

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO AGENTE MODIFICADOR EPIGENÉTICO
(TRICOSTATINA A) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES FÊMEAS DE
BOVINOS**

Bruna Mazeti Silva
Zootecnista

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
-2011-**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO AGENTE MODIFICADOR EPIGENÉTICO
(TRICOSTATINA A) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES FÊMEAS DE
BOVINOS**

Bruna Mazeti Silva

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui

Co-orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

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

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Outubro - 2011**

S586e Silva, Bruna Mazeti
Efeitos do agente modificador epigenético (Tricostatina A) no desenvolvimento embrionário pré-implantacional de embriões fêmeas de bovinos / Bruna Mazeti Silva. – – Jaboticabal, 2011
xiii, 49 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Jeffrey Frederico Lui
Banca examinadora: Gilson Hélio Toniollo, Sandro Henrique Antunes Ribeiro
Bibliografia

1. Epigenética. 2. Inibidor de histona desacetilase. 3. Produção *in vitro*. 4. Bovinos. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BRUNA MAZETI SILVA – nascida no município de Uberaba, MG, aos 24 dias do mês de julho de 1987, concluiu o curso colegial no “Colégio Cenecista Doutor José Ferreira”, na cidade de Uberaba, MG, em dezembro de 2004. Ingressou em fevereiro de 2005 no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, no município de Diamantina, MG; obteve bolsa de Iniciação Científica pela FAPEMIG. Concluiu, em julho de 2009, o curso superior em Zootecnia. Ingressou, em agosto de 2009, no curso de Pós-graduação (Mestrado), sob a orientação do Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui, no Programa de Genética e Melhoramento Animal, e a co-orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, com bolsa de Mestrado pela CAPES.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Período pré-implantacional em bovinos	5
3.1.1. Desenvolvimento e viabilidade embrionária	8
3.2. Modificações epigenéticas na regulação da expressão gênica durante a pré-implantação embrionária	10
3.3. Dinâmica de acetilação das histonas durante o desenvolvimento embrionário precoce	13
3.4. Efeitos da TSA na expressão gênica	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Preparação e seleção de oócitos	17
4.1.1. Maturação <i>in vitro</i>	17
4.1.2. Fertilização <i>in vitro</i>	18
4.1.3. Cultura <i>in vitro</i>	18
4.2. Tratamento com TSA	19
4.3. Reações de imunocitoquímica de H3K9 acetilada	19

4.4. Contagem diferencial das células da massa celular interna e do trofotoderma	20
4.5. Experimento 1: Efeitos do tratamento com TSA nos níveis de H3K9ac	21
4.6. Experimento 2: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário	21
4.7. Experimento 3: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a qualidade embrionária (número de células da MCI e TE)	21
4.8. Análises estatísticas	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Experimento 1: Efeitos do tratamento com TSA nos níveis de H3K9ac	23
5.2. Experimento 2: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário	26
5.3. Experimento 3: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a qualidade embrionária (número de células da MCI e TE)	28
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Efeitos da suplementação do meio de cultivo com Tricostatina A (TSA) sobre a clivagem, após 48 horas de FIV (porcentagem) e o desenvolvimento embrionário até blastocisto (porcentagem), no 7º dia após a FIV	26
Tabela 2. Efeitos da suplementação do meio de cultivo com Tricostatina A (TSA) na média de células da massa celular interna (MCI), da trofotoderma (TE) e totais em blastocistos corados por meio de coloração diferencial por fluorocromos após 7 dias de fecundação	29

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação: (A) Embrião de 2 células; (B) Embrião de 4 células; (C) Embrião de 8 células; (D) Mórula compacta; (E) Blastocisto inicial, com um pequeno fluido dentro da cavidade blastocística; (F) Blastocisto expandido (HARDY & SPANOS, 2002)	5
Figura 2. Ativação do genoma embrionário, caracterizada pela substituição gradual da atividade transcripcional materna pela atividade transcripcional do embrião. Em ruminantes, a ativação do genoma ocorre no estágio de 8 a 16 células (Adaptado de HARDY & SPANOS, 2002)	7
Figura 3. Blastocisto expandido mostrando a diferenciação de células do trofotoderma, que dará origem à placenta e às membranas extra-embrionárias; e da massa celular interna, que dará origem ao feto. O embrião é rodeado por uma camada acelular de glicoproteína, a zona pelúcida, importante para a aderência do espermatozóide ao oócito e integridade dos embriões (Adaptado de HARDY & SPANOS, 2002)	9
Figura 4. Representação dos grupos de blastocistos derivados de TN de acordo com a proporção de MCI:células totais: (A) grupo I: < 20%, (B) grupo II: 20–40%, (C) grupo III: 40–60%, (D) grupo IV: > 60% (KOO et al., 2002)	10
Figura 5. Controle epigenético da expressão gênica. As enzimas HATs acetilam as caudas das histonas, abrindo a estrutura da cromatina, ativando a transcrição. A remoção do grupo acetil pelas enzimas HDACs	

resulta na condensação da cromatina e repressão transcricional. (Adaptado de Nugent & McCarthy, 2011)	14
Figura 6. Efeitos da suplementação do meio de cultivo in vitro com Tricostatina A (TSA) sobre os níveis de H3K9ac em embriões fêmeas de bovinos. (a-d) Núcleos de diferentes grupos corados com Hoechst 33342. (a'-d') Imunocitoquímica de H3K9ac usando o corante Cy3 no dia 7	24
Figura 7. Níveis relativos de H3K9ac do grupo controle (TSA0) e do tratamento com 5 nM de TSA (TSA5). Colunas com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($p < 0,01$)	25
Figura 8. Porcentagem de clivagem após maturação in vitro de oócitos após 48 horas de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	27
Figura 9. Taxa de blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	28
Figura 10. Blastocistos corados pela técnica de coloração diferencial, 7 dias após FIV, observados em microscópio de epifluorescência	29
Figura 11. Número médio de células distribuídas em MCI, TE e células totais dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	30
Figura 12. Número de células da MCI dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	31

Figura 13. Número de células da TE dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	32
Figura 14. Número de células totais dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	33
Figura 15. Porcentagem de blastocistos que apresentaram células na proporção igual ou maior que 1:2 de MCI:TE, após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	34
Figura 16. Distribuição de blastocistos de acordo com a relação de MCI:células totais. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA	35

ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
CCOs	Complexo <i>cumulus</i> oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Células totais
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
DNA	Ácido dexoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
H3K9ac	Lisina 9 acetilada na histona H3
H3K4me	Lisina 4 metilada na histona H3
H3K9me	Lisina 9 metilada na histona H3
H3K20me	Lisina 20 metilada na histona H3
H3K27me	Lisina 27 metilada na histona H3
H3K36me	Lisina 36 metilada na histona H3
H3K79me	Lisina 79 metilada na histona H3
HAT	Histonas Acetiltransferases
HDAC	Histona desacetilase
HTM	Histonas Metiltransferases
MCI	Massa Celular Interna
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol

nm	Nanômetro
nM	Nanomol
PBS	Tampão Salina Fosfato
PI	Iodeto de propídeo
PIV	Produção <i>in vitro</i>
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
SAS	“Statistical Analysis System”
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRT	Sirtuína (deacetilase NAD-dependente)
SOF	Meio de cultivo “Synthetic Oviduct Fluid”
TA	Temperatura Ambiente
TALP	Tyrodé’s albumina lactato piruvato
TCM	Meio de Cultura para Tecidos
TE	Trofectoderma
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TSA	Tricostatina A
χ^2	Qui-quadrado
Xi	Cromossomo X inativo
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromol

EFEITOS DO AGENTE MODIFICADOR EPIGENÉTICO (TRICOSTATINA A) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES FÊMEAS DE BOVINOS

RESUMO – A acetilação das histonas é um dos principais mecanismos de reprogramação epigenética do genoma dos gametas a fim de estabelecer um estado totipotente para o desenvolvimento normal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da utilização da Tricostatina A (TSA) sobre os níveis de acetilação das histonas e o desenvolvimento embrionário, avaliando-se a contagem do número de células da massa celular interna (MCI), trofotoderma (TE), e células totais, e os níveis da reação de imunocitoquímica para H3K9ac. Para isso, três experimentos foram delineados. No primeiro experimento, verificou-se que o grupo tratado com 5nM de TSA por 144h durante o cultivo *in vitro* (CIV) aumentou ($p<0,01$) o nível de H3K9ac em relação ao grupo controle. A taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados em um segundo experimento, e o grupo tratado com 5nM de TSA não apresentou diferença na produção de embriões comparado ao grupo controle. No experimento 3, o tratamento com a TSA não apresentou efeitos significativos em relação ao número de células da MCI, porém houve redução ($p<0,01$) tanto do número de células da TE quanto de células totais comparado ao grupo controle. Portanto, conclui-se que o tratamento com TSA não altera o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de embriões fêmeas de bovinos, mostrando efeito negativo sobre o desenvolvimento dos embriões tratados.

Palavras-Chave: bovinos, epigenética, inibidor de histona desacetilase, produção *in vitro*

EFFECTS OF EPIGENETIC MODIFYING AGENT (TRICHOSTATIN A) IN PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT FEMALE BOVINE EMBRYOS

SUMMARY – Histone acetylation is one of the major mechanisms of epigenetic reprogramming of gamete genome to establish a totipotent state for normal development. The aim of this work was to evaluate the use of Trichostatin A (TSA) on the levels of histone acetylation and embryonic development, the assessment of counting the cell number of inner cell mass (ICM), trophectoderm (TE), and total cells, and the levels of H3K9ac for immunocytochemical reaction. Therefore, three experiments were designed. In the first experiment, it was verified that the group treated with TSA for 5nM for 144h during in vitro culture (IVC) increased ($p < 0.01$) the level of H3K9ac in the control group. Cleavage rate and embryo development were evaluated in a second experiment, and the group treated with 5nM TSA showed no difference in embryo production compared to control. In Experiment 3, treatment with TSA had no significant effect on the cell number of ICM, but decreased ($p < 0.01$) both the cell number of TE and total cells as compared to control. Therefore, it is concluded that treatment with TSA does not alter the preimplantation embryonic development female bovine embryos, showing a negative effect on the development of embryos treated.

Keywords: bovine, epigenetics, histone deacetylase inhibitor, in vitro production

1 INTRODUÇÃO

Apesar da técnica de FIV ter sido estabelecida em bovinos desde 1980 (BRACKETT et al. 1982), os resultados obtidos *in vitro* ainda são muito inferiores aos obtidos *in vivo*. Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar a eficiência da produção *in vitro* (PIV), porém, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (LONERGAN & FAIR, 2008). Além disso, o CIV aumenta a proporção de embriões do sexo masculino, que se desenvolvem mais rápido (AVERY et al., 1992) e atingem a fase de blastocisto com mais frequência (XU et al., 1992).

Dentre os diferentes eventos que caracterizam o período de pré-implantação em bovinos, a ativação do genoma embrionário pode ser considerada como um dos mais importantes, ocorrendo durante a transição do estágio de oito a 16 células (BADR et al., 2007). A transição materno-zigótica é essencial para a ativação de um grande número de genes, alcançando assim um padrão de expressão gênica compatível com o desenvolvimento embrionário e a diferenciação (SCHULTZ, 2002).

As altas taxas de mortalidade embrionária observada após a FIV de bovinos podem estar associadas com a parada de desenvolvimento durante a transição do quarto para o quinto ciclo celular (MEMILI & FIRST, 2000) como um resultado da incapacidade do embrião para modificar a estrutura da cromatina repressiva e ativar a transcrição de genes importantes para o desenvolvimento (BETTS & KING, 2001). Além disso, a FIV de embriões que adquirirem transcrição ativa podem apresentar alterações nas modificações epigenéticas da cromatina (ENRIGHT et al., 2003) que resultam em um perfil diferente do gene de transcrição entre embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (WRENZYCKI et al., 2004).

A PIV de embriões afeta mecanismos epigenéticos envolvidos no controle da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e à inativação do cromossomo X. O processo fisiológico de inativação de um cromossomo X no embrião fêmea de mamíferos pode ser afetado, comprometendo a viabilidade das fêmeas no

sistema *in vitro*, comparado aos machos. Logo, a alteração da expressão de genes localizados no cromossomo X e envolvidos no processo da inativação do X, pode contribuir para maior proporção de embriões machos na PIV.

Uma vez que o cromossomo X é inativado em uma célula, todas as suas descendentes terão o mesmo Xi (LUCIFERO et al., 2004). Faz-se necessária, então, a existência de mecanismos de manutenção desse estado silenciado, o que se dá por meio de modificações epigenéticas.

Uma das mais importantes modificações epigenéticas é a acetilação das histonas. Quando ocorre, a interação da cauda da histona com o nucleossomo é enfraquecida, liberando o DNA local para a transcrição. Assim, a acetilação de histonas pode aumentar o acesso de fatores de transcrição ao DNA, e desta forma, altos níveis de acetilação podem levar a aumentos significativos na transcrição gênica (VERDONE et al., 2005).

