Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

JULIANO RODRIGUES SANGALLI

**Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência
nuclear de células somáticas em bovinos**

São Paulo
2016

JULIANO RODRIGUES SANGALLI

**Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de
células somáticas em bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3327
FMVZ

Sangalli, Juliano Rodrigues

Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de células
somáticas em bovinos / Juliano Rodrigues Sangalli. -- 2016.
106 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Clonagem. 2. Bovinos. 3. Ácido Valpróico. 4. Ácido β -Hidróxibutírico. 5. Histonas
deacetilases. I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de células somáticas em bovinos”, protocolado sob o nº 2546/2012, utilizando 1 (um) bovino, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

São Paulo, 18 de maio de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANGALLI, Juliano Rodrigues

Título: **Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de células somáticas em bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô Francisco Sangalli, o Vô Chico, sobrevivente após contrair malária em 1925, e que sempre me ensinou a trabalhar duro. Ele odiava quando me via estudando e insistentemente pedia para eu parar. Aqui eu termino mais uma etapa, mas sinto lhe informar que acho que vou ter que estudar o resto da vida.

Agradecimentos

Aos meus pais (João e Sônia) e ao meu irmão Leandro pela família maravilhosa que nós somos. A família é a coisa mais importante na nossa vida. Em especial gostaria de agradecer ao ambiente uterino que minha mãe me proporcionou sem muito *stress* tanto social, quanto metabólico. E ao meu pai, pois contrariando a crença popular que “males contribute little but sperm to fertilization”, a sua herança cultural e epigenética (transmitida provavelmente através de *non-coding* RNAs squeezing somewhere inside the sperm) ajudou a formar a minha personalidade e ser como eu sou.

Ao meu orientador Flávio Vieira Meirelles pela oportunidade de realizar o trabalho de Doutorado sob sua supervisão e pela sua amizade. Gostaria de agradecê-lo também por tolerar minhas insubordinações nestes últimos ~8 anos, e por me oferecer liberdade de pensamento.

Ao Professor Felipe Perecin, por todos os ensinamentos que ele me transmitiu desde a época do treinamento técnico, pelas análises estatísticas e pela amizade. Sem a sua ajuda este trabalho não teria sido possível.

Aos meus dois irmãos bastardos, Rafael Vilar Sampaio (Profeta) e Rodrigo da Silva Nunes Barreto (Bocudinho) pela parceiragem, pelos cafés da manhãs e almoços, pela família que nós formamos durante toda nossa estadia em Pira. Sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível.

Ao Professor Willian Allan King, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no Canadá, pela sua paciência e ternura ajudando os meninos com “language barrier”.

Ao “Round peg in the square hole” Oliver Joaquim Rando (Ollie), o “dude” que abriu as portas de seu laboratório para um descendente de escravo desconhecido. O período que trabalhei no seu laboratório foi um dos mais frutíferos da minha vida científica. E só tenho que agradecer a oportunidade de conviver contigo, e ter tido a oportunidade de aprender tantas coisas novas.

Ao Professor e amigo Marcos Roberto Chiaratti, por todas as discussões, os trabalhos e os churrascos realizados juntos.

Ao “shampoo sem sal” Juliano Coelho da Silveira pela amizade, pela ajuda nos experimentos, por cuidar da churrasqueira e por ajudar introduzir novos pensamentos no nosso laboratório.

Ao Tiago Henrique Camara de Bem, pela amizade e pela parceria nas clonagens.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte e financiamento deste trabalho. Processo número: 2013/06673-7 (Doutorado) e Bolsa Estágio e Pesquisa no Exterior (BEPE) 2014/21097-5.

Aos membros da banca examinadora por dispendere um tempo precioso no julgamento deste trabalho.

A CAPES, que em parceria com o governo canadense suportou a minha estadia no Canadá no início do doutorado, edital CAPES/DFAIT.

Este momento de agradecimento é ingrato, pois nesta longa jornada nós temos a ajuda de centenas de pessoas, e a nossa família LMMD é gigante. Peço perdão a algum amigo se eu esquecer no agradecimento, mas segue aqui todos os que me ajudaram nesta luta:

Fabiana Bressan, Kelly Roballo, Pedro Ratto, Laís Pessoa, Reno Roldi, Gabriella +nerd, Maitê (Deuskera), Mateus, Moysés, Lígia, Nayra, Aninha Mançanares, Celina, Van, Monalisa, Dewison (Alpaca de Ibatinga), Letícia, Bruna, Tiago Pardal, Tiago Presidente, Carolzinha Carolzinha, Arina, Gabriel, Márcia, Heidge, Peninha, Lilian Oliveira.

Ao Léo, Leonardo Amaral, pela coleta dos ovários, fundamental ao nosso trabalho, e pelo companheirismo. Gostaria de agradecer também ao Frigorífico pela doação dos ovários utilizados para a produção in vitro de embriões.

Your time is limited, so don't waste it living someone else's life. Don't be trapped by dogma - which is living with the results of other people's thinking. Don't let the noise of other's opinions drown out your own inner voice. And most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary."

That's been one of my mantras -- focus and simplicity. Simple can be harder than complex: You have to work hard to get your thinking clean to make it simple. But it's worth it in the end, because once you get there, you can move mountains.

Your work is going to fill a large part of your life, and the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work. And the only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it."

You can't connect the dots looking forward; you can only connect them looking backward. So you have to trust that the dots will somehow connect in your future. You have to trust in something -- your gut, destiny, life, karma, whatever. This approach has never let me down, and it has made all the difference in my life.

"Here's to the crazy ones, the misfits, the rebels, the troublemakers, the round pegs in the square holes ... the ones who see things differently -- they're not fond of rules, and they have no respect for the status quo. ... You can quote them, disagree with them, glorify or vilify them, but the only thing you can't do is ignore them because they change things. ... They push the human race forward, and while some may see them as the crazy ones, we see genius, because the people who are crazy enough to think that they can change the world, are the ones who do."

Steve Jobs

"“You'll live longer and you'll be healthier too,” he answered. ‘Because as we were saying today, there's nothing in the world like eating moderately to live a long life.’ ‘If that's the way things are,’ I thought to myself, ‘I never will die.’ Because I've always been forced to keep that rule, and with my luck I'll probably keep it all my life.”—Anonymous, *The Life of Lazarillo de Tormes and of His Fortunes and Adversities* (1554).

RESUMO

SANGALLI, J. R. **Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de células somáticas em bovinos.** [Use of histone deacetylases inhibitors in bovine somatic cell nuclear transfer]. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A clonagem de mamíferos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ainda é afetada pela baixa eficiência. As modificações epigenéticas estabelecidas durante o processo de diferenciação celular estão entre os principais fatores. Uma vez que estas modificações atuam como barreiras epigenéticas restringindo a reprogramação do núcleo somático. Considerando isso, a maioria dos fatores que promovem a descondensação da cromatina, incluindo os inibidores das Histonas Deacetilases (HDACis), tem sido demonstrado aumentarem a eficiência da reprogramação nuclear, tornando o seu uso comum para melhorar as taxas da TNCS. Neste trabalho, nós testamos dois inibidores das histonas deacetilases: o Ácido Valpróico (VPA) e o Ácido β -Hidróxibutírico (BOHB), sendo um farmacológico e o outro um metabólito endógeno na TNCS. Nosso objetivo era testar se o tratamento de células doadoras de núcleo ou zigotos com estes HDACis melhoravam o desenvolvimento de embriões bovinos clonados. Em relação ao VPA, nós observamos que o tratamento de fibroblastos com o VPA aumentou a acetilação das histonas e a expressão de genes importantes para o desenvolvimento como *IGF2R* e *PPARGC1A*. Entretanto, quando as células tratadas foram usadas como doadoras de núcleo, não foi observado diferença nos níveis de acetilação das H3K9 entre os grupos. Além disso, as alterações foram rapidamente removidas após a transferência nuclear. Em relação as taxas de desenvolvimento, o uso de células tratadas como doadoras de núcleo não resultou em diferença durante o desenvolvimento pré- e pós-implantacional. Em relação ao BOHB, nós executamos um série de experimentos para testar se esta molécula age como um inibidor das HDACs em bovinos. Nós observamos que fibroblastos tratados com BOHB apresentam aumento nos níveis globais de H3K9ac. O tratamento altera a

expressão de genes importantes como os transportadores de glicose e a enzima chave no metabolismo lipídico SCD. Também, nós demonstramos que este metabólito é capaz de alterar uma marca epigenética em zigotos clonados, que persiste até o estágio de blastocisto. Entretanto, o tratamento dos zigotos com este metabólito endógeno não aumentou a taxa de desenvolvimento pré-implantacional, embora tenha alterado a expressão de um fator de transcrição que protege embriões contra estresse oxidativo, o FOXO3a. O tratamento de zigotos partenogênicos com BOHB não afetou o desenvolvimento embrionário, nem a produção de ATP, sugerindo que o BOHB não apresenta efeitos tóxicos como anteriormente pensado. Concluindo, os resultados deste trabalho mostram que a inibição das HDACs através de uma molécula farmacológica ou um metabólito endógeno, não aumenta a eficiência da TNCS em bovinos. Entretanto, aqui nós mostramos que o corpo cetônico BOHB pode ser um elo de ligação entre o ambiente extracelular e a regulação do metabolismo. E serve como um modelo in vitro para testar como distúrbios metabólicos como a cetose afeta o metabolismo e epigenoma celular e embrionário em bovinos.

Palavras-chave: Clonagem. Bovinos. Ácido Valpróico. Ácido β -Hidróxibutírico. Histonas deacetilases.

ABSTRACT

SANGALLI, J. R. **Use of histone deacetylases inhibitors in bovine somatic cell nuclear transfer.** [Uso de inibidores das histonas deacetilases na transferência nuclear de células somáticas em bovinos]. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cloning of mammals by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is still plagued by the low efficiency. The epigenetic marks established during the cell differentiation process are among the main cause. These modifications act as a barrier restricting the nuclear reprogramming process of somatic nuclei. Based on this, molecules that promotes chromatin decondensing, including Histone Deacetylases inhibitors (HDACis), has been demonstrated increase the efficiency of nuclear reprogramming, making their use common on SCNT procedure. Herein, we tested two histone deacetylase inhibitors: Valproic Acid and β -hydroxybutyric Acid, the former a pharmacological drug and the latter, an endogenous metabolite on SCNT. Our objective was to test whether the donor cells treatment or zygotes with these HDACis improve the bovine cloned embryos development. Regarding the VPA, we observed that fibroblasts treatment with VPA increases the histone acetylation and expression of developmentally important genes such as *IGF2R* and *PPARGC1A*. However, when treated cells were used as nuclear donors, we did not observe difference on H3K9ac levels between the groups. Moreover, the alterations were quickly removed after SCNT. Regarding the developmental rates, the use of treated cells as nuclear donors did not affect the pre- and post-implantation development. In the second experiment, we used the BOHB in a series of experiments to test whether this molecule acts as a histone deacetylase inhibitor in bovines. We observed that treatment of fibroblasts with BOHB increased the global levels of H3K9ac. Also, treatment alters the expression of important genes such as glucose transporters and a key enzyme regulating lipid synthesis. Additionally, we demonstrated that this metabolite affect at least one epigenetic mark in cloned zygotes, that lasts until the blastocyst stage. However, zygote treatment with this endogenous metabolite did not increase the pre-implantation developmental rates, albeit increased the expression of

a transcription factor that protects cells against oxidative stress, the FOXO3a. Treatment of parthenogenetic embryos with BOHB did not affect the embryo development, neither ATP production, suggesting that BOHB is not toxic as previously believed. Concluding, the results presented here shows that the HDAC inhibition through a pharmacological compound or an endogenous metabolite did not increase the efficiency of bovine SCNT. However, here we showed that the ketone body BOHB might be a nexus between the extracellular environment and the cellular metabolism. Also, it can used as a in vitro model to interrogate questions about does metabolic disturbances such as ketosis in cattle affects the epigenome and cellular metabolism in bovines.

