

Universidade Federal de Juiz De Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Genética e Biotecnologia

Thamiris Dornelas de Araújo

**EFEITO DO MODELADOR EPIGENÉTICO 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE
NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
APÓS CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS**

Juiz de Fora
2015

THAMIRIS DORNELAS DE ARAÚJO

**EFEITO DO MODELADOR EPIGENÉTICO 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE
NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
APÓS CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Araújo, Thamiris Dornelas de.

Efeito do modelador epigenético 5-aza-2'-deoxycytidine no desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos após choque térmico em oócitos / Thamiris Dornelas de Araújo. -- 2015.

70 f. : il.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Estresse térmico. 2. PIVE. 3. Heterocromatina. 4. Apoptose. I. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida, orient. II. Título.

THAMIRIS DORNELAS DE ARAÚJO

“Efeito do modelador epigenético 5-aza-2'-deoxyxytidine no desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos após choque térmico em oócitos ”

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Orientador
EMBRAPA/Gado de Leite

Prof.^a Dr.^a Clara Slade Oliveira
Membro Externo
EMBRAPA/Gado de Leite

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Membro Interno
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Devo primeiramente agradecer à Universidade Federal de Juiz de Fora, e seu corpo docente, pela oportunidade de vivenciar estes dois anos de aprendizado e aperfeiçoamento profissional. É na relação entre as mentes que se evolui a capacidade de pensar.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo recurso financeiro, e à Embrapa Gado de Leite, pela concessão de toda a infra-estrutura necessários para a realização do trabalho.

Ao abatedouro municipal Fripai, pela cessão dos ovários que possibilitaram a realização do experimento.

Ao meu Deus, agradeço muito mais do que pela vida! É a Sua presença que fez todas as dificuldades serem superadas, cada degrau ser calcado, cada questionamento ser sanado, ou ao menos aliviado quando não havia respostas imediatas. É primeiramente por Ele e para Ele que sinto o desejo de escrever estas linhas e esboçar um mínimo agradecimento por tudo o que tenho vivido. Obrigada, Deus!

À Professora Priscila Faria, pela solicitude no uso do microscópio confocal e discussão das análises.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio, pela pronta disponibilidade na orientação durante o mestrado, e pela oportunidade de vivenciar tantas experiências – muito mais do que se poderia prever para um período tão curto!

À toda a equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, pelos agradáveis anos de convivência, troca de ideias, científicas ou não, que deram mais sabor ao curso dessa trajetória. Aos funcionários Myro e Joel, pelo suporte na execução dos experimentos; à Carolina Capobiango, pela troca de ideias e auxílio na organização dos cronogramas; aos pesquisadores Bruno Carvalho, João Henrique, pelas conversas de corredor ou de café, da pesquisa ou da vida. À enorme equipe de (ex)estagiários e (ex)bolsistas que conviveram direta ou indiretamente com as atividades: Sávio, Ivan (o trabalhador dos sábados), Fê (e os “lenti”), Deivid, Thiago, Juliane, Bia, Paula, Nara, Loriane, Monique, Alberto, Vivian, Carolzinha (e as benditas 12h de maturação à meia-noite, colorações de espermatozoides e bom-humor), Natana (adora trabalhar às sextas à tarde), Eliza (e

suas PCRs intermináveis, com direito a bate-papos nos intervalos sobre o estresse e a expressão gênica, FIVs, cultivos...), Jasmin (pelo auxílio nos procedimentos de imunocitoquímica)... não sei se esqueci alguém, mas de uma forma ou outra todos vocês fizeram este período ser mais proveitoso para a profissão e para a vida. Sintam-se todos abraçados por aquilo que sabem que fizeram!

Aos meus pais, Cida e Hilário, minha irmã e sobrinha, Keilla e Duda, por me fazerem lembrar que sempre há jeito pra contornar as dificuldades, e que o refúgio sempre existe quando a gente acha que deve parar. Vocês são meu maior exemplo de amor!

Ao meu eterno amigo e namorado Marco, pela paciência, ajuda com as inúmeras traduções, desenhos e pranchas, por compreender minhas ausências, cansaço e falta de bom humor. Obrigada por ouvir cuidadosamente todos os meus delineamentos, devaneios e empolgações, pelos pitacos, broncas e incentivos. Te amo muito!

A todos que permitiram que essa jornada se tornasse possível, meu sincero muito obrigada!

"É preciso força pra sonhar e perceber que
a estrada vai além do que se vê"

Marcelo Camelo

RESUMO

As mudanças climáticas constituem ameaça às espécies e à sustentabilidade financeira dos sistemas de produção. Estudos preliminares mostraram que embriões bovinos submetidos ao choque térmico apresentam níveis diferenciados de heterocromatina, o que pode comprometer o desenvolvimento. Algumas substâncias interferem na estrutura da cromatina ou na metilação do DNA e podem influenciar os eventos epigenéticos do desenvolvimento embrionário. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de 5-aza-2'-deoxycytidine na produção de embriões bovinos utilizando oócitos submetidos ao choque térmico. Oócitos de vacas de abatedouro foram maturados em TCM-199+10% soro de vaca em cio e distribuídos em: experimento 1 (NHS, sem choque térmico) - 5%CO₂ e 38,5°C 24h; experimento 2 (HS, choque térmico) - 6,5-7,0%CO₂ e 41,5°C 12h + 12h em 5%CO₂ e 38,5°C. Foi realizada FIV em FERT-TALP por 20h nas condições convencionais de maturação. Procedeu-se o cultivo em CR2aa+2,5%SFB a 38,5°C, 5%CO₂ e 5%O₂ por 8 dias. Em cada experimento os embriões foram divididos nos seguintes tratamentos: sem adição de 5-aza (NHS ou HS - Controles), expostos a 5-aza (10nM) por 24h (NHS24h ou HS24h) ou por 48h (NHS48h ou HS48h). Após exposição à droga os embriões foram cultivados em meio idêntico ao de NHS e HS até completarem o desenvolvimento. O estágio de desenvolvimento e a taxa de embriões foram avaliados nos dias 3 (D3), 7 (D7) e 8 (D8), e blastocistos D8 foram avaliados por TUNEL quanto à taxa apoptótica. Embriões D2 e D3 foram submetidos à imunofluorescência para marcação de HP1β. Não houve diferença na clivagem dos dois experimentos. O percentual de embriões com 8 células em D3 foi menor em todos os grupos tratados com 5-aza. Menores taxas de blastocistos em D7 e D8 foram obtidas no tratamento NHS48h. Menores taxas de blastocistos foram produzidas em D7 e D8 para HS24h e HS48h. O número de células totais e da massa celular interna dos blastocistos não diferiu entre os grupos dos dois experimentos. O índice apoptótico nos grupos do experimento 1 foi similar, e no experimento 2 ocorreu diferença apenas entre os grupos HS24h e HS48h. O índice apoptótico da massa celular interna não diferiu nos dois experimentos. O uso de 5-aza não influencia as taxas de clivagem em D3, mas a longa exposição reduz as taxas de blastocistos. Associado ao choque térmico, 5-aza reduz as taxas de

blastocistos independente do tempo de exposição. No entanto, não houve injúrias celulares detectáveis nos embriões que se desenvolveram a blastocisto. A intensidade do sinal para heterocromatina em embriões com 4-7 células foi similar entre os grupos, o percentual de núcleos não marcados foi baixo e NHS24h marcou mais núcleos fortemente. Embriões de 8-16 células apresentaram redução na intensidade do sinal quando expostos a 5-aza, o que não ocorre nos embriões de choque térmico, com intensidades similares a NHS, e 5-aza não tem aparente efeito sobre a presença de HP1 β . Mudanças nos padrões de eucromatina e heterocromatina nos embriões de choque térmico podem estar relacionadas a uma ativação do genoma embrionário mais complexa, reduzindo a produção de blastocistos.

Palavras-chave: Heterocromatina. Apoptose. Estresse

ABSTRACT

Climate changes is a threat to the species and the financial sustainability of the production systems. Preliminary studies showed that bovine embryos submitted to heat shock presented differentiated levels of heterochromatin, which can compromise the development. Some substances interfere in the chromatin structure or DNA methylation can influence the epigenetic events of embryonic development. The objective of this work was to evaluate the effect of 5-aza-2'deoxyctidine in the production of bovine embryos using oocytes submitted to heat shock. Oocytes of slaughterhouse cows were matured in TCM-199 + 10% serum cow in heat and distributed on: experiment 1 (NHS without heat shock) - 5%CO₂ and 38.5°C 24h; experiment 2 (HS with heat shock) - 6.5-7.0%CO₂ and 41.5°C 12h + 12h in 5%CO₂ and 38.5°C. IVF was performed in FERT-TALP for 20h in conventional maturation conditions. The cultivation was performed in CR2aa+2.5%FBS a 38.5°C, 5%CO₂ and 5%O₂ for 8 days. In each experiment, the embryos were divided into the following treatments: without addition of 5-aza (NHS or HS - Controls), exposed to 5-aza(10nm) for 24h (or NHS24h or HS24h) or 48h (or NHS48h or HS48h). After exposure to the drug, embryos were cultivated in the same NHS and HS to complete development. The development stage and the rate of embryos were evaluated at day 3 (D3), 7 (D7) and 8 (D8), and blastocysts were evaluated by TUNEL as the apoptotic rate. Embryos D2 and D3 were submitted to immunofluorescence for marking HP1 β . There was no difference in the cleavage of the two experiments. The percentage of 8-cell embryos D3 was lower in all the groups treated with 5-aza. Lower blastocyst rates were obtained in treatment NHS48h. Lower blastocysts rates were produced in D7 and D8 to HS24h and HS48h. The number of total cells and the inner cell mass of blastocysts was similar between groups in the two experiments. The apoptotic index in experimental group 1 was similar, and in experiment 2 occurred only difference between HS24h and HS48h groups. The apoptotic index of the inner cell mass did not differ in both experiments. The use of 5-aza do not affect the cleavage rates in D3, but the long exposition reduces blastocyst rates. Associated with heat shock, 5-aza reduces blastocyst rates independent of the exposition time. However, there was no detectable cell injury in embryos that developed to blastocyst. The intensity of the signal for heterochromatin in embryos

with 4-7 cells was similar between the groups, the percentage of HP1 β negative nucleus was low and more nucleus were exhibiting increased HP1 β signal in NHS24h. 8-16 cell embryos present a reduction of signal intensity when exposed to 5-aza, which does not occur in the heat shock embryos with similar intensities to NHS, and 5-aza has apparently no effect on HP1 β levels. Changes in euchromatin and heterochromatin patterns in the heat shock embryos may be related to a complex EGA related to those groups, which might be related to lower blastocyst rate.

Keywords: Heterochromatin. Apoptosis. Stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura geral de eucromatina e heterocromatina por histonas acetiltransferases e desacetilases	25
Figura 2	Ligações covalentes em resíduos de lisina para acetilação ou metilação.....	26
Figura 3	Modelo para a formação de heterocromatina pela interação de HP1 com H3K9me3.....	30
Figura 4	Molécula do nucleosídeo deoxycytidine e seu derivado 5-aza-2'-deoxycytidine.....	32
Figura 5	Mecanismo de ação de azacitidine, similar a 5-aza, pelo qual a metilação de DNA é inibida.....	33
Figura 6	Delineamento experimental.....	36
Figura 7	Parâmetros de qualidade embrionária pela MCI (grupos não submetidos ao choque térmico – NHS)	46
Figura 8	Parâmetros de qualidade embrionária pela MCI (grupos submetidos ao choque térmico – HS)	47
Figura 9	Imunofluorescência para HP1 β , análise quantitativa e semi-quantitativa em embriões de 4-7 células (44hpi) produzidos a partir de oócitos submetidos (HS) ou não ao choque térmico (NHS).....	49
Figura 10	Imunofluorescência para HP1 β , análise quantitativa e semi-quantitativa em embriões de 8-16 células (68hpi) produzidos a partir de oócitos submetidos (HS) ou não ao choque térmico (NHS).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alterações celulares induzidas por elevação da temperatura em oócitos.....	20
Tabela 2	Índice de embriões não oriundos de choque térmico que atingiram o estágio de 8 células no dia 3 de desenvolvimento (68hpi).....	43
Tabela 3	Índice de blastocistos nos dias 7 e 8 tratados com 5-aza por 24h ou 48h (oócitos não submetidos a choque térmico).....	44
Tabela 4	Índice de embriões oriundos de choque térmico que atingiram o estágio de 8 células no dia 3 de desenvolvimento (68hpi).....	44
Tabela 5	Índice de blastocistos nos dias 7 e 8 tratados com 5-aza por 24h ou 48h (oócitos submetidos a choque térmico).....	44
Tabela 6	Parâmetros de qualidade embrionária avaliados por TUNEL e marcação de núcleos com DAPI (grupos não submetidos ao choque térmico).....	45
Tabela 7	Parâmetros de qualidade embrionária avaliados por TUNEL e marcação de núcleos com DAPI (grupos submetidos ao choque térmico).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-aza-CdR	5-aza-2'-deoxycytidine
5-aza	5-aza-2'-deoxycytidine
5mC	5-metilcitosina
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
D3	dia 3 de desenvolvimento embrionário
D7	dia 7 de desenvolvimento embrionário
D8	dia 8 de desenvolvimento embrionário
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DNMT	DNA metiltransferase
ERO	espécies reativas de oxigênio
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i> (hormônio folículo-estimulante)
GC	grânulos corticais
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	histona desacetilase
HMT	histona metiltransferase
HP1	<i>heterochromatin protein 1</i> (proteína heterocromatina 1)
hpi	horas pós inseminação
HS	<i>heat shock</i> (choque térmico)
HSF	<i>heat shock factor</i> (fator de choque térmico)
HSP70	<i>heat shock protein 70</i> (proteína de choque térmico 70)
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i> (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas)
MCI	massa celular interna
MIV	maturação <i>in vitro</i>
NGS	<i>normal goat serum</i> (soro normal de cabra)
NHS	<i>no heat shock</i> (sem choque térmico)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (tampão salino fosfatado)
PFA	paraformaldeído

PVA	<i>polyvinyl alcohol</i> (álcool polivinílico)
RNA _m	<i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
Suv39h	<i>small unilamellar vesicles 39</i> (pequenas vesículas unilamelares, um grupo específico de metiltransferases)
TALP	<i>Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate</i>
TCM 199	<i>Tissue Culture Medium 199</i> (meio de cultura de tecidos)
TE	<i>trophectoderm</i> (trofocotoderme, trofoblasto)
TNCS	transferência nuclear de células somáticas
TSA	tricotostatina A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	O ESTRESSE TÉRMICO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS.....	17
2.1.1	Implicações celulares e moleculares do estresse térmico.....	19
2.2	FATORES EPIGENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	23
2.2.1	Acetilação de histonas.....	24
2.2.2	Metilação de histonas.....	25
2.2.3	Metilação de DNA.....	26
2.2.4	Eventos epigenéticos interrelacionados e desenvolvimento embrionário...	28
2.2.5	Remodelação epigenética por 5-aza-2'-deoxycytidine.....	31
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ETAPA 1 – PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	36
4.1.1	Obtenção dos ovários e maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	37
4.1.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	37
4.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> e exposição a 5-aza.....	38
4.1.4	Avaliação do desenvolvimento embrionário.....	39
4.2	ETAPA 2 – ÍNDICE APOPTÓTICO EMBRIONÁRIO (TUNEL).....	39
4.3	ETAPA 3 – IMUNOFLORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL...	40
4.4	ETAPA 4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	ETAPA 1 – PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	43
5.2	ETAPA 2 – ÍNDICE APOPTÓTICO EMBRIONÁRIO (TUNEL).....	45
5.3	ETAPA 3 – IMUNOFLORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL...	47
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global é uma realidade capaz de reduzir o bem-estar de diversos organismos vivos. Segundo relatório do IPCC (*INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE*) (2014), entre os anos 1880-2012 a temperatura média global do mar e terra aumentou cerca de 0,85°C (0,65-1,06°C). Essas mudanças no clima são vistas como uma grande ameaça à sobrevivência de muitas espécies e ecossistemas, bem como à sustentabilidade financeira dos sistemas de produção em várias partes do mundo (HOFFMANN et al., 2010). Há estudos recentes que afirmam a necessidade de se modificarem os sistemas de gestão face à mudança climática, sob pena de ocorrerem perdas graves (NARDONE et al., 2010).

Por este motivo, há um grande interesse, principalmente em países tropicais, em se compreender melhor como animais de produção reagem diante de estressores climáticos. Neste ínterim, os rebanhos bovinos se destacam pela posição que ocupam no cenário econômico do Brasil e de diversos países. Já foi demonstrado que o estresse térmico tem forte impacto sobre a reprodução desses animais (TORRES-JUNIOR et al., 2008; HANSEN et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2013; SILVA et al., 2013), o que pode gerar grandes prejuízos no sistema de produção. No entanto, ainda há pouco conhecimento sobre o comportamento de uma variedade de raças existentes e utilizadas na produção de alimentos diante de eventos de estresse, bem como os eventos moleculares responsáveis por quedas na eficiência reprodutiva.

Para que ocorra fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente, o oócito deve concluir satisfatoriamente o processo de maturação citoplasmática e nuclear, porém, alterações na expressão gênica em oócitos e embriões submetidos ao choque térmico têm sido relatadas (PALUDO et al., 2011; GENDELMAN et al., 2012). Em estudos preliminares, nossa equipe observou compactação precoce de heterocromatina em embriões clivados (44 horas pós-fertilização) cujos oócitos haviam sido submetidos ao choque térmico, o que aponta influência do calor sobre eventos epigenéticos. Este dado corrobora com a premissa de que a regulação epigenética possa ser alterada pelas condições de maturação dos oócitos, ou do cultivo dos próprios embriões nos primeiros dias de desenvolvimento, momentos de

maior susceptibilidade a temperaturas elevadas (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a; SAKATANI et al., 2013).