Em bovinos, logo após a fertilização, a hiperacetilação da histona ocorre inicialmente no pronúcleo masculino e só depois no pronúcleo feminino, resultando em maior grau de acetilação de histonas em núcleos masculinos do que em femininos (WEE et al., 2006).

A tricostatina A (TSA) é um inibidor reversível das enzimas histona-desacetilases (HDAC), que promove aumentos globais na expressão gênica (JOHNSTONE, 2002), podendo afetar o perfil de transcrição dos genes expressos em baixos níveis de PIV de embriões, aumentando a expressão destes genes para perto dos níveis normais. As HDAC retiram grupamentos acetil das histonas, portanto sua inibição promove o aumento dos níveis globais de acetilação. Oócitos bovinos maduros expressam essas enzimas (MCGRAW et al., 2003) e elas funcionam na remodelação do genoma dos gametas após a fertilização para estabelecer um estado totipotente para o desenvolvimento normal.

Ikeda et al. (2009) mostraram que o tratamento com TSA durante a FIV induziu a acetilação das histonas em estágio pronuclear de embriões bovinos, assim como aumentou o número de células da massa celular interna (MCI) e o número de células

totais (CT) em blastocistos. Oliveira et al. (2010) demonstraram que a PIV de embriões com sêmen convencional em concentrações superiores a 15nM de TSA por 24 horas foi tóxico para os embriões. Apenas a concentração de 5 nM de TSA resultou em melhor taxa de produção de blastocistos comparado ao obtido no controle quando aplicada até o dia sete de desenvolvimento (144h).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da Tricostatina A no cultivo *in vitro* de embriões fêmeas de bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar o desenvolvimento dos oócitos bovinos fertilizados *in vitro* até o estágio de blastocisto, utilizando ou não o agente modificador epigenético TSA.

Avaliar o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* por coloração diferencial e contagem do número de células da massa celular interna (MCI), células do trofotoderma (TE) e células totais.

Avaliar o padrão de acetilação das Histonas no DNA dos embriões fêmeas de bovinos, através do anticorpo de acetilação H3K9ac.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Período pré-implantacional em bovinos

Nos mamíferos, o período de pré-implantação pode ser compreendido entre a formação do zigoto até pouco além da fase de blastocisto, conforme mostrado na Figura 1. Este período de desenvolvimento é caracterizado por etapas biológicas distintas que ocorrem após a fertilização do oócito que incluem desde a primeira clivagem; a ativação do genoma embrionário; a compactação e a formação da polarização do epitélio embrionário; a diferenciação de mórula em blastocisto até a implantação do embrião no epitélio uterino (SCHULTZ et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2005), sendo que cada uma destas etapas é acompanhada por mudanças no padrão e no perfil da expressão gênica (WARNER & BRENNER, 2001).

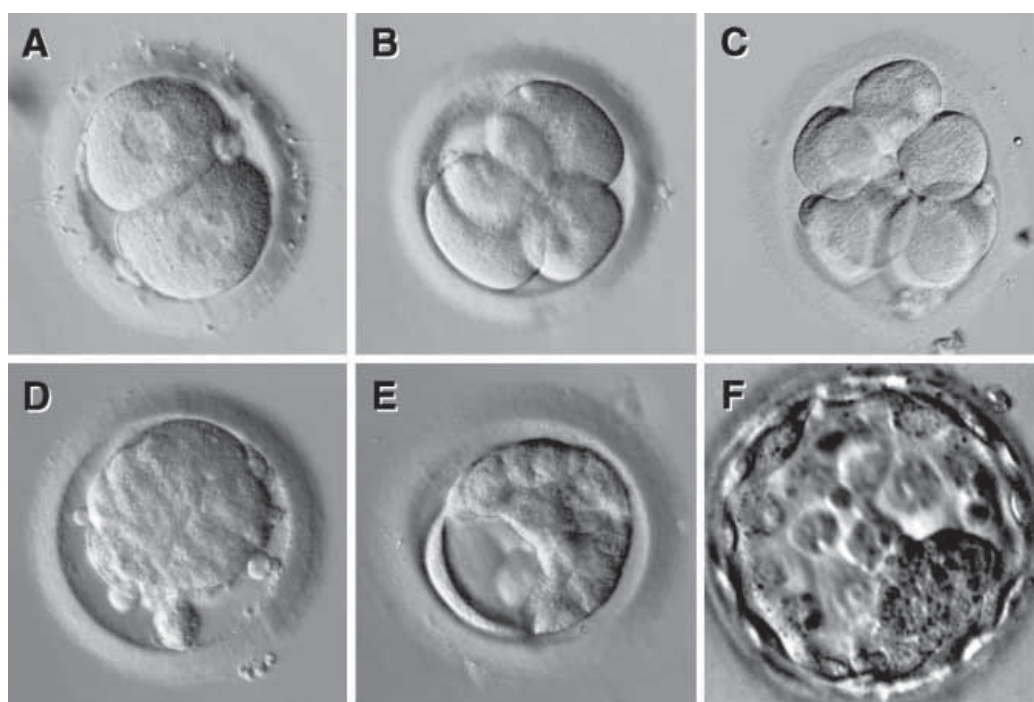


Figura 1. Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação: (A) Embrião de 2 células; (B) Embrião de 4 células; (C) Embrião de 8 células; (D) Mórula compacta; (E) Blastocisto inicial, com um pequeno fluido dentro da cavidade blastocística; (F) Blastocisto expandido (HARDY & SPANOS, 2002).

As principais mudanças morfológicas que ocorrem no embrião durante os estágios iniciais da embriogênese bovina são a compactação dos blastômeros (mórula compacta) e o desenvolvimento da blastocèle (blastocisto inicial). Acredita-se que a ativação do genoma embrionário esteja associada a esses eventos, a qual resulta em inativação da atividade transcricional materna e aumento da atividade biosintética do embrião (FREI et al., 1989).

A mortalidade de embriões em estágio inicial de desenvolvimento é reconhecida como uma das maiores falhas reprodutivas, tendo como principal causa a ocorrência de problemas de sinalização conceito-maternal. Em bovinos, durante a transição do quarto para o quinto ciclo celular, o embrião é responsável pela transcrição e tradução de seu próprio genoma, quando há a substituição gradual de transcritos maternos pelos embrionários (GANDOLFI & GANDOLFI, 2001; FAIR et al., 2007). Porém, nesta fase, os embriões cultivados *in vitro* são mais sensíveis ao bloqueio do desenvolvimento que coincide com a ativação do genoma embrionário (MEMILI & FIRST, 2000), resultado da incapacidade do embrião modificar a estrutura da cromatina repressiva e ativar a transcrição de genes importantes para o desenvolvimento (BETTS & KING, 2001).

A ativação do genoma embrionário pode ser considerada uma das mais importantes etapas que caracterizam o período de pré-implantação em mamíferos. A ativação ocorre quando os transcritos expressos a partir do genoma zigótico/embrionário substituem os transcritos maternos, que passam a direcionar o desenvolvimento inicial (Figura 2).

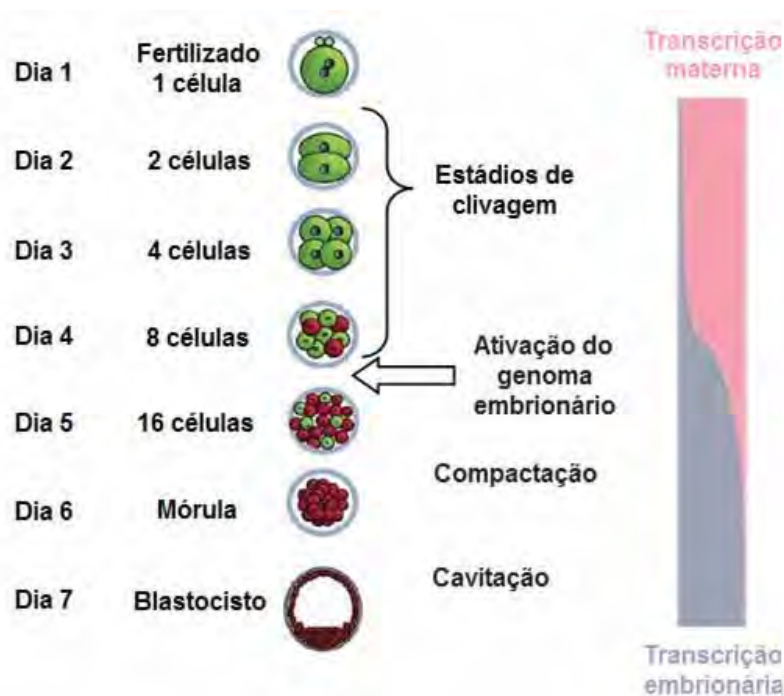


Figura 2. Ativação do genoma embrionário, caracterizada pela substituição gradual da atividade transcripcional materna pela atividade transcripcional do embrião. Em ruminantes, a ativação do genoma ocorre no estágio de 8 a 16 células (Adaptado de HARDY & SPANOS, 2002).

As mudanças na estrutura da cromatina de embriões no período inicial exercem um importante papel na ativação do genoma, porém não são suficientes para ativar a transcrição (KANKA, 2003). Foram registradas mudanças no citoplasma, principalmente na disponibilidade de conteúdo ou atividade de fatores transcripcionais, que atuam em conjunto com as mudanças na cromatina para a ativação da transcrição (LATHAM & SCHULTZ, 2001).

Em bovinos, a ativação do genoma embrionário que acontece por volta do estágio de oito-16 células, ocorre mudanças na estrutura do nucléolo do blastômero e nos padrões de síntese protéica (MEMILI & FIRST, 2000), necessária para a regulação da transcrição, adesão celular, transdução de sinal e metabolismo (MISIRLIOGLU et al., 2006). O desenvolvimento nesse período é dependente de mRNA e proteínas acumuladas durante a maturação citoplasmática (BLONDIN & SIRARD, 1995).

A expressão gênica espacial e temporalmente adequada durante o desenvolvimento de pré-implantação do embrião é pré-requisito para um crescimento normal que gere um indivíduo saudável (PONSUKISILI et al., 2002).

Acredita-se que uma das funções primárias da ativação do genoma embrionário seja a prevenção da morte celular programada, ou apoptose, uma vez que o oócito apresenta informações capazes de ativar esse mecanismo de morte celular quando não fertilizado (DALBIÉS-TRAN & MERMILLOD, 2003).

3.1.1 Desenvolvimento e viabilidade embrionária

Diversos estágios do desenvolvimento embrionário inicial são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. O embrião move-se do oviduto para o útero no estágio de oito a 16 células (GREALY et al., 1996). Com 5 a 6 dias de idade o embrião atinge o estágio de 16 a 32 células e estas células começam a se juntar para se formar uma esfera compacta, a mórula. A compactação representa a formação do primeiro epitélio de transporte do conceito (BIGGERS et al., 1988), estando envolvida no estabelecimento da polaridade dos blastômeros e, portanto, indicando uma mudança nos mecanismos homeostáticos disponíveis para o embrião.

Nos 7 ou 8 dias as células embrionárias se diferenciam em massa celular interna (MCI) ou trofotoderma (TE). As células da MCI contribuem para a formação de todos os tecidos embrionários e uma parte da membrana extra-embrionária. Mais tarde no desenvolvimento, as células do TE combinam-se com as membranas extra-embrionárias derivadas da MCI para formar a placenta do feto (NEUBER et al., 2002).

Entre os dias 9 e 10, o blastocisto expandido eclode da zona pelúcida e continua a se expandir antes de começar a alongar por volta do dia 13. A fixação do embrião ao endométrio começa aproximadamente no dia 19. A implantação embrionária está completa no dia 42. A sobrevivência do embrião e o estabelecimento da gestação apresentam comunicação ativa e passiva entre o embrião e o útero.

O sistema de desenvolvimento embrionário *in vitro* não apresenta a mesma eficiência que o sistema *in vivo*. Com isso vários estudos comparativos têm sido

realizados mostrando importantes diferenças na estrutura, na morfologia, no metabolismo, na bioquímica e na expressão de genes, podendo diminuir a capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* (KNIJIN et al., 2003).

A contagem do número de células em blastocistos é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade embrionária *in vitro*, se diferenciando em MCI e TE no quinto ao sexto ciclo celular, representado na Figura 3.