Keywords: Cloning. Bovines. Valproic Acid. β -Hydroxybutyric Acid. Histone deacetylases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
 Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO À TERMO DE BOVINOS CLONADOS DERIVADOS DE CÉLULAS DOADORAS TRATADAS COM ÁCIDO VALPRÓICO.....		
		17
2	INTRODUÇÃO.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Tratamento das células doadoras de núcleo com VPA	21
3.2	MTT Ensaio de Proliferação celular	22
3.3	Transferência nuclear de células somáticas.....	23
3.4	Transferência dos embriões e avaliação das gestações	24
3.5	Imunodeteccção da H3K9ac e 5-metilcitosina	25
3.6	Análise da expressão gênica	26
3.7	Análise Estatística	28
4	RESULTADOS	30
4.1	O ácido valpróico aumenta a proliferação/viabilidade das células doadoras de núcleo	30
4.2	O tratamento com VPA aumenta a acetilação da H3K9 sem afetar a metilação do DNA das células doadoras de núcleo	31
4.3	A expressão do IGF2R e PPARGC1A é aumentado em células doadoras tratadas com VPA	32
4.4	Os níveis elevados de acetilação das histonas nas células doadoras de núcleo não são mantidos após a transferência nuclear.....	33
4.5	Elevados níveis de acetilação das histonas em células doadoras não tem efeito sobre o desenvolvimento pré e pós-implantacional de clones.....	35
4.6	Análise do estado de saúde dos bezerros clonados pós-nascimento	36
5	DISCUSSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS	47

Capítulo 2: CONECTANDO EPIGENÉTICA E METABOLISMO UTILIZANDO O CORPO CETÔNICO ÁCIDO B-HIDROXIBUTÍRICO EM CÉLULAS E EMBRIÕES BOVINOS	56
6 INTRODUÇÃO.....	57
7 MATERIAL E MÉTODOS	60
7.1 Estabelecimento do cultivo primário de fibroblastos bovinos.....	60
7.2 Diluição do corpo cetônico Ácido β -Hidroxibutírico	61
7.3 Tratamento dos fibroblastos bovinos com BOHB para avaliação da proliferação/viabilidade celular baseada no ensaio MTT.....	61
7.4 Tratamento das células doadoras de núcleo com BOHB para avaliação global dos níveis de H3K9ac por Western Blot	62
7.5 Western Blotting para detecção de H3K9ac em blastocistos clonados e partenogênicos	64
7.6 Análise dos níveis de H3K9ac em fibroblastos por imunocitoquímica	64
7.7 Imunodeteção da H3K9ac em zigotos e células doadoras de núcleo	64
7.8 Análise dos níveis de H3K9ac em fibroblastos por microscopia de fluorescência.....	65
7.9 Análise dos níveis de H3K9ac em Zigotos por microscopia confocal	66
7.10 Transferência nuclear de células somáticas.....	66
7.11 Tratamento de presumíveis zigotos com BOHB.....	67
7.12 Produção de embriões por Fertilização in vitro.....	68
7.13 Análise da expressão gênica nos fibroblastos, blastocistos clonados e fertilizados in vitro	69
7.14 Ensaio bioluminescente para a detecção de ATP em zigotos.....	70
7.15 Análise Estatística	74
8 RESULTADOS	75
8.1 O Ácido β -Hidroxibutírico aumenta o metabolismo em fibroblastos bovinos	75
8.2 Fibroblastos bovinos aumentam os níveis globais de acetilação da H3K9 após o tratamento com o corpo cetônico BOHB.....	77
8.3 Fibroblastos bovinos cultivados com BOHB diminuem a transcrição dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 e da enzima SCD	79
8.4 Zigotos de embriões clonados tratados com BOHB apresentam maior acetilação das histonas	82

8.5	Efeito do tratamento de zigotos clonados com o BOHB sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional	83
8.6	Tratamento com o BOHB durante o estágio de zigotos altera a expressão gênica em embriões no estágio de blastocisto	84
8.7	Tratamento de zigotos clonados com o Ácido β -Hidroxibutírico leva a um aumento dos níveis de H3K9ac nos blastocistos	87
8.8	Blastocistos partenogênicos tratados com BOHB no estágio de zigoto não possuem aumento nos níveis globais de H3K9ac.....	88
8.9	Zigotos partenogênicos tratados com BOHB nas primeiras horas de desenvolvimento não apresentam alteração na produção de ATP	90
9	DISCUSSÃO	92
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
	REFERÊNCIAS	99
10	CONCLUSÕES.....	106

1 INTRODUÇÃO

Desde os experimentos seminais com *Xenopus* nos anos 60, a transferência nuclear (TN) tem se tornado uma ferramenta fundamental para questões básicas relacionadas ao desenvolvimento embrionário e a reprogramação nuclear. Em 1997 com o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado, abriu-se a perspectiva de utilizar este tipo de reprodução artificial para clonar animais de alto mérito genético e zootécnico, produção em larga escala de animais transgênicos, e até mesmo células-tronco utilizando a clonagem terapêutica. Entretanto, quase 20 anos já se passaram, e a eficiência da clonagem continua baixa, com menos de 10% dos embriões transferidos para o útero produzindo uma progênie viável/saudável. Isto ocorre porque os embriões clonados apresentam uma enormidade de alterações epigenéticas, provavelmente porque são derivados de uma célula somática, enquanto os oócitos evoluíram para reprogramar o espermatozóide. A cromatina somática apresenta uma enormidade de marcações epigenéticas que garantem seu estado diferenciado, e estabilidade de expressão gênica. Por isso, a utilização de moléculas que alteram globalmente a estrutura da cromatina tem o potencial de melhorar a eficiência da Transferência Nuclear de Células Somáticas. Neste trabalho, nós nos propusemos a investigar o uso de dois inibidores das histonas deacetilases, o Ácido Valpróico e o Ácido β -Hidroxibutírico, sendo um farmacológico e o outro um metabólito endógeno. Nós tínhamos a hipótese que a inibição das deacetilases poderia causar aumento global da acetilação das histonas, facilitando o processo de reprogramação nuclear. Nós executamos uma série de experimentos para investigar o papel destas moléculas em células e embriões bovinos. Os resultados encontram-se divididos em 2 capítulos abaixo, sendo o Capítulo 1 tratando dos efeitos do Ácido Valpróico sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional em bovinos; enquanto o Capítulo 2 trata da conexão entre o epigenoma e o metabolismo mediado pelo corpo cetônico Ácido β -Hidroxibutírico.

**CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO À TERMO DE BOVINOS CLONADOS
DERIVADOS DE CÉLULAS DOADORAS TRATADAS COM ÁCIDO
VALPRÓICO**

2 INTRODUÇÃO

Em 1997, a clonagem de mamíferos por transferência nuclear de células somáticas foi mostrada ser possível, tornando-se uma tecnologia promissora devido a sua aplicabilidade na medicina regenerativa (ex. derivação de células-tronco embrionária paciente específica), transgenia, entre outras (WILMUT et al., 1997). Entretanto, a TNCS é ainda afetada pela sua baixa eficiência, uma vez que muitos passos com sucesso são necessários para um animal clonado nascer saudável (WILMUT et al., 2002). Estes incluem a reprogramação do núcleo mediada pelo oócito, o estabelecimento da gestação, o desenvolvimento de uma placenta funcional com adequada interação materno-fetal, finalmente culminando com o nascimento e adaptação do animal a vida extra uterina (MEIRELLES et al., 2010). Problemas tais como a persistência dos padrões de metilação (SANTOS et al., 2003) e acetilação (WEE et al., 2006) das células somáticas em embriões de TNCS, expressão aberrante de genes *imprinted* (SUZUKI et al., 2011), falha para produzir uma placenta funcional e consequentemente pobre nutrição fetal são frequentemente observadas em animais clonados (ARNOLD et al., 2008). Estas observações sugerem que o processo de reprogramação nuclear é incompleto na maioria dos embriões de TNCS, representando um importante alvo para estratégias objetivando melhorar a eficiência da TNCS (DEAN et al., 2001).

Há varias modificações epigenéticas que acompanham a diferenciação celular, incluindo a metilação do DNA, as modificações nas histonas (ex. H3K9me2/3; deacetilação), incorporação de variantes de histonas (ex. macroH2A) e compactação da cromatina. Todas estas modificações atuam como barreiras epigenéticas restringindo a reprogramação do núcleo somático (PASQUE et al., 2011). Uma vez que a deacetilação das histonas, seguidas pela compactação do DNA, é comumente associadas com repressão gênica em células diferenciadas, o descondensamento da cromatina é necessário para permitir acesso dos reguladores transcricionais aos seus alvos genômicos para a reprogramação com sucesso do núcleo somático (GASPAR-MAIA et al., 2011; GURDON; WILMUT, 2011). Corroborando com esta hipótese, a maioria dos fatores que promovem a descondensação da cromatina, incluindo os inibidores de histonas deacetilases (HDACis), tem sido demonstrado aumentar a eficiência de reprogramação nuclear,

fazendo seu uso comum para melhorar as taxas de TNCS (KISHIGAMI et al., 2006; ZHAO et al., 2010a).

O uso dos HDACis, incluindo o Ácido Valpróico (VPA)(COSTA-BORGES; SANTALÓ; IBÁÑEZ, 2010), o Butirato de Sódio (NaBu)(SHI et al., 2003), Tricostatina A (TSA)(LEE et al., 2011) e Scriptaid (ZHAO et al., 2009) são associados com melhores taxas de reprogramação nuclear. Um aumento de até 5 vezes na taxa de sucesso de clonagem em camundongos foi relatada quando um HDACi foi usado na TNCS (KISHIGAMI et al., 2006). Por exemplo, o tratamento de células doadoras de núcleo com TSA, notoriamente melhorou o desenvolvimento *in vitro* de embriões de TNCS em coelhos (YANG et al., 2007a) e bovinos (ENRIGHT et al., 2003). Além disso, o uso de NaBu em bovinos melhorou a eficiência da TNCS (SHI et al., 2003), enquanto o uso de VPA aumentou a reativação gênica e a eficiência de reprogramação em suínos produzidos por TNCS (MIYOSHI et al., 2010), e em experimentos de geração de células-tronco pluripotentes induzida (IPSCs) em camundongo (HUANGFU et al., 2008).

O VPA, um ácido graxo de cadeia curta, é amplamente usado como um anticonvulsivante e estabilizante de humor na medicina humana (PHIEL et al., 2001). Recentemente, o VPA foi relatado ser um poderoso inibidor das HDACs com baixa toxicidade para as células, tanto *in vivo* como *in vitro* (GÖTTLICHER et al., 2001). O VPA diminui a repressão transcricional dependente das HDACs e causa hiperacetilação das histonas em células cultivadas e *in vivo* (MARCHION et al., 2005; HEZRONI; SAILAJA; MESHORER, 2011).

A hiperacetilação das histonas promove a neutralização das cargas positivas dos resíduos de lisina, isto reduz sua afinidade com o DNA, e pode contribuir diretamente para a abertura da cromatina e indiretamente para um aumento na transcrição gênica (TURNER, 2007). Por este motivo, o VPA tem sido utilizado em experimentos em bovinos para investigar seus efeitos sobre a reprogramação nuclear. O tratamento dos embriões bovinos clonados com VPA aumentou drasticamente a taxa de formação de blastocisto, o número de células na massa celular interna (MCI) e o trofotoderma (TE), assim como a sobrevivência celular (XU et al., 2012). Recentemente, Selokar et al. demonstrou em bovinos, que o uso de células doadoras de núcleo tratadas com VPA foi benéfico para a reprogramação eficiente destas usando a clonagem pelo método de *handmade* (SELOKAR et al., 2013). Contudo, o uso de VPA tem sido limitado a experimentos envolvendo o

desenvolvimento pré-implantacional como *end-points*, com nenhum estudo tendo avaliado seus efeitos sobre o desenvolvimento de bovinos clonados a termo.

Neste trabalho, o VPA foi usado na TNCS para testar se o tratamento das células doadoras de núcleo com este HDACi afeta o desenvolvimento pré- e pós-implantacional de clones bovinos. Nós testamos a hipótese que o tratamento de células doadoras de núcleo com VPA pode relaxar a estrutura da cromatina, tornando esta mais acessível para a reprogramação mediada pelo oócito. Como resultado, baseado em estudos prévios e a baixa toxicidade do VPA, um aumento dos níveis globais de acetilação das histonas favorecendo a reprogramação nuclear levando a maiores taxas de desenvolvimento foi esperado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados foram comprados da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), a menos que citado de outra maneira. Os procedimentos experimentais *in vitro* foram executados em incubadoras umidificadas, e mantidas a 38,5 °C em ar com 5% CO₂. Cada experimento consistiu de pelo menos três replicatas. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction).