Em categorias de embriões bovinos em que são conhecidas alterações nos padrões moleculares de desenvolvimento, como os produzidos por clonagem, estudos envolvendo moduladores epigenéticos têm sido aplicados visando a minimizar os efeitos adversos de técnicas ou condições nas quais as estruturas foram expostas. O inibidor de DNA metiltransferase, 5-aza-2'-deoxycytidine (ou suas variantes) é um destes moduladores, e seu uso tem sido descrito em estudos envolvendo embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (DING et al., 2008; WANG et al., 2011b; HUAN et al., 2014). Sua ação de desmetilação resulta em ativação da expressão de genes reprimidos e descondensação da heterocromatina (TAKEBAYASHI et al., 2001). Além disso, 5-aza já se mostrou um potencial repressor de linhagens de células cancerosas (OKA et al., 2005) e indutor de diferenciação celular (PENNAROSSA, MAFFEI e CAMPAGNOL, 2014).

Tendo-se em vista que alterações moleculares nos oócitos podem gerar efeitos negativos sobre eventos epigenéticos, o uso dessas substâncias pode ter impacto sobre a produção de embriões que tenham sofrido com temperaturas elevadas em etapas-chave do desenvolvimento. Neste contexto, nossa hipótese é que as alterações na expressão gênica previamente reportadas após o choque térmico em oócitos bovinos estejam associadas a alterações epigenéticas, e que o uso de 5-aza no período pré-implantacional de embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico possa ter um efeito benéfico sobre o desenvolvimento e sobre a heterocromatina embrionária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESTRESSE TÉRMICO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS

A temperatura corporal suportada por mamíferos em geral gira em torno dos 35-39°C, frequentemente mais alta que a do ambiente; isso decorre da produção ativa de calor. Considerando os animais endotérmicos como um grupo, observa-se que a tolerância a baixas temperaturas frequentemente é maior do que a temperaturas elevadas. Sob elevação de alguns graus no limiar máximo aceitável de temperatura, a morte dos organismos torna-se iminente por alterações na fluidez de membrana, estrutura de proteínas e, no caso de animais que transpiram ou ofegam, perda de líquido e eletrólitos (HANSEN, 2009).

Especificamente em bovinos, a faixa de temperatura ambiente na qual o animal não demonstra qualquer sinal de desconforto está entre 5 e 25°C (YOULSEF, 1985), podendo alcançar o limite superior de 27°C (FUQUAY, 1981). Maya-Soriano et al. (2013) apontam que a temperatura ótima do ar para a produção de leite e reprodução gira em torno dos 25-26°C. No entanto, para se estabelecer a zona de termoneutralidade deve-se levar também em consideração a umidade relativa do ar. O limite de umidade relativa do ar ideal para animais domésticos varia de 60% a 70% (MÜLLER, 1989). A partir desse limiar, ocorrem alterações no metabolismo do animal, na tentativa de manter a temperatura corporal constante (ALVES, 2008). Quando a zona de conforto térmico é ultrapassada estabelece-se o estresse.

Em relação ao efeito do estresse sobre a reprodução, Hansen (2009) discute dois mecanismos gerais que levariam à interrupção dos processos reprodutivos: o primeiro decorre das mudanças geradas na fisiologia do animal para regular a temperatura. Um desses mecanismos é a redistribuição de sangue do centro do corpo para as periferias como estratégia de liberação de calor e a diminuição do consumo de alimentos para reduzir a produção de calor metabólico, mas que leva a mudanças no balanço de energia com efeitos sobre a ciclicidade, prenhez e desenvolvimento fetal. Um segundo mecanismo pelo qual o estresse poderia afetar a reprodução é a ausência de sistemas regulatórios para o sistema reprodutivo.

Há trabalhos que apontam efeitos negativos das altas temperaturas sobre a reprodução de bovinos. Dados levantados por Cavestany, El-Whishy e Foot (1985) constataram que as taxas de concepção caem de 40-60% em estações frias para 10-20% (ou até menos) nas estações quentes. Al-Katanani, Webb e Hansen (1999) verificaram que altas temperaturas 10 dias antes do estro estavam associadas à baixa fertilidade. No trabalho de Roth et al. (2001) a produção de esteroides pelas células da granulosa e células da teca foi reduzida em animais expostos a condições de estresse térmico 20-26 dias antes, quando os folículos ainda possuíam entre 0,5-1 mm de diâmetro.

O gado *Bos indicus*, que evoluiu em condições de temperatura mais elevadas, é mais resistente às condições tropicais e apresenta melhor capacidade de regular a temperatura corporal quando comparado a *Bos taurus*. Entretanto, já foi demonstrado que *Bos indicus* também sofre os efeitos do estresse térmico no que diz respeito à sua performance reprodutiva: numa análise retrospectiva realizada por Ferraz et al. (2005), foi verificado que ocorria redução na produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos aspirados de vacas Nelore no verão.

Apesar de os dados apresentados por Ferraz et al. (2005) apontarem para um efeito negativo do estresse térmico em vacas zebuínas, um recente trabalho realizado por Silva et al. (2013) comparou os níveis de produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos obtidos de vacas zebuínas e taurinas submetendo embriões em estágios iniciais de desenvolvimento ao choque térmico (nome atribuído ao processo no qual as estruturas são expostas a condições de calor em laboratório). Foi observado que, embora o choque térmico tenha se relacionado a alterações no índice apoptótico e expressão de genes importantes no desenvolvimento, tanto em taurinos quanto em zebuínos, nestes não havia diferença na produção de embriões submetidos ou não a elevadas temperaturas, enquanto nos taurinos o choque térmico induziu a queda significativa das taxas de blastocistos. Estes dados apontam que, apesar de raças zebuínas sofrerem os efeitos do calor ligados à reprodução, o rigor do dano parece ser menor do que em raças taurinas. Da mesma forma, Barros et al. (2006), Eberhardt et al. (2009) e Satrapa et al. (2011) relataram que embriões de *Bos taurus* puros e mestiços foram mais sensíveis ao choque térmico do que *Bos indicus*, e que a raça da doadora de oócitos é mais importante na resposta ao choque térmico observável na produção de embriões do que a raça do touro doador de sêmen.

2.1.1 Implicações celulares e moleculares do estresse térmico

O excesso de calor tem forte impacto sobre o desenvolvimento de oócitos. O oócito bovino permanece, durante o período folicular, estacionado na meiose I, e é submetido a uma fase de crescimento que dura de 80 a 100 dias, caracterizada pela expansão do volume das células do *cumulus* (20-130 μm de diâmetro), alterações morfológicas e altas taxas de transcrição e tradução (BRITT, 1992). A aquisição do potencial de desenvolvimento – capacidade do oócito de sofrer maturação, fertilização, desenvolver-se com sucesso a blastocisto e gerar descendência viva – é o resultado de ações sinérgicas concomitantes de gonadotropinas e fatores de crescimento, que permitem o acúmulo de RNAm materno e proteínas necessárias para manter as divisões celulares anteriores à ativação do genoma embrionário. Quaisquer perturbações neste processo podem levar à redução da competência dos oócitos ao desenvolvimento (MÉNÉZO, ELDER, 2011).

A exclusão do oócito do ambiente folicular estimula o imediato retorno à meiose (SIRARD, 2001), o que inclui uma série de eventos, como condensação cromossômica, extrusão do primeiro corpúsculo polar e parada na metáfase II. Alterações no citoplasma incluem a redução do compartimento de Golgi, rearranjo mitocondrial, alinhamento dos grânulos corticais ao longo do oolema, e desenvolvimento contínuo de gotículas de lipídios de modo a formar um estoque de energia essencial para o oócito (DIELEMAN et al., 2002). Estudos *in vitro* indicaram que o choque térmico durante as primeiras horas de maturação prejudica o rearranjo do citoesqueleto (ROTH e HANSEN, 2005), afeta as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares (ZERON et al., 2001), induz apoptose (ROTH e HANSEN, 2005) e prejudica a formação do fuso (Tabela 1) (JU et al, 2005; ROTH e HANSEN, 2005). Edwards e Hansen (1997) verificaram que o principal efeito do choque térmico durante a maturação era acelerar o progresso de maturação citoplasmática e nuclear. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) diante de temperaturas elevadas é outro fator que causa danos à competência oocitária. A exposição de oócitos bovinos ao estresse térmico causa desequilíbrio redox resultando no aumento da quantidade de ERO e diminuição nos níveis de glutatona intraoocitária (NABENISHI et al., 2012). O aumento de estresse

oxidativo também é observado em embriões de estágios iniciais submetidos a choque térmico (SAKATANI et al., 2008).

Tabela 1: Alterações celulares induzidas por elevação da temperatura em oócitos.

Região da célula	Estrutura	Alterações	
		Oócitos em vesícula germinal (GV)	Oócitos maturados
Citoplasma	Filamentos de actina	-----	Redução na polimerização de actina
	Microtúbulos	-----	Desorganização dos microtúbulos
	Grânulos corticais (GC)	Aumento da translocação para o oolema	Aumento da translocação para o oolema
	Mitocôndria	Redução da atividade mitocondrial	Redução da atividade mitocondrial
	Proteínas	Redução na síntese total de proteínas	Redução na síntese total de proteínas
Atividade de caspases do grupo II não foi afetada		Aumento da atividade de caspases do grupo II	
Núcleo	Fuso meiótico	Redução da maturação meiótica (estágio MII)	Redução da maturação meiótica (estágio MII)
	DNA	Aumento da fragmentação de DNA (TUNEL positivo)	Aumento da fragmentação de DNA (TUNEL positivo)
	RNA	Quantidade de RNA total não foi afetada	Quantidade de poly(A) RNA não foi afetada
Membrana	Lipídeos	Aumento de ácidos graxos saturados	-----
		-----	Translocação de fosfatidilserina para porção exterior da membrana plasmática (anexina-V)

Fonte: Paula-Lopes et al., 2012, p.398 (adaptado).

Conforme foi demonstrado em vacas (PUTNEY et al., 1989) e posteriormente em camundongos (ROTH et al., 2008), o estresse térmico experimental aplicado no período ovulatório pode ou não ter efeito sobre a capacidade de fertilização dos oócitos, mas os embriões resultantes são mais propensos a desenvolver-se lentamente ou de forma anormal. Além disso, os efeitos do estresse térmico não se restringem a um ciclo estral: Roth et al. (2001) observaram que uma vez que o pool de oócitos em maturação é danificado depois de submeter vacas zebuínas a altas temperaturas, um período de 2 a 3 ciclos estrais após o término das condições de estresse foi necessário para se restabelecerem os padrões de competência oocitária.

Diversos autores procuraram responder se o efeito do calor em um animal poderia ser reproduzido em laboratório. Foi demonstrado que expondo oócitos ao calor (41°C) nas primeiras 12h de maturação *in vitro* ocorria diminuição nas taxas de clivagem (ROTH E HANSEN, 2004, 2005) e de blastocistos (EDWARDS e HANSEN, 1997; JU et al., 2005). O termo choque térmico passou a ser usado para caracterizar a exposição temporária de gametas ou embriões a temperaturas elevadas em condições de laboratório, ao contrário do estresse térmico, que se refere às condições ambientais, artificiais ou não, às quais um animal fica exposto (HANSEN et al., 2001).

Contudo, o modelo de choque térmico num sistema controlado *in vitro* não é idêntico ao que ocorre *in vivo* por diversos aspectos, como a diminuição na solubilidade do CO₂ no meio diante da elevação da temperatura, com consequente aumento do pH (conforme exposto por Li et al., 2005), e há relatos de que a própria produção de embriões *in vitro* cause alterações epigenéticas que limitam a eficácia da técnica (LI et al., 2005; MAALOUF, ALBERIO e CAMPBELL, 2008). Como o próprio choque térmico também altera o desenvolvimento embrionário pela relação com maior liberação de radicais livres (ARÉCHIGA et al., 1995), é difícil definir se o choque por calor afeta o desenvolvimento embrionário da mesma maneira que os ambientes *in vivo*, onde há menos radicais livres. O experimento conduzido por Riviera e Hansen (2001) avaliou diversas questões a respeito: 1 – se a exposição de oócitos bovinos e embriões a temperaturas similares às temperaturas corporais de estresse térmico nas vacas afetaria o desenvolvimento embrionário *in vitro*; 2 – se o cultivo em baixas tensões de O₂ nos primeiros estágios (12h de cultivo de embriões com 1-2 células) eliminaria os efeitos adversos do choque térmico sobre o desenvolvimento embrionário; 3 – e se os efeitos prejudiciais do calor não ocorriam devido a mudanças de pH como resultado da redução da solubilidade de CO₂ em temperaturas elevadas. Os resultados mostraram diminuição da produção de embriões quando submetidos ao choque térmico (taxas próximas a 5%) comparadas aos aproximados 30% de embriões produzidos em condições convencionais. A produção de embriões também caiu em condições de choque térmico independente do sistema de O₂ utilizado (5% ou atmosférico) ou do controle de pH no meio. Este relato foi importante para se ajustarem variáveis na aplicação do choque térmico em oócitos e embriões e para se compreender melhor quais fatores são decisivos no

sucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro* em estruturas submetidas ao choque térmico.

No trabalho proposto por Gendelman et al (2012) foram avaliadas similaridades entre os efeitos do estresse térmico e do choque térmico sobre a produção de embriões. Os autores observaram que as taxas de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de abatedouro coletados nas estações frias não diferiram das taxas de embriões oriundos de oócitos de vacas aspiradas no inverno. No entanto, as taxas de embriões originados das aspirações de vacas no verão foram menores quando comparadas à produção do inverno, e similares às obtidas de oócitos de abatedouro submetidos a choque térmico na maturação *in vitro* (MIV). Quanto à expressão gênica, os autores também verificaram similaridades entre os grupos submetidos ao choque térmico com os grupos de aspiração no verão. Em geral, houve diminuição da expressão de genes em embriões estressados, com funções relacionadas à manutenção da totipotência (POU5F1), à maturação oocitária (C-MOS e GDF9) e catálise de reações na via glicolítica (GAPDH). Os dados demonstraram que o modelo de choque térmico pode ser utilizado para se compreenderem melhor os processos que regulam a resposta de oócitos e embriões às elevações de temperatura.

A descoberta do efeito do choque térmico em *Drosophila* (RITOSSA, 1962) foi o primeiro passo para se compreenderem as respostas celulares nas altas temperaturas, e atualmente já é conhecido que há efeito do calor sobre o desenvolvimento embrionário em muitas espécies. Em peixes-zebra já foi observado que ocorriam problemas na formação de somitos em embriões expostos a temperaturas elevadas (39-41°C) por 20 min (ROY, PRINCE e HO, 1999). Em ratos foi demonstrado que a exposição dos embriões a 42°C foi capaz de aumentar a morte celular e alterar a proliferação das células, de modo que acarretaram mal formações no esqueleto axial (BRENN et al., 1999). Em suínos, ocorreu diminuição no desenvolvimento embrionário e aumento da apoptose em blastocistos quando os oócitos foram expostos ao choque térmico durante a maturação *in vitro* (TSENG, TANG, JU, 2006). Apesar disso, pouco se conhece sobre os efeitos do choque térmico sobre a regulação da expressão de conjuntos de genes.

Quando as células são expostas ao calor, uma resposta celular é iniciada para minimizar os efeitos deletérios. Sabe-se hoje que nos mamíferos essa resposta inclui alteração na expressão de genes como *HSF* (do inglês, *Heat Shock Factor*)

(COLLIER et al., 2008). *HSF1* é o principal fator de transcrição do estresse por calor: liga-se à região do promotor de *HSP* (*Heat Shock Protein*), resultando na expressão de genes de rápida indução (XIAO et al., 1999). Tal como descrito por Bulman e Nelson (2005), e posteriormente por Li et al. (2011), após a detecção de uma tensão térmica o gene *HSF1* é altamente transcrito; este alto nível de transcrição é, em seguida, gradualmente perdido após a remoção da tensão. As proteínas de choque térmico (HSPs) são expressas em todas as células em resposta a estressores ambientais e servem para protegê-las do aquecimento e substâncias tóxicas, o que pode ocorrer durante o cultivo embrionário. Sugeriu-se que a HSP70 tenha um papel direto na indução de tolerância térmica e que o nível de termotolerância pode ser correlacionado com o nível da proteína HSP70 (JIA et al., 2010). Por este motivo, estudos com choque térmico em oócitos e embriões vêm sendo realizados a fim de se compreender como as HSPs se comportam durante a maturação e desenvolvimento embrionário, tendo em vista a criação de estratégias de mitigação para os efeitos nocivos do estresse.

2.2 FATORES EPIGENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Por meio da fertilização *in vitro* tem-se compreendido os processos metabólicos que impulsionam o crescimento embrionário e o desenvolvimento de um oócito fertilizado a blastocisto. O desenvolvimento pós-fecundação é dependente do correto rearranjo dos genomas parentais e da expressão controlada de conjuntos específicos de genes (CHASON et al., 2011). O papel dos fatores de transcrição é conhecido na promoção da expressão desses genes, mas a manutenção de estados específicos ao longo das divisões celulares necessita de mecanismos epigenéticos adicionais. Assim, a cromatina pode atuar como facilitadora ou barreira para a transcrição dependendo da sua conformação (NESTOROV, TARDAT, PETERS, 2013).

O termo “epigenética” refere-se ao estudo das mudanças funcionais no genoma que ocorrem sem alterações da sequência de DNA. Incluem-se dentre os processos epigenéticos a metilação do DNA e as modificações nas histonas (SHI et al., 2003; BERNSTEIN e ALLIS, 2005).

A unidade básica de cromatina consiste de um octâmero de histonas (nucleossomo) H2A, H2B, H3, e H4, com o DNA envolvido em torno desse núcleo, o que proporciona estabilidade estrutural e capacidade para regular a expressão de genes (FEIGENBERG et al., 2013). Os nucleossomos estão dispostos num intervalo de aproximadamente 200 pares de nucleotídeos, e normalmente são compactados em arranjos quase regulares, formando uma fibra de cromatina de 30nm (essas fibras podem dobrar-se sobre um esqueleto de proteínas, que atingem, no momento da divisão, um estado altamente condensado). Estudos da década de 1930 mostraram dois tipos diferentes de cromatina no núcleo interfásico de células eucarióticas: a heterocromatina, forma bastante compacta, disposta em vários locais ao longo dos cromossomos, incluindo centrômeros e telômeros, e a eucromatina, forma mais relaxada dessa disposição (ALBERTS et al., 2005).

