havendo diferença entre os grupos (Figura 10B; $P > 0.05$).

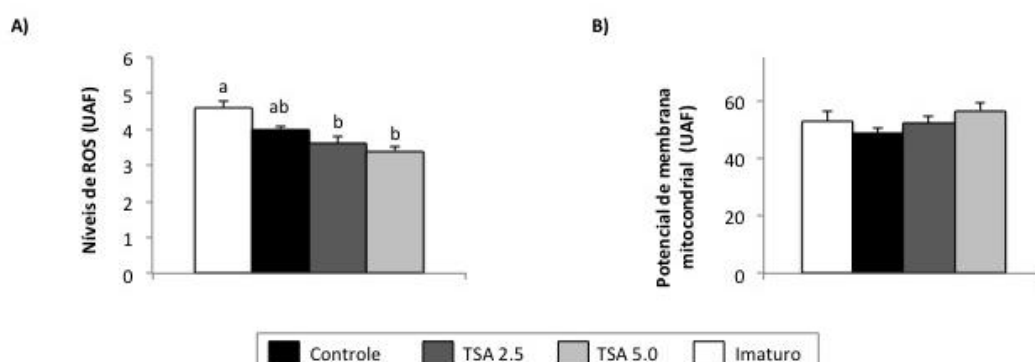


Figura 10. Indicadores de qualidade de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e pré-maturados *in vitro* com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM) durante 24 horas. **A)** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). **B)** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em UAF). Os oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo ovariano (imaturos) e após a pré-maturação durante 24 horas. ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais.

A progressão da meiose foi avaliada ao término do cultivo de maturação (Figura 11A). Não foi observada diferença entre os grupos ($P > 0,05$) nas categorias da meiose incompleta, ou seja, de oócitos imaturos com a meiose bloqueada em GV (variação entre 29,2% e 43,2%) e nas fases intermediárias da meiose (variação entre 22,7% e 29,9%). A taxa de conclusão da meiose (oócitos que atingiram metáfase II) variou entre 34,1% a 46,4%, sem diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Os oócitos também foram avaliados ao final da maturação quanto à sua qualidade, e não foram observadas diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos para os níveis intracelulares de ROS (Figura 11B) e sobre o potencial de membrana mitocondrial (Figura 11C).

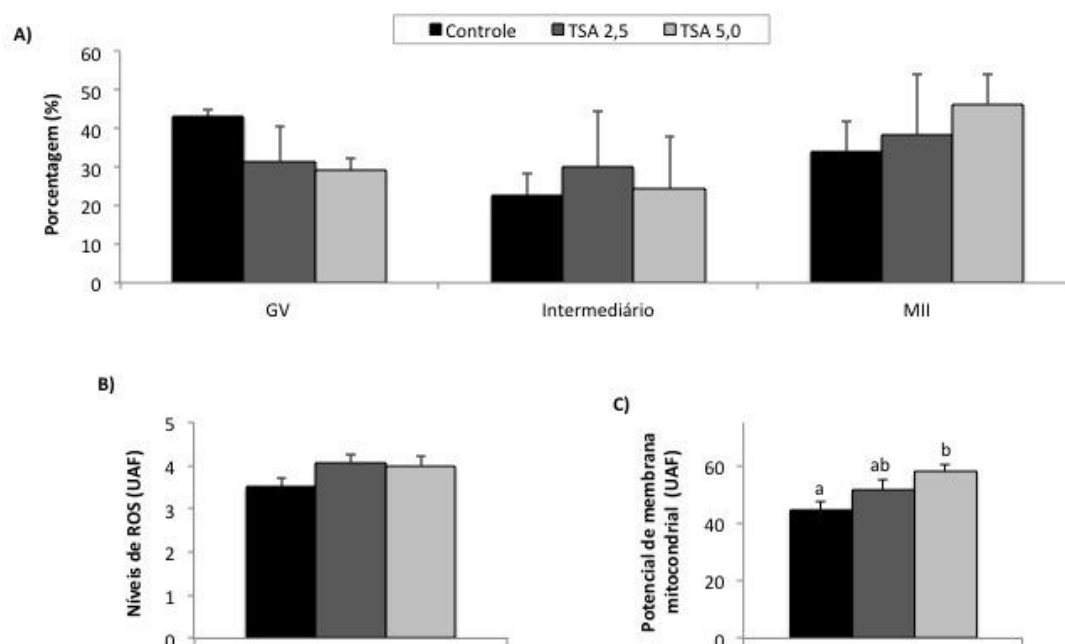


Figura 11. Progressão da meiose e indicadores de qualidade ao término do cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados *in vitro* com NPPC, cisteamina, ITS e IGF e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM - controle, 2,5 nM e 5,0 nM). **A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM) das fases da meiose. **B)** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). **C)** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em UAF).