3.1 Tratamento das células doadoras de núcleo com VPA

As células doadoras de núcleo foram derivadas de um touro da Raça Gir (*Bos indicus*) de 14 anos de idade como descrito anteriormente (SANGALLI et al., 2012). Brevemente, biópsias de pele (1-2 cm²) foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de lâminas de bisturi e digeridas com 0,1% de colagenase por 3 h a 38,5°C. A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 5 min e o pellet celular foi ressuspensionado em Alpha Minimum Essential Medium (α-MEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina. As células foram plaqueadas em placas de petri de 35 mm e mantidas por 6 dias na incubadora para o estabelecimento do cultivo primário, e depois crescidas por mais duas passagens. Após isto, as células foram tripsinizadas da placa usando Tryple Express (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ressuspensionadas em α-MEM suplementado com 20% SFB, 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, colocadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

Fibroblastos na terceira passagem foram plaqueados na densidade de 7×10^4 células por placa de Petri de 35-mm em Alpha Minimum Essential Medium (α-MEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina. Após 48h do plaqueamento, o meio foi trocado para α-MEM suplementado com 0.5% SFB e 50 µg/ml de sulfato de

gentamicina, e as células foram cultivadas por um período adicional de 3 dias para sincronizar o ciclo celular nos estágios de G1/G0. O tratamento com VPA foi feito pela adição de 0, 1, 2 e 5mM de VPA ao meio de cultivo, 24 horas antes do fim do cultivo celular. Baseado nos resultados da análise do MTT (ver abaixo), somente 0 mM (controle) e 2 mM (tratado) do VPA foram usados nos seguintes experimentos. A Figura 1 abaixo ilustra a obtenção e tratamento dos fibroblastos usados como células doadoras de núcleo.

Figura 1 - Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados com as células doadoras de núcleo

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Figura ilustrando o tratamento das células doadoras de núcleo com VPA e os experimentos realizados após o tratamento.

3.2 MTT Ensaio de Proliferação celular

Para avaliar a proliferação/viabilidade dos fibroblastos após o tratamento com VPA (Figura 1 acima), nós usamos o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 4-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT) (MOSMANN, 1983) como descrito anteriormente

(SANGALLI et al., 2012), com algumas modificações. Brevemente, os fibroblastos foram plaqueados em placas de 96 poços na densidade de 7×10^3 células por poço, e tratadas com 0, 1, 2 e 5 mM de VPA como descrito acima. Após isto, 100 µl da solução de MTT (0.5 mg/ml concentração final) foi adicionada dentro de cada poço e cultivadas em incubadora umidificada com 5% CO₂ a 38.5°C. Após 3h, a solução de MTT foi removida e 200 µl de isopropanol ácido (0.04 M HCl em isopropanol absoluto) foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. Cada placa foi lida usando um espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) no comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (sem VPA).

3.3 Transferência nuclear de células somáticas

A transferência nuclear de células somáticas foi executada conforme descrito por (SANGALLI et al., 2012). Brevemente, complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de ovários obtidos de abatedouros locais e selecionados baseados em características morfológicas. CCOs foram então submetidos a maturação *in vitro* (MIV), e os oócitos desnudados das células do *cumulus* por pipetagem de maneira suave. Os oócitos com o primeiro corpúsculo polar visível (CP) foram enucleados pela remoção do 1° CP e da placa metafásica (MII) por aspiração gentil usando uma pipeta de vidro de 15-µm (diâmetro interno - ES transferTip; Eppendorf, Hamburg, Germany). Os oócitos enucleados foram reconstruídos pela injeção de um único fibroblasto (anteriormente não tratado ou tratado com VPA) dentro do espaço perivitelínico. O produto resultante (citoplasto + fibroblasto) foi fundido em solução de eletrofusão (0.28 M manitol, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES e 0.05% BSA em água ultra pura) aplicando-se um pulso de corrente alternada (0.05 kV/cm por 5 s) e dois pulsos de corrente contínua (1.75 kV/cm por 45 µs). Conjuntos citoplasto+fibroblasto (CF) que fundiram com sucesso foram fixados imediatamente antes da ativação (veja abaixo) ou artificialmente ativados 26 h após o início da maturação *in vitro* (Figura 2). A ativação artificial foi executada pelo tratamento com 5 µM de ionomicina por 5 min, lavados em solução de 3% de BSA e tratamento com

2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 h (SANGALLI et al., 2012). Presumíveis zigotos foram cultivados por um período adicional de 2 h pós-ativação (h.p.a.) e fixados para análise por imunocitoquímica (5 h.p.a.) ou cultivado por 7 dias em SOF suplementado com 2.5% v/v SFB, 0.5% albumina sérica bovina (BSA), 0.2 mM de piruvato de sódio e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Figura 2 abaixo). As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas 48 e 168 h.p.a., respectivamente. Em todos experimentos, embriões partenogenéticos foram gerados em paralelo e usados como controle.

Figura 2 - Desenho esquemático ilustrando o delineamento experimental

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Figura ilustrando a TNCS, os experimentos de imunocitoquímica e transferência de embriões realizados após a produção dos embriões clonados.

3.4 Transferência dos embriões e avaliação das gestações

Blastocistos no dia 7 de desenvolvimento foram individualmente transferidos via transcervical para vacas receptoras com o ciclo estral previamente sincronizado (NASSER et al., 2004). As receptoras foram avaliadas para diagnosticar as

gestações por palpação transrectal/ultrassonografia nos dias 30, 60, 90 e 270 após a transferência dos embriões. A taxa de aborto foi calculada mensalmente.

3.5 Imunodeteção da H3K9ac e 5-metilcitosina

Imunocitoquímica para a acetilação do resíduo de lisina 9 da histona 3 (H3K9ac) foi executada em conjuntos citoplasto + fibroblasto (CF) fundidos com sucesso (imediatamente antes da ativação) e em presumíveis zigotos (5 h.p.a.), ver Figura 2 acima. As células doadoras de núcleo foram também avaliadas por imunocitoquímica para a marcação epigenética H3K9ac e para os níveis globais de metilação do DNA (5-mC) como descrito anteriormente (GIRALDO et al., 2007; DING et al., 2008; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010), com poucas modificações. As amostras foram fixadas por 12 minutos em 4% (p/v) de paraformaldeído diluído em solução tamponada de fosfato (PBS) com 0.1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PBS-PVP) e permeabilizadas por 20 min em PBS-PVP com 1% (v/v) de Triton X-100, lavados em PBS-PVP contendo 0.1% (v/v) de Tween 20 (TW-PBS) e incubados por 15 min em 4 N de HCl. Após isto, as amostras foram extensivamente lavadas em TW-PBS e sítios de ligação não específica foram bloqueados por incubação overnight a 4°C em um tampão de bloqueio consistindo de PBS-PVP contendo 0.4% (p/v) de BSA. As amostras foram incubadas por 3 h a 37°C com anticorpos primários diluídos na concentração de 1:1000. A marcação da metilação do DNA foi realizada com o anticorpo anti-mouse 5-mC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), enquanto que o anti-rabbit H3K9ac (Millipore, Bedford, MA, USA) foi usado para marcação da acetilação das histonas (fibroblastos, CF e presumíveis zigotos). Seguindo, as amostras foram lavadas em TW-PBS e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com anticorpos secundários diluídos na concentração de 1:500. O anticorpo goat anti-rabbit conjugado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) foi usado para a marcação da acetilação das histonas e o rabbit anti-mouse conjugado com rodamina (Santa Cruz Biotechnology) para a marcação da metilação do DNA. Após várias lavagens em TW-PBS, fibroblastos, CF e presumíveis zigotos foram montados sobre lâminas de vidro com lamínulas usando o reagente Prolong Antifade (Invitrogen). Um

microscópio de epifluorescência (Axioplan; Carl Zeiss, Zeppelingstrasse, Germany) foi usado para avaliação da metilação do DNA e acetilação das histonas. Como controle negativo, o PBS foi usado no lugar do anticorpo primário.

As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Zeiss MC 80 DX; Carl Zeiss), e os mesmos parâmetros para todas as amostras submetidas a mesma marcação. O nível de acetilação foi analisado usando pelo menos 15 imagens de CF ou presumíveis zigotos para cada grupo experimental. Com relação as células doadoras, 5 imagens de uma monocamada de fibroblastos foram avaliadas para cada grupo experimental para avaliar tanto a metilação do DNA, como a acetilação da histonas. Núcleos individuais foram delimitados (excluindo-se os núcleos sobrepostos) usando o Adobe Photoshop v. 7 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Cerca de 30 núcleos foram delimitados em cada imagem de fibroblastos. O *background* foi subtraído da intensidade de pixels em todas as análises, e a intensidade média do sinal foi calculada usando o programa ImageJ (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Neste trabalho, a intensidade refere-se ao grau de brilho dos pixels (em uma escala de cinza: 0-255; sendo 0 = preto e 255 = branco), onde a maior intensidade de brilho indica maior reatividade imunocitoquímica.

3.6 Análise da expressão gênica

O RNA foi extraído dos fibroblastos controle e tratado usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, com poucas modificações. Para isso, um mix contendo 100 µl de TRIzol, 5 µg de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX, USA) e 5 µl de água tratada com DEPC (dietileno pirocarbonato) foi adicionado em cada amostra. O RNA extraído foi dissolvido em 10 µl de solução de DNase I (Invitrogen) mais 1 unidade/µl de RNase OUT para a degradação do DNA, como sugerido pelo fabricante. Após isto, o RNA foi imediatamente utilizado em uma reação de transcrição reversa para gerar os cDNA usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante e armazenado a -20°C até o uso.

Os genes alvos de interesse foram o *POU5F1*, *IGF2R* e *PPARGC1A* enquanto que o *ACTB* foi usado como o gene endógeno ou de referência. Oligonucleotídeos iniciadores usados para PCR em tempo real foram desenhados usando o programa Primer Express software v.3.1 (Applied Biosystems) baseado em sequências disponíveis no GenBank (Quadro 1). A quantificação relativa dos transcritos de mRNA específicos de cada gene foi executado em reações de 20- μ l contendo 0.2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores (*POU5F1*, *IGF2R*, *PPARGC1A* e *ACTB*) mais 1 x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2 μ l de um cDNA diluído 8 vezes em água ultrapura. Todos os cDNAs específicos de cada gene amplificados para uma determinada amostra foram corridos em triplicata na mesma placa de PCR. O controle negativo foi sempre corrido em paralelo com as amostras usando 2 μ l de água ultrapura ao invés do cDNA. As seguintes condições de ciclagem foram aplicadas para amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos consistindo de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. A fluorescência do SYBR Green foi lida no final de cada passo de extensão (60°C). Experimentos pilotos usando 5 diferentes concentrações de cDNA (extendendo-se de 4 vezes até 64 vezes diluído) foram corridas para ajustar as condições dos experimentos com o PCR em tempo real. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela análise da curva de *melting*. A quantidade dos transcritos alvos foram determinados usando a seguinte fórmula: $E_{(target)}^{-\Delta Ct(target)}/E_{(ref)}^{-\Delta Ct(ref)}$, na qual o E corresponde a eficiência de amplificação e ΔCt a diferença do ciclo de threshold (Ct) entre as amostras controle e tratadas. Valores de Ct foram obtidos após retirar-se a média das triplicatas das amostras, enquanto E refere se a eficiência média estimada para cada par de primers (os quais variaram de 93.6% a 95.2%) usando o software LinRegPCR (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; RAMAKERS et al., 2003). Dados de expressão gênica de sete replicatas biológicas são apresentadas.

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (RT-PCR)

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Número de acesso	Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1	NM_174580.2	F: CAGGCCCGAAAGAGAAAGC	78	60
			R: CGGGCACTGCAGGAACA		
<i>IGF2R</i>	Insulin-like growth factor 2 receptor	NM_174352.2	F: CAGGTCTTGCAACTGGTGTATGA	83	60
			R: ACGAAGCTGATGACGCTCTTG		
<i>PPARGC1A</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	NM_177945.3	F: ACCATGCAAACCATAATCACAGGAT	82	60
			R: CTCTTCGCTTTATTGCTCCATGAAT		
<i>ACTB</i>	Actin beta	NM_173979.3	F: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	91	60
			R: AACGCAGCTAACAGTCCGC		

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

3.7 Análise Estatística

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes. A análise estatística foi executada usando o sistema SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). As taxas de desenvolvimento foram analisadas usando o teste do qui-quadrado. Os dados restantes foram testados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, e analisados como se segue. Os dados de MTT e imunocitoquímica foram analisados por análise de regressão e Teste T de student, respectivamente. Análise de expressão gênica foram analisados por ANOVA de uma via, seguido por teste de Tukey post-hoc. Os dados de expressão gênica são apresentados em escala logarítmica (Ln) natural devido a distribuição logarítmica

normal considerada para análise. Diferenças com probabilidades (P) < 0.05 foram consideradas significativas. No texto, os valores são apresentados como médias $\pm$ o erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 O ácido valpróico aumenta a proliferação/viabilidade das células doadoras de núcleo

Visando avaliar se as células tratadas com VPA eram apropriadas para serem utilizadas como doadoras de núcleo e monitorar as mudanças causadas pelo tratamento com o VPA, fibroblastos bovinos foram avaliados pelo ensaio do MTT após o tratamento com 0, 1, 2, e 5 mM de VPA por 24 h. A taxa de proliferação/viabilidade destas células se ajustaram ($P = 0.0001$) em uma regressão polinomial de segundo grau (Figura 3). As células tratadas com 1, 2 e 5 mM de VPA aumentaram a proliferação/viabilidade por $134 \pm 5,32\%$, $135 \pm 5,53\%$ e $127 \pm 4,97\%$, respectivamente, comparadas as células não tratadas ($100 \pm 5,60\%$). Deste modo, concluiu-se que uma vez que o tratamento não compromete a viabilidade celular, estas eram apropriadas para serem usadas como doadoras de núcleo.