Cada núcleo de histona dentro do nucleossomo contém um domínio globular e uma cauda N terminal altamente dinâmica que se estende desde os domínios globulares. Proteínas histonas têm caudas que podem sofrer modificações pós-traducionais, incluindo a acetilação, a metilação, a fosforilação, a ubiquitinação, a glicosilação dentre outros (FEIGENBERG et al., 2013). Essas modificações covalentes podem alterar a interação da cauda de histonas com o DNA ou com proteínas associadas à cromatina (RICE e ALLIS, 2001).

2.2.1 Acetilação de histonas

Quando as histonas recebem radicais acetil nos grupos lisina, a carga positiva da molécula é neutralizada, levando ao enfraquecimento da interação da cauda da histona com o DNA carregado negativamente e induzindo a abertura pontual das estruturas da cromatina (ZUPKOVITZ et al., 2006). Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição (VERDONE et al., 2005).

Modificações de histonas associadas à acetilação são reguladas por várias enzimas, incluindo acetiltransferases de histona (HAT) e desacetilases (HDAC). A acetilação de proteínas histonas por HAT é comumente encontrada em eucromatina (estado de cromatina relaxada) e é associada com a transcrição ativa. A desacetilação de histonas por HDAC e a metilação de DNA por DNA

metiltransferases (DNMT) é um indicador de heterocromatina (estado condensado), que é associada com a repressão transcricional (Figura 1)(FEIGENBERG et al., 2013). Os resíduos de lisina (K) para a acetilação são bastante conservados em histonas H4 (posições K5, K8, K12, K16) e H3 (K9, K14, K18, K23) (BJERLING et al., 2002).

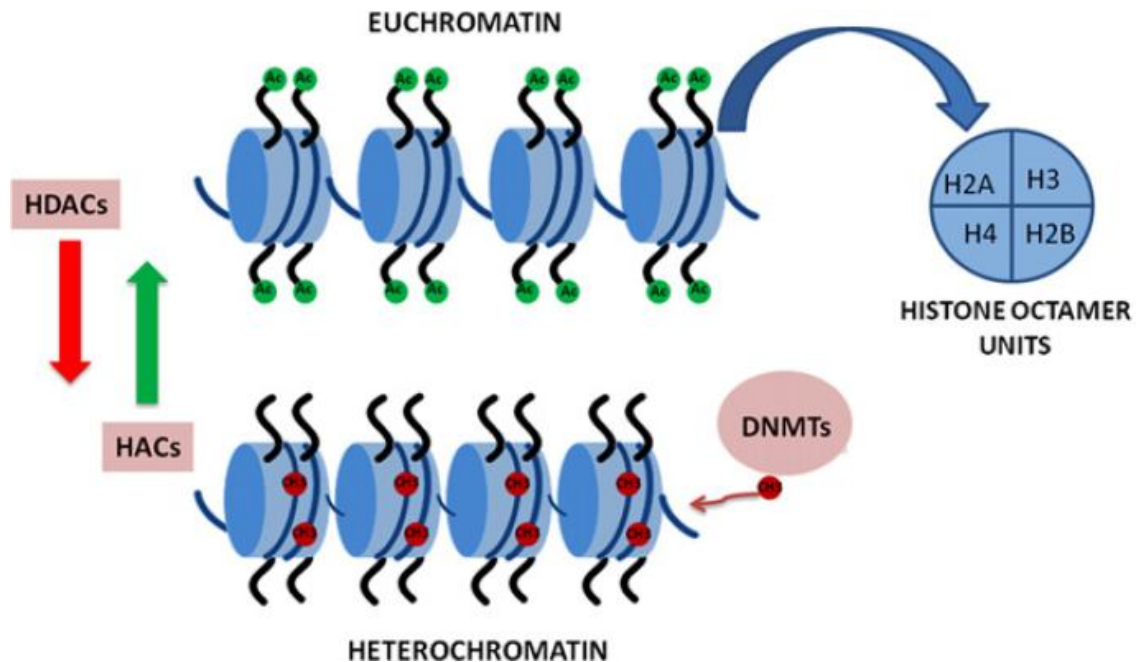


Figura 1: Estrutura geral de euromatina e heterocromatina por histonas acetiltransferases e desacetilases. Marcas epigenéticas são estabelecidas por mecanismos que incluem a metilação de DNA por DNA metiltransferases (DNMT) e modificações de histonas por histonas acetiltransferases (HAT ou HAC, na figura), e histonas desacetilases (HDAC). A acetilação de histonas caracteriza o estado de euromatina (indicativa de transcrição global ativa), e a desacetilação de histonas associa-se com a metilação de DNA e está relacionada à repressão da transcrição (estado de heterocromatina). Fonte: FEIGENBERG et al., 2013, p. 608.

2.2.2 Metilação de histonas

As histonas também podem receber radicais metil em suas caudas de aminoácidos. Esse mecanismo pode ocorrer em resíduos de lisina e arginina posicionados nas cadeias laterais, dos quais H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3R2, H3R8, H4R3 estão entre as mais extensivamente estudadas, e um único resíduo pode ser monometilado (me1), dimetilado (me2) ou trimetilado (me3) no grupo amina (GREER e SHI, 2012). Os resíduos de lisina possuem sítios para ligação de radicais acetil ou metil (Figura 2). Ao contrário da acetilação de histonas, a metilação (por

adição de um, dois ou três radicais) não altera a carga global das regiões caudais da molécula, mas aumenta a sua afinidade por compostos aniônicos, como o DNA, e acentua a basicidade e hidrofobicidade (RICE e ALLIS, 2001).

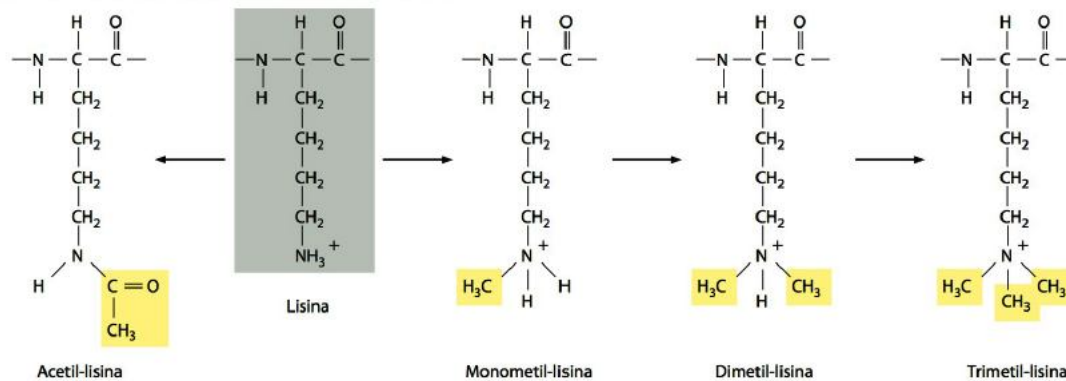


Figura 2: Ligações covalentes em resíduos de lisina para acetilação ou metilação. São mostrados a ligação de acetilação e três níveis distintos de metilação a partir de um resíduo de lisina. É importante observar que a acetilação retira a carga positiva do aminoácido, e quando acetilado não pode ser metilado ao mesmo tempo (e vice-versa). Fonte: ALBERTS, 2005, p.222

A metilação de lisinas e argininas (nas histonas) é realizada por histonas metiltransferases (HMT) (RICE e ALLIS, 2001), e o efeito sobre a expressão dos genes pode ser de ativação ou de repressão, dependendo da posição do aminoácido e do número de resíduos metilados. Como exemplo pode-se citar a histona H3 metilada na lisina 9 (designada H3K9me) que representa uma marca de DNA transcricionalmente inativo comumente presente em heterocromatina, enquanto a histona H3 trimetilada na lisina 4 (H3K4me3) indica regiões transcricionalmente ativas (SCHAGDARSURENGIN et al., 2012). Além destes exemplos, a metilação de arginina na histona H3 (R2, R17 e R26) e a trimetilação de H3K4 tem ligação com a estimulação da transcrição (STALLCUP, 2001; JAHANGIRI, SHAHHOSEINI, MOVAGHAR, 2014), enquanto a metilação da lisina na histona H3 (K9, K27, K36 e K79) e histona H4K20 reprimem a expressão (LACHNER, O'SULLIVAN e JENUWEIN, 2003).

2.2.3 Metilação de DNA

Proteínas específicas, como metiltransferases de DNA (DNMT), podem estabelecer ou manter padrões de metilação do DNA. A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil no carbono 5 da citosina. Nos mamíferos, ocorre quase

que exclusivamente em dinucleotídeos CG, denominados “Ilhas CpG” que normalmente contêm cerca de 5 a 10 CpGs por 100 bp e muitas vezes colocalizados com promotores de genes e regiões reguladoras (AUCLAIR, WEBER, 2012). DNMT1 é a enzima responsável pela manutenção primária da metilação de DNA com uma elevada afinidade por DNA hemimetilado. Esta modificação epigenética é geralmente associada ao silenciamento transcricional e *imprinting*, devido à incapacidade de fatores de transcrição se ligarem a sequências de DNA metilado (HIENDLEDER et al., 2004).

A desmetilação do DNA também é crítica durante a formação de células germinativas primordiais e o desenvolvimento embrionário inicial. Pode ocorrer através de desmetilação passiva, que está associada às divisões celulares, ou ativa, usando mecanismos de reparo e excisão (FEIGENBERG et al., 2013). No desenvolvimento embrionário inicial, o genoma paterno é o primeiro a ser modificado de forma intensa, sendo altamente desmetilado pouco após a fecundação, provavelmente por desmetilação ativa (enzimática). Já foi demonstrado que um oócito pode desmetilar ativamente o núcleo de uma célula somática por transferência nuclear (apesar da baixa eficiência alguns embriões clones se desenvolveram a termo), o que aponta para que os fatores de desmetilação estejam contidos no oócito e não no espermatozoide. Contudo, o DNA materno permanece metilado nesta fase (MORGAN et al., 2005).

A metilação do DNA materno é reduzida progressivamente conforme avançam as divisões de clivagem; esta perda da metilação depende da replicação do material genético e resulta em cromátides irmãs desigualmente metiladas. A proteína Dnmt1 herdada do oócito não é detectada durante as três primeiras divisões de clivagem, que representam a perda de metilação por um mecanismo passivo (MORGAN et al., 2005). Marcas epigenéticas como genes imprintados são estabelecidas no início do desenvolvimento e protegidas da onda global de desmetilação por isoformas de Dnmt1, como Dnmt1o, herdada do oócito (FEIGENBERG et al., 2013). Há diferenças na desmetilação passiva entre espécies de mamíferos (FAIRBURN et al., 2002; MORGAN et al., 2005).

Apesar do número crescente de estudos, o padrão exato de metilação no embrião bovino não foi estabelecido. No entanto, sabe-se que após a fertilização, o embrião permanece em estado de quietude transcricional que é mantido até uma fase espécie-específica (8-16 células em bovinos, 2 células em camundongos, 4

células em suínos e 4-8 células em humanos), quando a transcrição é retomada em consequência da ativação do genoma embrionário (MORGAN et al., 2005). Em seguida a onda de metilação *de novo* é mediada pelas metiltransferases Dnmt3a e Dnmt3b. Os níveis totais de metilação de blastocistos são menores na MCI do que em TE (DOBBS et al., 2013), o mesmo observado em estudos anteriores com coelhos (SHI et al., 2004; CHEN et al., 2004). Já em embriões de camundongos foi observado o inverso, com os níveis de metilação da MCI maiores que os das células do trofoblasto (CARLSON, PAGE e BESTOR, 1992). Essa diferença, segundo os autores, pode ter relação com a expressão diferencial de genes regulados distintamente na MCI e TE entre espécies.

No entanto, ainda não há clareza na conformidade de resultados. O trabalho proposto por Dean et al. (2001) indicou desmetilação generalizada no estágio de 8 células aumentando a partir de 16 células, enquanto outro trabalho indicou que a desmetilação persistiu até o estágio de mórula (HOU et al., 2007). A própria diferença na metilação entre MCI e TE do blastocisto bovino também não está clara, com um estudo indicando maior metilação na MCI (DEAN et al., 2001) e outro indicando maior metilação em TE (HOU et al., 2007). Mudanças no desenvolvimento do metiloma embrionário são também susceptíveis de serem modificadas pela genética do embrião e do ambiente em que residem. O sexo do embrião pode afetar o desenvolvimento: a abundância de transcritos é maior em embriões femininos do que masculinos (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010). A expressão de metiltransferases *de novo* também difere entre os dois sexos, com blastocistos do sexo feminino expressando menos Dnmt3a e Dnmt3b em comparação com os blastocistos masculinos. Dessa forma, o nível global de metilação do DNA na fase de blastocisto parece ser menor em embriões fêmeas do que em machos (DOBBS et al., 2013).

2.2.4 Eventos epigenéticos interrelacionados e desenvolvimento embrionário

O papel da modificação de histonas durante o desenvolvimento embrionário inicial tem sido o foco de muitos grupos de investigação, dado o papel crítico que essas modificações possuem (CANTONE; FISHER, 2013; RIVIERA; ROSS, 2013; GASPAR et al., 2015). Modificações de histonas durante a oogênese e embriogênese tem sido catalogadas em alguns estudos (OOI et al., 2007; AUCLAIR;

WEBER, 2012), no entanto, conforme discutem Gill, Erkek, Peters (2012), apenas um número limitado de trabalhos identificou papéis funcionais para estas modificações, sendo escassas informações acerca de modificações epigenéticas em embriões produzidos a partir de procedimentos envolvendo choque térmico.

É possível que haja uma dependência entre a metilação de DNA e as modificações de histonas repressivas em mamíferos. A metilação das lisinas 9 e 27 da histona H3 (H3K9 e H3K27) parece ser um sinal de recrutamento para a metilação de DNA (DONG et al., 2008). É sugerida ainda uma possível ligação entre a metilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36) e a metilação do DNA (BLACKLEDGE et al., 2010). Em mamíferos, parece ocorrer uma correlação inversa entre a metilação do DNA e a metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4 – MEISSNER et al., 2008). Sugere-se que ela desempenhe um papel de destaque na proteção do DNA contra a metilação *de novo*, e que a sua remoção possa ser um sinal para a metilação do DNA. Assim, a metilação do DNA favorece a repressão do gene, mas as alterações de histonas é que executam o silenciamento gênico final (AUCLAIR, WEBER, 2012). No trabalho proposto por Lagger et al. (2002) foi identificado que ocorre uma diminuição na metilação de H3K9 em células-tronco HDAC1-deficientes, apontando para uma inter-relação entre as modificações que ocorrem em histonas.

No entanto, há resultados que se mostram controversos diante dessas observações. No estudo desenvolvido por Wu et al. (2010), foram analisadas as mudanças de H3K4me3 (uma marca de ativação da transcrição) em embriões bovinos produzidos por TNCS e por FIV em diferentes estágios de desenvolvimento a partir de imunocitoquímica. Foi observada a presença de H3K4me3 em embriões FIV de 1-2 células, com redução ou desaparecimento do sinal até o estágio de 8 células, e reaparecimento em mórula e blastocisto. Essas mudanças acompanharam a acetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9ac), e são similares (não inversas) às modificações na metilação de DNA que parecem ocorrer em embriões bovinos produzidos por FIV (DOBBS et al., 2013). Em embriões clonados, a marcação de H3K4me3 e de H3K9ac foi mais elevada que a de embriões FIV em todos os estágios até 8 células, mas manteve-se similar ao observado nos estágios de mórula a blastocisto produzidos por fertilização. Os resultados deste estudo sugeriram que em clones esteja ocorrendo alta atividade transcricional antes do momento adequado para a ativação do genoma embrionário, o que pode ser uma das causas

que levam à baixa eficiência das biotécnicas de clonagem a partir do uso de células somáticas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel das modificações de histonas ao longo do desenvolvimento.

A interação entre os eventos epigenéticos, observada na correlação entre modificações de histonas e metilação de DNA, envolve também a ação de proteínas adicionais, embora não seja absolutamente bem resolvida. Eucariotos superiores expressam várias proteínas contendo domínios que se ligam às caudas das histonas quando metiladas em lisinas específicas. Um exemplo é a proteína heterocromatina 1 (HP1). Além das histonas, HP1 é uma das principais proteínas associadas à heterocromatina. Um domínio de HP1 se liga à cauda terminal de H3 somente quando ela está trimetilada na lisina 9. HP1 também se liga à enzima que metila a H3K9 (Suv39h), fazendo com que nucleossomos contendo HP1 também sejam metilados na lisina 9 (Figura 3) (LODISH et al., 2014).