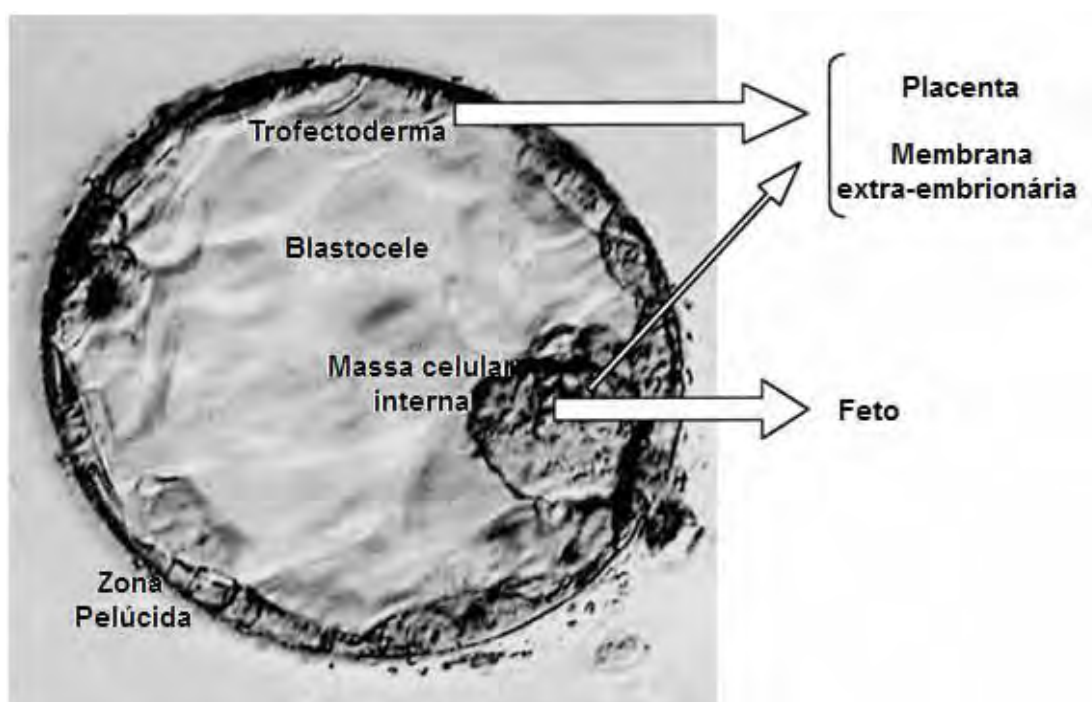


Figura 3. Blastocisto expandido mostrando a diferenciação de células do trofoblasto, que dará origem à placenta e às membranas extra-embriônicas; e da massa celular interna, que dará origem ao feto. O embrião é rodeado por uma camada acelular de glicoproteína, a zona pelúcida, importante para a aderência do espermatozoide ao oócito e integridade dos embriões (Adaptado de HARDY & SPANOS, 2002).

A qualidade embrionária pode ser avaliada pela coloração diferencial, descrita por Thouas et al. (2001), onde se pode quantificar as células da MCI e do TE. O estabelecimento de uma correlação da proporção de MCI:TE é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (FLEMING, 1987). Embora não seja

determinada uma razão ideal de MCI:TE, tem-se considerado blastocistos de qualidade superior aqueles que apresentarem razão igual ou acima de 1:2 (AVELINO, 2004).

Além dessa classificação, Koo et al. (2002) dividiram os blastocistos em quatro grupos de acordo com a proporção de MCI:células totais (grupo I: <20%, grupo II: 20-40%, grupo III: 40-60%, grupo IV: >60%), onde compararam embriões derivados da fertilização *in vivo*, *in vitro* e de transferência nuclear (TN) (Figura 4).

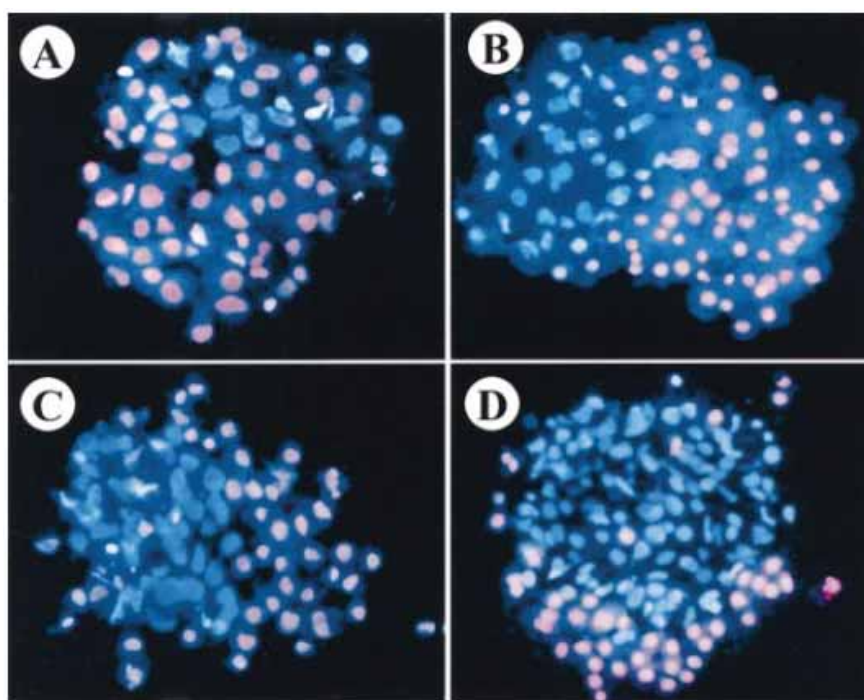


Figura 4. Representação dos grupos de blastocistos derivados de TN de acordo com a proporção de MCI:células totais: (A) grupo I: < 20%, (B) grupo II: 20–40%, (C) grupo III: 40–60%, (D) grupo IV: > 60% (KOO et al., 2002).

3.2 Modificações epigenéticas na regulação da expressão gênica durante a pré-implantação embrionária

O desenvolvimento de um mamífero requer o estabelecimento de centenas de tipos celulares diferentes, derivados a partir de uma célula totipotente indiferenciada.

Estas diferenças estão relacionadas ao padrão temporal e espacial da expressão gênica tecido-específica, que é controlada por modificações epigenéticas da cromatina (SHI et al., 2003).

As modificações epigenéticas referem-se a mudanças na transcrição de genes através da modulação da cromatina, que são provocadas por alterações que não estão relacionadas à sequência de DNA (ALLIS et al., 2007). As modificações epigenéticas adquiridas são transmitidas de maneira estável durante as divisões celulares, porém são apagadas, zeradas e reiniciadas a cada geração, nas gônadas do feto em desenvolvimento (GOTO & MONK, 1998).

Nas células eucarióticas, aproximadamente 6 milhões de pares de bases de DNA estão presentes, que codificam em torno de 30.000 proteínas diferentes. No entanto, a maior parte da fita de DNA permanece armazenada, sob uma forma de organização de cromatina compactada que dificulta ou impossibilita a transcrição de genes (GOODSELL, 2003). Desta forma, apenas uma parte do DNA é utilizado para expressão de genes em cada tecido.

A cromatina tem como unidade básica o nucleossomo, caracterizado por 147 pares de base do DNA arranjadas ao redor de um octâmero de proteínas histonas – H2A, H2B, H3 e H4 – mais uma histona de conexão – H1. As extremidades N-terminais das histonas H3, H4, H2A, H2B se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer modificações pós-traducionais alterando a estrutura da cromatina.

Por muito tempo, acreditou-se que o nucleossomo tivesse função apenas estrutural, permitindo a condensação e organização do DNA no núcleo da célula (COSGROVE & WOLBERGER, 2005). Recentemente, descobriu-se o papel crucial e dinâmico do nucleossomo no controle da expressão gênica. Conforme a maior ou menor interação do DNA com as proteínas que compõem o nucleossomo, a expressão dos genes pode ser alterada.

Esta organização da cromatina é estabelecida por modificações epigenéticas que incluem: a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, o remodelamento da cromatina e os RNAs não codificantes (BERNSTEIN & ALLIS, 2005). No desenvolvimento de mamíferos e estabelecimento de linhagens, a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas são processos que vem sendo consistentemente estudados (LI, 2002).

Cada histona apresenta um domínio global, e um domínio caudal longo e flexível, que se estende além do nucleossomo, e que pode ser modificado pela adição de grupamentos acetil, fosfato, metil, entre outros (GOODSELL, 2003). Tais modificações covalentes têm funções fundamentais na condensação da cromatina, replicação, reparo do DNA, e regulação transcricional. Algumas destas modificações são associadas à eucromatina (acetil-lisina9, mono-, di- e tri-metil lisina 4 na histona H3 e histona h4 acetilada) e outras são associadas à heterocromatina (mono-,di-, tri-metil lisina 9 e tri-metil lisina 27 na H3) (KOUZARIDES, 2007).

A acetilação das histonas é um dos principais mecanismos de reprogramação epigenética do genoma dos gametas após a fertilização para estabelecer um estado totipotente para o desenvolvimento normal (IKEDA et al., 2009). Esse processo está relacionada a domínios genômicos transcricionalmente ativos, e o grau de modificação se correlaciona com o nível de transcrição (SCHUBELER et al., 2004).

Já a metilação das histonas pode ter diferentes efeitos na expressão gênica, dependendo de qual resíduo está modificado (MARTIN & ZHANG, 2005). Na maioria dos casos, a inibição da transcrição e o silenciamento gênico estão associados à metilação do DNA. Certas modificações são encontradas ao nível de região eucromática, que são áreas do DNA menos compactadas (H3K4me, H3K36me, H3K79me) e outras no nível de região heterocromática, que se refere às áreas mais compactas (H3K9me, H3K27me, H4K20me). A metilação é catalizada pelas Histonas Metiltransferases (HTM) (KOUZARIDES, 2007).

Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal tendo importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina (SIMONSSON & GURDON, 2004).

3.3 Dinâmica de acetilação das histonas durante o desenvolvimento embrionário precoce

Durante o desenvolvimento embrionário precoce, a expressão do gene é controlada pelas modificações epigenéticas do DNA e das enzimas histonas. Dentre essas modificações, uma das mais importante é a acetilação das histonas, em que modifica a cromatina e aumenta a acessibilidade dos fatores de transcrição, resultando na regulação da expressão gênica.

A acetilação de resíduos de lisina de regiões N-terminais de histonas faz com que a carga positiva das mesmas seja neutralizada, e ocorra o enfraquecimento da interação da cauda da histona com o DNA local carregado negativamente, induzindo abertura local das estruturas da cromatina (ZUPKOVITZ et al., 2006). Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição e promovendo aumentos significativos na transcrição gênica (VERDONE et al., 2005).

A acetilação é catalisada pelas Histonas Acetiltransferases (HAT), que adiciona grupamentos acetil à cauda da histona, neutralizando-a e enfraquecendo sua ligação com os nucleossomos, e consequentemente aumentando a transcrição. Já a desacetilação é catalisada pelas Histonas Desacetilases (HDAC) que, ao contrário, remove grupamentos acetil e causa compactação da cromatina e silenciamento do segmento de DNA neste local (JOHNSTONE, 2002) (Figura 5). O equilíbrio de HAT e HDAC em uma determinada célula controla os níveis de expressão do gene-alvo, e o desequilíbrio provoca várias doenças (LAWLESS et al., 2009).

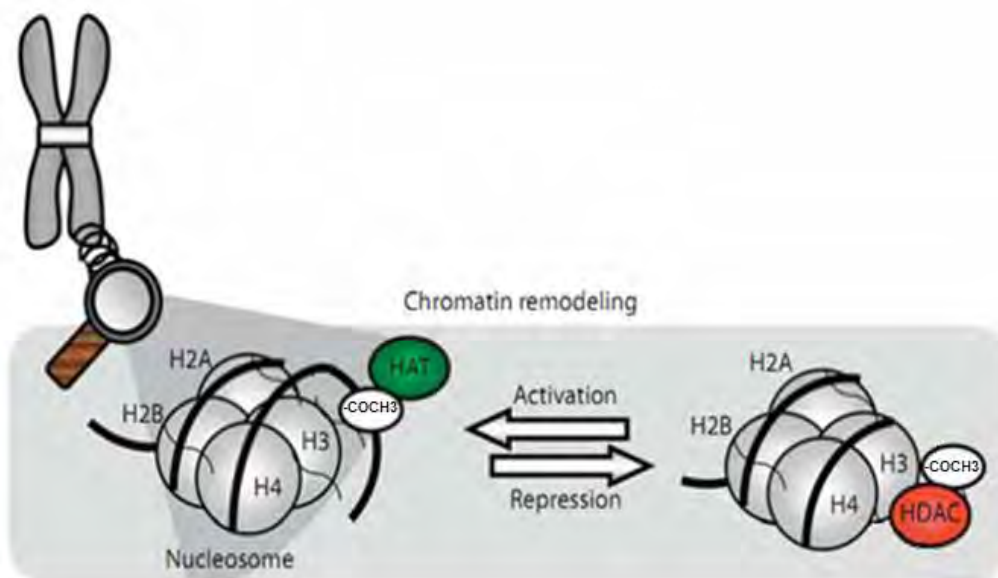


Figura 5. Controle epigenético da expressão gênica. As enzimas HATs acetilam as caudas das histonas, abrindo a estrutura da cromatina, ativando a transcrição. A remoção do grupo acetil pelas enzimas HDACs resulta na condensação da cromatina e repressão transcrricional. (Adaptado de Nugent & McCarthy, 2011).