Figura 3 - O Ácido Valpróico aumenta a proliferação/viabilidade das células doadoras de núcleo

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Taxas de proliferação/viabilidade das células doadoras de núcleo tratadas com 0, 1, 2 e 5 mM de VPA medidas pelo ensaio de MTT. Valores ajustaram em uma regressão polinomial de segundo grau ($P = 0.0001$).

4.2 O tratamento com VPA aumenta a acetilação da H3K9 sem afetar a metilação do DNA das células doadoras de núcleo

Visando confirmar o efeito do tratamento com VPA sobre a acetilação das histonas, os níveis globais de acetilação das histonas dos fibroblastos tratados com 2 mM de VPA foram avaliados por imunocitoquímica (Figura 4). Comparado as células controle, o tratamento com VPA aumentou a H3K9ac por cerca de 1.9 vezes ($P < 0.0001$). Além disso, uma vez que o VPA tem sido mostrado diminuir a metilação do DNA em células cultivadas (DETICH; BOVENZI; SZYF, 2003), nós avaliamos os níveis globais de metilação do DNA, mas não foi observado diferença entre as células controle e tratadas (Figura 4).

Figura 4 - O tratamento com VPA aumenta a acetilação da H3K9 sem afetar a taxa de metilação das células doadoras de núcleo

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Intensidade média relativa da acetilação da H3K9 de células controle e tratadas com VPA. (B) Intensidade média relativa da 5-metilcitosina (5-mC) de células controles e tratadas com VPA. (C-D) Imunocitoquímica para a acetilação da H3K9 de células controle (C) e tratadas com VPA (D). (E-F) Imunocitoquímica para a 5-mC de células controle (E) e tratadas com VPA (F). O (*) significa diferença significativa entre os grupos experimentais ($P < 0.0001$). Todas imagens foram retiradas na objetiva de mesmo aumento (200 X).

4.3 A expressão do IGF2R e PPARGC1A é aumentado em células doadoras tratadas com VPA

Visando observar o efeito do VPA sobre a expressão gênica das células, nós avaliamos a expressão dos genes *POU5F1*, *IGF2R* e *PPARGC1A* por PCR em tempo real (Figura 5). Os genes avaliados são conhecidos por seus papéis

regulando o crescimento fetal (*IGF2R*) (YOUNG et al., 2001), promoção da pluripotência (*POU5F1*) (BOIANI et al., 2002) e regulação do metabolismo (*PPARGC1A*) (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012). Com relação ao *IGF2R*, foi encontrado que o tratamento com VPA aumentou ($P < 0.0001$) a abundância dos transcritos por cerca de 2 vezes comparado as células controle (Figura 5a). Não foi observado diferença nos níveis de transcritos do *POU5F1* (Figura 5b). Finalmente, a expressão do *PPARGC1A* foi aumentada ($P < 0.0001$) cerca de 5 vezes nas células tratadas com VPA (Figura 5c). Em resumo, o tratamento das células com VPA aumentou a expressão do *IGF2R* e *PPARGC1A*, mas não do *POU5F1*.

Figura 5 - A expressão do gene *IGF2R* e *PPARGC1A* é aumentada em células doadoras tratadas com VPA

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: A quantidade de transcritos de *IGF2R* (A), *POU5F1* (B) e *PPARGC1A* (C) são expressadas em relação ao grupo controle. O asterisco (*) denota diferença entre os grupos controle e VPA ($P < 0.0001$).

4.4 Os níveis elevados de acetilação das histonas nas células doadoras de núcleo não são mantidos após a transferência nuclear

Fibroblastos com níveis aumentados de acetilação das histonas após o tratamento com VPA foram usados como doadores de núcleo na TNCS. Para confirmar se os altos níveis de acetilação foram mantidos após a transferência nuclear, estes foram medidos em CF e presumíveis zigotos antes e após a ativação artificial, respectivamente (Figura 6). Embora os níveis de H3K9ac foram marginalmente superior no grupo VPA (28.0 ± 4.44 versus 36.5 ± 3.37 ,

respectivamente para o controle e o tratado com VPA), não foi observado diferença significativa entre os grupos imediatamente antes da ativação ($P = 0.12$). Inesperadamente, quando H3K9ac foi avaliada após a ativação artificial (5 h.p.a.), uma diminuição significativa de cerca de 1,3 vezes foi verificada no grupo VPA ($P = 0.03$). Concluindo, os níveis elevados de acetilação das histonas não são mantidos após a transferência nuclear.

Figura 6 - Os maiores níveis de acetilação da H3K9 em células doadoras de núcleo não é mantido após a transferência nuclear

Fonte: Sangalli, J.R. (2016)

Legenda: (A) Intensidade média relativa da H3K9ac de conjuntos citoplasto-célula doadora de núcleo dos grupos controle e tratado com VPA. (B) Intensidade média relativa H3K9ac de presumíveis zigotos 5 h.p.a dos grupos controle e tratados com VPA. (C-D) Imunocitoquímica para H3K9ac de conjuntos citoplasto-célula do grupo controle (C) e tratado com VPA (D). (E-F) Imunocitoquímica para H3K9ac de presumíveis zigotos 5 h.p.a. dos grupos controle (E) e tratado com VPA (F). O asterisco (*) denota diferença entre os grupos controle e tratados com VPA ($P = 0.03$). Todas imagens foram tiradas em objetiva de mesmo aumento (200x).

4.5 Elevados níveis de acetilação das histonas em células doadoras não tem efeito sobre o desenvolvimento pré e pós-implantacional de clones

Uma vez que as células tratadas com VPA mostraram maiores níveis de acetilação das histonas, elas foram utilizadas como doadoras de núcleo na TNCS para avaliar os efeitos da acetilação nas células doadoras sobre as taxas de desenvolvimento (Tabela 1). Um total de 254 embriões clonados foram produzidos em 4 rotinas experimentais, sendo 180 do grupo controle e 168 do grupo tratado com VPA, mas não foram observadas diferenças nas taxas de fusão, clivagem e blastocisto entre os grupos experimentais.

Tabela 1 - Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com VPA sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional de embriões clones

Grupos	Oócitos N	Embriões Fundidos N (%)	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)
Controle	180	139 (77.22)	112 (80.57)	44 (31.65)
VPA	168	115 (68.45)	90 (78.26)	38 (33.04)

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente. Taxa de Fusão: número de embriões fundidos/número de embriões reconstruídos. Taxa de Clivagem: número de embriões clivados/número de embriões fundidos. Taxa de Blastocisto: número de blastocistos/número de embriões fundidos.

Embora estes achados indicam que o tratamento das células doadoras de núcleo com VPA não afetam o desenvolvimento dos embriões de SCNT, os blastocistos produzidos de ambos os grupos foram transferidos para receptoras para avaliar se o tratamento afetava o desenvolvimento pós-implantacional (Tabela 2). Sessenta e quatro blastocistos, 34 do grupo controle e 30 do grupo tratado foram transferidos individualmente para receptoras sincronizadas. Embora um menor número de gestações foram obtidas dos embriões gerados com células doadoras de núcleo tratadas com VPA, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos controle e tratados em qualquer estágio durante a gestação. Isto confirma

que o tratamento das células doadoras tratadas com VPA não afetou as taxas de desenvolvimento de bovinos clonados.

Tabela 2 - Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com VPA sobre o desenvolvimento pós-implantacional de embriões clones

Grupos	Embriões transferidos (N)	Gestações N (%)				Bezerros Nascidos
		Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 270	Dia 289
Controle	34	7 (20.58)	3 (8.82)	3 (8.82)	3 (8.82)	3 (8.82)
VPA	30	6 (20.00)	2 (6.66)	2 (6.66)	2 (6.66)	1 (3.33)

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente. Taxa de Gestação: número de gestações/número de embriões transferidos.

4.6 Análise do estado de saúde dos bezerros clonados pós-nascimento

Cinco bezerros nasceram após a TNCS, dois do grupo VPA e três do grupo controle (Tabela 2). Uma receptora gestante de um feto do grupo VPA mostrou sinais de hidroalantóide severa no dia 270 de gestação (Figura 7A). Nós realizamos uma cesárea de emergência, e obtivemos um bezerro natimorto, apesar dos cuidados intensivos e tentativas de ressuscitação. O bezerro nasceu com o cordão umbilical aumentado de tamanho e ascite (Figura 7B). Os outros 4 bezerros desenvolveram a termo, e foram realizadas cesáreas no dia 289 de gestação. Entre estes, o bezerro restante do grupo VPA apresentou logo após o nascimento atonia intestinal e morreu 12 horas após devido a complicações gastrointestinais. Um bezerro do grupo controle, mostrou pouca viabilidade após o nascimento, recebeu cuidado intensivo, incluindo suplementação intranasal de oxigênio, e colostro via sonda nasoentérica, mas morreu 7 dias após o nascimento de septicemia secundária a onfalite. Os outros 2 bezerros do grupo controle não tinham nenhuma anormalidade aparente no momento do nascimento, mostraram reflexo de sucção e ingeriram colostro com vigor. Ambos tiveram os parâmetros clínicos monitorados (glicemia, frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal, e concentração sanguínea dos gases) durante as primeiras 24 h. Após este período, como eles não mostraram nenhuma anormalidade clínica, foram colocados em uma baia limpa e

ventilada. No momento que nós estávamos escrevendo esta tese, os bezerros sobreviventes (ambos do grupo controle) estavam com 13 meses de vida, saudáveis e normais quando comparados com outros bezerros de mesma idade derivados de reprodução natural. É digno notar que entre os dois bezerros que sobreviveram, um é morfologicamente normal, ajustou todos os parâmetros vitais e mamou na receptora (Figura 7D) mais rápido que o outro sobrevivente. Surpreendentemente, quatro bezerros (dois do grupo controle e dois do grupo tratado com VPA) tinham algum grau de braquignatismo (Figura 7B e 7E). Além disso, o bezerro sobrevivente que tinha braquignatismo, possuía também monorquidismo (Figura 7F).

Figura 7 - Análise dos bezerros clonados pós nascimento

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Vaca receptora de embrião do grupo tratado com VPA mostrando sinais de hidroalantóide severa no dia 270 de gestação. (B) Bezerro natimorto proveniente do grupo tratado com VPA com cordão umbilical aumentado e ascite (seta branca) e braquignatismo (seta vermelha). (C) Bezerros viáveis derivados do grupo controle. (D) Bezerro do grupo controle mamando, foto destacando a correta morfologia da mandíbula (seta branca). (E) Mandíbula de um bezerro clonado do grupo controle com braquignatismo moderado (seta branca). (F) Foto destacando a região inguinal do bezerro do grupo controle evidenciando monorquidismo.