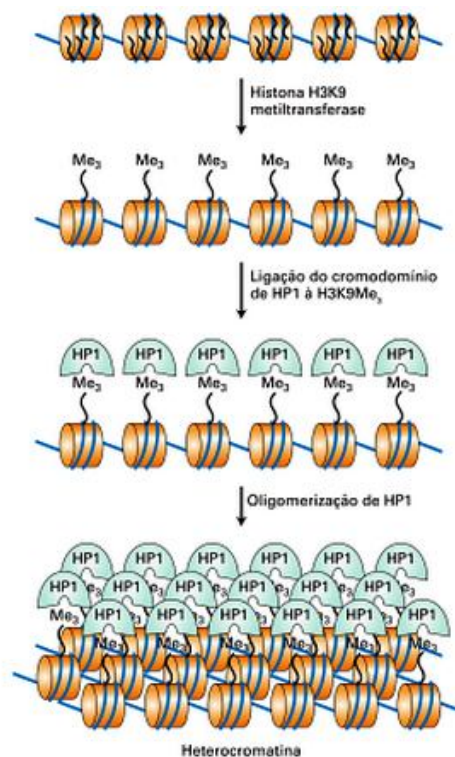


Figura 3: Modelo para a formação de heterocromatina pela interação de HP1 com H3K9me3. A proteína heterocromatina 1 (HP1) contribui para a formação de heterocromatina ligando-se a lisinas trimetiladas de histonas H3. Por se ligar à histona metiltransferase que metila H3K9, HP1 pode recrutar novas trimetilações, novos sítios de ligação surgem nos nucleossomos próximos, propagando o estado de heterocromatina ao longo do cromossomo. Fonte: Lodish et al., 2014, p. 262

A descoberta de enzimas mediadoras da metilação de H3K9 contendo um sítio de ligação para HP1 (LACHNER et al., 2001) enfatiza a importância dessa via na regulação da estrutura da heterocromatina (CHEUTIN et al., 2003), tornando-se de particular interesse no desenvolvimento embrionário. À exceção de algumas situações, a remoção de componentes que modificam H3K9 ou HP1 já resultou em defeitos no desenvolvimento embrionário em vários organismos. Geralmente, a metilação do DNA e de H3K9 servem semelhantes propósitos no silenciamento de longo prazo (são marcas de heterocromatina constitutiva, conforme exposto por Saksouk et al., 2014). No entanto, a interdependência direta entre estes dois mecanismos de silenciamento nem sempre é clara (NESTOROV, TARDAT, PETERS, 2013).

Em mamíferos, três subtipos de HP1 foram identificados: HP1 α , HP1 β e HP1 γ . As três isoformas têm localização diferente e exercem diferentes funções (MEGLICKI, ZIENTARSKI e BORSUK, 2007). Em células de mamíferos, o HP1 α e HP1 β são principalmente relacionados à heterocromatina, enquanto HP1 γ é observada tanto na heterocromatina quanto na eucromatina (LOMBERK, WALLRATT e URRUTIA, 2006). Meglicki, Zientarski e Borsuk (2007) compararam as isoformas HP1 α e HP1 β em oócitos de rato, e concluíram que o HP1 β é a de maior afinidade para heterocromatina, sendo a isoforma melhor estudada em embriões. Proteínas HP1 interagem com Suv39h, a principal histona metiltransferase (HMTase) responsável pela trimetilação de H3K9. Há indícios de que essa proteína esteja diretamente relacionada com a estabilidade da heterocromatina (WANG et al., 2013). A partir do recrutamento de Suv39h para regiões de heterocromatina, sua atividade enzimática poderia criar locais de ligação adicionais para HP1, formando assim um circuito auto-sustentável (PROBST e ALMOUZNI, 2008).

2.2.5 Remodelação epigenética por 5-aza-2'deoxyctidine

Algumas substâncias químicas são capazes de interferir na estrutura de cromatina ou na metilação do DNA, e podem ser úteis para entender os eventos epigenéticos envolvidos no desenvolvimento inicial do embrião derivado de oócitos submetidos ao choque térmico. O entendimento desses eventos epigenéticos em embriões oriundos de oócitos estressados abre a oportunidade de desenvolver

procedimentos que controlem ou modulem possíveis alterações epigenéticas e, assim, contribuam na mitigação dos efeitos nocivos do calor sobre o desenvolvimento (FARHUD et al., 2010).

5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR ou 5-aza) é uma variação do nucleosídeo deoxycytidine com modificação na posição 5 do anel pirimidina, sintetizada há 50 anos (PLIML e SORM, 1964) (Figura 4). Desde então, inúmeros estudos revelaram que 5-aza é um potente inibidor da atividade de DNA metiltransferase (Dnmt), através da ligação irreversível da Dnmts a 5-aza substituindo o DNA (Figura 5). Ao promover hipometilação pode favorecer a expressão de genes silenciados (JABBOUR et al., 2008). Devido à interligação entre a metilação do DNA e as modificações de histonas, a inibição de Dnmts pode favorecer a acetilação dessas proteínas. Foi observado que em células cancerígenas 5-aza é capaz de reduzir os níveis de H3K9 metilado (NGUYEN et al., 2002, MENG et al., 2011).

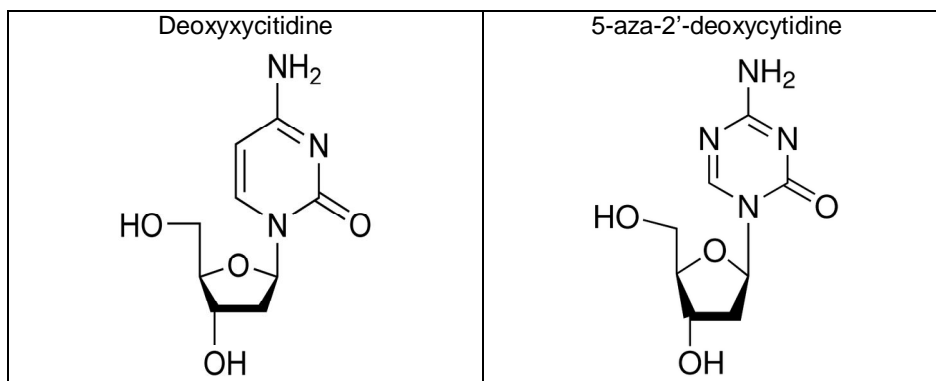


Figura 4: Molécula do nucleosídeo deoxycytidine e seu derivado 5-aza-2'-deoxycytidine. A mudança na posição 5 no anel pirimidina constrói a molécula. Outras variações deste inibidor existem, como a 5-aza-cytidine, que possui um grupo hidroxila adicional na pentose do nucleosídeo, daí a derivação desoxi. O carbono 5 do anel pirimidina do nucleotídeo é substituído por nitrogênio na molécula de 5-aza.

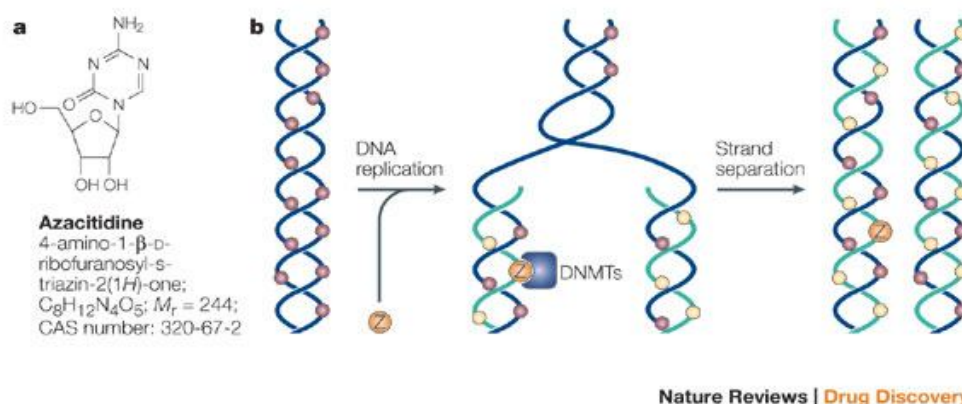


Figura 5: Mecanismo de ação de azacitidine, similar a 5-aza, pelo qual a metilação de DNA é inibida. Azacitidine (Z) é incorporada no lugar da citidina ao DNA no momento de replicação, onde pode inibir diretamente Dmnts por ligar-se de forma covalente e irreversível ao sítio catalítico da enzima, impossibilitando que ocorra a metilação. Consequentemente, ocorre hipometilação global de DNA e reativação de genes previamente silenciados. As esferas rosa representam ilhas CpG metiladas, e as amarelas as não metiladas. Fonte: ISSA, KANTARJIAN, KIRKPATRICK, p.275, 2005.

5-aza foi capaz de induzir a expressão de genes supressores de tumor naturalmente silenciados em linhagens celulares do câncer de mama humano (WOSNIAK et al., 2007). Os resultados do trabalho de Wozniak et al., (2007) também mostraram que a determinação da maneira precisa em que 5-aza alivia a repressão da transcrição exigirá uma maior compreensão dos efeitos específicos da droga, no que diz respeito à sua capacidade de desmetilar tanto DNA quanto histonas. Há evidências de que 5-aza induza a desmetilação de H3K9: Nguyen et al. (2002), ao estudarem o efeito deste inibidor sobre o remodelamento da cromatina em células normais e cancerosas, demonstraram redução da metilação de H3K9 e aumento da acetilação de H3K4, independentemente dos efeitos sobre a metilação ao nível de DNA, sugerindo um modo adicional de ação para esta droga.

O uso de 5-aza na produção de embriões bovinos clones parece ser explorado há pouco mais de uma década (ENRIGHT et al., 2003) a partir de relatos envolvendo o uso dessa molécula em camundongos para melhorar a expressão de genes de alelos imprintados (HU et al., 1997; KHARROUBI, PIRAS e STEWART, 2001), e a concentração de 10nM foi descrita por diversos autores como a mais adequada para uso tanto em células doadoras (ENRIGHT et al., 2005; JAFARPOUR et al., 2011) quanto em embriões pós-fusionados (WANG et al., 2011a). Wang et al., (2011b) verificaram um aumento significativo na taxa de natalidade, de 2,6% no grupo controle para 13,4% no grupo tratado, após o tratamento de células somáticas doadoras de núcleo com 5-aza associada à tricostatina A (TSA, um inibidor de

histona desacetilases), seguindo de nova exposição de embriões pós-fusão com os mesmos inibidores. Resultados positivos em clones bovinos a partir do uso de 5-aza e TSA também foram encontrados no trabalho de Ding et al. (2008), no qual o uso combinado das mesmas substâncias em embriões pós-fusão resultou em aumento significativo na produção de blastocistos, que foi ainda maior quando associado ao tratamento das células doadoras. Os autores justificam que a contribuição de 5-aza ao desenvolvimento embrionário seja a de reprimir a metilação *de novo* precoce, conhecida em embriões produzidos por clonagem, enquanto TSA deve promover acetilação de histonas e colaborar com a expressão de genes após a ativação do genoma embrionário. Há apenas um relato do uso de 5-aza em embriões FIV vitrificados. No trabalho de Zhao et al. (2012), embriões bovinos com duas células foram expostos por 48h a 5-aza após desvitrificação, e houve normalização na expressão de genes imprintados que são comumente alterados pelo congelamento.

Considerando os resultados obtidos por trabalhos envolvendo o uso de 5-aza na produção de embriões bovinos antes da ativação do genoma embrionário, a alteração no nível de expressão de heterocromatina já observada em embriões cujos oócitos foram injuriados termicamente, e a interligação entre metilação de DNA e modificações de histonas, é possível que essa molécula, quando utilizada no período pré-ativação do genoma embrionário, seja capaz de influenciar o remodelamento da cromatina durante o desenvolvimento pré-implantacional, com reflexo no desenvolvimento embrionário. Este possível efeito pode ter impacto mais relevante em embriões oriundos de oócitos submetidos ao choque térmico.

3 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do inibidor de metilação 5-aza na produção *in vitro* de embriões bovinos derivados de oócitos submetidos a condições de choque térmico;

ESPECÍFICOS

- Avaliar a possível influência de 5-aza sobre o desenvolvimento dos embriões;
- Avaliar as taxas de apoptose, número de células apoptóticas e número de células totais em embriões tratados com 5-aza;
- Avaliar níveis globais de heterocromatina em embriões oriundos de oócitos submetidos ao choque térmico;
- Avaliar níveis globais de heterocromatina em embriões expostos a 5-aza nos primeiros estágios do desenvolvimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi executado nos meses de maio a outubro de 2014 no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, segundo delineamento experimental abaixo (Figura 6).

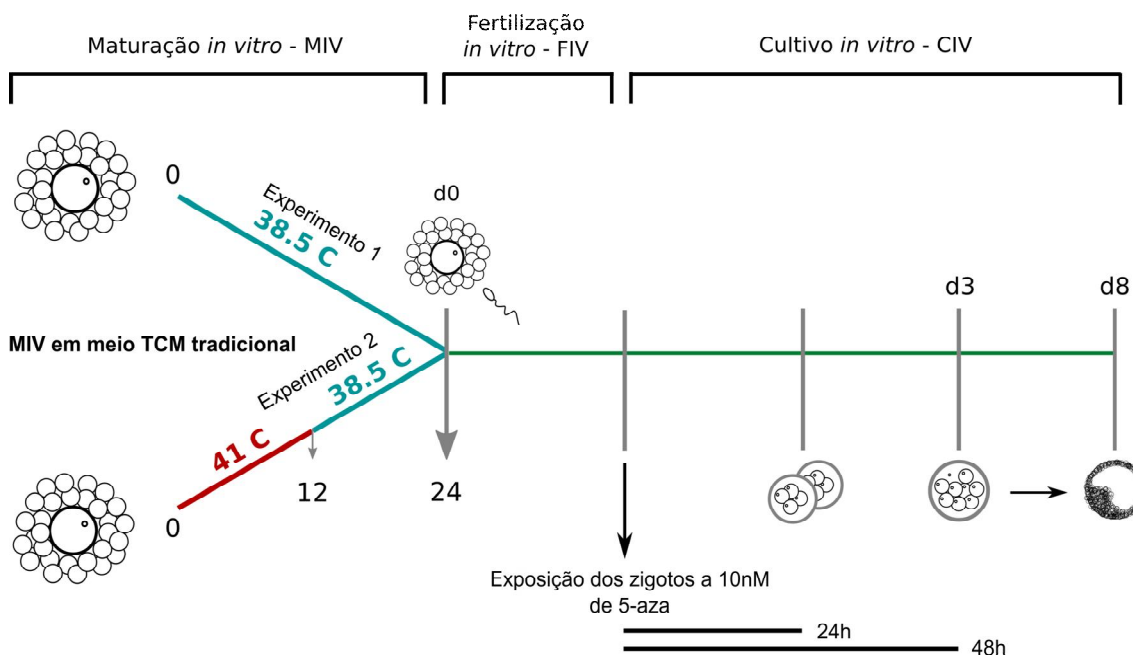


Figura 6: Delineamento experimental: oócitos serão submetidos ou não ao choque térmico e os possíveis zigotos foram expostos a 5-aza durante as primeiras 24h ou 48h de cultivo.

4.1 ETAPA 1 – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Para a condução da avaliação da produção *in vitro* de embriões, foram conduzidos dois experimentos. O experimento 1 avaliou o efeito da 5-aza por 24 ou 48h no desenvolvimento de embriões derivados de oócitos maturados *in vitro* em condições normais de temperatura (38,5°C). O experimento 2 avaliou o efeito da 5-aza por 24 ou 48h no desenvolvimento de embriões derivados de oócitos maturados *in vitro* em condições de estresse térmico (41-41,5°C). As condições de maturação para os experimentos estão descritas conforme segue:

- EXPERIMENTO 1 (*No heat shock*, NHS): maturação *in vitro* realizada em 38,5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e umidade saturada por 24h.

- EXPERIMENTO 2 (*heat shock*, HS): maturação *in vitro* realizada em 41-41,5°C, 6,5-7,0% de CO₂ em ar atmosférico e umidade saturada por 12h, seguido da troca do ambiente de maturação para as condições do Experimento 1 por mais 12h, completando 24h de maturação *in vitro*.

Todas as demais condições (descritas a seguir), salvo onde especificado, foram idênticas para os dois experimentos.

4.1.1 Obtenção dos ovários e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) oriundos de rebanhos de Juiz de Fora e região foram coletados no matadouro local (Fripai Distribuidora de Carnes Ltda) para a obtenção dos oócitos imaturos. Os ovários foram obtidos logo após o abate e transportados para o laboratório em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina à temperatura de 35° C. Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm.

Após decantação do fluido folicular aspirado, o conteúdo sobrenadante foi removido e o sedimento lavado em meio TALP para seleção morfológica dos oócitos Grau I. A MIV foi realizada em placa de 4 poços contendo 400µL de meio *Tissue Culture Medium 199* (TCM 199 – Invitrogen, California, EUA) suplementado com 20 µg mL⁻¹ de hormônio folículo estimulante (FSH, Pluset, Barcelona, Espanha) e soro inativado de vaca em cio (10%). Os oócitos foram maturados em estufa incubadora seguindo as condições descritas para cada experimento. Em cada poço foram maturadas entre 40-60 estruturas.

4.1.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após 24h de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen previamente testado no laboratório quanto à capacidade de desenvolvimento de embriões de FIV. Para a seleção dos espermatozoides foi usado o método do gradiente de Percoll (Biodux, Campinas, Brasil) com as concentrações de 45% e 90% (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995).

A FIV foi realizada em gotas de 100 μL de meio FERT-TALP, acrescido de 10 UI mL^{-1} de heparina. As gotas continham uma concentração espermática de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} , foram cobertas com óleo mineral e mantidas por 20h em estufa incubadora com 5% de CO_2 em ar e $38,5^\circ\text{C}$ e umidade saturada. Cada gota de fecundação continha aproximadamente 30 oócitos.

4.1.3 Cultivo *in vitro* e exposição a 5-aza

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram desnudados em hialuronidase 0,1% m/v (Sigma, St Louis, EUA) em vórtex por 5 min e lavados em meio TALP-HEPES. O cultivo foi realizado em placas de 4 poços contendo 400 μL de meio de cultivo (descrito a seguir) coberto com óleo mineral, em incubadora com 5% de CO_2 , 5% de O_2 , $38,5^\circ\text{C}$ e umidade saturada por 8 dias. Os embriões foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

- Controle: cultivo realizado em CR2aa sem 5-aza;
- AZA-24h: cultivo realizado em CR2aa acrescido de 10nM de 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma, St Louis, EUA) durante 24h após fim da FIV;
- AZA-48h: cultivo realizado em CR2aa acrescido de 10nM de 5-aza durante 48h após fim da FIV.

Os tempos de 24h e 48h de exposição a 5-aza baseiam-se na premissa de que o efeito de 5-aza seja mais evidente na remodelação da cromatina antes da grande ativação do genoma embrionário.