Na última década, mais de uma dúzia de HDACs foram identificadas nas células de mamíferos. Baseado em suas semelhanças sequenciais, as HDACs foram divididas em 4 classes funcionais: classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10), classe III (SIRT1 a SIRT7), e classe IV (HDAC11 e enzimas relacionadas) (GROZINGER & SCHREIBER, 2002).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que a acetilação da histona H4 facilita a ligação de alguns fatores de transcrição aos nucleossomos (LEE et al., 1993). Jeppesen & Turner (1993) demonstraram que a acetilação da histona H4 é reduzida no cromossomo X inativo em mamíferos fêmeas, sugerindo que a ausência do grupamento acetil torne a estrutura mais condensada e inativa.

Apesar de o padrão e os locais de deposição relacionados à acetilação da histona H4 ser altamente conservados, o mesmo não ocorre com a histona H3 (SOBEL

et al., 1995). No entanto, a lisina 9 em H3 parece ter um papel mais dominante na deposição de histona e na montagem da cromatina em alguns organismos (TURNER & O'NEILL, 1995).

A acetilação da lisina 9 ou 14 na histona 3 (H3K9/14ac) está associada com a cromatina ativa (RICE & ALLIS, 2001) e com a transcrição (FUKS et al. 2003), enquanto que a H3K9 metilada (H3K9me) está associada com o estado reprimido da cromatina (LACHNER et al., 2003). Além disso, a acetilação da H3K9 é inversamente correlacionada com a metilação do DNA e está associada com a regulação da ativação gênica (WU et al., 2007).

3.4 Efeitos da TSA na expressão gênica

A tricostatina A é uma molécula que inibe as enzimas histona desacetilases em concentrações nano molares, agindo sobre a maioria das HDACs de classe I e II (ZUPKOVITZ et al., 2006). Estudos de cristalografia indicam que a droga se encaixa no sítio catalítico da enzima, que possui uma estrutura tubular com íon zinco em sua base (MARKS et al., 2001). Assim, a droga promove uma hiperacetilação do DNA, que se torna excessivamente ativo na produção de proteínas.

O tratamento com a tricostatina A tem sido utilizado para avaliar os efeitos da acetilação das histonas na expressão gênica antes e após a diferenciação celular, buscando a identificação dos eventos moleculares que regulam a perda do estado indiferenciado e o comprometimento com linhagens específicas (GREGORY et al., 2002; LEE et al., 2004; HATTORI et al., 2004; BAQIR e SMITH, 2006; HOSSEINKHANI et al., 2007; MCCOOL et al., 2007).

A inibição da atividade da enzima histona desacetilases leva a hiperacetilação da histona, induzindo o efeito citostático, a diferenciação celular e/ou a apoptose de células em proliferação (GRAY & DANGOND, 2006; WANG et al., 2006; LAWLESS et al., 2009; ROBERTSON et al., 2010).

Enright et al. (2003) usaram a TSA para aumentar a acetilação das histonas e o 5-aza-29-desoxicitidina, um inibidor de DNA metil-transferase, para diminuir a metilação da cromatina em células doadoras utilizadas na transferência nuclear na tentativa de melhorar sua reprogramação genética.

Estudos recentes têm demonstrado que o tratamento de embriões murinos de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) com TSA melhorou a eficiência da clonagem ao longo prazo (KISHIGAMI et al., 2006). Esta melhoria é resultado da reprogramação assistida pela TSA em termos de modificação das histonas. A TSA inibe a desacetilação de histonas global que ocorre em núcleos de células somáticas após a TNCS (RYBOUCHKIN et al., 2006).

O tratamento com a tricostatina A também tem sido utilizado para avaliar os efeitos da acetilação das histonas na expressão gênica de embriões bovinos, buscando a identificação dos níveis de acetilação em blastômeros e o comprometimento no desenvolvimento embrionário e na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (MAALOUF et al., 2008; IKEDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SHIRATSUKI, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação e seleção de oócitos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Ovários bovinos provenientes de abatedouro foram transportados em recipiente isotérmico contendo solução salina estéril e mantidos à temperatura de 30-35°C. No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina (37°C) e os folículos ovarianos com diâmetro entre 3 a 8 mm foram aspirados, utilizando agulha 18-G acoplada à seringa descartável de 20 mL.

O fluido aspirado foi transferido para um tubo cônico de 50mL e decantado por 15 minutos para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento formado foi distribuído em placas de Petri, procedendo-se à seleção dos oócitos em microscópio estereoscópico. Os oócitos de complexos cumulus-oócitos (CCOs) apresentando pelo menos 3 camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo foram selecionados para a MIV.

Os CCOs foram lavados em solução tampão TCM 199 Hepes (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% SFB (SFB; Cripion, Andradina, SP, Brasil), 16 µg/mL de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil).

4.1.1 Maturação *in vitro*

Grupos de 15 CCOs foram maturados sob óleo mineral (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA) em gotas de 100 µL de meio contendo TCM 199 tamponado com bicarbonato de sódio suplementado com 10% SFB, 1,0 µg/mL FSH (FolltropinTM; Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canadá), 50 µg/mL gonadotrofina

coriônica humana (ProfasiTM; Serono, São Paulo, Brasil), 1,0 µg/mL estradiol, 16 µg/mL piruvato de sódio e 83,4 µg/mL amicacina. Os CCOs foram mantidos em estufa com umidade saturada a 38,5°C; com 5% de CO₂ em ar, por 24 horas.

4.1.2 Fertilização *in vitro*

Após a MIV, as células do cumulus foram parcialmente removidas dos oócitos por pipetagem. Grupos de 25 oócitos foram lavados duas vezes e transferidos para gotas de 40 µL de Tyrode Albumina Lactato Piruvato (TALP), suplementado com 0,6% de albumina de soro bovino (BSA), 10 µg/mL de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de adrenalina e coberto com óleo mineral estéril. Foi utilizado sêmen congelado de um mesmo touro Nelore (*Bos indicus*) sexado de fêmea (CRV Lagoa, Sertãozinho, SP, Brasil). Cada palheta, contendo aproximadamente 2 milhões de espermatozóides, foi centrifugada separadamente em um gradiente de Percoll descontínuo 45/90 por 7 min a 4500 RPM. O sedimento foi ressuspenso em 700 µL de TALP-FIV e novamente centrifugado por 5 min a 1700 RPM. Depois da centrifugação, 100 µL do meio contendo o sedimento foi recolhido do fundo do tubo e homogeneizados em um tubo cônico. A suspensão final foi dividida entre dez gotas contendo oócitos em uma concentração final de aproximadamente 10⁴ espermatozóides para cada ovócito. As placas foram incubadas a 38,5°C por 20 h em atmosfera de 5% de CO₂ no ar sob umidade saturada.

4.1.3 Cultura *in vitro*

Após a FIV, os supostos zigotos foram desnudados de células do cumulus, pipetando vigorosamente antes de serem cultivados em meio fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com 2,5% de SFB e 5 mg/mL de BSA a 38,5°C por 20 h em atmosfera de 5% de CO₂ no ar sob umidade saturada. Grupos de 15-20 zigotos foram cultivados em gotas de 100 µL até a hora do tratamento com TSA. A taxa de clivagem

foi determinada 48h após a fertilização *in vitro*, enquanto que o desenvolvimento de blastocisto será avaliado 7 dias depois da FIV.

4.2 Tratamento com TSA

Os embriões foram lavados e transferidos para gotas de 100 μ L de meio CIV suplementado ou não com 5 nM de TSA 70h após a FIV. Os embriões foram corados e avaliados no dia 7 de cultivo.

4.3 Reações de imunocitoquímica de H3K9 acetilada

Depois de 144 h tratados com TSA, fixou-se os embriões em paraformaldeído 4% por 40 minutos e armazenados a 4°C em solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com BSA 3% e Triton X-100 0,5% por até uma semana. Embriões já fixados foram incubados com solução bloqueio (3% BSA e 0,2% Tween-20 em PBS) por uma hora em temperatura ambiente, e em seguida, incubados com o anticorpo primário (anti-mouse H3K9 acetilada (H3K9ac) anticorpo monoclonal, 1: 100) por 12 h a 4°C. Depois disso, os embriões foram lavados três vezes em PBS por 10 minutos, sendo posteriormente incubados com o anticorpo secundário (anticorpo secundário de carneiro anti-rato conjugado com Cy3, 1: 200) por duas horas. Logo depois, os núcleos dos embriões foram corados com 10 μ L/mL Hoechst 33342 por 10 minutos. Em seguida, lavou-se os embriões três vezes em PBS por 10 minutos, sendo avaliados sob um microscópio de fluorescência. Reações em que o anticorpo primário foi omitido serviram como controle negativo, adicionando apenas o anticorpo secundário.

As imagens de cada estrutura foram capturadas com uma câmera AxioCam e armazenadas usando o software 4.7.1 AxioVision (Carl Zeiss, Jena Alemanha). A intensidade de fluorescência em cada blastocisto foi medida usando o Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., Beaverton, OR). Primeiro, colocou-se as duas imagens de cada embrião (HOECHST e Cy3) em um novo arquivo, em diferentes

camadas. Os núcleos foram selecionados com a ferramenta varinha mágica na camada HOECHST para cada blastocisto. Seções foram medidas utilizando a função de histograma através do canal vermelho. O Photoshop atribui valores de intensidade entre 0 e 255 para cada pixel na área selecionada, dando, em seguida, a intensidade média de cada uma dessas seções.

A diferença dos níveis de H3K9ac entre os grupos foram estimados atribuindo um grau de acetilação para cada embrião, classificando o grau de reatividade das células baseada na intensidade da resposta de H3K9ac.

4.4 Contagem diferencial das células da massa celular interna e do trofotoderma

No dia 7 de cultivo, a contagem diferencial das células MCI e do TE de três blastocistos produzidos *in vitro* selecionados aleatoriamente de cada grupo experimental foi realizada através da técnica descrita por Ikeda et al. (2009). Os blastocistos foram primeiramente incubados em 25 mM HEPES-buffered TCM-199 (Hank's salts, Invitrogen) com 1% Triton X-100 e 100 µg/mL de iodeto de propídeo por 30 segundos e depois transferidos imediatamente para a solução fixadora de 4% paraformaldeído em PBS com 10 µg/mL Hoechst 33342 e incubados por 30 min. Depois foram lavados com PBS por 10 min. Em seguida, blastocistos corados foram fixados entre lâminas e lamínulas com glicerol, onde foram levemente achatados por pressão manual.

Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (com filtro de excitação de 340-380 nm e emissão de 430 nm), quanto ao número de células da MCI (contado a partir da imagem de Hoechst, núcleos com fluorescência azul) e do TE (contado a partir da imagem de PI, núcleos com fluorescência rosa corado tanto pelo iodeto de propídeo quanto pelo Hoechst).

4.5 Experimento 1: Efeitos do tratamento com TSA nos níveis de H3K9ac

O objetivo do presente experimento foi avaliar os níveis de acetilação das histonas H3 em lisina 9 (K9) nos dois tratamentos, suplementado ou não com 5 nM de TSA. Foram realizadas 2 sessões de FIV, utilizando palhetas de sêmen congelado de um mesmo touro Nelore (*Bos indicus*) sexado de fêmea (CRV Lagoa, Sertãozinho, SP, Brasil). Dessas 2 repetições foram analisados 60 embriões do sexo feminino no dia 7 de desenvolvimento.

4.6 Experimento 2: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário

Para realização deste experimento, oócitos foram cultivados na ausência ou presença (5nM) de TSA e avaliados quanto à clivagem, após 48 horas de fecundação, e ao desenvolvimento embrionário considerando embriões de 2 células até o estágio de blastocisto no 7º dia após fecundação. Foram realizadas 5 sessões de FIV, utilizando palhetas de sêmen congelado de um mesmo touro Nelore (*Bos indicus*) sexado de fêmea (CRV Lagoa, Sertãozinho, SP, Brasil). As taxas de blastocistos foram calculadas em relação ao número de oócitos bovinos clivados.

4.7 Experimento 3: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a qualidade embrionária (número de células da MCI e TE)

No experimento proposto, foi avaliada a capacidade da TSA em influenciar o número de células da massa celular interna (MCI), do trofotoderma (TE) e total (MCI e TE) dos blastocistos provenientes do experimento 2. 30 blastocistos produzidos em cada tratamento foram corados pela técnica de coloração diferencial e avaliados em microscópio de epifluorescência.