Com o intuito de avaliar a aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário dos oócitos, foram avaliadas às taxas de clivagem e de produção de blastocistos e a qualidade dos embriões produzidos (Figura 12). Não houve diferença entre os grupos com relação ao desenvolvimento embrionário ($P > 0.05$), assim como não houve diferenças no número de blastômeros, nas taxas de apoptose e no potencial de membrana mitocondrial dos embriões ($P > 0.05$).

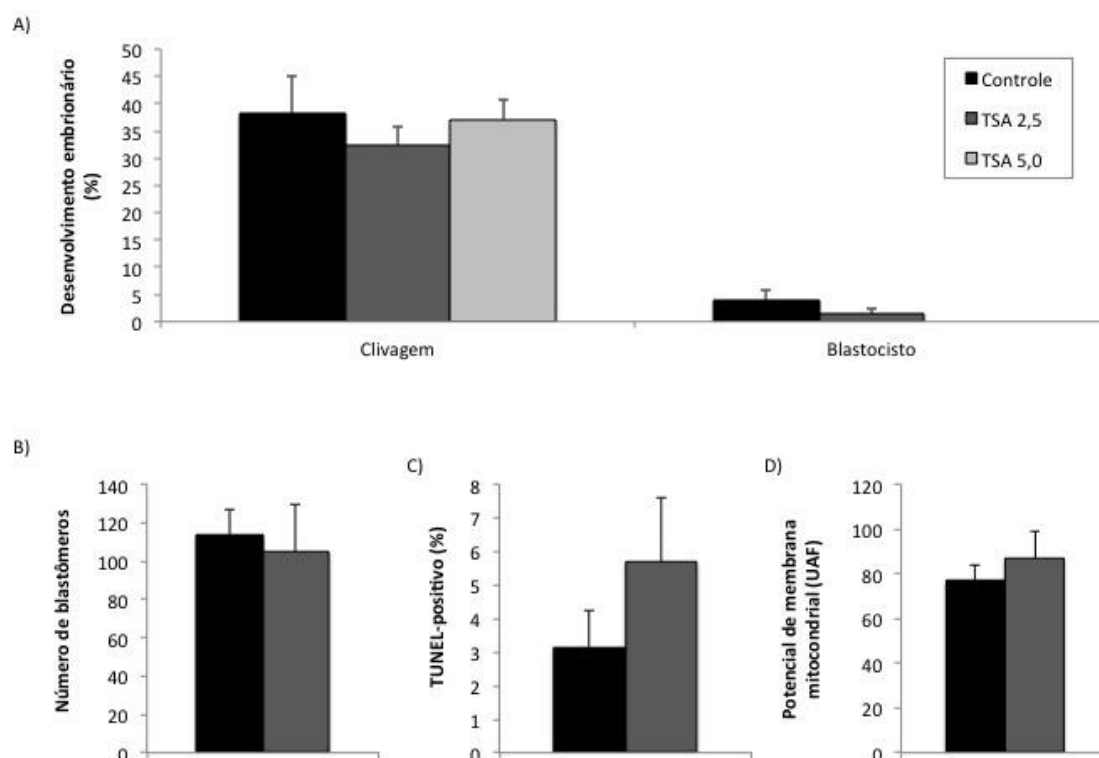


Figura 12. Desenvolvimento e indicadores de qualidade de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos bovinos recuperados de folículos antrais iniciais e previamente pré-maturados *in vitro* com NPPC e diferentes concentrações de tricostatina (TSA: 0 nM, 2,5 nM, 5,0 nM e 10,0 nM). **A)** O gráfico representa a porcentagem (média $\pm$ EPM) das fases de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto. Os blastocistos produzidos em D7 foram avaliados quanto ao: **B)** Número de blastômeros; **C)** Taxa de apoptose (percentual de células TUNEL-positivas em relação ao número total de blastômeros); e **D)** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). ^{ab}Letras distintas indicam diferença entre os grupos experimentais, avaliados em réplicas independentes.