5 DISCUSSÃO

Quase duas décadas se passaram desde que o primeiro mamífero foi clonado a partir de células doadoras de um animal adulto (WILMUT et al., 1997). Ainda, a TNCS continua sendo um processo ineficiente em que menos que 10% dos embriões transferidos para receptoras resultam no nascimento de clones viáveis (WILMUT et al., 2002; YANG et al., 2007b; GURDON; MELTON, 2008). Entre os fatores afetando a eficiência da TNCS, a compactação da cromatina, é acreditada ser um dos principais desafios para se reprogramar as células doadoras, uma vez que ela age como uma barreira epigenética para a completa reprogramação nuclear (GURDON; WILMUT, 2011; PASQUE et al., 2011). Inibidores das histonas deacetilases (HDACi), tais como o VPA são moléculas que aumentam os níveis globais de acetilação das histonas (HEZRONI; SAILAJA; MESHORER, 2011), e o tratamento de células doadoras de núcleo com HDACi tem sido relatado efetivamente aumentar a eficiência da clonagem *in vitro* (ENRIGHT et al., 2003; SHI et al., 2003). Deste modo, nós tínhamos a hipótese de que o tratamento de células doadoras de núcleo com VPA deveria aumentar os níveis globais de acetilação das histonas, levando estas a um estado de “cromatina aberta”. O uso destas células na TNCS poderia resultar em melhores taxas de desenvolvimento, uma vez que seus núcleos eram esperados serem mais acessíveis aos fatores que causam a reprogramação (HEZRONI; SAILAJA; MESHORER, 2011; PASQUE et al., 2011). Para testar esta hipótese, nós investigamos o efeito do tratamento das células doadoras de núcleo com VPA sobre a proliferação/viabilidade celular, remodelamento epigenético, expressão gênica, e desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos bezerros clonados derivados destas. Nosso resultados mostraram que, embora o tratamento com VPA aumenta a proliferação/viabilidade celular, expressão dos genes *PPARGC1A* e *IGF2R*, e os níveis de H3K9ac nas células doadoras de núcleo, não foi observado efeito sobre a eficiência da TNCS quando as células tratadas foram usadas como doadoras de núcleo.

A viabilidade das células usadas como doadoras de núcleo é um ponto crucial na TNCS, uma vez que seu núcleo guia o desenvolvimento dos embriões de TNCS após a reconstrução dos oócitos. Estudos anteriores mostraram que o desenvolvimento de clones é comprometido negativamente quando células

doadoras de núcleo são tratadas com agentes modificadores de cromatina (AMCs) que comprometem a distribuição do ciclo celular, características morfológicas e proliferação celular (ENRIGHT et al., 2003, 2005; DAS et al., 2010; SANGALLI et al., 2012). Por isso, fibroblastos doadores de núcleo foram tratados por 24 h com concentrações crescentes de VPA (1, 2 e 5 mM) e avaliados baseados no ensaio de MTT. Uma vez que todas doses resultaram em maiores taxas de proliferação/viabilidade de maneira significativa, 2 mM de VPA foi usado nos experimentos subsequentes visto que esta concentração tinha sido mostrada aumentar a taxa de produção de embriões clonados (COSTA-BORGES; SANTALÓ; IBÁÑEZ, 2010) e células tronco induzidas em camundongos (HUANGFU et al., 2008). É digno notar que baseado no ensaio de MTT, o tratamento com VPA aumentou a proliferação/viabilidade enquanto estas células não eram esperadas proliferar devido ao uso da privação de soro para sincronizar o ciclo celular (CAMPBELL, 1999; MIRANDA et al., 2009). Entretanto, este aumento pode ser causado por um efeito colateral do VPA sobre o metabolismo celular, uma vez que o ensaio de MTT é baseado na atividade metabólica de enzimas que reduzem o sal de tetrazólio (MOSMANN, 1983). De acordo com um artigo recente, a inibição das HDAC dobrou a atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo intermediário celular (ZHAO et al., 2010b). *PPARGC1A* é um coativador transcricional com um papel central na biogênese mitocondrial e regulação do metabolismo nas células (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012). Os achados de que o tratamento com VPA aumentou a expressão de *PPARGC1A* suporta seus efeitos sobre o metabolismo celular como anteriormente relatado (AOUALI et al., 2009; CHIANG et al., 2013). Baseados nestes achados, 2 mM de VPA foi encontrada ser uma concentração adequada para ser usada nos experimentos subsequentes.

Em um segundo experimento nós confirmamos o efeito do VPA sobre a acetilação das histonas pela avaliação dos fibroblastos tratados com 2 mM de VPA por 24 h em comparação as células não tratadas. Além disso, visto que o VPA tem sido demonstrado causar demetilação no DNA (DETICH; BOVENZI; SZYF, 2003), os níveis globais de metilação do DNA foram avaliados, mas não foi observado diferença entre as células controle e tratadas. Devido ao mecanismo de ação do VPA, que causa uma demetilação através da estimulação de uma demetilase ao DNA (DETICH; BOVENZI; SZYF, 2003), nós acreditamos que um tratamento mais prolongado poderia ser necessário a fim de se obter níveis detectáveis de

demetilação do DNA. Em seguida, nós tínhamos a hipótese de que os efeitos do tratamento com VPA poderia persistir durante o desenvolvimento embrionário, nós tentamos confirmar que os maiores níveis de acetilação das células doadoras de núcleo eram mantidos após a transferência nuclear. Entretanto, níveis similares de acetilação das histonas foram encontrados entre os embriões clonados produzidos com as células controle e tratadas. Além disso, um decréscimo significativo nos níveis de acetilação das histonas foi encontrado nos presumíveis zigotos 5 h.p.a. quando fibroblastos tratados com VPA foram utilizados como doadores de núcleo. Isto contrasta com um relato em camundongos, no qual as modificações nas histonas causadas pelo tratamento de embriões de 8 células com VPA foram mantidos ao menos até o estágio de blastocisto (VERMILYEA; O'NEILL; TURNER, 2009). Por outro lado, é sabido que os oócitos possuem atividades enzimáticas especiais, tais como enzimas que causam modificações nas histonas e demetilação do DNA (GURDON; WILMUT, 2011), que são responsáveis por reprogramar o epigenoma do espermatozóide após a fertilização (JULLIEN et al., 2011). Gao et al. mostrou que a reprogramação por transferência nuclear usa o mesmo programa de desenvolvimento que é normalmente utilizado após a fecundação, chamado por estes autores como processo *"erase-and-rebuild"* (GAO et al., 2007). Além disso, nós especulamos que o oócito pode ter apagado as marcas epigenéticas trazidas pelo núcleo transferido, para reestabelecer um novo programa de desenvolvimento. De acordo com nossos dados, este processo começa imediatamente após a transferência nuclear, uma vez que não foi vista diferença entre os níveis de acetilação entre os grupos controle e tratados imediatamente antes da ativação artificial (aproximadamente 1 a 2 h após a fusão do fibroblasto com o citoplasto receptor). A habilidade do oócito de reverter os níveis de acetilação comparados ao grupo controle (5 h.p.a.), levantam questões sobre a relevância do pré-tratamento de células doadoras de núcleo com AMCs. Enright et al. também encontrou hipoacetilação em embriões de TNCS produzido após o tratamento de células doadoras de núcleo com TSA (ENRIGHT et al., 2003). Os autores sugerem que isto foi causado por um efeito rebote do tratamento com a droga, visto que os efeitos dos HDACis são reversíveis (ENRIGHT et al., 2003). Em coelhos, resultados similares foram encontrados após o tratamento com NaBu e os autores concluíram que as os padrões aberrantes das marcas epigenéticas em clones não podem ser corrigidos pelo tratamento com HDACis (YANG et al., 2007a). Em resumo, embora o

tratamento das células doadoras de núcleo com VPA causou hiperacetilação das histonas, este estado epigenético foi revertido após a reconstrução dos oócitos resultando em presumíveis zigotos do grupo tratado com menores níveis de H3K9ac que o grupo controle.

Em um terceiro experimento, nós investigamos os efeitos do tratamento com VPA sobre a expressão gênica em fibroblastos. Foi relatado que o tratamento com VPA, mesmo por um curto período de tempo, causou um efeito significativo sobre a expressão gênica global em células em cultivo (FELISBINO; TAMASHIRO; MELLO, 2011; HEZRONI; SAILAJA; MESHORER, 2011). Uma vez que o tratamento das células doadoras de núcleo tem sido relatados melhorar as taxas de TNCS (SHI et al., 2003; SELOKAR et al., 2013), nós testamos a hipótese de que este efeito poderia ser mediado, entre outros fatores, por um efeito do VPA sobre a expressão de genes fundamentais a TNCS. Visto que a apropriada expressão do *POU5F1* (BORTVIN et al., 2003) e *IGF2R* (SMITH et al., 2012) durante a embriogênese inicial é crítico para o sucesso da TNCS, nós avaliamos se a expressão destes seria alterada em fibroblastos tratados com VPA. Nós não encontramos efeito do tratamento sobre a expressão do *POU5F1*, mas o VPA aumentou a expressão do *IGF2R* comparado as células não tratada. O *POU5F1* desempenha um papel essencial controlando a pluripotência celular e por isso é um fator chave na reprogramação nuclear em TNCS (BOIANI et al., 2002). Foi demonstrado que o tratamento de células musculares com VPA aumentou a expressão de *POU5F1* (TENG et al., 2010). Deste modo, a TNCS poderia se beneficiar de uma superexpressão de *POU5F1* em células doadoras, já que os embriões produzidos por TNCS frequentemente falham em expressar este gene (BORTVIN et al., 2003). Entretanto, como nós observamos que o VPA não afetou a expressão do *POU5F1*, nós acreditamos que outras modificações epigenéticas, não a acetilação das histonas, estão envolvidas no controle da expressão do *POU5F1*, como a metilação do DNA por exemplo (SIMONSSON; GURDON, 2004). Com relação ao *IGF2R*, este gene desempenha um papel importante como um efector negativo no crescimento fetal, uma vez que ele promove o sequestro do *IGF2* dentro dos lisossomos seguidos por degradação (LAU et al., 1994; LUDWIG et al., 1996). Tem sido hipotetizado que a desregulação de genes *imprinted* tais como o *IGF2R* são a causa das baixas taxas de desenvolvimento observada na TNCS (SMITH et al., 2012), e alterações da expressão do *IGF2R* tem sido frequentemente associadas aos

problemas comumente observados em embriões clonados (PERECIN et al., 2009). Por exemplo, em ovelhas embriões partenogenéticos que expressam baixos níveis de *IGF2* e altos níveis de *IGF2R* e *H19*, tem crescimento retardado quando comparados à embriões controles (FEIL et al., 1998; HAGEMANN et al., 1998; YOUNG et al., 2003). De modo contrário, a expressão reduzida do *IGF2R* em embriões ovinos cultivados in vitro é associado com a Síndrome da Cria Gigante (YOUNG et al., 2001). Baqir et al. observou que a maioria dos genes imprinted tem a sua expressão aumentada seguindo a exposição de células-tronco embrionárias de camundongo à TSA (BAQIR; SMITH, 2006). Interessantemente, eles também encontraram que a expressão de vários genes *imprinted* permaneciam alto, e em alguns casos, aumentava mais ainda, após a remoção da droga ou mesmo após a passagem das células em cultivo, indicando um efeito duradouro e retardado do tratamento sobre a expressão gênica (BAQIR; SMITH, 2006). Neste trabalho nós confirmamos o efeito do VPA causando um aumento na expressão de um gene *imprinted*, fornecendo evidências adicionais de que a acetilação é envolvida na regulação dos genes *imprinted* (HU et al., 2000; BAQIR; SMITH, 2006). O maior nível de expressão do *IGF2R* induzido pelo tratamento das células doadoras de núcleo poderia afetar a TNCS uma vez que as modificações epigenéticas induzidas pelo VPA sobre o *IGF2R* poderiam ter um efeito duradouro sobre o desenvolvimento (BAQIR; SMITH, 2006). Entretanto, baseado nos nossos resultados nós podemos inferir que este aumento na expressão não causou diferenças observáveis entre os grupos. Concluindo, o tratamento das células doadoras de núcleo com VPA resultou em aumento na expressão do *IGF2R* sem afetar a expressão do *POU5F1*.