4.8 Análises estatísticas

A diferença na taxa de blastocistos entre os grupos foi analisada pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2). O número total de células e o nível de H3K9ac foram submetidos ao teste de normalidade e avaliados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Todas as análises descritas foram realizadas pelo programa “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: Efeitos do tratamento com TSA nos níveis de H3K9ac

Modificações dos resíduos de lisina das histonas têm grande potencial de desdobramento da cromatina para recrutar diferentes fatores de transcrição estando associadas com a ativação da transcrição de genes (RICE & ALLIS, 2001; FUKS et al., 2003; KURDISTANI et al., 2004; KOUZARIDES, 2007). Valls et al. (2005) demonstraram que altos níveis de acetilação das histonas foram associados com altos níveis de transcrição do genoma. No presente experimento, foram observados os efeitos do tratamento nos oócitos cultivados na ausência ou presença (5 nM) de TSA em embriões bovinos fêmeas comparando os níveis de acetilação das histonas nos dois grupos. Os blastocistos foram avaliados pelo método de imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-mouse H3K9 acetilada (H3K9ac) .

Estudos têm demonstrado que, em embriões bovinos, o nível de acetilação é mais alto na fase de oito células, quando ocorre ativação do genoma embrionário (YANG et al. 2007; MAALOUF et al. 2008). Sendo assim, o momento da suplementação com TSA escolhida no presente estudo foi de 70 h após a fertilização *in vitro*, quando a maioria dos embriões provavelmente já estariam no estágio de oito células. A Figura 6 indica claramente que o tratamento com 5nM de TSA durante o CIV aumentou ($p < 0,01$) o nível de H3K9ac em relação ao grupo controle.

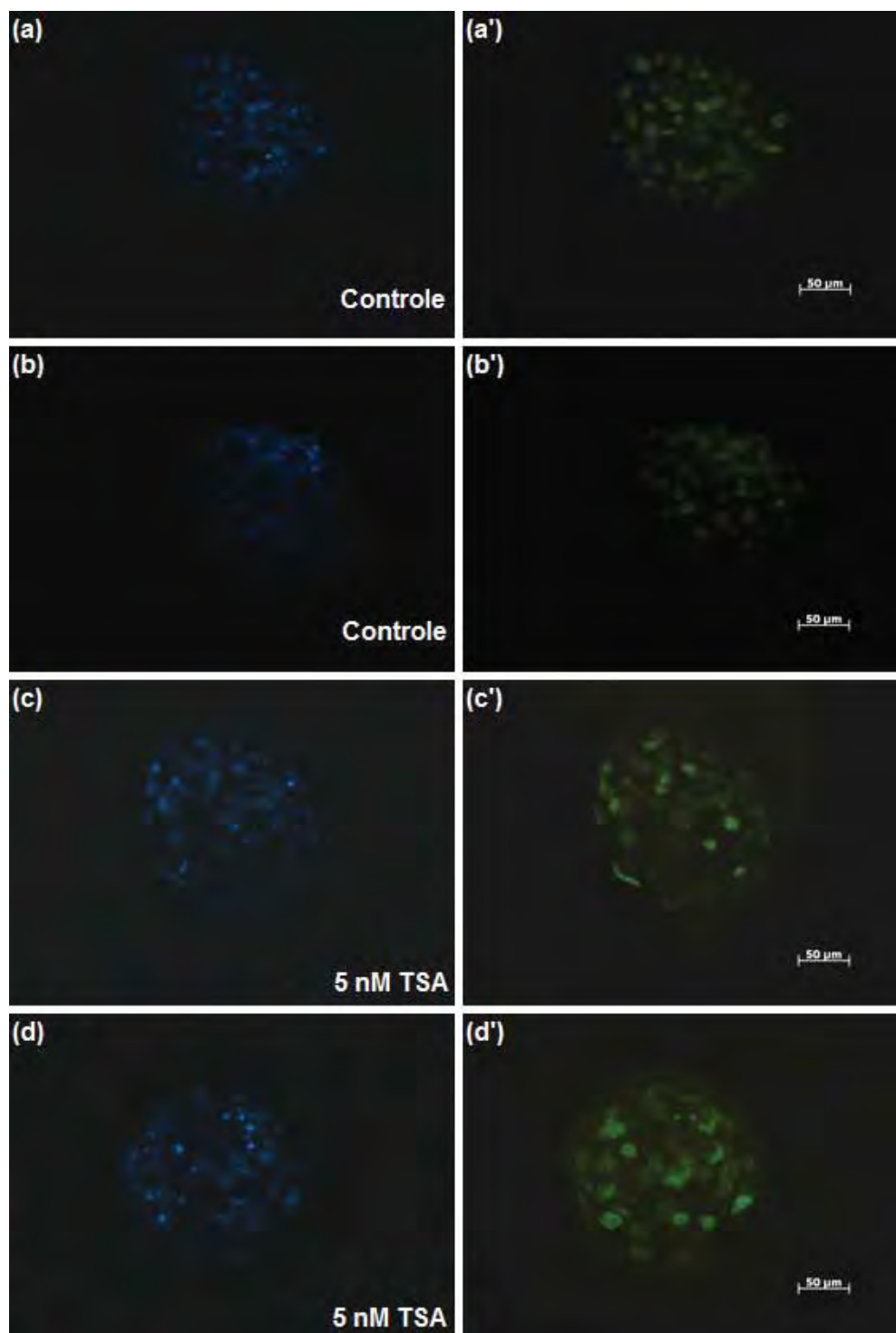


Figura 6. Efeitos da suplementação do meio de cultivo in vitro com Tricostatina A (TSA) sobre os níveis de H3K9ac em embriões fêmeas de bovinos. (a-d) Núcleos de diferentes grupos corados com Hoechst 33342. (a'-d') Imunocitoquímica de H3K9ac usando o corante Cy3 no dia 7.

Após a fecundação, a cromatina dos espermatozóides sofre descondensação, acompanhada pela substituição de protaminas (proteína nuclear espermática) por histonas fornecidas pelos oócitos (PERREAULT, 1992). Estudos em murinos demonstraram a importância da HDAC1 para o estabelecimento da cromatina organizada (MA & SCHULTZ, 2008) sendo fundamental para a máxima expressão de genes endógenos. Com isso, o tratamento de embriões com inibidores de HDAC aumenta significativamente os níveis de expressão gênica (AOKI et al., 1997). Após 144 h de tratamento com TSA, os blastocistos foram analisados e foi observado que os níveis de acetilação das histonas H3 em K9 em embriões tratados com 5nM de TSA foram superiores ($p<0,01$) aos do grupo controle (0nM de TSA), conforme mostrado na Figura 7.

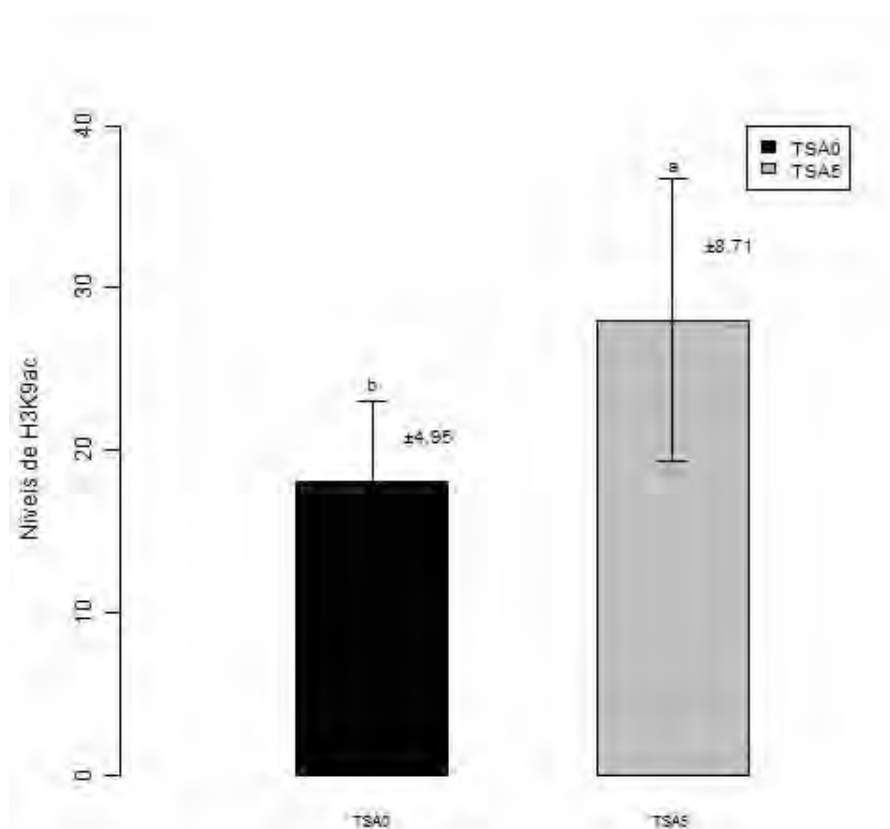


Figura 7. Níveis relativos de H3K9ac do grupo controle (TSA0) e do tratamento com 5 nM de TSA (TSA5). Colunas com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($p<0,01$).

Os resultados encontrados no presente experimento foram semelhantes aos demonstrados por Oliveira et al. (2010). Os sinais de fluorescência de H3K9ac foram mais intensos em embriões tratados com TSA comparados ao controle.

5.2 Experimento 2: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário

Dos 1.187 oócitos maturados *in vitro*, 989 (83,32%) clivaram e desses 989, 153 (15,47%) atingiram o estágio de blastocisto no 7º dia. O tratamento com 5nM de TSA durante o cultivo *in vitro* não afetou ($p>0,01$) as taxas de clivagem ou de desenvolvimento de blastocistos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos da suplementação do meio de cultivo com Tricostatina A (TSA) sobre a clivagem, após 48 horas de FIV (porcentagem) e o desenvolvimento embrionário até blastocisto (porcentagem), no 7º dia após a FIV.

TSA (nM)	Nº de oócitos	Clivados (%)	Blastocistos (%)	χ^2
0 (controle)	575	479 (83,30)	85 (17,74)	0,101 ^{NS}
5nM TSA	612	510(83,33)	68 (13,33)	

A taxa de blastocisto foi calculada em relação aos embriões clivados.

NS = Não significativo ($p<0,01$)

χ^2 = Qui-Quadrado

Comparando a taxa de clivagem dos dois tratamentos (Figura 8) observou-se que não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Qui-Quadrado ($p>0,01$). Quanto à taxa de blastocistos produzidos (Figura 9), apesar de não significativos ($p>0,01$), o grupo controle apresentou maior taxa (17,74%) em relação ao grupo tratado (13,33%).

Os resultados obtidos estão de acordo com Oliveira et al. (2010), quando verificaram que nenhuma das concentrações de TSA testadas no CIV (5nM e 15nM) foi suficiente para aumentar a taxa de blastocistos em embriões do sexo feminino e masculino comparado ao grupo controle. Também estão de acordo com os resultados obtidos por Ikeda et al. (2009), onde embriões foram tratados com 5, 50 ou 500nM de

TSA no momento da FIV e não afetaram ($p>0,05$) a taxa de clivagem e de desenvolvimento dos blastocistos comparado ao controle.

O tratamento suplementado com TSA, assim como o controle, apresentou taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário similares entre si. Estes resultados não mostraram ser influenciados pela concentração de TSA.

Os resultados, apesar de não significativos, demonstraram queda de 11% da produção de blastocistos do tratamento suplementado com TSA em relação ao controle.