Após a exposição a 5-aza os embriões foram removidos do meio, lavados em meio de cultivo CR2aa e mantidos na estufa incubadora até dia 8.

Para o experimento 1 (sem choque térmico: NHS) os grupos foram denominados:

- NHS: controle, sem 5-aza;
- NHS24h: 5-aza por 24h;
- NHS48h: 5-aza por 48h.

Para o experimento 2 (com choque térmico: HS) os grupos foram denominados:

- HS: controle, sem 5-aza;
- HS24h: 5-aza por 24h;

- HS48h: 5-aza por 48h.

Para o Experimento 1, o tratamento adicional com dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St Louis) foi executado para comprovar a não-interferência dessa substância no desenvolvimento embrionário, visto que é o principal diluente descrito para 5-aza. A concentração de diluente do meio de cultivo foi ajustada para 0,1%, descrita em outros trabalhos como não nociva ao desenvolvimento embrionário (PAYTON et al., 2004; CARAMBULA, OLIVEIRA, HANSEN, 2009; KALO, ROTH, 2011). Foram realizadas 4 repetições concomitantes à realização de 4 repetições do experimento 1.

Para a condução dos experimentos, foram realizadas 12 repetições, com 20-30 presumíveis zigotos por tratamento em cada uma.

4.1.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem dos embriões foi calculada no dia 3 (D3) imediatamente após a manipulação dos embriões expostos a 5-aza por 48h (68hpi). O número e o estágio de desenvolvimento de blastocistos foi avaliado nos dias 7 (D7) e 8 (D8).

4.2 ETAPA 2 – ÍNDICE APOPTÓTICO EMBRIONÁRIO (TUNEL)

Nesta etapa a fragmentação do DNA foi avaliada como indicador de apoptose em células embrionárias para o experimento 1 e para o experimento 2. Para tanto, utilizou-se o Kit comercial *Dead end fluorimetric terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end (TUNEL) System* (Promega, Madison, WI, EUA). Após a avaliação do desenvolvimento embrionário em D8 dos blastocistos dos experimentos 1 e 2, as estruturas foram lavadas em solução de PBS contendo 0,1% de polivinilálcool (PVA, Sigma), fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em geladeira por 25min, lavadas novamente e armazenadas em PBS a 4°C.

Após permeabilização em solução de Triton X-100 0,2% em solução salina fosfatada, os embriões foram incubados em tampão de equilíbrio, *mix* de nucleotídeos e enzima *recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase* (rTdT) e

corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), que cora o DNA fragmentado. Os embriões permaneceram nesta condição a 37°C por 1 h em câmara úmida coberta com papel alumínio. No controle negativo, os embriões foram incubados na ausência da enzima rTdT. No controle positivo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio, enzima DNase (para promover a degradação do DNA nas células do embrião) e a enzima fluoresceína-12-dUTP.

Após lavagens, os embriões foram transferidos para lâmina e corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA), um corante de DNA, e recobertos com lamínula. Todos os blastômeros embrionários foram visualizados em azul no filtro de 460 nm do microscópio de epifluorescência (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). As células embrionárias em apoptose foram identificadas no filtro de 520±20 nm, apresentando-se a cor verde pela absorção da fluoresceína.

O número de células totais e o número de células apoptóticas foi analisado utilizando-se o software *Image J* 1.49. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e do número de células contendo corpos apoptóticos.

4.3 ETAPA 3 – IMUNOFLOURESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Para esta etapa os embriões foram produzidos simultaneamente e nas mesmas condições dos Experimentos 1 e 2, de modo que os resultados foram comparados entre todos os grupos NHS e HS. Para esta análise os embriões com 24h e com 48h de exposição a 5-aza foram avaliados 44 horas pós inseminação (hpi) e 68hpi.

As estruturas foram lavadas em PBS-PVA e fixadas em PFA 4% em geladeira durante a noite. Após novas lavagens (três vezes de 5 minutos), as estruturas foram permeabilizadas em 1% de Triton X-100 em PBS por 25 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado bloqueio em 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma) por 30 minutos, e incubação durante a noite em geladeira (câmara úmida) com o anticorpo Anti-Heterochromatin Protein-1 beta (HP1β, Millipore, Temecula, CA) diluído 1:400 em PBS contendo 2% de albumina sérica bovina fração V (BSA, Sigma).

Após três lavagens em PBS contendo 0,01% de Triton X-100, os embriões foram tratados com anticorpo secundário de Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Califórnia, EUA), diluído 1:400 em PBS-BSA 2% por 1h em temperatura ambiente e câmara úmida. As lâminas foram preparadas após mais três lavagens em PBS-Triton 0,01% e incubação com DAPI por 20 minutos, seguida de duas lavagens adicionais e cobertura com DAPI em Vectashield (DAPI serviu de referência para a marcação dos núcleos). A captura das imagens foi executada em microscópio confocal Leica TCS SP5II, objetiva de 40x e zoom digital de 2x. As imagens de cada embrião foram geradas de forma a capturar completamente todos os núcleos marcados com DAPI, com cortes de espessura de 3 μ m. Em cada grupo de análise, foram processados no mínimo 25 embriões de mesmo número de hpi. O procedimento envolveu embriões escolhidos aleatoriamente de *pools* de 3 repetições para cada grupo.

- Análise quantitativa

A intensidade de fluorescência para cada núcleo (fluorescência verde) foi analisada no software *Image J* 1.49. Núcleos individuais foram identificados em imagem gerada a partir da sobreposição de todos os cortes, usando ferramenta de mão livre ou marcação circular do software, dependendo da geometria observada. Os processos de aferição foram determinados no manual do software. Um total de 5 regiões dispostas externamente à posição dos núcleos foram aferidas para cada embrião para constituírem a referência de *background*, e suas médias subtraídas da intensidade por pixel para cada núcleo. Os valores dos núcleos foram agrupados em relação ao estágio de desenvolvimento e tempo após fecundação *in vitro* aos quais os embriões pertenciam (4-7 células com 44hpi ou 8-16 células com 68hpi).

- Análise semi-quantitativa

Os mesmos núcleos utilizados na análise quantitativa foram classificados visualmente quanto à força da marcação. Foram categorizados 4 níveis. 1 – nulo (núcleos não marcados); 2 – Fraca marcação; 3 – Média marcação; 4 – forte marcação. A observação para a classificação dos núcleos foi feita sobre as imagens originais do Software LAS-AF Lite (versão 2.6), sem nenhum tipo de edição. Os

núcleos foram agrupados por estágio de desenvolvimento e de acordo com a categorização proposta. Foi computado o percentual de núcleos em cada tratamento que exibiam cada característica do índice.

4.4 ETAPA 4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística das taxas de embriões produzidos, número total de células embrionárias, número de células apoptóticas, índice apoptótico e análise quantitativa de intensidade de fluorescência, foi realizada análise de variância (ANOVA) e as comparações entre médias avaliadas por SNK ao nível de significância de 5%. Os dados quantitativos de imunofluorescência sofreram transformação logarítmica de $\log(x+1)$ por não atenderem a pressuposição de normalidade avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As taxas percentuais de embriões em estágio de 8 células e da análise semi-quantitativa de imunofluorescência foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado. Para tais análises foi utilizado o Software GraphPad Prism versão 5.03. Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA 1 – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Para avaliar um possível efeito do DMSO sobre os embriões foi feita a comparação entre controle do Experimento 1 (NHS) e um grupo contendo 0,1% de DMSO, concentração usada na diluição do 5-aza. A produção de embriões do grupo tratado com DMSO foi similar ao controle (clivagem 82,03±3,74%, blastocistos D7 19,87±6,48%, blastocistos D8 22,17±7,38%), em comparação às repetições concomitantes de 77,25±7,45 para clivagem, 20,29±4,54 para D7 e 28,73±4,31 para D8 observados no controle.

- EXPERIMENTO 1 (No *heat shock*, NHS)

Este experimento avaliou o efeito de 10 nM de 5-aza por 24 ou 48h em embriões derivados de oócitos maturados em condições normais de temperatura de 38,5°C e observou que 5-aza não afetou ($P>0,05$) o índice total de embriões clivados no dia 3 (82,18±2,75, 79,16±2,97 e 84,38±2,48 para NHS, NHS24h e NHS48h, respectivamente). No entanto, o percentual de embriões com mais de 8 células na população de embriões clivados foi reduzido ($P<0,05$) em NHS24h e NHS48h quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Houve redução ($P<0,05$) no percentual de blastocistos nos dias 7 e 8 no grupo tratado com 5-aza por 48h (NHS48h) enquanto o tratamento por 24h (NHS24h) não interferiu significativamente na produção de blastocistos em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 2: Índice de embriões não oriundos de choque térmico que atingiram o estágio de 8 células no dia 3 de desenvolvimento (68hpi).

Tratamento	N	Número de embriões que atingiram 8 células (n-%)
NHS	317	128 (40,38) a
NHS24h	339	94 (27,73) b
NHS48h	312	102 (32,69) b

a, b: letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P<0,05$; Qui-quadrado). Porcentagem de embriões com 8-células baseado no número de estruturas clivadas.

Tabela 3: Índice de blastocistos nos dias 7 e 8 tratados com 5-aza por 24h ou 48h (oócitos não submetidos a choque térmico).

Tratamento	N	Blastocistos D7(%)	Blastocistos D7(%) / clivados D3	Blastocistos D8 (%)	Blastocistos D8 (%) / clivados D3
NHS	418	23,43±2,38 a	28,30±2,43	32,21±3,40 a	39,67±4,16 a
NHS24h	408	21,10±2,26 ab	25,18±3,27	25,85±3,97 a	31,47±4,41 a
NHS48h	406	15,01±2,49 b	18,42±3,05	15,77±2,95 b	19,05±3,53 b

a,b: letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$; ANOVA). Valores de 12 repetições. Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média.

- EXPERIMENTO 2 (*heat shock*, HS)

Este experimento avaliou o efeito de 10 nM de 5-aza por 24 ou 48h em embriões derivados de oócitos maturados em condições de choque térmico (41,5°C) por 12h. Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de clivagem entre os tratamentos (79,20±3,86, 79,05±2,47 e 80,68±1,41 para HS, HS24h e HS48h, respectivamente), mas o percentual de embriões que atingiram 8 células no dia 3 foi menor ($P > 0,05$) nos grupos de exposição ao inibidor (Tabela 4). Embriões expostos a 5-aza por 24h (HS24h) ou 48h (HS48h) tiveram redução ($P < 0,05$) na produção de blastocistos nos dias 7 e 8 quando comparados ao grupo controle HS (Tabela 5).

Tabela 4: Índice de embriões oriundos de choque térmico que atingiram o estágio de 8 células no dia 3 de desenvolvimento (68hpi).

TTO	N	Número de embriões que atingiram 8 células (n-%)
HS	283	95 (33,57) a
HS24h	275	71 (25,82) b
HS48h	321	71 (22,12) b

a, b: letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$; Qui-quadrado). Porcentagem de embriões com 8-células baseado no número de estruturas clivadas. Embriões derivados de oócitos submetidos a choque térmico de 41,5°C por 12h na maturação *in vitro*.

Tabela 5: Índice de blastocistos nos dias 7 e 8 tratados com 5-aza por 24h ou 48h (oócitos submetidos a choque térmico).

Tratamento	N	Blastocistos D7(%)	Blastocistos D7(%) / clivados D3	Blastocistos D8 (%)	Blastocistos D8 (%) / clivados D3
HS	356	19,45±2,44 a	23,79±2,93 a	21,61±3,41 a	25,83±3,81 a
HS24h	348	8,40±1,76 b	10,30±2,06 b	9,57±2,25 b	11,77±2,65 b
HS48h	406	7,98±1,45 b	9,98±1,86 b	11,17±2,42 b	13,81±3,00 b

a,b: letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$; ANOVA). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. Embriões derivados de oócitos submetidos a choque térmico de 41,5°C por 12h na maturação *in vitro*.

5.2 ETAPA 2 - ÍNDICE APOPTÓTICO EMBRIONÁRIO (TUNEL)

A apoptose foi avaliada em embriões em estágio de blastocistos no D8 para ambos os experimentos. Não houve diferença ($P>0,05$) no número total de células e número de células apoptóticas em nenhuma das comparações realizadas (experimentos 1 e 2, Tabelas 6 e 7). O índice apoptótico diferiu ($P<0,05$) apenas entre os grupos HS24h e HS48h do experimento 2. Para a avaliação da MCI, todos os grupos foram similares nos 2 experimentos (Figuras 7 e 8).

Tabela 6: Parâmetros de qualidade embrionária avaliados por TUNEL e marcação de núcleos com DAPI (grupos não submetidos ao choque térmico).

TTO	N	Número total de células	Número de células apoptóticas	Índice apoptótico
NHS	56	106,1±3,99	6,32±0,93	5,97±0,81
NHS24h	63	105,6±4,27	5,44±0,54	5,13±0,51
NHS48h	39	102,8±5,45	5,79±0,63	5,87±0,62

Não houve diferença significativa ($P>0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média.

Tabela 7: Parâmetros de qualidade embrionária avaliados por TUNEL e marcação de núcleos com DAPI (grupos submetidos ao choque térmico).

TTO	N	Número total de células	Número de células apoptóticas	Índice apoptótico
HS	20	123,0±8,68	7,70±1,45	6,69±1,22 ab
HS24h	25	101,3±5,00	9,08±1,27	9,14±1,20 a
HS48h	24	105,9±6,33	5,91±0,87	5,32±0,76 b

a,b: letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os tratamentos ($P<0,05$; ANOVA). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. Embriões derivados de oócitos submetidos a choque térmico de 41,5°C por 12h na maturação *in vitro*.

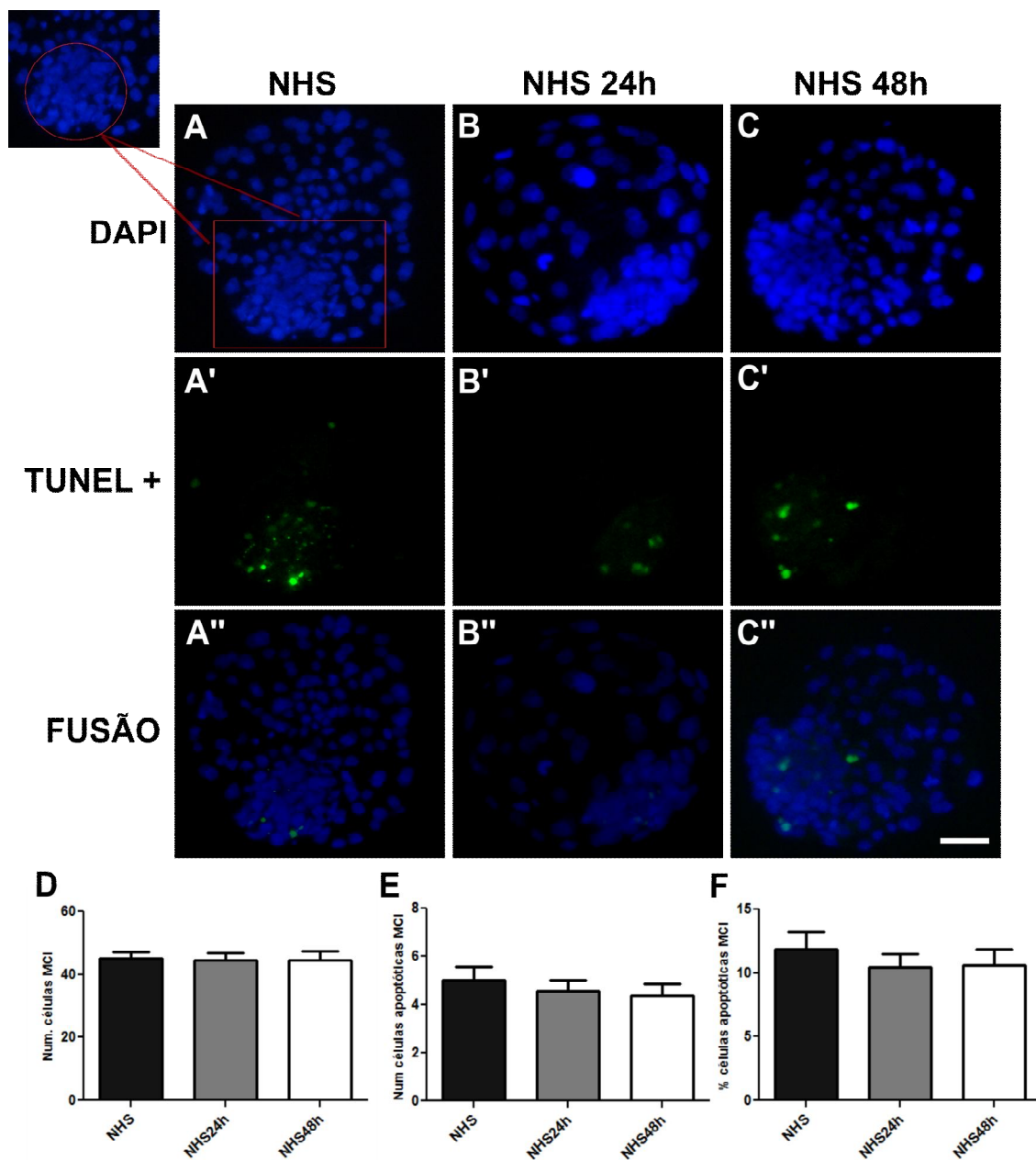


Figura 7: Parâmetros de qualidade embrionária pela MCI (grupos não submetidos ao choque térmico – NHS). Análise de variância seguida de SNK ao nível de 5% de significância não apontou diferenças entre os grupos. Isso pode ser observado tanto na visualização direta dos embriões por microscopia de epifluorescência – NHS (A, A', A''), NHS24h (B, B', B'') e NHS48h (C, C', C'') – quanto nos gráficos indicados pelas letras D, E e F. A letra D mostra a contagem total de células da MCI; E mostra o número de células apoptóticas da MCI; F indica o índice apoptótico da MCI. Aumento: 40x. Zoom digital: 3,2. Barra: 50µm. Na imagem indicada pela letra A, detalhe dos parâmetros de individualização da MCI para contagem das células.