Embora a hiperacetilação causada pelo VPA nas células doadoras de núcleo foi revertida após a transferência nuclear, nós decidimos avaliar o desenvolvimento dos embriões clonados para posteriormente caracterizar os efeitos do VPA na TNCS. É possível que algumas das modificações induzidas pelo VPA sobre células doadoras de núcleo (ex. superexpressão do *IGF2R*) permaneçam após a transferência nuclear, com um consequente efeito sobre a eficiência da clonagem. Vários grupos tem relatado taxas aumentadas de TNCS quando células doadoras foram tratadas com HDACis, incluindo o VPA (SELOKAR et al., 2013), TSA em bovinos (ENRIGHT et al., 2003; DING et al., 2008) e NaBu em bovinos (SHI et al., 2003) e coelhos (YANG et al., 2007a). Ainda, neste experimento nós não encontramos efeito das células doadoras tratadas com VPA sobre o

desenvolvimento pré-implantacional de embriões de TNCS. Embora surpreendente, este achado está em concordância com um trabalho anterior no qual o NaBu foi usado para produzir clones de suínos (DAS et al., 2010). Este trabalho relata que o tratamento de células doadoras com NaBu resultou em hiperacetilação das histonas, mas o uso destas células na TNCS não afetou o desenvolvimento de embriões clonado. Estes resultados contraditórios fornecem evidências que os efeitos dos AMCs podem divergir dependendo de vários fatores, incluindo a espécie e o sistema de reprogramação (ex. SCNT ou iPSCs). Esta noção é suportada por um trabalho recente com camundongos clonados o qual mostrou que vários HDACis tais como TSA, scriptaid, SAHA e oxamflatina reduziram as taxas de apoptose em blastocistos e melhoraram a taxa de desenvolvimento a termo, enquanto o VPA não teve efeito sobre a eficiência da TNCS (ONO et al., 2010). Os autores argumentaram que o VPA é um inibidor das HDAC de classe I e IIa, enquanto os outros são inibidores das HDAC classe I e IIa/b, sugerindo que a inibição da HDAC classe IIb é um passo chave para a reprogramação com sucesso no camundongo (ONO et al., 2010). Contrastando com isso, Costa-Borges et al. encontraram que o VPA melhorou o desenvolvimento *in vitro*, a qualidade dos blastocistos, e o desenvolvimento a termo em camundongos clonados, em níveis semelhantes a TSA (COSTA-BORGES; SANTALÓ; IBÁÑEZ, 2010). O tratamento com VPA também melhorou o desenvolvimento pré-implantacional de bovinos (XU et al., 2012) e suínos (KIM et al., 2011) quando os embriões clonados foram tratados durante o cultivo *in vitro*. O tratamento resultou em um aumento das taxas de blastocisto e número de células na massa celular interna (KIM et al., 2011; XU et al., 2012). Selokar et al mostrou que o tratamento das células doadoras de núcleo com VPA melhorou a produção de blastocistos bovinos de TNCS, reduziu a apoptose e os níveis de metilação da H3K9me3 similar a aqueles de embriões derivados de fertilização *in vitro* (SELOKAR et al., 2013). Enquanto estes resultados diferem dos nossos, deve ser notado que Selokar et al. usou a clonagem pelo método de “handmade”, a qual é caracterizada por diferenças significantes na técnica comparando a usada no presente estudo, o que pode explicar as diferenças observadas no desenvolvimento pré-implantacional. Além disso, o VPA foi recentemente encontrado regular a pluripotência em iPSCs, aumentando a eficiência como medido pelo número de colônias, e aumento da expressão de genes de pluripotência (HUANGFU et al., 2008). Em resumo, o efeito de AMCs tais como o VPA sobre a TNCS não são claros (AKAGI; GESHI; NAGAI,

2013), mas neste experimento nós não encontramos efeito do VPA sobre as taxas de desenvolvimento em embriões de TNCS.

Considerando que o VPA poderia ter afetado os embriões de TNCS mais tarde durante o desenvolvimento, os blastocistos produzidos foram transferidos para receptoras para avaliar o desenvolvimento pós-implantação. A clonagem de bovinos por TNCS é tipicamente associada com uma alta incidência de falhas gestacionais durante todo o período (ARNOLD et al., 2008; CHAVATTE-PALMER et al., 2012). Nosso dados estão de acordo com relatos anteriores, mostrando que a maioria das gestações estabelecidas (60-70%) foram perdidas por volta do período da implantação (HILL et al., 2000; SMITH et al., 2012). Em bovinos clonados, as perdas que ocorrem entre os dias 30 e 60 de gestação são frequentemente associados a anomalias morfológicas (placentomegalia e vascularização defeituosa) e funcionais (esteroidogênese) nas placentas. Com relação ao VPA, a ausência de efeitos do seu tratamento foi visto sobre o desenvolvimento pós-implantacional, uma vez que as taxas de falhas gestacionais entre os dias 60 e 270 e taxa de desenvolvimento a termo não diferiu entre os grupos. Estes resultados inesperados suportam a hipótese de que todas as modificações induzidas pelo tratamento com VPA foram sem efeito para o desenvolvimento após o estágio de blastocisto ou revertidas após a transferência de núcleo. Além disso, enquanto dois de um total de três clones produzidos com células não tratadas eram saudáveis no nascimento, os dois clones derivados das células tratadas com VPA morreram após a cesárea. Isto destaca a importância de se avaliar o desenvolvimento pós-implantacional e taxa de sobrevivência quando AMCs são empregados na TNCS. Isto está de acordo com o trabalho de Kang et al. com suínos, no qual estes demonstraram que o VPA melhorou o desenvolvimento *in vitro* de embriões clonados, mas não a sobrevivência dos animais até a idade adulta (KANG et al., 2013). Interessantemente, no nosso trabalho, quatro dos cinco bezerros produzidos por TNCS (dois de células controle e dois de células tratadas) apresentaram braquignatismo. Esta característica é amplamente aceita como sendo uma anormalidade congênita e herdável (JOHNSON et al., 2010). Entretanto, o touro cuja célula doadora de núcleo foi coletada não apresentava este fenótipo. Nós especulamos que o ambiente de cultivo *in vitro* ou um processo de reprogramação nuclear incompleto pode ter ocasionado esta anormalidade. Em um estudo anterior, Johnson et al. também relatou a ocorrência de braquignatismo em potros derivados de TNCS, característica

fenotípica que não era presente no equino usado para derivar a célula doadora (JOHNSON et al., 2010). De modo surpreendente, um dos bezerros viáveis, além de braquignatismo, tinha também monorquidismo, enquanto o outro não possuía anormalidades visíveis. Após o nascimento, o bezerro sem anormalidades, ficou de pé, ingeriu colostro e ajustou seus parâmetros fisiológicos mais rápido que o outro portando braquignatismo e monorquidismo. Isto sugere que o processo de reprogramação nuclear é estocástico, com bezerros derivados da mesma linhagem celular apresentando níveis variados de “reprogramação” e viabilidade. Em resumo, o tratamento das células doadoras de núcleo com VPA não afetou as taxas de desenvolvimento resultando em um bezerro natimorto e um bezerro que sobreviveu somente 12 h após o nascimento.

Concluindo, evidências acumuladas sugerem que os AMCs são altamente importantes para auxiliar na reprogramação nuclear, com um consequente aumento na eficiência de TNCS em camundongos (OGURA; INOUE; WAKAYAMA, 2013). Em bovinos o uso de AMCs permanece ainda altamente controverso (AKAGI; GESHI; NAGAI, 2013; GALLI et al., 2014). De modo geral, nossos resultados mostraram que apesar das alterações causadas nos fibroblastos pelo tratamento com VPA, o uso destas como doadoras de núcleo na TNCS não melhorou o desenvolvimento pré- e pós-implantacional em clones de bovinos. No futuro, será interessante dissecar o papel que os AMCs tem nas células doadoras e nos embriões clonados, para entender os seus mecanismos de ação e otimizar o seu uso.

REFERÊNCIAS

AKAGI, S.; GESHI, M.; NAGAI, T. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 3, p. 191–9, mar. 2013.

AOUALI, N.; PALISSOT, V.; EL-KHOURY, V.; MOUSSAY, E.; JANJI, B.; PIERSON, S.; BRONS, N. H. C.; KELLNER, L.; BOSSELER, M.; VAN MOER, K.; BERCHEM, G. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists potentiate the cytotoxic effect of valproic acid in multiple myeloma cells. **British Journal of Haematology**, v. 147, n. 5, p. 662–71, dez. 2009.

ARNOLD, D. R.; FORTIER, A. L.; LEFEBVRE, R.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; SMITH, L. C. Placental insufficiencies in cloned animals - a workshop report. **Placenta**, v. 29 Suppl A, p. S108–10, mar. 2008.

AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. Pt 21, p. 4963–71, 1 nov. 2012.

BAQIR, S.; SMITH, L. C. Inhibitors of histone deacetylases and DNA methyltransferases alter imprinted gene regulation in embryonic stem cells. **Cellular Reprogramming**, v. 8, n. 3, p. 200–213, 2006.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHÖLER, H. R.; MCLAUGHLIN, K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. **Genes & Development**, v. 16, n. 10, p. 1209–19, 15 maio 2002.

BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, D.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, D.; JAENISH, R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. **Development**, v. 130, n. 8, p. 1673–1680, 15 abr. 2003.

CAMPBELL, K. H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. **Cloning**, v. 1, n. 1, p. 3–15, jan. 1999.

CHAVATTE-PALMER, P.; CAMOUS, S.; JAMMES, H.; LE CLEAC'H, N.; GUILLOMOT, M.; LEE, R. S. F. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v. 33, p. S99–S104, fev. 2012. Supplement.

CHIANG, M.-C.; CHENG, Y.-C.; LIN, K.-H.; YEN, C.-H. PPAR γ regulates the mitochondrial dysfunction in human neural stem cells with tumor necrosis factor α . **Neuroscience**, v. 229, p. 118–29, 15 jan. 2013.

COSTA-BORGES, N.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. Comparison between the Effects of Valproic Acid and Trichostatin A on the In Vitro Development, Blastocyst Quality, and Full-Term Development of Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 4, p. 437–446, 2010.

DAS, Z. C.; GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their in vitro development in pigs. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, p. 95–104, 2010.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development : Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13734–13738, 2001.

DETICH, N.; BOVENZI, V.; SZYF, M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27586–92, 25 jul. 2003.

DING, X.; WANG, Y.; ZHANG, D.; GUO, Z.; ZHANG, Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 622–30, 1 set. 2008.

ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 896–901, set. 2003.

ENRIGHT, B. P.; SUNG, L.-Y.; CHANG, C.-C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 944–8, abr. 2005.

FEIL, R.; KHOSLA, S.; CAPPAL, P.; LOI, P. Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep. **Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 9, n. 10, p. 831–4, out. 1998.

FELISBINO, M. B.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; MELLO, M. L. S. Chromatin

remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. **PloS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29144, jan. 2011.

GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 138–51, 1 jan. 2014.

GAO, T.; ZHENG, J.; XING, F.; FANG, H.; SUN, F.; YAN, A.; GONG, X.; DING, H.; TANG, F.; SHENG, H. Z. Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Cell Research**, v. 17, n. 2, p. 135–50, fev. 2007.

GASPAR-MAIA, A.; ALAJEM, A.; MESHORER, E.; RAMALHO-SANTOS, M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 36–47, jan. 2011.

GIRALDO, A. M.; LYNN, J. W.; PURPERA, M. N.; GODKE, R. A. DNA Methylation and histone acetylation patterns in cultured bovine fibroblasts for nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 1524, n. April, p. 1514–1524, 2007.

GÖTTLICHER, M.; MINUCCI, S.; ZHU, P.; KRÄMER, O. H.; SCHIMPF, A.; GIAVARA, S.; SLEEMAN, J. P.; LO COCO, F.; NERVI, C.; PELICCI, P. G.; HEINZEL, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 6969–78, 17 dez. 2001.

GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science** (New York, N.Y.), v. 322, n. 5909, p. 1811–5, 19 dez. 2008.

GURDON, J. B.; WILMUT, I. Nuclear transfer to eggs and oocytes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 6, jun. 2011.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S. F.; TERVIT, H. R. In Vitro and Early In Vivo Development of Sheep Gynogenones and Putative Androgenones. **Molecular Reproduction and Development**, v. 2, n. 50, p. 154–162, 1998.

HEZRONI, H.; SAILAJA, B. S.; MESHORER, E. Pluripotency-related, valproic acid (VPA)-induced genome-wide histone H3 lysine 9 (H3K9) acetylation patterns in embryonic stem cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p.

35977–88, 14 out. 2011.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1787–94, dez. 2000.

HU, J.; PHAM, J.; DEY, I.; LI, T.; VU, T. H.; HOFFMAN, A. R. Allele-Specific Histone Acetylation Accompanies Genomic Imprinting of the Insulin-Like Growth Factor II Receptor Gene. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4428–4435, 2000.

HUANGFU, D.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; SNITOW, M.; CHEN, A. E.; MELTON, D. A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 795–7, jul. 2008.

JOHNSON, A. K.; CLARK-PRICE, S. C.; CHOI, Y.-H.; HARTMAN, D. L.; HINRICHS, K. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 9, p. 983–990, 2010.

JULLIEN, J.; PASQUE, V.; HALLEY-STOTT, R. P.; MIYAMOTO, K.; GURDON, J. B. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 7, p. 453–9, jul. 2011.

KANG, J.-D.; LI, S.; LU, Y.; WANG, W.; LIANG, S.; LIU, X.; JIN, J.-X.; HONG, Y.; YAN, C.-G.; YIN, X.-J. Valproic acid improved in vitro development of pig cloning embryos but did not improve survival of cloned pigs to adulthood. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 306–11.e1, 15 jan. 2013.