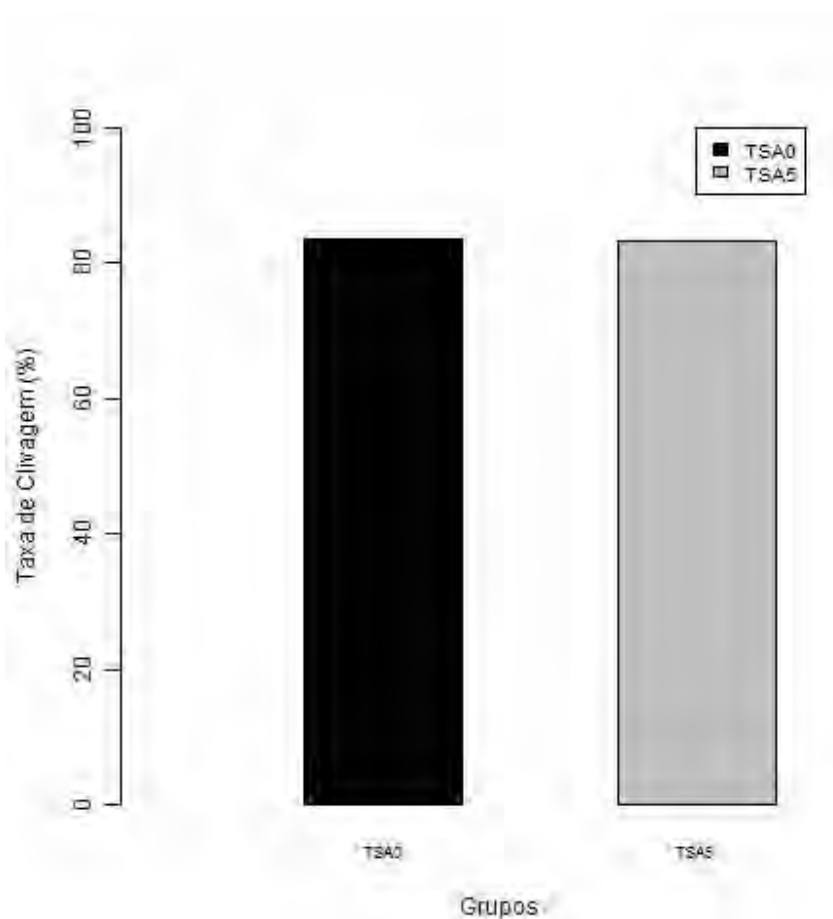


Figura 8. Taxa de clivagem após maturação in vitro de oócitos após 48 horas de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

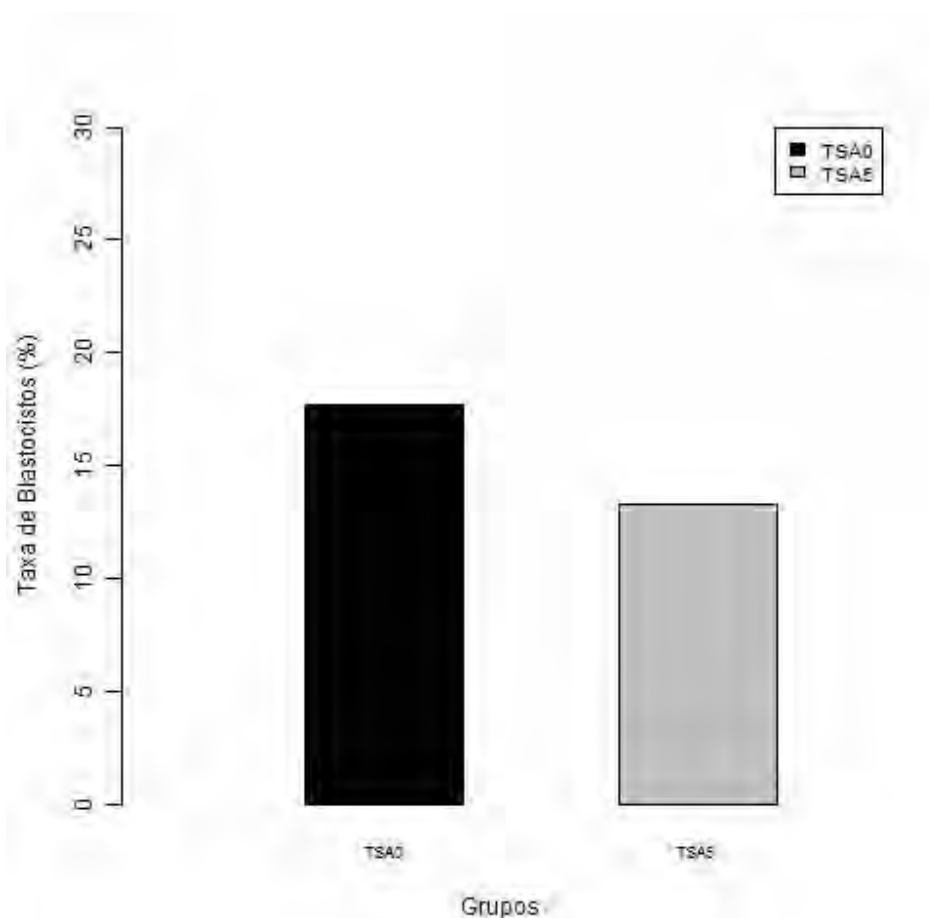


Figura 9. Taxa de blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

5.3 Experimento 3: Efeitos da hiperacetilação das histonas sobre a qualidade embrionária (número de células da MCI e TE)

Dos 153 blastocistos desenvolvidos em 7 dias de cultivo *in vitro*, 60 foram observados após coloração diferencial por fluorocromos, em microscópio de epifluorescência, em que os núcleos corados em azul pertenciam à MCI e em rosa ao TE (Figura 10). As médias do número de células da MCI, TE e total estão demonstradas na Tabela 2 e na Figura 11. As análises foram comparadas pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

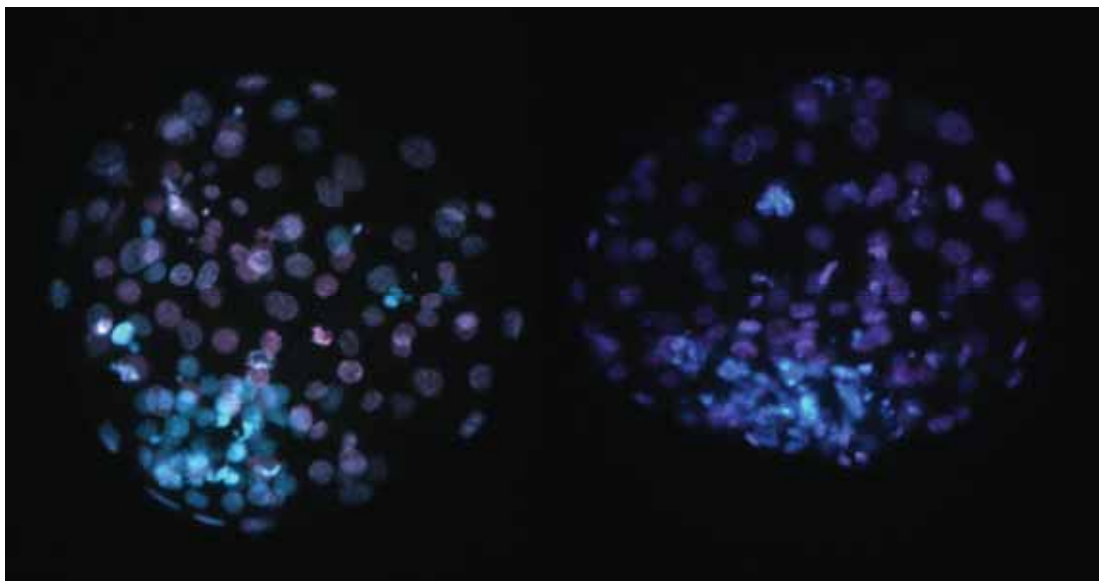


Figura 10. Blastocistos corados pela técnica de coloração diferencial, 7 dias após FIV, observados em microscópio de epifluorescência. Azul: núcleo de células da MCI, Hoechst 33342; Rosa: núcleo das células do TE, iodeto de propídeo.

Tabela 2. Efeitos da suplementação do meio de cultivo com Tricostatina A (TSA) na média de células da massa celular interna (MCI), da trofotoderma (TE) e totais em blastocistos corados por meio de coloração diferencial por fluorocromos após 7 dias de fecundação.

TSA (nM)	Nº de blastocistos	Média		
		MCI	TE	Total
0	30	36,5 ^a	85,6 ^a	121,1 ^a
5	30	34,9 ^a	52,2 ^b	87,1 ^b

^{a,b} Valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem entre si ($p < 0,01$)

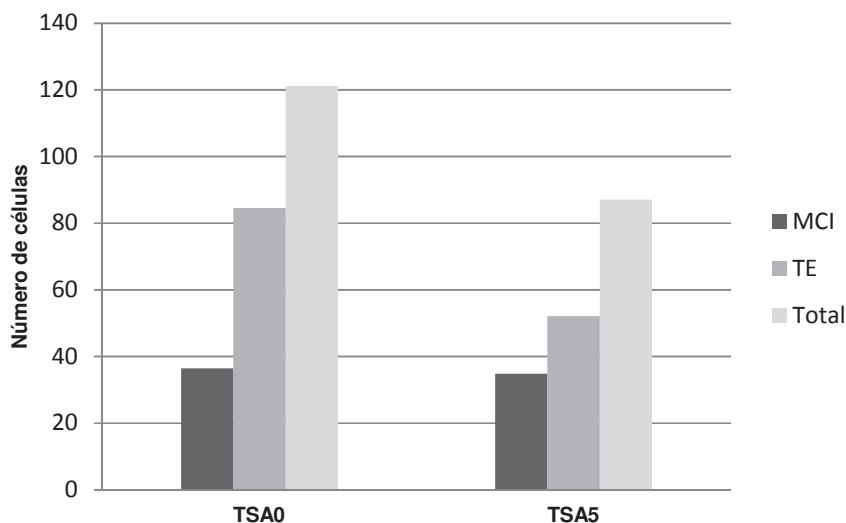


Figura 11. Número médio de células distribuídas em MCI, TE e células totais dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

O número de células é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade embrionária *in vitro*. Durante o processo de desenvolvimento de embriões pré-implantacionais, as células embrionárias se diferem em TE ou MCI. O TE são células externas do blastocisto que originam as membranas extra-embrionárias enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem para a formação das membranas extra-embrionárias (NEUBER et al., 2002).

Avaliando a média de células encontradas na MCI por blastocisto, os dois grupos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,01$) (Figura 12). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Akagi et al. (2011). No entanto, Ikeda et al. (2009) utilizaram diferentes concentrações de TSA por 18h durante a FIV, e o grupo tratado com 5nM de TSA apresentou maior número de células na MCI comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

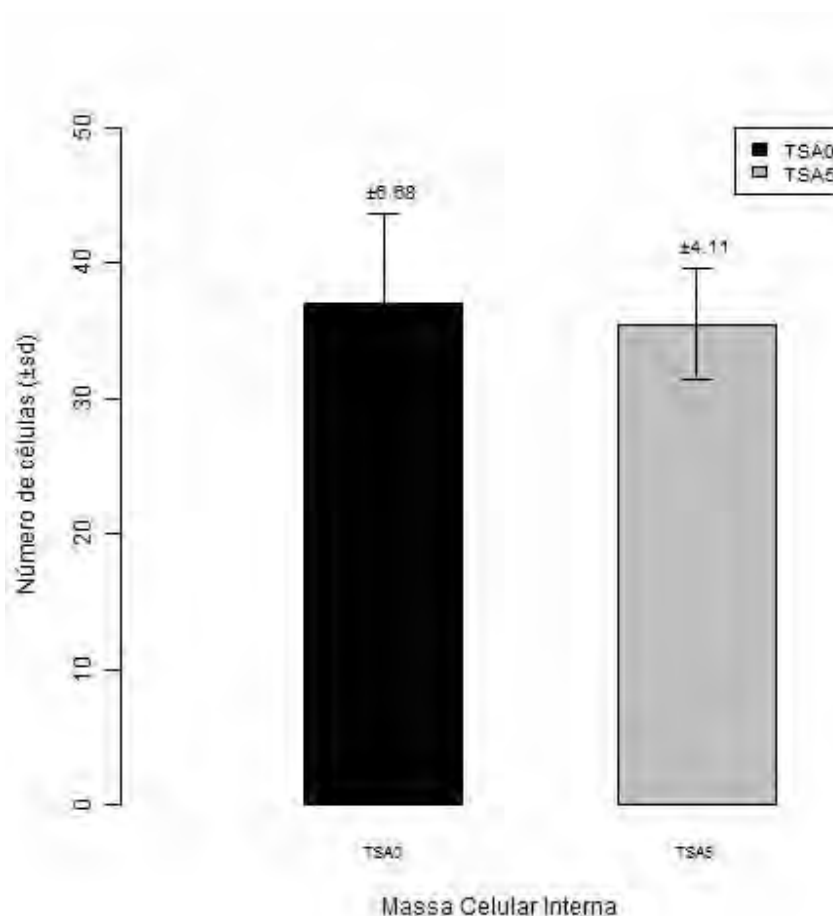


Figura 12. Número de células da MCI dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

Avaliando a média de células encontradas na TE por blastocisto, houve redução ($p < 0,01$) no número de células no grupo tratado em relação ao grupo controle (Figura 13). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Ikeda et al. (2009). No entanto, Akagi et al. (2011) utilizaram 5nM de TSA durante 20 horas após a ativação química (cálcio ionóforo, durante 5 min; citocalasina D + cicloheximida por 1h; e cicloheximida durante 4h) dos embriões derivados de transferência nuclear, e o grupo tratado com 5nM de TSA não apresentou diferença no número de células na TE comparado ao grupo controle ($p > 0,05$).