4. DISCUSSÃO

No protocolo da biotecnologia de produção *in vitro* de embriões bovinos, não é recomendada a utilização de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais (menores que do 2 mm de diâmetro), pois embora estes oócitos exibam atividade transcricional (Bannister & Kouzarides, 2011), ainda não possuem competência meiótica e nem capacidade para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Essas falhas podem estar

associadas tanto ao fato de os oócitos ainda não terem finalizado o seu crescimento quanto também à retomada espontânea da meiose após a remoção do ambiente inibitório folicular, pois os oócitos ainda não acumularam todos os transcritos necessários para viabilizar a síntese de proteínas essenciais para as próximas etapas do desenvolvimento, tais como a progressão meiótica, a maturação citoplasmática e molecular, a fecundação, as primeiras clivagens e a transição materno-zigótica (Pavlok et al., 1992). Para prolongar o tempo destes oócitos em cultivo, visando a finalização do crescimento oocitário até o tamanho específico da espécie e o aumento no acúmulo de transcritos, propusemos no presente estudo submetê-los a um cultivo prolongado de pré-MIV na presença de uma droga promotora da hiperacetilação de histonas (TSA) e, conseqüentemente, da atividade transcricional (Silva et al., 2019).

No presente estudo, foi observado que oócitos removidos de folículos antrais iniciais cresceram em tamanho quando cultivados *in vitro* no sistema de pré-MIV prolongado em meio simples, seguido do cultivo de MIV (duração total do cultivo foi de 46 horas), independentemente de terem sido cultivados na presença de TSA ou não. Apesar do sistema de cultivo prolongado proposto ter proporcionado condições de crescimento aos oócitos, os mesmos não foram capazes de atingir o tamanho final, variando de 102 a 109 microns de diâmetro, diferente dos descritos anteriormente, onde a média da espécie fica em torno de 115 a 130 microns de diâmetro (Lodde et al., 2008). É sabido que apenas os oócitos plenamente crescidos já foram capazes de adquirir as competências meióticas e de desenvolvimento embrionário (Otoi et al., 1997) e, devido ao fato de que os oócitos ainda não terem finalizado a etapa de crescimento no sistema proposto neste estudo, é possível que tais competências não foram ainda adquiridas. Desta forma, estas competências foram avaliadas na continuidade do estudo, visando avaliar a viabilidade e ajustar o sistema de pré-MIV prolongada proposto.

Numa primeira etapa do estudo, foi avaliada a viabilidade dos oócitos tratados com diferentes concentrações de TSA durante a pré-MIV, objetivando-se determinar uma concentração efetiva para aumentar a atividade transcricional. Embora tenha sido observada diminuição da viabilidade dos oócitos tratados com TSA nas diferentes concentrações quando comparados aos oócitos imaturos, a viabilidade foi semelhante à do grupo controle. Desta forma, os resultados sugerem que a TSA não afeta a viabilidade dos oócitos quando utilizada em concentração de até 10 nM.

Com relação à efetividade do NPPC para manutenção do bloqueio da meiose em oócitos cultivados em meio simples de pré-MIV, foi observado que este sistema de cultivo permitiu a manutenção da maior proporção de oócitos na fase de GV0 (médias variando de 50 a 60%) ao término de 8 horas de cultivo. Isso era esperado, pois a ação efetiva do NPPC na manutenção do bloqueio meiótico é de apenas 8 horas, conforme anteriormente reportado por Franciosi et al., 2014 que apresentou 74% de oócitos em GV0. Ao final das 24 horas de cultivo, a maior proporção dos oócitos ainda estava com a meiose bloqueada na fase de GV, no entanto, houve maior compactação da cromatina, com diminuição da distribuição dos oócitos na categoria de GV0 e aumento nas categorias de GV1 a GV3 em comparação com o cultivo durante 8 horas. Apesar disso, o sistema de pré-MIV prolongado em meio simples proposto neste estudo foi eficaz na manutenção do bloqueio da meiose, especialmente na categoria de GV0 em que os oócitos exibem elevada atividade transcricional, decorrente da acetilação de histonas onde ocorre maior acesso ao DNA por fatores de transcrição promovendo maior síntese de RNAs, (Simonson e Gurdon, 2004). Devido a isso, o sistema de pré-MIV prolongado na presença de TSA permitiu aumento da atividade transcricional global (grupo TSA 2,5) quando comparado ao grupo controle, promovendo maior acúmulo de RNAm, proteínas e fatores de transcrição (Luciano et al, 2018). O acúmulo de transcritos no oócito, anteriormente à retomada da meiose, faz parte do que se denomina maturação molecular e é uma etapa essencial na aquisição das competências oocitárias (Lodde et al., 2008). O acúmulo de transcritos no oócito é essencial para a finalização do processo de oogênese, pois estes transcritos serão utilizados para a síntese de proteínas essenciais para permitir ao oócito que prossiga para as demais fases do desenvolvimento, incluindo a progressão e conclusão da meiose. Da mesma forma, também serão essenciais para viabilizar o sucesso da fecundação, primeiras clivagens e desenvolvimento do embrião até a transição materno-zigótica (Luciano et al., 2018).