KIM, Y. J.; AHN, K. S.; KIM, M.; SHIM, H. Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing in vitro development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 47, n. 4, p. 283–9, abr. 2011.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N. Van; WAKAYAMA, S.; BUI, H.-T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 1, p. 183–9, 3 fev. 2006.

LAU, M. M.; STEWART, C. E.; LIU, Z.; BHATT, H.; ROTWEIN, P.; STEWART, C. L. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2953–2963, 15 dez. 1994.

LEE, M.-J.; KIM, S.-W.; LEE, H.-G.; IM, G.-S.; YANG, B.-C.; KIM, N.-H.; KIM, D.-H. Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 1, p. 34–42, fev. 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LUDWIG, T.; EGGENSCHWILER, J.; FISHER, P.; D'ERCOLE, A. J.; DAVENPORT, M. L.; EFSTRATIADIS, A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. **Developmental Biology**, v. 177, n. 2, p. 517–35, 1 ago. 1996.

MARCHION, D. C.; BICAKU, E.; DAUD, A. I.; SULLIVAN, D. M.; MUNSTER, P. N. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3815–22, 1 maio 2005.

MARTINEZ-DIAZ, M.; CHE, L.; ALBORNOZ, M.; SENEDA, M.; COLLIS, D.; COUTINHO, A.; EL-BEIROUTHI, N.; LAURIN, D.; ZHAO, X.; BORDIGNON, V. Pre- and Postimplantation Development of Swine-Cloned Embryos Derived from Fibroblasts and Bone Marrow Cells after Inhibition of Histone Deacetylases. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, 2010.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V.; KOMNINOU, E. R.; SANGALLI, J. R.; NETO, P. F.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 1, p. 88–97, jan. 2010.

MIRANDA, M. D. S.; BRESSAN, F. F.; ZECCHIN, K. G.; VERCESI, A. E.; MESQUITA, L. G.; MERIGHE, G. K. F.; KING, W. A.; OHASHI, O. M.; PIMENTEL, J. R. V.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. **Cloning and Stem Cells**, v. 11, n. 4, p. 565–73, dez. 2009.

MIYOSHI, K.; MORI, H.; MIZOBE, Y.; AKASAKA, E.; OZAWA, A.; YOSHIDA, M.; SATO, M. Valproic Acid Enhances In Vitro Development and Oct-3/4 Expression of Miniature Pig Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, p. 67–74, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, M. A; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in Bos indicus x Bos taurus recipients. **Theriogenology**, v. 62, n. 9, p. 1577–84, dez. 2004.

OGURA, A.; INOUE, K.; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1609, p. 20110329, jan. 2013.

ONO, T.; LI, C.; MIZUTANI, E.; TERASHITA, Y.; YAMAGATA, K.; WAKAYAMA, T. Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 6, p. 929–37, dez. 2010.

PASQUE, V.; JULLIEN, J.; MIYAMOTO, K.; HALLEY-STOTT, R. P.; GURDON, J. B. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. **Trends in Genetics**, v. 27, n. 12, p. 516–25, dez. 2011.

PERECIN, F.; MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MERIGHE, G. K. F.; MEIRELLES, F. V; GARCIA, J. M. Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 1, p. 76–85, jan. 2009.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. e36, maio 2002.

PHIEL, C. J.; ZHANG, F.; HUANG, E. Y.; GUENTHER, M. G.; LAZAR, M. A.; KLEIN, P. S. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734–41, 28 set. 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. Assumption-

free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, mar. 2003.

SANGALLI, J. R.; CHIARATTI, M. R.; DE BEM, T. H. C.; DE ARAÚJO, R. R.; BRESSAN, F. F.; SAMPAIO, R. V.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; KING, W. A.; MEIRELLES, F. V. Development to Term of Cloned Cattle Derived from Donor Cells Treated with Valproic Acid. **PloS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101022, jan. 2014.

SANGALLI, J. R.; DE BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. D. J.; DE ARAÚJO, R. R.; VALIM PIMENTEL, J. R.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. **Cellular Reprogramming**, v. 14, n. 3, p. 235–47, jun. 2012.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos Fa. **Current Biology**, v. 13, p. 1116–1121, 2003.

SELOKAR, N. L.; ST JOHN, L.; REVAY, T.; KING, W. A.; SINGLA, S. K.; MADAN, P. Effect of Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Treatment on Donor Cell Growth Characteristics, Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Handmade Cloned Bovine Embryo Production Efficiency. **Cellular Reprogramming**, v. 15, n. 6, 1 nov. 2013.

SHI, W.; HOEFLICH, A.; FLASWINKEL, H.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 301–309, jul. 2003.

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 10, p. 984–90, out. 2004.

SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A. K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A. C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 47, p. 107–14, ago. 2012. Supplement, 4.

SUZUKI, J.; THERRIEN, J.; FILION, F.; LEFEBVRE, R.; GOFF, A. K.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell

nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 947–56, maio 2011.

TENG, H. F.; KUO, Y.-L.; LOO, M. R.; LI, C. L.; CHU, T. W.; SUO, H.; LIU, H. S.; LIN, K. H.; CHEN, S. L. Valproic acid enhances Oct4 promoter activity in myogenic cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 4, p. 995–1004, 1 jul. 2010.

TURNER, B. M. Defining an epigenetic code. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 2–6, 2007.

VERMILYEA, M. D.; O'NEILL, L. P.; TURNER, B. M. Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. **PloS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6086, jan. 2009.

WEE, G.; KOO, D.-B.; SONG, B.-S.; KIM, J.-S.; KANG, M.-J.; MOON, S.-J.; KANG, Y.-K.; LEE, K.-K.; HAN, Y.-M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 6048–6057, 3 mar. 2006.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P. A.; DINNYES, A.; KING, T. J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D. N.; YOUNG, L. E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v. 419, n. 6907, p. 583–6, 10 out. 2002.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810–3, 27 fev. 1997.

XU, W.; WANG, Y.; LI, Y.; WANG, L.; XIONG, X.; SU, J.; ZHANG, Y. Valproic acid improves the in vitro development competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 14, n. 2, p. 138–45, abr. 2012.

YANG, F.; HAO, R.; KESSLER, B.; BREM, G.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 133, n. 1, p. 219–30, jan. 2007a.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J.-P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295–302, mar. 2007b.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.;

GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–154, 2001.

YOUNG, L. E.; SCHNIEKE, A. E.; MCCREATH, K. J.; WIECKOWSKI, S.; KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A. J.; WILMUT, I.; LOI, P.; FEIL, R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 12, p. 1433–1442, dez. 2003.

ZHAO, J.; HAO, Y.; ROSS, J. W.; SPATE, L. D.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M. S.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S. Histone Deacetylase Inhibitors Improve In Vitro and In Vivo Developmental Competence of Somatic Cell Nuclear Transfer Porcine Embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, p. 75–83, 2010a.

ZHAO, J.; ROSS, J. W.; HAO, Y.; SPATE, L. D.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M. S.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 525–30, set. 2009.

ZHAO, S.; XU, W.; JIANG, W.; YU, W.; LIN, Y.; ZHANG, T.; YAO, J.; ZHOU, L.; ZENG, Y.; LI, H.; LI, Y.; SHI, J.; AN, W.; HANCOCK, S. M.; HE, F.; QIN, L.; CHIN, J.; YANG, P.; CHEN, X.; LEI, Q.; XIONG, Y.; GUAN, K.-L. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. **Science** (New York, N.Y.), v. 327, n. 5968, p. 1000–4, 19 fev. 2010b.

**CAPÍTULO 2: CONECTANDO EPIGENÉTICA E METABOLISMO UTILIZANDO O
CORPO CETÔNICO ÁCIDO B-HIDROXIBUTÍRICO EM CÉLULAS E
EMBRIÕES BOVINOS**

6 INTRODUÇÃO

O estudo do processo de reprogramação nuclear é uma ferramenta poderosa para entender os princípios básicos que governam o desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e a reversão celular à um estado pluri/totipotente (GURDON, 2006). Células pluripotentes podem ser utilizadas para uma enormidade de fins, como terapia celular, modelagem de doenças *in vitro*, testes de fármacos, entre outras (YANG et al., 2007). Existem 3 diferentes maneiras de se reprogramar células: fusão celular, indução à pluripotência e transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (YAMANAKA; BLAU, 2010). Dentre estas a TNCS mostra-se um meio eficiente, visto que com ela é possível alcançar totipotência, evidenciado pela produção de animais clonados saudáveis, assim como o produção de linhagens *bona fide* de células-tronco (TACHIBANA et al., 2013).

Apesar de todas estas aplicações, a TNCS ainda tem limitações devido a ineficiência da técnica. O epigenoma dos embriões clonados apresentam enorme quantidade de alterações. Estas incluem perda da metilação em genes *imprinted*, incompleta demetilação do núcleo doador, e alterações nas modificações pós-traducionais das histonas (BOURC'HIS et al., 2001; SANTOS et al., 2003; WEE et al., 2006; PEAT; REIK, 2012). Em conjunto, todas estas desregulações levam a padrões alterados de expressão gênica e baixas taxas de desenvolvimento, tanto pré- como pós-implantacional (SMITH et al., 2012). Por isso, desde o nascimento da Dolly, há ~20 anos atrás, pouco progresso foi observado na produção de animais clonados saudáveis, com as taxas de sucesso estendendo-se de 0-5% em média (WILMUT et al., 2002; GURDON; MELTON, 2008).

Várias estratégias já foram tentadas objetivando melhorar o desenvolvimento dos animais clonados, como o uso de inibidores das metiltransferases do DNA ou das histonas, inibidores das histonas deacetilases (HDACis), tratamento das células somáticas com extratos de oócitos, entre outras (MONTEIRO et al., 2010). De todas as estratégias que mostraram algum sucesso, um característica marcante é que todas elas alteram o epigenoma de maneira global. Podemos mencionar o uso do HDACi TSA em camundongos (KISHIGAMI et al., 2006), knockdown do *Xist* (INOUE et al., 2010), injeção de mRNA da KDM4d em zigotos (MATOBA et al., 2014) e protaminização de células somáticas (IUSO et al., 2015). Curiosamente, a TSA que

apresenta melhoria significativa na clonagem de camundongos, mostra resultados contraditórios quando usada em bovinos (SANGALLI et al., 2012; HOSSEINI et al., 2016). Entre os possíveis motivos desta diferença observada seja o fato dos camundongos terem evoluído para que as decisões tomadas durante as especificações das linhagens iniciais, como o trofotoderma (TE) e massa celular interna (ICM) sejam mais rápidos comparados aos bovinos, coelhos, suínos e humanos (BERG et al., 2011). Outra razão pelo insucesso no uso de HDACis como a TSA em bovinos pode ser também os efeitos colaterais e tóxicos destas moléculas. Os HDACis são potentes inibidores do ciclo celular e tem sido usado com sucesso no tratamento de leucemias e mesmo tumores sólidos em humanos (GÖTTLICHER et al., 2001; KELLY; DE CARVALHO; JONES, 2010). Por esta razão, o uso de HDACis com baixa toxicidade celular é desejado.

Recentemente, o corpo cetônico Ácido β -Hidroxibutírico (BOHB), conhecido a décadas simplesmente como um fornecedor de energia em estados de privação de nutrientes ou exercício extenuante, foi descoberto ser um potente inibidor das histonas deacetilases tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (SHIMAZU et al., 2013a). O BOHB apresenta vantagem de ser um metabólito endógeno, por isso sem efeito tóxico para as células em concentrações dentro dos limites fisiológicos (CAHILL, 2006). Além disso, o BOHB foi demonstrado possuir função protetora contra o stress oxidativo, estimulando a expressão de genes responsáveis por eliminar radicais livres (SHIMAZU et al., 2013a). As espécies reativas de oxigênio são a bastante tempo conhecidas por danificar o DNA e comprometer o desenvolvimento embrionário *in vitro* (GUERIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Além disso, cada vez mais novas funções do BOHB são descobertas, tais como atuar como molécula sinalizadora através da superfície celular ou através de produtos decorrentes do seu metabolismo (i.e. acetil-CoA, Succinil-CoA e NAD⁺) (NEWMAN; VERDIN, 2014a). Estas funções sinalizadoras do BOHB servem para conectar o ambiente extracelular com a função celular, metabolismo e expressão gênica (NEWMAN; VERDIN, 2014b). A investigação destas novas funções tem importantes implicações para o entendimento dos problemas metabólicos sistêmicos e até mesmo reprodutivos causados pela elevação sérica dos corpos cetônicos.