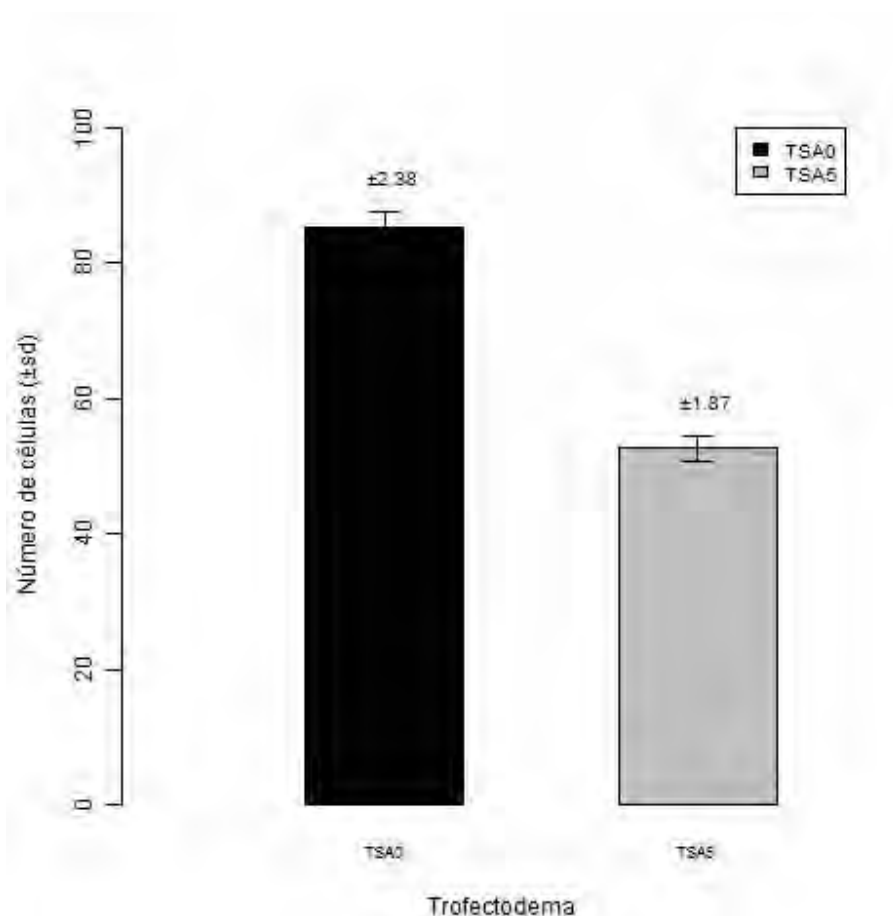


Figura 13. Número de células da TE dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

A TSA tem sido utilizada com sucesso na produção de clones bovinos para aumentar a eficiência da recombinação genética de células adultas (WU et al., 2008; DING et al., 2008). Dai & Rasmussen (2007) observaram que baixas concentrações de TSA devem ser usadas para o tratamento de blastômeros para obter altos níveis de acetilação, sem comprometer o desenvolvimento do embrião. A qualidade dos embriões produzidos *in vitro* pode ser interferida indiretamente, com base nas taxas de apoptose e no número de células totais. No presente estudo, houve diminuição do número de células totais ($p < 0,01$) nos embriões tratados com 5nM de TSA comparados ao controle (Figura 14). Este fato pode comprometer o desenvolvimento embrionário dos embriões tratados, uma vez que o desenvolvimento de embriões femininos é mais lento (AVERY et al. 1992) e mais sensíveis às condições estressantes do CIV (EDWARDS et al.

2001), apresentando um menor número de células totais (Xu et al. 1992) comparado aos machos.

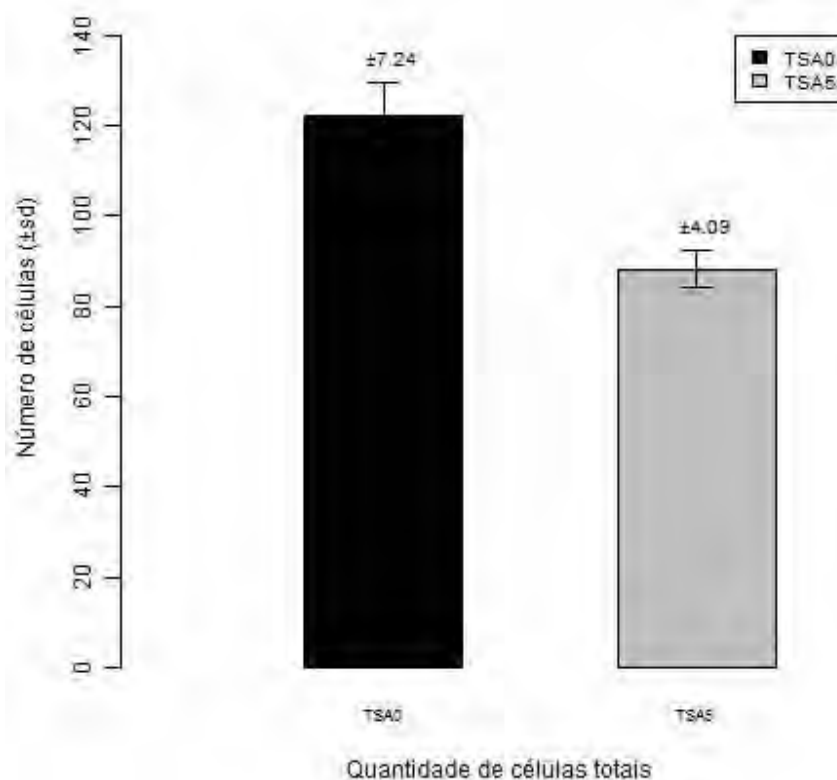


Figura 14. Número de células totais dos blastocistos desenvolvidos após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células do embrião (LANE & GARDNER, 1997) e o estabelecimento de uma proporção entre MCI:TE é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (FLEMING, 1987). Embora não se tenha um parâmetro ideal para esta razão, tem se adotado valores de uma célula da MCI para duas de TE (AVELINO, 2004).

Considerando as médias gerais do experimento (MCI= 36; TE= 69 e T= 105) e proporção MCI:TE igual ou acima de 1:2, os blastocistos foram classificados quanto a qualidade. Os que apresentaram maior ou os que apresentaram igual e menor número

de células que a média, foram considerados de qualidade superior ou inferior, respectivamente.

Conforme essa classificação, os embriões tratados com 5nM de TSA, apesar de a proporção MCI:TE ser acima de 1:2 (Figura 15), apresentaram valores inferiores à média, resultando em embriões de qualidade inferior.

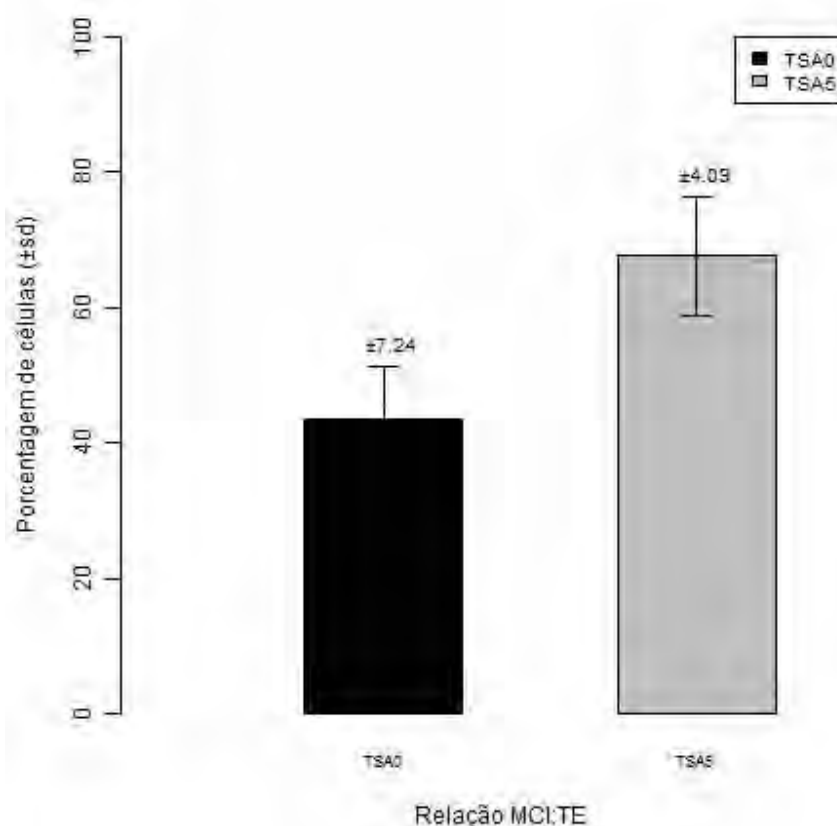


Figura 15. Porcentagem de blastocistos que apresentaram células na proporção igual ou maior que 1:2 de MCI:TE, após 7 dias de fecundação. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

Devido ao baixo número de células da TE encontrado no grupo tratado com TSA, foram encontrados menores índices de MCI:células totais comparado ao grupo controle.

Koo et al. (2002) encontraram uma elevada proporção de MCI:células totais nos blastocistos bovinos derivados de TNCS (50,1%) em comparação aos derivados de

fertilização *in vitro* (42,6%) ou de inseminação artificial (34,9%). Eles classificaram os blastocistos bovinos em quatro grupos (Grupo I, <20%, grupo II, 20-40%, grupo III, 40-60%; grupo IV, > 60%) de acordo com a proporção de MCI:células totais. A maioria dos blastocistos derivados de TNCS estava no grupo III (40-60%) e IV (> 60%), enquanto a maioria dos blastocistos derivados de fertilização *in vitro* e *in vivo* foram classificados no grupo II (20-40%). Eles concluíram que os embriões do grupo II aparentavam ser normais.

Proporções de MCI:células totais muito alta em blastocistos (KANG et al., 2002; KOO et al., 2002) ou muito baixa (BRISON & SCHULTZ, 1997; TARIN et al., 2002) têm sido consideradas como anormalidade em embriões.

No presente estudo, apesar de não significativo, a maior parte dos blastocistos tratados podem ser considerados anormais, devido à relação mais elevada de MCI:células totais (Figura 16). Esses resultados foram concordantes aos encontrados por Ikeda et al. (2009) em que blastocistos derivados de fertilização *in vitro* tratados com TSA (5-500 nM) refletiu anormalidades.

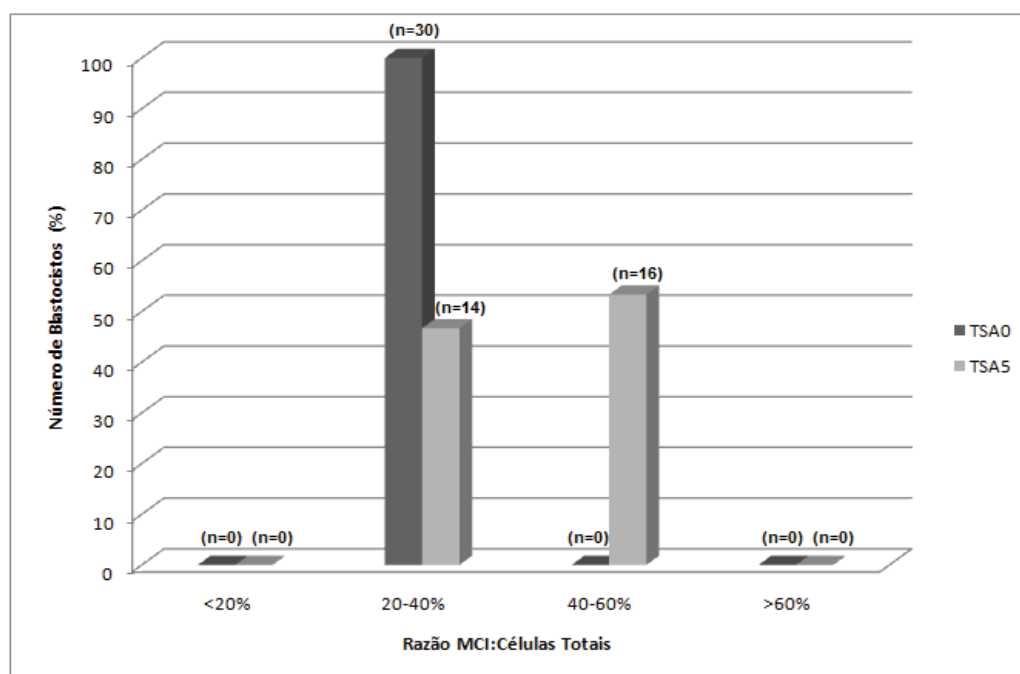


Figura 16. Distribuição de blastocistos de acordo com a relação de MCI:células totais. TSA0= Grupo Controle (0 nM de TSA), TSA5= 5 nM de TSA.