Assim, foi avaliado se o aumento da atividade transcricional observado foi capaz de melhorar a aquisição da competência meiótica dos oócitos maturados in vitro. No entanto, poucas estruturas concluíram a meiose ao término da MIV (variação entre 34,1% a 46,4%). Estas taxas são muito baixas quando comparadas às taxas em torno de 80 a 90% de MII exibidas por oócitos derivados de folículos antrais maiores do que 3 mm de diâmetro, como anteriormente reportado na literatura (Ambroggi et al.,

2017; Rocha-Frigoni et al., 2016). Desta forma, os dados indicam que embora a atividade transcricional esteja aumentada em oócitos estimulados com TSA na concentração de 2,5 nM, o maior acúmulo de transcritos não promoveu aumento da competência meiótica destas estruturas conforme nossa hipótese inicial.

Por outro lado, ao avaliar a qualidade destes oócitos, foram observados menores níveis intracelulares de ROS nos oócitos tratados com TSA nas concentrações de 5,0 e 10,0 nM, sugerindo aumento na qualidade dos mesmos. Estes resultados sugerem que a TSA pode promover um efeito de proteção aos eventuais danos causados por estresse oxidativo nos oócitos cultivados *in vitro*, tais como manipulações excessivas, exposição à luz, variações de pH e de temperatura (Qiu et al., 2019). O efeito da TSA na atenuação do estresse oxidativo já foi anteriormente demonstrado no miocárdio, via ações sobre o aumento da acetilação de H4 da região promotora de FoxO3a (Guo et al., 2017), uma vez que o gene FoxO3a tem como função atuar na sobrevivência celular e resistência ao estresse oxidativo ativando SOD2 e catalase em resposta ao estresse (Nho et al., 2014). As mitocôndrias maternas acumuladas durante a maturação oocitária são fundamentais para a produção de energia destinada a eventos de liberação de cálcio, assim como para o crescimento e desenvolvimento embrionário (Jones 2004; Roth, 2018). O fato do potencial de membrana mitocondrial avaliado em oócitos do grupo TSA ter sido inferior em comparação ao controle, sugere que este resultado implicou em oócitos de baixa qualidade, assim como a produção e qualidade embrionária reduzida (Roth, 2018).

Embora não tenha sido verificado aumento nas taxas de produção embrionária após fecundação dos oócitos pré-maturados em meio simples, foi possível notar um aumento numérico nas taxas de blastocistos no grupo TSA 2,5, cujos oócitos exibiram maior atividade transcricional e melhor qualidade com base nos níveis intracitoplasmáticos de ROS. Portanto, apesar das baixas taxas de produção de embriões e de não ter sido observada diferença entre os tratamentos, os resultados do grupo TSA 2,5 sugerem uma melhoria da qualidade destes oócitos e estimulam a melhoria da estratégia proposta neste estudo, visando o aumento da aquisição das competências do oócito recuperado de folículos antrais iniciais (Hyttel et al., 1997).

Neste sentido, um segundo experimento foi realizado utilizando de substâncias estimuladoras ao cultivo de pré-MIV com ou sem TSA, que pudessem melhorar nossas taxas de maturação oocitária e competência para o desenvolvimento embrionário. No experimento anterior, o crescimento do oócito foi insuficiente, assim

como houve possíveis alterações oxidativas. Por isso, no intuito de regular o crescimento e desenvolvimento oocitário, propusemos adicionar insulin-like growth factor (IGF) como um fator anti-apoptótico, bem como auxiliar no crescimento folicular e desenvolvimento embrionário (Wasielak e Bogacki, 2007; Shabankareh e Zandi, 2010). Além disso, utilizamos a Cisteamina como um mecanismo de defesa no desequilíbrio de produção e liberação de ROS nos oócitos (Merton et al., 2013), assim como Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) também foi acrescida melhorando captação de glicose e aminoácidos e protegendo contra danos oxidativos (Córdova et al., 2010).