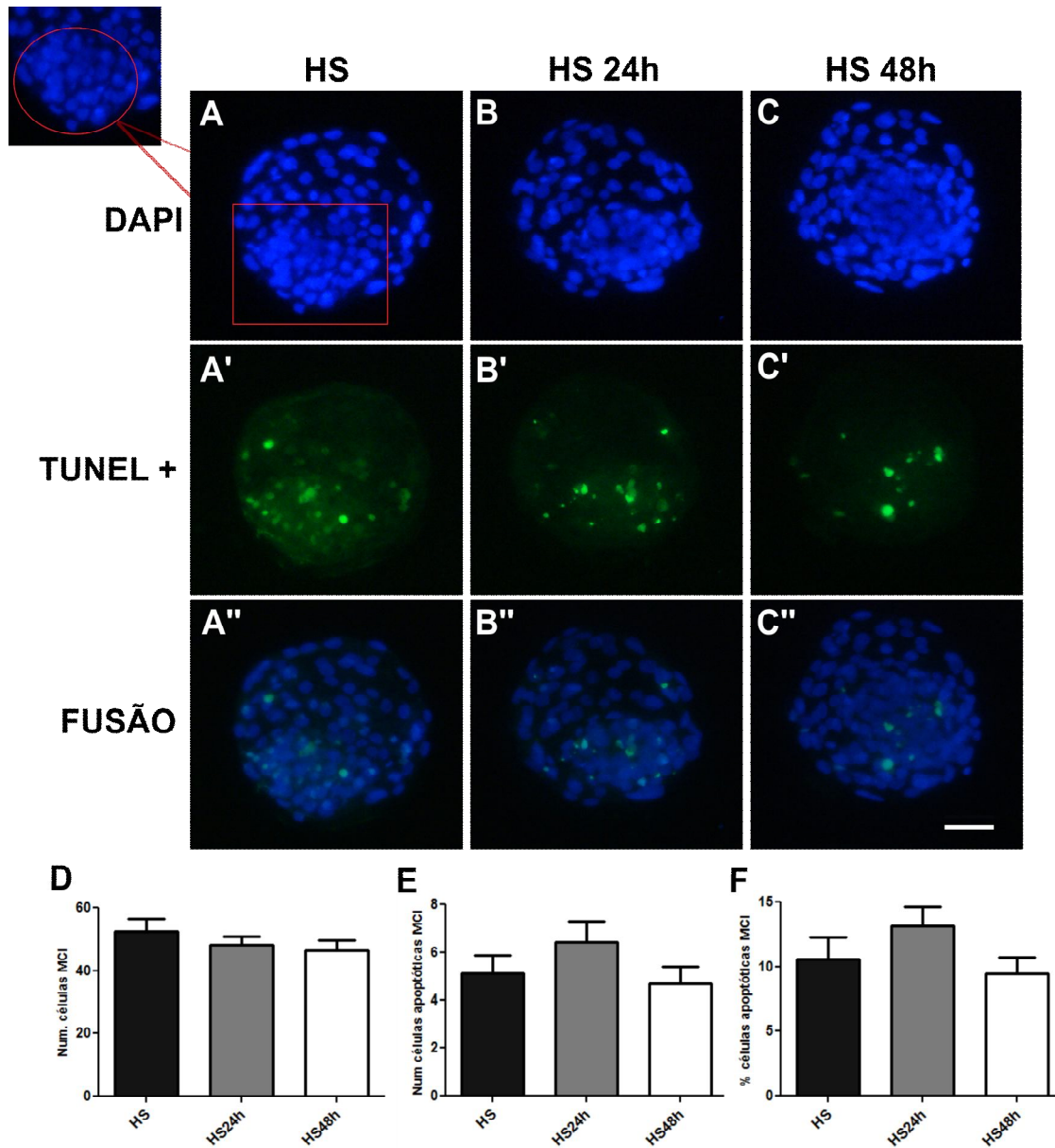


Figura 8: Parâmetros de qualidade embrionária pela MCI (grupos submetidos ao choque térmico – HS). Análise de variância seguida de SNK ao nível de 5% de significância não apontou diferenças entre os grupos. Isso pode ser observado tanto na visualização direta dos embriões por microscopia de epifluorescência – NHS (A, A', A''), NHS24h (B, B', B'') e NHS48h (C, C', C'') – quanto nos gráficos indicados pelas letras D, E e F. A letra D mostra a contagem total de células da MCI; E mostra o número de células apoptóticas da MCI; F indica o índice apoptótico da MCI. Aumento: 40x. Zoom digital: 3,2. Barra: 50µm. Na imagem indicada pela letra A, detalhe dos parâmetros de individualização da MCI para contagem das células.

5.3 ETAPA 3 – IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Para a análise de imunofluorescência os embriões foram produzidos simultaneamente e nas mesmas condições dos Experimentos 1 e 2, de forma a

permitir as comparações da estrutura da cromatina entre os grupos submetidos ou não ao choque térmico. Foram realizadas uma análise quantitativa e uma semi-quantitativa.

- Análise quantitativa

A análise de intensidade de fluorescência calculada para cada núcleo apontou não haver ($P>0,05$) diferenças nos níveis de HP1 β entre os grupos de embriões com 4 a 7 células fixados no dia 2 (44hpi) após tratamentos com 5-aza (Figura 9, letra E). Já em embriões fixados no dia 3 (68hpi) nos estágios de 8-16 células não houve diferença de intensidade de fluorescência entre os tratamentos com embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico (HS, HS24h e HS48h) e o tratamento NHS ($P>0,05$). Contudo, os núcleos dos embriões dos tratamentos NHS24h e NHS48h apresentaram uma redução ($P<0,01$) da fluorescência quando comparado com os demais tratamentos (Figura 10, letra G).

- Análise semi-quantitativa

Na análise semi-quantitativa foi feita uma avaliação da distribuição dos núcleos de acordo com o padrão de fluorescência visual das imagens, classificados em nulo (sem fluorescência), fraco (baixa marcação de fluorescência), médio (fluorescência intermediária) e forte (alta fluorescência). Nos embriões de 4-7 células a proporção de núcleos com ausência de fluorescência é baixa na maioria dos tratamentos, sendo a menor ($P<0,05$) proporção no HS. A proporção de núcleos com fraca fluorescência é similar ($P>0,05$) entre NHS, NHS24h e HS, mas maior ($P<0,05$) em HS24h enquanto a proporção de núcleos com fluorescência média é menor ($P<0,05$) para NHS24h e HS24h. Uma maior proporção de núcleos com forte fluorescência foi encontrada em NHS24h quando comparado com os demais tratamentos.

Nos embriões com 8-16 células a proporção de núcleos nulos para marcação de HP1 β é alta (pelo menos 61% do total de núcleos em cada tratamento), e maior ($P<0,05$) em NHS24h e NHS48h, enquanto a proporção de núcleos com fluorescência média é similar ($P<0,05$) entre NHS, HS, HS24h e HS48h. As diferenças referentes às variações na intensidade de fluorescência entre os núcleos

dos 2 estágios de desenvolvimento podem ser melhor visualizadas nas Figuras 9 (letra F) e 10 (letra H).

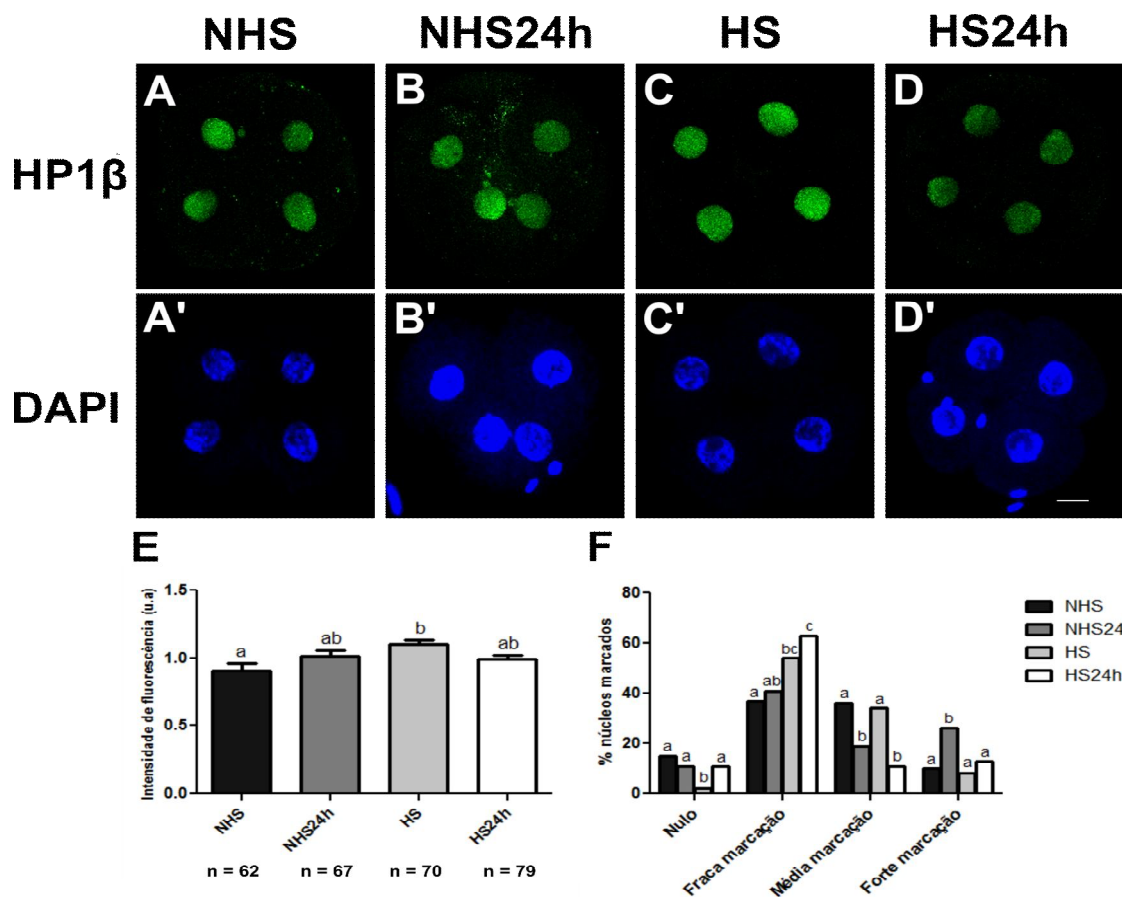


Figura 9: Imunofluorescência para HP1 β , análise quantitativa e semi-quantitativa em embriões de 4-7 células (44hpi) produzidos a partir de oócitos submetidos (HS) ou não ao choque térmico (NHS). Imagens A,A' representam embriões não submetidos ao choque térmico e não tratados com 5-aza (NHS). B,B': NHS24h; C,C': HS; D,D': HS24h. Imagens capturadas em microscopia confocal. Aumento: 40x. Zoom digital: 2x. Barra-20 μ m. E: intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) para cada um dos tratamentos. À exceção de ligeiro aumento da intensidade em HS quando comparado ao controle, não houve diferença entre os demais grupos. Dados com transformação logarítmica e analisados por ANOVA. "n" indica o número de núcleos analisados. F: Percentual de núcleos classificados quanto ao nível de fluorescência em embriões com 4-7 células produzidos 44hpi. Menor proporção de núcleos não marcados ocorre em HS. A fraca marcação é maior em HS e HS24h do que em NHS, a média marcação diminui nos grupos tratados com 5-aza, mas NHS24h apresenta mais núcleos fortemente marcados. Letras diferentes indicam diferença entre os agrupamentos ($P < 0,01$).

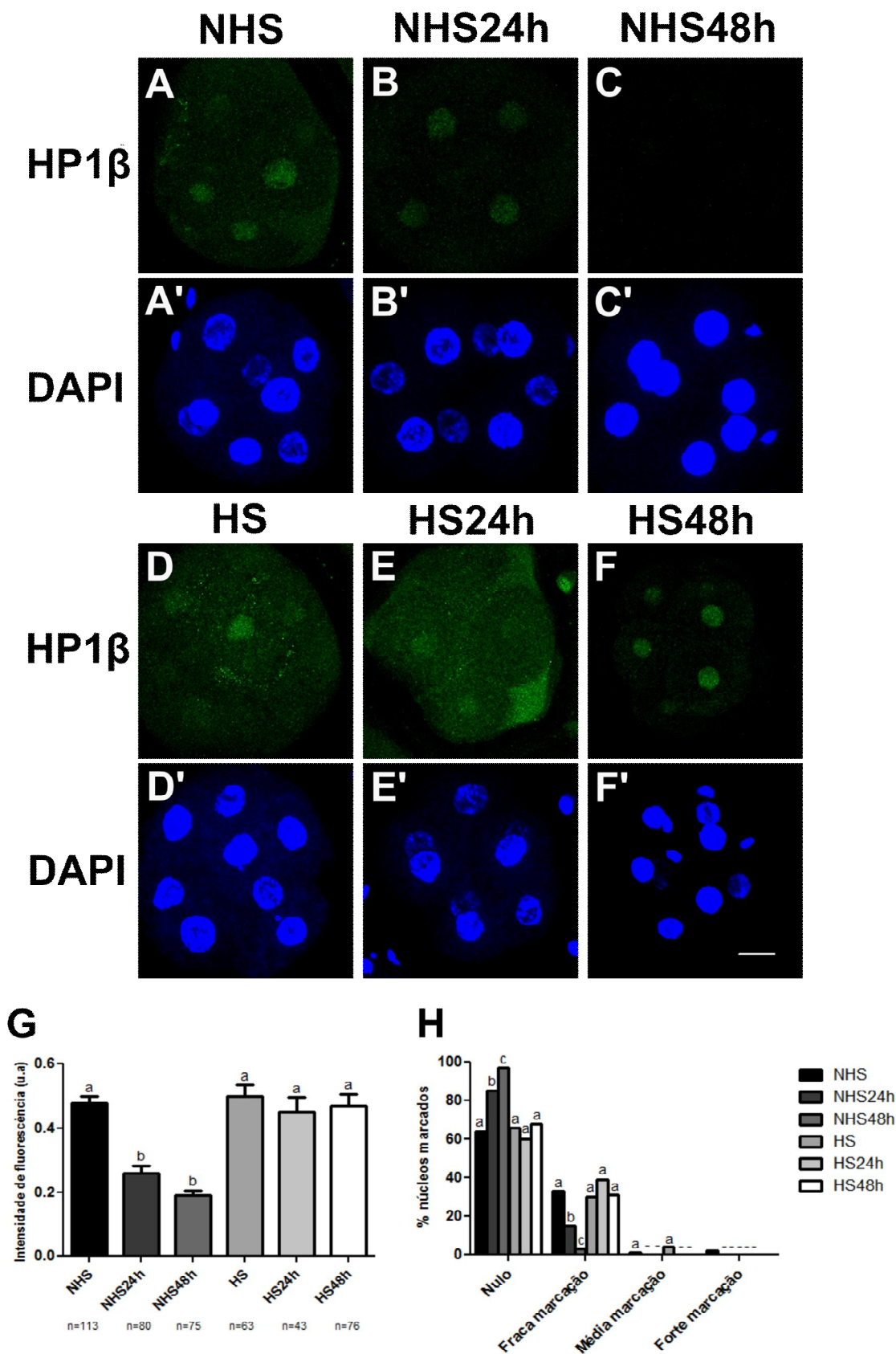


Figura 10: Imunofluorescência para HP1 β , análise quantitativa e semi-quantitativa em embriões de 8-16 células (68hpi) produzidos a partir de oócitos submetidos (HS) ou não ao choque térmico (NHS).

Imagens A,A' representam embriões não submetidos ao choque térmico e não tratados com 5-aza (NHS). B,B': NHS24h; C,C': NHS48h; D,D': HS; E,E': HS24h; F,F': HS48h. Imagens capturadas em microscopia confocal. Aumento: 40x. Zoom digital: 2x. Barra-20 μ m. G: intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) para cada um dos tratamentos. A intensidade de fluorescência para HP1 β cai significativamente nos grupos não expostos a choque térmico mas tratados com 5-aza. Dados com transformação logarítmica e analisados por ANOVA. "n" indica o número de núcleos analisados. H: Percentual de núcleos classificados quanto ao nível de fluorescência em embriões com 8-16 células produzidos 68hpi. O percentual de núcleos não marcados é alto em todos os tratamentos (agrupamento nulo, painel H), mas é maior em NHS24h e NHS48h, enquanto a fraca marcação diminui nesses grupos. Letras diferentes indicam diferença entre os agrupamentos (P<0,01). A presença de traço no painel H indica ausência da marcação nos agrupamentos para alguns tratamentos.

6 DISCUSSÃO

A fertilização *in vitro* tem proporcionado uma oportunidade para a compreensão dos processos que impulsionam o desenvolvimento embrionário, no entanto, pouco se sabe sobre as alterações que proporcionam um novo conjunto de instruções epigenéticas para guiar a diferenciação celular no embrião (CHASON et al., 2011). Os aspectos envolvidos na termoproteção de embriões contra o estresse por calor também ainda não são claros (JIN et al., 2007), o que dificulta a criação de estratégias de minimização dos efeitos deletérios do calor sobre a produção de embriões. Apesar de serem numerosos os estudos que investigam alterações moleculares causadas pelo choque térmico em oócitos e embriões, pouco tem sido abordado sobre modificações epigenéticas em bovinos. Nosso trabalho está focado em contribuir na compreensão de aspectos epigenéticos associados ao choque térmico e eventuais alterações causadas pelo uso de 5-aza com impacto no desenvolvimento embrionário.