6 CONCLUSÕES

Com a metodologia utilizada neste estudo e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

O tratamento com TSA aumentou os níveis de acetilação das histonas H3 em K9 em embriões tratados com 5nM de TSA durante 144h no CIV, mas não apresentou efeitos benéficos sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de embriões fêmeas de bovinos em termos dos parâmetros avaliados no presente estudo. Os resultados obtidos sugerem que a TSA tem efeito negativo sobre o desenvolvimento dos embriões tratados, já que houve redução no número de células totais.

Portanto, mais estudos são necessários para verificar os efeitos da TSA em longo prazo, investigando o padrão da expressão gênica e os eventos do desenvolvimento de pós-implantação em embriões tratados.

7 REFERÊNCIAS

ALLIS, C.D.; BERGER, S.L.; COTE, J.; DENT, S.; JENUWIEN, T.; KOUZARIDES, T.; PILLUS, L.; REINBERG, D.; SHI, Y.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A.; WORKMAN, J.; ZHANG, Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell**, Cambridge, v.131, p.633-636, 2007.

AKAGI, S.; MATSUKAWA, K.; MIZUTANI, E.; FUKUNARI, K.; KANEDA, M.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, S. Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v.57, p.120-126, 2011.

AOKI, F.; WORRAD, D.M.; SCHULTZ, R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. **Developmental Biology**, Orlando, v.181, p.296-307, 1997.

AVELINO, K.B. **Estimulação e inibição da síntese de glutatona em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro***. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AVERY, B.; JORGENSEN, C.B.; MADISON, V. GREVE, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.32, p.265-270, 1992.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, Cambridge, v.15, p.355-367, 2007.

BAQIR, S.; SMITH, L.C. Inhibitors of histone deacetylases and DNA methyltransferases alter imprinted gene regulation in embryonic stem cells. **Cloning and Stem Cells**, Larchmont, v.8, p.200-213, 2006.

BERNSTEIN, B.E.; ALLIS, C.D. RNA meets chromatin. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v.19, p.1635-1655, 2005.

BETTS, D.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.171-191, 2001.

BIGGERS, J.D.; BELL, J.E.; BENOS, D.J. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.255, p.419-432, 1988.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.41, p.54-62, 1995.

BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, New York, v.27, p.147-158, 1982.

BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, New York, v.56, p.1088-1096, 1997.

COSGROVE, M.S., WOLBERGER, C. How does the histone code work? **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.83, p.468-76, 2005.

DAI, B.; RASMUSSEN, T.P. Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. **Stem Cells**, Basel, v.25, p.2567-2574, 2007.

DALBIÉS-TRAN, R.; MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, New York, v.68, p.252-261, 2003.

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

EDWARDS, J.L., KING, W.A., KAWARSKY, S.J., EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.209-223, 2001.

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

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, Stoneham, v.68, p.91-97, 2007.

FLEMING, T.P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, v.119, p.520-31, 1987.

FREI, R.E.; SCHULTZ, G.A.; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryo genesis in the cow. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v.86, p.637-641, 1989.

FUKS, F.; HURD, P. J.; DEPLUS, R.; KOUZARIDES, T. The DNA methyltransferases associate with HP-1 and SUV39H1 histone methyltransferases. **Nucleic Acids Research**, London, v.31, p.2305-2312, 2003.

GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.1255-1276, 2001.

GOODSELL, D. The molecular perspective: histone deacetylase. **Stem Cells**, Basel, v.21, p.620-621, 2003.

GOTO, T.; MONK, M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, p.362-378, 1998.

GRAY, S.G.; DANGOND, F. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis. **Epigenetics**, Georgetown, v.1, p.67-75, 2006.

GREALY, M.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v.107, p.229-233, 1996.

GREGORY, R.I.; O'NEIL, L.P.; RANDALL, T.E.; FOURNIER, C.; KHOSLA, S.; TURNER, B.M.; FEIL, R. et al. Inhibition of histone deacetylases alters allelic chromatin conformation at the imprinted U2af1-rs1 locus in mouse embryonic stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, p.11728-11734, 2002.

GROZINGER, C.M.; SCHREIBER, S.L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. **Chemistry & Biology**, London, v.9, p.3-16, 2002.

HARDY, K.; SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. **Journal of Endocrinology**, London, v.172, p.221-236, 2002.

HATTORI, N.; NISHINO, K.; KO, Y.G.; HATTORI, N.; OHGANE, J.; TANAKA, S.; SHIOTA, K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, p.17063-17069, 2004.

HOSSEINKHANI, M.; HASEGAWA, K.; ONO, K. Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.356, p.386-391, 2007.

IKEDA, S.; TATEMIZO, A.; IWAMOTO, D.; TANIGUCHI, S.; HOSHINO, Y.; AMANO, T.; MATSUMOTO, K.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; SAEKI, K. 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**, Cambridge, v.17, p.209-215, 2009.

JEPPESEN, P., TURNER, B.M. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. **Cell**, Cambridge, v.74, p.281-289, 1993.

JOHNSTONE, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v.1, p.287-299, 2002.

KANG, Y.K.; PARK, J.S.; KOO, D.B.; CHOI, Y.H.; KIM, S.U.; LEE, K.K.; HAN, Y.M. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine preimplantation embryos. **EMBO Journal**, Oxford, v.21, p.1092-1100, 2002.

KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. **Theriogenology**, Stoneham, v.59, p.3-19, 2003.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N.V.; WAKAYAMA, S.; BUI, H.T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.340, p.183-189, 2006.

KNIJN, H.M.; GJORRET, J.O.; VOS, P.L.; HENDRIKSEN, P.J.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *in vitro* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.69, p.1371-1378, 2003.

KOO, D.B.; KANG, Y.K.; CHOI, Y.H.; PARK, J.S.; KIM, H.N.; OH, K.B.; SON, D.S.; PARK, H.; LEE, K.K.; HAN, Y.M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biology of Reproduction**, New York, v.67, p.487-492, 2002.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Cambridge, v.128, p.693-705, 2007.

KURDISTANI, S.K.; TAVAZOIE, S.; GRUNSTEIN, M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. **Cell**, Cambridge, v.117, p.721-733, 2004.

LACHNER, M.; O'SULLIVAN, R.J.; JENUWEIN, T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. **Journal of Cell Science**, London, v.116, p.2117-2124, 2003.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v.14, p.398-403, 1997.

LATHAM, K.E.; SCHULTZ, R.M. Embryonic genomic activation. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v.6, p.748-759, 2001.

LAWLESS M.W.; NORRIS S.; O'BYRNE K.J.; GRAY, S.G. Targeting histone deacetylases for the treatment of disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v.13, p.826-852, 2009.

LEE, D.Y.; HAYES, J.J.; PRUSS, D.; WOLFFE, A.P. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. **Cell**, Cambridge, v.72, p.73-84, 1993.

LEE, J.H.; HART, S.R.L.; SKALNIK, G. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. **Genesis**, New York, v.38, p.32-38, 2004.

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

LONERGAN, P.; FAIR T. *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, Stoneham, v.69, p.17-22, 2008.

LUCIFERO, D.; MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.13, p.839-849, 2004.

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

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

MARKS, P.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; RIFKIND, R.A. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v.13, p.477-483, 2001.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.6, p.838-849, 2005.

MCCOOL, K.W.; XU, X.; SINGER, D.B.; MURDOCH, F.E.; FRITSCH, M.K. The role of histone acetylation in regulating early gene expression patterns during early embryonic stem cell differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.6696-6706, 2007.

MCGRAW, S.; ROBERT, C.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. **Biology of Reproduction**, New York, v.68, p.383-389, 2003.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, Cambridge, v.8, p.87-96, 2000.

MISIRLIOGLU, M.; PAGE, G.P.; SAGIRKAYA, H.; KAYA, A.; PARRISH, J.J.; FIRST, N. L.; MEMILI, E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.103, p.18905-18910, 2006.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.2193-2202, 2002.

NUGENT, B.M.; MCCARTHY, M.M. Epigenetic Underpinnings of Developmental Sex Differences in the Brain. **Neuroendocrinology**, Basel, v.93, p.150-158, 2011.

OLIVEIRA, C.S.; SARAIVA, N.Z.; SOUZA, M.M.; TETZNER, T.A.D.; LIMA, M.R.; GARCIA, J.M. Effects of histone hyperacetylation on the preimplantation development of male and female bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.22, p.1041-1048, 2010.

PERREAULT, S.D. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.296, p.43-55, 1992.

PONSUKISILI, S.; WIMMERS, K.; ADJAYE, J.; SCHELLANDER, K. A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.1611-1624, 2002.

RICE, J.C.; ALLIS, C.D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.13, p.263-273, 2001.

ROBERTSON, F.M.; WOODWARD, W.A.; PICKEI, R.; YE, Z.; BORNMANN, W.; PAL, A.; PENG, Z.; HALL, C.S.; CRISTOFANILLI, M. Suberoylanilide hydroxamic acid blocks self-renewal and homotypic aggregation of inflammatory breast cancer spheroids. **Cancer**, Philadelphia, v.116, p.2760-2767, 2010.

RYBOUCHKIN, A.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, New York, v.74, p.1083-1089, 2006.

SCHUBELER, D.; MACALPINE, D.M.; SCALZO, D.; WIRBELAUER, C.; KOOPERBERG, C.; VAN LEEUWEN, F.; GOTTSCHLING, D.E.; O'NEIL, L.P.; TURNER, B.M.; DELROW, J.; BELL, S.P.; GROUDINE, M. The histone modification pattern of genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v.18, p.1263-1271, 2004.

SCHULTZ, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.8, p.323-331, 2002.

SCHULTZ, R.M.; DAVIS, W.JR.; STEIN, P.; SVOBODA, P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 285, p. 276-82, 1999.

SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, London, v.71, p.91-113, 2003.

SHIRATSUKI, S.; IWATA, H.; KIMURA, K.; KUGE, T.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T. Trichostatin A-treated eight-cell bovine embryos had increased histone acetylation and gene expression, with increased cell numbers at the blastocyst stage. **Theriogenology**, Stoneham, v.75, p.841-848, 2011.

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature Cell Biology**, London, v.6, p.984-990, 2004.

SOBEL, R.E.; COOK, R.G.; PERRY, C.A.; ANNUNZIATO, A.T.; ALLIS, C.D. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p.1237-1241, 1995.

TARIN, J.J.; PEREZ-ALBALA, S.; GOMEZ-PIQUER, V.; HERMENEGILDO, C.; CANO, A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects preimplantation embryo development in vitro in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.62, p.312-319, 2002.

THOUAS, G.A.; KORFIATIS, N.A.; FRENCH, A.J.; JONES, G.M.; TROUNSON, A.O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.3, p.25-29, 2001.

TURNER, B.M.; O'NEILL, L.P. Histone acetylation in chromatin and chromosomes. **Seminars in Cell Biology**, London, v.6, p.229-236, 1995.

VALLS, E.; SANCHEZ-MOLINA, S.; MARTINEZ-BALBAS, M.A. Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, p.42592-42600, 2005.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.83, p.344-353, 2005.

WANG, S.; YAN-NEALE, Y.; CAI, R.; ALIMOV, I.; COHEN, D. Activation of mitochondrial pathway is crucial for tumor selective induction of apoptosis by LAQ824. **Cell Cycle**, Georgetown, v.5, p.1662-1662, 2006.

WARNER, C.M.; BRENNER, C.A. Genetic Regulation of Preimplantation Embryo Survival. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v.52, p.151-193, 2001.

WEE, G.; KOO, D.B.; SONG, B.S.; KIM, J.S.; KANG, M.J.; MOON, S.J.; KANG, Y.K.; LEE, K.K.; HAN, Y.M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatins in cloned embryos. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.281, p.6048-6057, 2006.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., LEMME, E., KORSAWE, K., NIEMANN, H. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.82-83, p.593-603, 2004.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.17, p.23-35, 2005.

WU, J.; WANG, S.H.; POTTER, D.; LIU, J.C.; SMITH, L.T.; WU, Y.Z.; HUANG, T.H.; PLASS, C. Diverse histone modifications on histone 3 lysine 9 and their relation to DNA methylation in specifying gene silencing. **BMC Genomics**, London, v.8, p.1-9, 2007.

WU, X.; LI, Y.; LI, G.P.; YANG, D.; YUE, Y.; WANG, L.; LI, K.; XIN, P.; BOU, S.; YU, H. Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. **Animal Biotechnology**, New York, v.19, p.211-224, 2008.

XU, K.P., YADAV, B.R., KING, W.A., BETTERIDGE, K.J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.31, p.249-252, 1992.

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, New York, v.39, p.295-302, 2007.

ZUPKOVITZ, G.; TISCHLER, J.; POSCH, M.; SADZAK, I.; RAMSAUER, K.; EGGER, G.; GRAUSENBURGER, R.; SCHWEIFER, N; CHIOCCA, S.; DECKER, T.; SEISER, C. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.26, p.7913-7928, 2006.