Quando avaliamos o crescimento dos oócitos, os grupos tratados com a TSA apresentaram maior tamanho quando comparado ao grupo Imaturo, no entanto, tiveram diâmetro ainda menor quando comparado ao meio simples (médias variando de 102 a 106 microns), indicando que o tamanho final dos oócitos cultivados em meio enriquecido durante a pré-MIV mesmo com a adição do IGF ao meio, mais uma vez não foi suficiente e distante dos tamanhos descritos anteriormente para a espécie (Lodde et al., 2008; Otoi et al., 1997). Com isso, sugere-se que os mecanismos que possibilita o crescimento dos oócitos derivados de folículos menores que 2 mm, ainda não foram bem elucidados. E o que se sabe, é que as células da granulosa estão fortemente relacionadas com o crescimento do oócito, pois seu contato íntimo auxilia na troca de moléculas e fatores de crescimento entre si (Matzuk et al., 2002). Com relação a maturação nuclear, a maioria dos oócitos também estavam bloqueados nas fases de GVs ao final de pré-MIV de 8 horas (Franciosi et al., 2014), no entanto, grande parte dos oócitos ao final da pré-MIV de 24 horas, progrediram para fases além das GVs. A partir disso, nos sugere que essa progressão da meiótica foi possível através das melhores condições de cultivo que o meio enriquecido proporcionou (Anchordoquy et al., 2015; Córdova et al., 2010; Yang et al., 2022), uma vez que as estruturas tratadas no meio de pré-MIV simples permaneceram nas fases de GVs até o final da pré-MIV de 24 horas. A partir da figura 9, foi observado um aumento sobre a atividade transcricional de oócitos tratados com TSA após 8 horas de pré-MIV em relação ao controle, no entanto, após 24 horas de pré-MIV os grupos TSA não diferiram do controle. Isso pode estar relacionado a retomada meiótica ao final das 24 horas, pois o maior remodelamento da cromatina é associado a diminuição da acetilação de histonas e consequentemente, diminuição da atividade de transcrição (Gu et al., 2010; Racedo et al., 2009). A qualidade dos oócitos tratados em meio enriquecido com TSA durante a pré-MIV de 24 horas, houve novamente um possível

efeito protetor da TSA contra o estresse oxidativo frente aos níveis de EROs (Guo et al., 2017). No entanto, ao final da MIV não demonstraram diferença, e ainda que numericamente apenas, as mesmas foram semelhantes as estruturas cultivadas em meio simples, desta forma a cisteamina não pôde melhorar esse cenário. Porém, o uso da Cisteamina e ITS pode ter melhorado o potencial de membrana mitocondrial após a progressão meiótica, principalmente no grupo TSA 5, uma vez que suas funções facilitam a produção de ATP pelas mitocôndrias através fornecimento de moléculas e atuando no controle oxidativo (Córdova et al., 2010; Merton et al., 2013).

A produção de embriões foi afetada significativamente ainda mais quando comparada aos dados do cultivo de pré-MIV em meio simples, e isso pode estar relacionado com o baixo crescimento dos oócitos, visto que o momento de maior acúmulo de transcritos designados ao desenvolvimento embrionário seja no final do crescimento oocitário (Labrecque et al., 2015).

A partir dos dados apresentados neste trabalho, foi visto que o meio enriquecido proporcionou maior aquisição de competência meiótica, mas não foi eficaz em promover aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário, visto que a taxa de produção de blastocisto foi muito baixa, assim como não houve diferença nos indicadores de qualidade entre os grupos.

5. CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que o sistema de cultivo de pré- maturação prolongado na presença de TSA e fatores de crescimento foi eficaz para promover o crescimento do oócito, melhorar sua qualidade pela redução do estresse e aumento da transcrição e, mesmo que em menor grau, proporcionar a aquisição da competência meiótica. Embora o sistema proposto não tenha sido eficaz para atingir o crescimento final do oócito e aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário, os resultados estimulam a continuidade do estudo, visando o aprimoramento do sistema para o melhor aproveitamento dos oócitos incompetentes obtidos de folículos antrais iniciais, visando aumentar a oferta de gametas femininos para o aproveitamento da biotécnica de produção de embriões *in vitro*.