Os resultados do experimento 1 mostraram que a exposição dos embriões a 5-aza por 24h não teve efeito sobre a produção de blastocistos. Esse dado corrobora com observações realizadas a partir do uso de 5-aza em células doadoras de núcleo (ENRIGHT et al., 2005), cultivo pós-fusão de embriões produzidos por clonagem (WANG et al., 2011b; SANGALLI et al., 2012) ou embriões FIV vitrificados (ZHAO et al., 2012), nos quais não foi observada redução da produção de embriões quando comparadas aos respectivos controles. Esses dados, somados ao número de células totais dos blastocistos e baixos níveis de apoptose detectados por TUNEL, dados similares ao grupo controle, demonstram aparente efeito não-deletério ao desenvolvimento de embriões produzidos por FIV. No entanto a proporção de embriões que se desenvolveu ao estágio de 8 células com 68hpi é menor quando comparado ao controle, o que indica atraso no desenvolvimento de embriões tratados com 5-aza no dia 3. Contudo, esta menor proporção de embriões com 8 células não interferiu significativamente no desenvolvimento posterior até estágio de blastocisto, aferido pelas taxas de blastocistos calculadas em função do número de presumíveis zigotos ou de embriões clivados.

Entretanto, quando os embriões foram expostos a 5-aza por 48h, apesar de não haver diferença na taxa de clivagem total, a proporção de embriões com 8

células e de blastocistos foi menor que o controle e o tratamento com 24h de 5-aza. Esses dados mostram que a exposição de embriões a 5-aza logo após a fertilização tem um efeito sobre o desenvolvimento nas primeiras clivagens e se reflete no desenvolvimento posterior, mas que parece ser tempo-dependente, visto que 24h de exposição, apesar de atrasar o desenvolvimento, não é suficiente para comprometer significativamente todo o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Isso pode ser devido ao fato de que a ação de desmetilação da 5-aza ocorre na incorporação da substância ao DNA recém sintetizado, em substituição à citosina, requerendo, portanto, que ocorra divisão celular (SEIDEL et al., 2012; KARAHOCA, MOMPALER, 2013; PENNAROSSA, MAFFEI, CAMPAGNOL, 2014), de modo que quanto maior o tempo de exposição maior deve ser a severidade do seu efeito. Logo, 24h de exposição pode não ser suficiente para causar desmetilação em níveis críticos.

Um dos possíveis mecanismos envolvidos na redução do desenvolvimento embrionário na exposição prolongada a 5-aza é uma redução da metilação de DNA a níveis críticos para etapas seguintes do desenvolvimento dos embriões, possivelmente permitindo a expressão de genes cuja repressão tenha importância funcional (ENRIGHT et al., 2003). De fato, há relatos de que a elevada redução da atividade de DNA metiltransferase e a consequente redução dos níveis globais de 5mC em embriões murinos tenha provocado atraso no desenvolvimento e letalidade fetal (LI, BESTOR, JAENISCH, 1992).

Contrao-se aos resultados do experimento 1, os dados do experimento 2 com embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico demonstram um efeito diferente. Observou-se uma redução na proporção de embriões com 8-16 células após exposição dos embriões por 24h e 48h a 5-aza, semelhante ao encontrado no Experimento 1, contudo, as taxas de blastocistos foram também inferiores, independente do tempo de exposição, o que difere do observado no experimento 1 para embriões derivados de oócitos sem choque térmico. A expectativa inicial era de que 5-aza, por induzir a desmetilação, pudesse facilitar o remodelamento da cromatina e contribuir para o desenvolvimento do embrião derivado de oócitos submetidos a injúria térmica. Contudo, o presente estudo sugere que nesses embriões, o efeito de 5-aza no desenvolvimento embrionário possa ser mais severo, necessitando de menos tempo para exercer sua ação.

Embora 5-aza seja descrita como potencial melhoradora das taxas de embriões (principalmente clones), há resultados conflitantes. Ding et al. (2008) verificaram efeito positivo de 5-aza sobre as taxas de blastocistos bovinos produzidos por clonagem quando associada a TSA, o que contrasta com os resultados de Enright et al. (2003), que observaram queda nas taxas de embriões clones produzidos no dia 7. Em murinos produzidos por clonagem, o uso de células doadoras tratadas com 5-aza também já resultou na diminuição da produção de embriões (ZHOU et al., 2002).

A contagem de células totais e apoptóticas em blastocistos mostrou não haver diferenças no número de células e no índice apoptótico entre os tratamentos de 24h ou 48h de exposição a 5-aza com o controle, tanto em embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico (HS) quanto não injuriados (NHS). Essa informação sugere que o efeito de 5-aza seja atenuado antes da formação dos blastocistos, prejudicando o embrião em alcançar este estágio, mas uma vez alcançado, os efeitos nocivos em termos de número e morte de células são menores. Segundo Paula-Lopes e Hansen (2002b), a apoptose em embriões injuriados por choque térmico pode ser dependente do estágio de desenvolvimento, e embriões com 8-16 células mais atrasados tendem a ser mais propensos a sofrer esse tipo de morte celular. Neste caso, diante da redução no percentual de clivados que atingiram 8 células no dia 3 em embriões tratados com 5-aza e oriundos de oócitos injuriados, é possível que este fato tenha eliminado embriões com atraso no desenvolvimento antes que pudessem se desenvolver a blastocisto. Em contrapartida, os embriões que prosseguiram com o desenvolvimento em velocidade fisiologicamente normal não tiveram esses parâmetros de qualidade afetados, com taxas de apoptose inferiores às relatadas por alguns autores (ROTH; HANSEN, 2004).

Nossos resultados de análise quantitativa fornecidos a partir da imunofluorescência mostram similaridade nos níveis de intensidade de fluorescência para HP1 β nos núcleos de embriões de 4 a 7 células fixados 44hpi, à exceção dos grupos NHS e HS, que se mostraram distintos, com ligeiro aumento da intensidade para HS. O efeito de 5-aza parece não ser imediatamente visível após 24h de exposição sobre os níveis de HP1, independente de os embriões serem de oócitos submetidos ao choque térmico (HS) ou não (NHS). Entretanto, quando foram avaliados embriões com 8 ou mais células do grupo sem choque térmico 68hpi,

observou-se uma menor intensidade de fluorescência para os embriões expostos a 24h ou 48h com 5-aza quando comparados com seu respectivo controle (NHS). O oposto foi observado com os embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico, não havendo diferença na fluorescência entre controle (HS) e exposição por 24 e 48h (HS24h e HS48h) a 5-aza.

Diferente da avaliação quantitativa, que fornece um valor médio de fluorescência por tratamento, a análise semi-quantitativa oferece uma visão da distribuição dos núcleos conforme padrões pré-determinados. No caso de avaliações com 44hpi em embriões com 4-7 células, a análise semi-quantitativa apontou que um pouco mais de 1/4 dos núcleos do tratamento com 24h sem choque térmico (NHS24h) apresentavam forte fluorescência, indicadora da presença de HP1 β para formação de heterocromatina. Provavelmente essa proporção de 1/4 dos núcleos não foi suficiente para aumentar a média de fluorescência do tratamento que pudesse ser indicada na análise quantitativa como significativa, mas mostra que pode haver diferenças na distribuição dos núcleos.

Na avaliação da fluorescência em núcleos de embriões com 8-16 células 68hpi, a análise semi-quantitativa mostrou resultados parecidos com os da avaliação quantitativa. A maior parte dos núcleos dos embriões dos tratamentos sem choque térmico com 24h ou 48h de exposição a 5-aza (NHS24h e NHS48h) apresentavam ausência de sinal de fluorescência quando comparado com o controle e com os demais tratamentos. Esse resultado coincide com a análise quantitativa, onde a fluorescência foi significativamente inferior para esses tratamentos do que para os demais, provavelmente porque a maior parte dos núcleos não emitiu fluorescência.

Os resultados da imunofluorescência que apontam, nos embriões produzidos sem choque térmico, menor concentração de HP1 β nos núcleos de embriões expostos por 24h ou 48h a 5-aza, assim como maior proporção de núcleos sem fluorescência, mostram que 5-aza possui um efeito sobre a formação de heterocromatina. De fato, já foi demonstrado que o padrão de metilação do DNA influencia positivamente a formação de heterocromatina (FUKE et al., 2003; SMALLWOOD et al., 2007). 5-aza, por induzir a desmetilação, pode levar a uma redução da formação de heterocromatina, como observado nos tratamentos NHS24h e NHS48h. Alguns estudos já demonstraram esses efeitos de 5-aza (HAAF, SCHMID, 2000; TAKEBAYASHI et al., 2001; SMALLWOOD et al., 2007; SERRANO, RODRÍGUEZ-CORSINO, LOSADA, 2009).

Nossos resultados mostram também um resultado intrigante. Enquanto embriões derivados de oócitos não submetidos ao choque térmico apresentam alta sensibilidade de heterocromatina ao tratamento com 5-aza, representando pela menor fluorescência, os embriões derivados de oócitos injuriados termicamente não apresentam alteração identificável na formação de heterocromatina, apesar do tratamento com 5-aza diminuir a proporção de embriões que alcançam estágio de blastocisto. Essa diferença pode indicar que a cromatina de embriões derivados de oócitos estressados apresenta comportamento diferente, com manutenção de HP1 β mesmo quando desafiada por um agente químico. Essa situação implicaria em embriões nos quais a ativação do genoma embrionário, que envolve mudanças nos padrões de formação da eucromatina e heterocromatina (MARTIN et al., 2006a; MARTIN et al., 2006b; KOEHLER et al., 2009; AGUIRRE-LAVIN et al., 2012), seja mais complexa. Outra possibilidade é que em embriões derivados de oócitos estressados a ação de 5-aza seja diferente, com menos influência na formação de heterocromatina mas com efeitos significativos em outros aspectos, como no padrão de metilação, cuja análise não pôde ser desenvolvida neste trabalho.

Esperava-se que o tratamento com 5-aza de embriões derivados de oócitos estressados pudesse melhorar o desenvolvimento embrionário por uma ação na formação de HP1 β . Essa expectativa se devia ao fato de que em estudo preliminar Camargo et al. (2015) observaram que embriões bovinos oriundos de oócitos injuriados por choque térmico apresentavam maior proporção de núcleos com HP1 β distribuída na forma de grânulos maiores ainda no estágio de 4 células, um ciclo celular antes do observado para embriões derivados de oócitos sem choque térmico. Assim, o tratamento com 5-aza a partir de zigotos com 20h poderia reduzir a proporção de heterocromatina e contribuir para ativação do genoma. Contudo, apesar da 5-aza ser capaz de modificar a cromatina de embriões derivados de oócitos sem choque térmico, isso não se repetiu com os embriões de oócitos injuriados, a partir dos parâmetros avaliados.

De forma geral identificamos que o tratamento com 5-aza por 48h de embriões derivados de oócitos não submetidos ao choque térmico reduz a presença de HP1 β na cromatina dos embriões no estágio de 8-16 células, com consequente redução do desenvolvimento embrionário. Contudo, para embriões derivados de oócitos estressados, o tratamento com 5-aza não interfere na presença de HP1 β apesar de reduzir o desenvolvimento. Novos estudos devem ser conduzidos para

tentar elucidar os mecanismos moleculares pelos quais 5-aza reduz a viabilidade de embriões derivados de oócitos que sofreram efeito do calor.

7 CONCLUSÕES

- O uso de 5-aza é prejudicial ao desenvolvimento de embriões derivados de oócitos submetidos a altas temperaturas. Em embriões derivados de oócitos sem choque térmico, este efeito é dependente do tempo de exposição.
- A exposição a 5-aza de embriões derivados de oócitos injuriados termicamente não interfere na formação de heterocromatina, diferentemente do que ocorre com os embriões derivados de oócitos maturados em condições normais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-LAVIN, T.; ADENOT, P.; BONNET-GARNIER, A.; LEHMANN, G.; FLEUROT, R.; BOULESTEIX, C.; DEBEY, P.; BEAUJEAN, N. 2012. **BioMed Central Developmental Biology**.**12(30)**:1-19.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. **Biologia Molecular da célula**. Artmed. Porto Alegre. 10 ed. 222.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in a hot climate. **Journal of Dairy Science**. **82(12)**: 2611-2616.
- ALVES, B.R.C. 2008. **Produção in vivo e transferência de embriões F1 em rebanhos leiteiros, utilizando-se cruzamento recíproco entre as raças holandês e gir, em duas épocas do ano**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 110 p.
- ARÉCHIGA, C.F.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. **Biology of Reproduction**. **52**: 1296-1301.
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. 2012. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**. **94**: 2202-2211.
- BARROS, C.M.; PEGORER, M.F.; VASCONCELOS, J.L.; EBERHARDT, B.G.; MONTEIRO, F.M. 2006. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, **65**:210 -218.
- BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.**107**: 3394-3399.
- BERNSTEIN, B.E.; ALLIS, C.D. 2005. RNA meets chromatin. **Genes and Development**. **19**:1635-1655.
- BERNSTEIN, B.E.; KAMAL, M.; LINDBLAD-TOH, K.; BEKIRANOV, S.; BAILEY, D.K.; HUEBERT, D.J.; MCMAHON, S.; KARLSSON, E.K.; KULBOKAS, E.J.; GINGERAS, T.R.; SCHREIBER, S.L.; LANDER, E.S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. **Cell**. **120**:169-181.
- BJERLING, P.; SILVERSTEIN, R.A.; THON, G.; CAUDY, A.; GREWAL, S.; EKWALL, K. 2002. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and *in vivo* specificity. **Molecular and Cell Biology**. **22**: 2170-2181.

BLACKLEDGE, . P.; ZHOU, J. C.; TOLSTORUKOV, M. Y.; FARCAS, A. M.; PARK, P. J.; KLOSE, R. J. 2010. CpG Islands Recruit a Histone H3 Lysine 36 Demethylase. **Molecular Cell**. **38**:179-190.

BREEN, J. G.; CLAGGETT, T. W.; KIMMEL, G. L.; KIMMEL, C. A. 1999. Heat shock during rat embryo development *in vitro* results in decreased mitosis and abundant cell death. **Reproductive Toxicology**. **13(1)**:31-39.

BRITT, J.H. 1992. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **The Bovine Practitioner Proceedings**. **24**:39-43.

BULMAN, A.L.; NELSON, H.C. 2005. Role of trehalose and heat in the structure of the C-terminal activation domain of the heat shock transcription factor. **Proteins**, **58**:826-835.

CAMARGO, L. S. A.; AGUIRRE-LAVIN, T.; ADENOT, P.; ARAÚJO, T. D.; SOUZA, E. D.; BEAUJEAN, N. 2015. Effect of heat shock during *in vitro* maturation on heterochromatin compaction in bovine embryos at 4-and 8-cell stages: preliminary study. **Reproduction, Fertility and Development**. **27(1)**:132.

CANTONE, I.; FISHER, A. G. 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nature Structural & Molecular Biology**. **20**:282-289.

CARAMBULA, F.; OLIVEIRA, L.J.; HANSEN, P.J. 2009. Repression of induced apoptosis in the 2-cell bovine embryo involves DNA methylation and histone deacetylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **388**:418-421.

CARLSON, L.L.; PAGE, A.W.; BESTOR, T.H. 1992. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. **Genes and Development**. **6**: 2536-2541.

CAVESTANY, D.; EL-WHISHY, A.B.; FOOT, R.H. 1985. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**. **68**:1471-1478.

CHASON, R. J. ; CSOKMAY, J. ; SEGARS, J. H.; DECHERNEY, A. H.; ARMANT, D. R. 2011. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. **Trend in Endocrinology and Metabolism**. **22(10)**:412-420.

CHEN, T.; ZHANG, Y. L.; JIANG, Y.; LIU, S. Z.; SCHATTEH, H.; CHEN, D. Y.; SUN, Q. Y. 2004. The DNA methylation events in normal and cloned rabbit embryos. **FEBS Letters**. **578**:69-72.

CHEN, C. H.; DU, F.; XU, J.; CHANG, W. F.; LIU, C. C.; SU, H. Y.; LIN, T. A.; JU, J. C.; CHENG, W. T. K.; WU, S. C.; CHEN, Y. E.; SUNG, L. Y. 2013. Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. **Theriogenology**. **79**:1284-1293.

CHEUTIN, T. C.; MCNAIRN, A. J.; JENUWEIN, T.; GILBERT, D. M.; SINGH, P. B.; MISTELI, T. 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. **Science**. **299**:271-275.

COLLIER, R.J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R.P.; BAUMGARD, L.H. 2008. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**. **91**: 445-454.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **98**:13734-13738.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. **Theriogenology**. **57**:5-20.

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. 2008. **Theriogenology**. **70**:622-630.

DOBBS, K. B.; RODRIGUEZ, M.; SUDANO, M. J.; ORTEGA, M. S.; HANSEN, P. J. 2013. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. **Public Library of Science (PLoS) One**. **8(6)**:1-10.

DONG, K. B.; MAKSAKOVA, I. A.; MOHN, F.; LEUNG, D.; APPANAH, R.; LEE, S.; YANG, H. W.; LAM, L. L.; MAGER, D. L.; SCHÜBELER, D.; TACHIBANA, M.; SHINKAI, Y.; LORINCZ, M. C. DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. **The EMBO Journal**, **27**:2691-2701.

EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R.; TRINCA, L. A.; BARROS C. M. 2009. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, **114**:54-61.

EDWARDS, J. L., HANSEN, P. J. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. **46**:138-145.

ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of Reproduction**, **69**:896-901.

ENRIGHT, B. P.; SUNG, L. Y.; CHANG, C. C.; XANG, X.; TIAN, X. C. 2005. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of Reproduction**. **72**:994-948.

FAIRBURN, H. R.; YOUNG, B.; HENDRICH, D. 2002. Epigenetic Reprogramming: How Now, Cloned Cow? **Current Biology**. **12**:68-70.

FARHUD, D.; ZARIF, Y. M.; ZARIF, Y. 2010. Nutrigenomics and nutrigenetics. **Iranian Journal of Public Health**. **39**:1-14.

FEIGENBERG, M.I.; CHOUFANI, S.; BUTCHER, D. T.; ROIFMAN, M.; WEKSBERG, R. 2013. Basic concepts of epigenetics. **Fertility and Sterility**. **99(3)**:607-615.