REFERÊNCIAS

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010) Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum Reprod** 25: 2999-3011.

Ambrogi M, Dall'Acqua PC, Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Mingoti GZ (2017) Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in vitro. **Reprod Dom Anim** 52: 409-421.

Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Testa JA, Sirini MA, Furnus CC (2015) Influence of vascular endothelial growth factor and Cysteamine on in vitro bovine oocyte maturation and subsequent embryo development. **Cell Biol Int** 39: 1090-1098.

Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res** 21: 381-395.

Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M (2010) Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. **Toxicol In Vitro** 24: 224–230.

Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T (2010) Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology** 74: 1341-1348.

Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modena SC, Fadini R, Dal-Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM (2014) Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biol Reprod** 91: 1-9.

Gu L, Wang Q, Sun QY (2010) Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle** 9: 1942-1950.

Guo Y, Li Z, Shi C, Li J, Yao M, Chen X (2017) Trichostatin A attenuates oxidative stress-mediated myocardial injury through the FoxO3 signaling pathway. **Int J Mol Med** 40: 999-1008.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology** 47: 23-32.

Jin,YX, Zhao MH, Zheng Z, Kwon JS, Lee SK, Cui XS, Kim NH (2014) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A affects porcine oocyte maturation in vitro. **Reprod Fertil Dev**, 26: 806–816.

Jones A, Blerkom JV, Davis P, Toledo AA (2004) Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential implications for developmental competence. **Hum Reprod** 19: 1861-1866.

Labrecque R, Lodde V, Dieci C, Tessaro I, Luciano AM, Sirard MA (2015) Chromatin remodelling and histone mRNA accumulation in bovine germinal vesicle oocytes. **Mol Reprod Dev** 82: 450-462.

Lodde V, Modina S, Maddox-Hyttel P, Franciosi F, Lauria A, Luciano AM (2008) Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Mol Reprod Dev** 75: 915-924.

Lonergan P, Fair T (2008) In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts **Theriogenology** 69: 17-22.

Luciano A, Sirard MA (2018) Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biol Reprod** 98: 162-169.

Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V (2014) Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. **Anim Reprod Sci** 149: 3-10.

Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V (2011) Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biol Reprod** 85: 1252-1259.

Matzuk MM, Bruns KH, Viveiros MM, Eppig JJ (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science** 296: 2178-2180.

Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction** 130: 791-799.

Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BAJ, Vos PLAM, Mullaart E (2013) Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology** 80: 365-371.

Nho RS, Hergert P (2014) FoxO3a and disease progression. **World J Biol Chem** 5: 346-354.

Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997) Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology** 48: 769-774.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H (1992) Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev** 31: 63-67.

Qiu X, Rong X, Yang J, Lu Y (2019) Evaluation of the antioxidant effects of different histone deacetylase inhibitors (HDACis) on human lens epithelial cells (HLECs) after UVB exposure. **BMC Ophthalmol** 19: 1-12.

Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H (2009) Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev** 21: 738-748.

Re M, Zhang T, Yang Y, Wang C (2021) Mechanisms of oocyte maturation and related epigenetic regulation. **Front Cell Dev Biol** 9: 654028.

Rocha-Frigoni NAS, Leão BSC, Dall'Acqua PC, Mingoti GZ (2016) Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology** 86: 1897-1905.

Roth Z (2018) Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. **J Dairy Sci** 101: 3642-3654.

Shabankareh HK, Zandi M (2010) Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. **Fertil Steril** 94: 335-340.

SILVA, CG, Martins CF et al. (2019) Use of trichostatin A alters the expression of HDAC3 and KAT2 and improves *in vitro* development of bovine embryos cloned using less methylated mesenchymal stem cells. **Reprod Domest Anim** 54:289-299.

Simonsson S, Gurdon J (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nat Cell Biol** 6: 984-990.

Tseng JK, Chen CH, Chou PC, Yeh SP, Ju JC (2004) Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reprod Domest Anim** 39:146-153.

Wasielak M, Bogacki M (2007) Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **J Reprod Dev** 53: 419-426.

Yang S, Yang Y, Hao H, Du W, Pang Y, Zhao S, Zou H, Zhu H, Zhang P, Zhao X (2022) Supplementation of EGF, IGF-1, and Connexin 37 in IVM Medium Significantly Improved the Maturation of Bovine Oocytes and Vitrification of Their IVF Blastocysts. **Genes** 30: 1-13.