FERRAZ, M.L.; WATANABE, Y.F.; SÁ-FILHO, M.F.; REIS, E.L.; BARUSELLI, P.S. 2005. **Influência dos meses do ano no número, na qualidade ovocitária e na produção *in vitro* de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*)**. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia. CBRA. Belo Horizonte, 1: 16.

FUKS, F.; HURD, P. J.; DEPLUS, R.; KOUZARIDES, T. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. **Nucleic Acids Research**. **31(9)**:2305-2312.

FUQUAY, J.W. 1981. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**. **52**:164-182.

GASPAR, R. C.; ARNOLD, D. R.; CORRÊA, C. A. P.; ROCHA, C. V.; PENTEADO, J. C. T.; COLLADO, M.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M.; LOPES, F. L. 2015. Oxygen tension affects histone remodeling of *in vitro* produced embryos in a bovine model. **Theriogenology**:1-30.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. 2012. In vivo vs *in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, **134**, 125-134.

GILL, M. E.; ERKEK, S.; PETERS, A. H. F. M. 2012. Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming? **Current Opinion in Cell Biology**. **24**:387-396.

GREER, E.L.; SHI, Y. 2012. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. **Nature**, **13**:343-357.

HAAF, T.; SCHMID, M. 2000. Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**. **91**:113-123.

HANSEN, P.J.; DROST, M.; RIVIERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; CHASE, C. C. 2001. Adverse impact os heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**. **55(1)**: 91-103.

HANSEN, P. J. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**. **364**:3341-3350.

HIENDLEDER, S.; MUND, C.; REICHENBACH, H. D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; ZAKHARTCHENKO, V.; LYKO, F; WOLF, E. 2004. Tissue-specific elevated

genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by *in vitro* techniques. **Biololy Reproduction**, **71**:217–223.

HOFFMANN, I. 2010. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetics resources. **Animal Genetics**. **41(1)**:32-46.

HOU, J. ; LIU, L.; LEI, T.; CUI, X.; AN, X.; CHEN, Y. 2007. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from *in vitro* fertilization. **Science China Life Sciences**, 50: 56-61.

HOWELL, C. Y.; BESTOR, T. H.; DING, F.; LATHAM, K. E.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J. M.; CHAILLET, J. R. 2001. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. **Cell**. **104**:929-838.

HUAN, Y. J.; ZHU, J.; WANG, H. M.; FU, Z. F.; ZHANG, J. G.; XIE, B. T.; LI, J. Y.; KONG, Q. R.; LIU, Z. H.; HE, H B. 2014. Epigenetic modification agents improve genomic methylation reprogramming in porcine cloned embryos. **Journal of Reproduction and Development**. **60(5)**:377-382.

HU, J. F.; NGUYEN, P. H.; PHAM, N. V.; VU, T. H.; HOFFMAN, A. R. 1997. Modulation of Igf2 genomic imprinting in mice induced by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation. **Molecular Endocrinology**. **11(13)**:1891-1898.

IPCC (INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). 2014. **Climate Change 2014**. Synthesis Report. Suíça, p. 2. Disponível em: <
http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full.pdf >.
Acesso em: 15 jan.2015.

ISSA, J. P.; KANTARJIAN, H. M.; KIRKPATRICK, P. 2005. Azacitidine. **Nature reviews (Drug Discovery)**. **4**:275-276.

JABBOUR E.; ISSA, J.P.; GARCIA-MANERO, G.; KANTARJIAN, H. 2008. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. **Cancer**, 112, 2341-2351.

JAFARPOUR, F.; HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; FOROUZANFAR, M.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; OSTADHOSSEINI, S.; GHOLAMI, S.; ESFAHANI, M. H. N. 2011. Developmental competence and pluripotency gene expression of cattle cloned embryos derived from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. **International Journal of Fertility and Esterility**. **4(4)**:148-155.

JAHANGIRI, M.; SHAHHOSEINI, M.; MOVAGHAR, B. 2014. H19 and MEST gene expression and histone modification in blastocysts cultured from vitrified and fresh two-cell mouse embryos. **Reproductive Biomedicine Online**. **29**:559-566.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. 2001. Translating the histone code. **Science**. **293**:1074-1080.

JIA, Y.; HARTSHORN, C.; HARTUNG, O.; WANGH, L. J. 2010. Heat shock memory in preimplantation mouse embryos. **Fertility and Sterility**. **93(8)**:2760-2763.

JIN, Y. X.; LEE, J. Y.; CHOI, S. H.; KIM, T.; CUI, X. S.; KIM, N. H. 2007. Heat shock induces apoptosis related gene expression and apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. **100**:118-127.

JU, J.C.; PARKS, J.E.; YANG, X. 1999. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after shortterm heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. **53**: 336-340.

JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. 2005. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**. **64**:1677-1689.

KARAOCA, M.; MOMPALER, R. L. 2013. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. **Clinical Epigenetics**. **5(3)**:1-16.

KHARROUBI, A. E.; PIRAS, G. ; STEWART, C. L. 2001. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**. **276(12)**:8674-8680.

KOBAYASHI, Y.; WAKAMIYA, K.; KOHKA, M.; YAMANO, Y.; OKUDA, K. 2013. Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. **Society for Reproduction and Fertility**. **146**:103-110.

KOEHLER, D.; ZAKHARTCHENKO, V.; FROENICKE, L.; STONE, G.; STANYON, R.; WOLF, E.; CREMER, T.; BRERO, A. 2009. Changes of higher order chromatin arrangements during major genome activation in bovine preimplantation embryos. **Experimental Cell Research**. **315**:2053-2063.

LACHNER, M.; O'CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins . **Nature**. **410(1)**:116-120.

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

LAGGER, G.; O'CARROLL, D. O.; REMBOLD, M.; KHIER, H.; TISCHLER, J.; WEITZER, G.; SCHUETTENGROBER, B.; HAUSER, C.; BRUNMEIR, R.; JENUWEIN, T.; SEISER, C. 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. **The EMBO Journal**. **21(11)**:2672-2681.

LI, e.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**. **69**:915-926.

LI, T.; VU. T. H.; ULANER, G. A.; LITTMAN, E.; LING, J. Q.; CHEN, H. L.; HU, J. F.; BEHR, B.; GIUDICE, L.; HOFFMAN, A. R. 2005. IVF results in *de novo* DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. **Molecular Human Reproduction**. **11(9)**:631-640.

- LI, Q. L.; JU, Z. H.; HUANG, J. M.; LI, J. B.; LI, R. L.; HOU, M. H.; WANG, C. F.; ZHONG, J. F. 2011. Two novel SNPs in HSF1 gene are associated with thermal tolerance traits in Chinese Holstein cattle. **DNA and Cell Biology**. **30(4)**:247-254.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, HIDDLE; AMON, A. 2014. **Biologia celular e molecular**. 7^aed., Artmed, p.261-262.
- LOMBERK, G.; WALLRATT, R.; URRUTIA, R. 2006. The heterochromatin protein I family. **Genome Biology**. **7(7)**:228.1-228.8.
- MAALOUF, W. E.; ALBERIO, R.; CAMPBELL, K. H. 2008. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of *in vitro* fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. **Epigenetics**. **3(4)**:199-209.
- MARTIN, C.; BEAUJEAN, N.; BROCHARD, V.; AUDOUARD, C.; ZINK, D.; DEBEY, P. 2006a. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. **Developmental Biology**. **292**:317-332.
- MARTIN, C.; BROCHARD, V.; MIGNÉ, C.; ZINK, D.; DEBEY, P.; BEAUJEAN, N. 2006b. Architectural Reorganization of the nuclei upon transfer into oocytes accompanies genome reprogramming. **Molecular Reproduction and Development**. **73(9)**:1102-1111.
- MAYA-SORIANO, M. J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; ANDREU-VÁSQUEZ, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M. 2013. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. **Theriogenology**. **79**:299-305.
- MEGLICKI, M.; ZIENTARSKI, M.; BORSUK, E. 2007. Constitutive heterochromatin during mouse oogenesis: the pattern of histone H3 modifications and localization of HP1 α and HP1 β proteins. **Molecular Reproduction and Development**. **75(2)**:414-428.
- MEISSNER, A.; MIKKERLSEN, T. S.; GU, H.; WERNING, M.; HANNA, J.; SIVACHENKO, A.; ZHANG, X.; BERNSTEIN, B. E.; NUSBAUM, C.; JAFFE, D. B.; GNIRKE, A.; JAENISCH, R.; LANDER, E. S. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. **Nature**, **454(7205)**: 766-770.
- MÉNÉZO, Y. J. R.; ELDER, K. 2011. The enhancers of oocyte competence. In: TOSTE, E.; BONI, R. **Oocyte maturation and fertilization: A long history for a short event**. P.64-70.
- MENG, C. F.; SU, B.; LI, W. 2011. DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells. **Molecular Medicine Reports**. **4**:1273-1278.
- MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, L. Z.; SARAIVA, N. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; GARCIA, J. M. 2011. Chromatin modifying agents in the *in vitro* production of bovine embryos. **Veterinary Medicine Internacional**:1-9.

MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**. **14(1)**: 47–58.

MÜLLER, P. B. 1989. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Porto Alegre: Sulina, 262p.

NABENISHI, H.; TAKAGI, S.; KAMATA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. 2012. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular Reproduction and Development**. **79**:31-40.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M.S.; BERNABUCCI, U. 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**. **130**:57-69.

NESTOROV, P.; TARDAT, M.; PETERS, A. H. F. M. 2013. H3K9/HP1 and polycomb: two key epigenetic silencing pathways for gene regulation and embryo development. In: HEARD, E. **Epigenetics and Development**. 243-291.

NGUYEN, C.T; WEISENBERGER, D.J.; VELICESCU, M.; GONZALES, F.A.; LIN, J.C.; LIANG, G.; JONES, P.A. 2002. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Research**. **62**:6456-6461.

OKA, M.; MEACHAM, A. M.; HAMAZAKI, TT.; RODIC, N.; CHANG, LJ.; TERADA, N. 2005. De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. **Oncogene**. **24**, 2091-3099.

OOI, S. K. T.; QIU, C.; BERNSTEIN, E.; LI, K.; JIA, D.; YANG, Z.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; LIN, S. P.; ALLIS, C. D.; CHENG, X.; BESTOR, T. H. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA. **Nature**. **448(9)**:714-718.

PALUDO, F.; PEREIRA, M. M.; QUINTÃO, C. C. R.; GIOSO, M. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. 2011. Effect of heat stress on development of *in vitro*-fertilized and parthenogenetic bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**. **23(1)**: 203-204.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. 1995. Effect of bovine PENNAROSSA, G.; MAFFEI, S.; CAMPAGNOL, M. 2014. Reprogramming of pig dermal fibroblast into insulin secreting cells by a brief exposure to 5-aza-cytidine. **Stem Cell Reviews and Reports**. **10**:31-43.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. 2002a. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **295**:37-42.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. 2002b. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**. **66**:1169-1177.

PAULA-LOPES, F. F.; LIMA, R. S.; RISOLIA, P. H. B.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. **Animal Reproduction**. **9(3)**:395-403.

PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. 2004. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**. **71**: 1303-1308.

PENNAROSSA, G.; MAFFEI, S.; CAMPAGNOL, M.; RAHMAN, M. M.; BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F. 2014. Reprogramming of pig dermal fibroblast into insulin secreting cells by a brief exposure to 5-aza-cytidine. **Stem Cell Reviews and Reports**. **10**:31-43.

PLIM, L.J.; SORM, F. 1964. Synthesis of a 2-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. **Collect of Czechoslovak Chemical Communications**, 29: 2576–2577.

PROBST, A. V.; ALMOUZNI, G. 2008. Pericentric heterochromatin : dynamic organization during early development in mammals. **Differentiation**. **76**:15-23.

PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; GROSS, T.S. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**. **19**:37-51.

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

RITOSSA, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**. **18(12)**:571-573.

RIVIERA, R.M.; HANSEN, P.J. 2001. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Journal of Reproduction and Fertility**, 121:107-115

RIVIERA, R. M.; ROSS, J. W. 2013. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. **113**:423-432.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**. **121**: 745–751.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology Reproduction**. **71**:1898-1906.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J.; 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction** 129: 235–244.

ROTH, Z.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ARAV, A. 2008. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. **Theriogenology**. 70:887-897.

ROY, M. N.; PRINCE, V. E.; HO, R. K. 1999. Heat shock produces periodic somatic disturbances in the zebrafish embryo. **Mechanisms of Development**. 85:2734.

SAKATANI, M.; YAMANAKA, K.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. 2008. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in *in vitro* early stage bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**. 54:496-501.

SAKSOUK, N.; BARTH, T. K.; ZIEGLER-BIRLING, C.; OLOVA, N.; NOWAK, A.; REY, E.; MATEOS-LANGERAK, J.; URBACH, S.; REIK, W.; TORRES-PADILLA, M. E.; IMHOF, A.; DÉJARDIN, J. 2014. Redundant mechanisms to form silent chromatin at pericentromeric regions rely on BEND3 and DNA methylation. **Cell**. 56:580-594.

SANGALLI, J. R.; BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. J.; ARAUJO, R. R.; PIMENTEL, J. R. V.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. 2012. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term developmental of cloned cattle. **Cellular Reprogramming**. 14(3): 1-13.

SATRAPA, R.A.; NABHAM, T.; SILVA, C.F.; SIMÕES, R.A.L.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. 2011. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**. 76:1161-1167.

SAWAI, K.; FUJII, T.; HIRAYAMA, H.; HASHIZUME, T.; MINAMIHASHI, A. 2012. Epigenetic status and full-term development of bovine cloned embryos treated with trichostatin A. **Journal of Reproduction and Development**, 58(3), 302-309.

SCHAGDARSURENGIN, U.; PARADOWSKA, A.; STEGER, K. 2012. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. **Nature**, 9: 609-619.

SEIDEL, C.; FLOREAN, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. 2012. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. **Biochimie**. 94:2264-2279.

SERRANO, A.; RODRÍGUEZ-CORSINO, M.; LOSADA, A. 2009. Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesion enrichment in human cells. **Public Library of Science (PLoS) One**. 4(4):1-10.

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

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. 2013. Effects of heat stress on development, quality and survival os *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, **79**:351-357.

SIRARD, M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**. **55**:1241-1254.

SMALLWOOD, A.; ESTÈVE, P. O.; PRADHAN, S.; CAREY, M. 2007. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. **Genes and Development**. **21**: 1169-1178.

STALLCUP, M. R. 2001. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. **Oncogene**. **20**: 3014-3020.

SUN, L.; WU, K.L.; ZHANG, D.; WANG, H.Y.; WANG, Y.; XU, Z.Y.; HUANG, X.Y.; CHEN, Z.J.; LIU, H.Q. 2012. Increased cleavage rate of human nuclear transfer embryos after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. **Reproductive Biomedicine Online**. **25**:425-433.

TAKEBAYASHI, S.I.; NAKAO, M. ; FUJITA, N.; SADO, T.; TANAKA, M.; TAGUCHI, H.; OKUMURA, K. 2001. 5-aza-2'-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **288**:921-926.

TORRES-JUNIOR, J. R. S.; PIRES, M. F. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; SÁ FILHO, M.L F.; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**. **69**:155-166.

TSENG, J. K.; TANG, P. C.; JU, J. C. 2006. *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. **Theriogenology**. **66**:1073-1082.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochemistry and Cell Biology**. **83(3)**: 344-353.

WANG, J.Z.; SUI, H.S.; MIAO, D.Q.; LIU, N.; ZHOU, P.; GE, L.; TAN, J.H. 2009. Effects os heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. **Reproduction**, **137**: 181-189.

WANG, Y.; SU, J.; WANG, L.; XU, W.; QUAN, F.; LIU, J.; ZHANG, Y. 2011a. The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. **Cellular Reprogramming**. **13(4)**:297-306.

WANG, Y.S.; XIONG, X.R. AN, Z.X.; WANG, L.J.; LIU, J.; QUAN, F.S.; HUA, S.; ZHANG, Y. 2011b. Production of cloned calves by combination treatment of both

donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, 75, 819-825.

WANG, D.; ZHOU, J.; LIU, X.; LU, D.; SHEN, C.; DU, Y.; WEI, F.; SONG, B.; LU, X.; YU, Y.; WANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, H.; YANG, Y.; AKIYAMA, Y.; ZHANG, H.; ZHU, W. Methylation of SUV39H1 by SET7/9 results in heterochromatin relaxation and genome instability. **Proceedings of the National Academy of Science**, **110(14)**:5516-5521.

WOZNIAK, R.J.; KLIMECKI, W.T.; LAU, S.S.; FEINSTEIN, Y.; FUTSCHER, B.W. 2007. 5-aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. **Oncogene**, **26**: 77-90.

WU, X.; LI, Y.; XUE, L.; WANG, L.; YUE, Y.; LI, K.; BOU, S.; LI, G.P.; YU, H. 2010. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and *in vitro* fertilized bovine embryos. **Zygote**, 19:31-45.

XIAO, X.; ZUO, X.; DAVIS, A.A.; MCMILLAN, D.R.; CURRY, B.B.; RICHARDSON, J.A.; BENJAMIN, I.J. 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory response in mice. **EMBO Journal**. **18**:5943-5952.

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

YOULSEF, M. K. 1985. **Stress Physiology in Livestock**. Boca Raton: CRC press. 217p.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, **121**:447-454.

ZHAO, X.M.; REN, J.J.; DU, W.H.; HAO, H.S.; WANG, D.; LIU, Y.; QIN, T.; ZHU, H.B. 2012. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the *in vitro* development of vitrified bovine two-cell embryos. **Fertility Sterility**. **98**:222-227.

ZHOU, Q.; BAQUIR, S.; BROCHARD, V.; SMITH, L.C.; RENARD, J. P. 2002. Donor nuclei are not well reprogrammed by nuclear transfer procedure. **Biology Reproduction**. **66(1)**:237-238.

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