Um exemplo clássico disso são os ruminantes, como os bovinos, que possuem corpos cetônicos em condições fisiológicas normais. Eles utilizam estes como fonte de energia para os tecidos periféricos, assim como para a síntese de

gordura do leite (BERGMAN, 1971). Entretanto, a indústria leiteira moderna visando produtividade, faz com que os animais desenvolvam cada vez mais uma condição clínica conhecida como cetose. A cetose é uma condição clínica marcada por elevação nos níveis circulantes dos corpos cetônicos, em decorrência do balanço energético negativo causado pela excessiva demanda de energia para a produção do leite. Nesta condição os animais apresentam sinais clínicos como letargia, problemas neurológicos, redução do apetite e da produção leiteira (BAIRD, 1982).

Como um problema secundário a este distúrbio metabólico, nas últimas décadas tem sido observado um declínio considerável na fertilidade das vacas leiteiras (WALSH et al., 2007). E os níveis elevados de corpos cetônicos tem sido postulados serem um dos responsáveis pela diminuição da qualidade oocitária e embrionária. Os ácidos graxos não-esterificados e os corpos cetônicos podem afetar o microambiente folicular, comprometendo a qualidade oocitária e do embrião resultante deste gameta (WATHES et al., 2007). Porém, os mecanismos moleculares pelos quais os corpos cetônicos agem sobre os embriões não são completamente entendidos. Baseado nisso, este estudo visa investigar o papel do corpo cetônico Ácido β -hidroxibutírico (BOHB) sobre o epigenoma de células e embriões bovinos. Nós temos a hipótese que o BOHB age como um inibidor da HDACs em bovinos, levando hiperacetilação global e consequentemente alteração no metabolismo e expressão gênica. Também, visto que a inibição das HDACs tem o potencial de aumentar a produção de animais clonados por TNCS, nós utilizamos o BOHB como uma ferramenta biotecnológica para testar se ocorre incremento nas taxas de desenvolvimento embrionário em embriões clonados cultivados na presença do BOHB.

Para testar nossa hipótese, neste estudo nós: 1- tratamos fibroblastos bovinos com BOHB e avaliamos o efeito do sobre o epigenoma, metabolismo celular e expressão gênica, 2- tratamos zigotos de embriões bovinos partenogenéticos ou clonados por TNCS e avaliamos alterações na acetilação das histonas, metabolismo energético, expressão gênica e taxas de desenvolvimento.

7 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados foram comprados da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), a menos que citado de outra maneira. Os procedimentos experimentais *in vitro* foram executados em incubadoras umidificadas, e mantidas a 38,5 °C em ar com 5% CO₂. Cada experimento consistiu de pelo menos três replicatas. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction).

7.1 Estabelecimento do cultivo primário de fibroblastos bovinos

As células doadoras de núcleo foram derivadas de uma novilha da Raça Girolando (*Bos taurus indicus*) de aproximadamente 14 meses de idade como descrito anteriormente (SANGALLI et al., 2014). Brevemente, uma biópsia de pele (1-2 cm²) foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de lâminas de bisturi e digeridas com 0,1% de collagenase por 3 h a 38,5°C. A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 5 min e o pellet celular foi ressuspensionado em Alpha Minimum Essential Medium (α-MEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina. As células foram plaqueadas em placas de petri de 35 mm e mantidas por 6 dias na incubadora para o estabelecimento do cultivo primário, e depois crescidas por mais duas passagens. Após isto, as células foram tripsinizadas da placa usando Tryple Express (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ressuspensionadas em α-MEM suplementado com 20% SFB, 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, colocadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

7.2 Diluição do corpo cetônico Ácido β -Hidroxibutírico

O Ácido β -Hidroxibutírico é uma molécula pequena e polar, sendo prontamente solúvel em água. Nós utilizamos o Ácido β -Hidroxibutírico (Sigma cat # 54920) diluído em água ultra pura para produzir a solução estoque, e em para cada experimento específico o BOHB foi diluído no meio de cultivo correspondente.

7.3 Tratamento dos fibroblastos bovinos com BOHB para avaliação da proliferação/viabilidade celular baseada no ensaio MTT

O ensaio de MTT foi realizado, como descrito anteriormente (SANGALLI et al., 2014), com algumas modificações. Os bovinos possuem níveis menores de glicose circulante (~40mg/dl) quando comparados com camundongos e humanos (~80-110 mg/dl). Por isso, nós utilizamos o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA cat # 11966-025) que não possui glicose na sua formulação, e suplementamos com 400 mg de glicose por litro, para se assemelhar/mimetizar as condições que os fibroblastos bovinos apresentam *in vivo* (MAPLESDEN; MCSHERRY; STONE, 1960). Para realizar o ensaio, um criotubo foi descongelado, e fibroblastos bovinos na terceira passagem foram plaqueados na densidade de 1×10^3 células/poço em placa de 96-poços em 200 μ l DMEM suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB), 400 mg/L de glicose e 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina. Após ~48 h do plaqueamento, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco, porém suplementado com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mM de BOHB ao meio de cultivo para realizar o tratamento por 12 h. Como controle de inibição de atividade das HDACs, nós utilizamos o potente inibidor de HDACs Trichostatin A (TSA) na concentração de 1 μ M pelo mesmo período.

Três horas antes do final do cultivo, 22 μ l de solução de 5 mg/ml de MTT foi adicionado em cada poço, para atingir a concentração final de 0,5 mg/ml de MTT. As células foram cultivadas em incubadora umidificada com 5% CO₂ a 38.5°C por 3h adicionais, para totalizar as 12h de tratamento. A solução de MTT foi removida, e 100 μ l de isopropanol acídico (0.04 M HCl em isopropanol absoluto) foi adicionado

em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. Cada placa foi lida usando um espectrofotômetro BMG Labtech Fluorstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância são expressos em unidades arbitrárias em relação ao grupo controle (sem adição de BOHB). O experimento foi repetido 3 vezes, e as células plaqueadas em quadruplicata por tratamento em cada repetição.

7.4 Tratamento das células doadoras de núcleo com BOHB para avaliação global dos níveis de H3K9ac por *Western Blot*

Western blot foi realizado para medir os níveis globais de acetilação da histona H3K9ac. Para isso, fibroblastos bovinos foram plaqueados na densidade de 25×10^4 células por placa de 35 mm, cultivados por 48 horas com o meio descrito acima, e tratados com 0 ou 6 mM de BOHB, assim como com 1 μ M de TSA (controle positivo para inibição de deacetilase). Proteína foi extraída dos fibroblastos usando o reagente TRIzol, seguindo as recomendações do fabricante e com algumas modificações. Brevemente, 1 mL de TRIzol foi adicionado diretamente na placa de cultivo de 35 mm para a lise das células. Em seguida, o TRIzol foi transferido para um Eppendorf de 1.5 mL, 200 microlitros de clorofórmio foi adicionado, e centrifugados por 15 minutos a 12000 x g para a remoção da fração aquosa contendo o RNA (armazenada para a análise da expressão gênica, ver abaixo). Na fração orgânica (contendo as proteínas), foi adicionado 1 mL de álcool isopropílico para precipitar as proteínas. As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugada por 12000 x g por 10 minutos a 4°C para sedimentar a proteína. O sobrenadante foi removido e descartado, e o *pellet* de proteínas lavado com uma solução de 0.3 M de hidrocloreto de guanidina em 95% de etanol. Para isso, 1.5 mL desta solução foi adicionado ao *pellet*, e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 7500 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, e esta lavagem foi repetida mais uma vez. Em seguida, 1.5 mL de etanol foi adicionado ao *pellet* de proteína, brevemente agitado com vortex e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida centrifugado por 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O etanol foi removido e

descartado, e o pellet secado em ar ambiente por 5-10 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado com 50 µl de solução de 8M de ureia. Esta solução foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4°C para sedimentar qualquer material insolúvel presente. O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi transferido para um tubo novo e a concentração proteica determinada pelo método de Bradford. A proteína foi armazenada a -20 até a realização do Western Blot.

As proteínas foram preparadas em tampão de corrida Laemmli Sample Buffer 4x (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA cat #161-0747) suplementado com 10% v/v de 2-mercaptoetanol (Sigma, cat # M-7154). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida 10% (SDS-PAGE), utilizando o *precast gel* Mini-Protean TGX (Bio Rad, cat # 456-1033). A eletroforese foi realizada em voltagem constante (100 V) por 70 minutos. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando o sistema Trans Blot Turbo Transfer Pack (Bio Rad, cat # 170-4156) acoplado ao sistema de transferência semi-seco Trans Blot Turbo Transfer System. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com TRIS com 0,1% de Tween (TBS-T) contendo 5% de BSA por uma hora a temperatura ambiente sobre agitação, para evitar a ligação de anticorpos em sítios inespecíficos. As membranas foram incubadas overnight a 4°C em TBS-T contendo 1% de BSA e anticorpo primário anti-H3K9ac (Sigma, cat # H9286) na diluição de 1:2000 ou anticorpo monoclonal Anti-β-Actina-Peroxidase (Sigma, cat # A3854) diluído 1:100000. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 x em TBS-T por 5 min, e incubadas com o anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado com HRP (Cell Signaling, cat # 7074S) na diluição de 1:3000 em TBST contendo 1% BSA por uma hora a temperatura ambiente. A membrana incubada com o anticorpo Anti-β-Actina não foi realizado este passo pois já era conjugado com HRP. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas 3x em TBST por 5 min, e revelados usando-se o sistema quimioluminescente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, cat # RPN 2232). As imagens foram capturadas usando câmera de CCD de alta resolução com o sistema ChemiDoc MP Image System Bio Rad. Cada experimento foi executado pelo menos três vezes para os fibroblastos bovinos. Para mensurar os níveis de expressão das proteínas, o volume das bandas foram medidos utilizando o Software Image Lab version 5.1 Bio-Rad laboratories. Para normalizar

as amostras, o volume da banda H3K9ac foi dividido pelo volume da sua respectiva banda de ACTB (H3K9ac/ACTB).

7.5 Western Blotting para detecção de H3K9ac em blastocistos clonados e partenogenéticos

Para a extração de proteínas de embriões e *western blot*, após o cultivo embrionário estes foram lavados 3x em PBS e transferidos para um microtubo de centrífuga com o mínimo volume possível. Em seguida ressuspensos em 500 µL de TRIzol, e extraídos exatamente conforme descrito acima, exceto que todas soluções foram reduzidas pela metade. O pellet proteico foi ressuspensionado com 7.5 µL de solução de 8M de ureia, misturado com 2.5 µL de Laemmli buffer 4x e toda a proteína resultante aplicada no gel. O WB foi realizado de maneira idêntica a descrita acima.

7.6 Análise dos níveis de H3K9ac em fibroblastos por imunocitoquímica

Fibroblastos bovinos foram plaqueados na densidade de 25×10^4 células por placa de 35 mm, cultivados por 48 horas com DMEM (ver composição acima), e tratados com 0 ou 6 mM de BOHB, assim como com 1 µM de TSA (controle positivo para inibição de deacetilase) por 12 horas. Após o término do cultivo, foram fixados com 4% de paraformaldeído por 12 minutos e foi realizada a imunocitoquímica (descrita abaixo).

7.7 Imunodetecção da H3K9ac em zigotos e células doadoras de núcleo

Imunocitoquímica para H3K9ac foi executada em presumíveis zigotos 12 horas pós ativação (h.p.a) e nos fibroblastos bovinos como descrito anteriormente,

com poucas modificações (SANGALLI et al., 2012). Presumíveis zigotos 12 h.p.a ou fibroblastos foram fixados em 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS por 12 minutos. Lavados 3x com PBS e permeabilizados com 1% de Triton X-100 por 20 minutos. Em seguida lavados 3x em PBS, e bloqueados em solução de PBS + 5% de BSA por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-H3K9ac (Sigma, cat # H9286) diluído na concentração 1:500 em PBS + 1% BSA overnight a 4°C com agitação. Como controle negativo, as amostras foram incubadas com Rabbit Polyclonal IgG (ABCAM cat # AB27478) no lugar do anticorpo primário. Depois as amostras foram lavadas 5x em PBS + 1% BSA e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit IgG (Life Tech, cat # A11008) diluído na concentração 1:500 em PBS + 1% BSA por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 5x em PBS + 1% BSA, e montadas sobre lâmina, usando a solução Prolong Gold Antifade Mountant (Life Tech, cat # P36935) contendo DAPI.

7.8 Análise dos níveis de H3K9ac em fibroblastos por microscopia de fluorescência

Para a análise das lâminas de fibroblastos foi utilizado o microscópio de epifluorescência (Axioplan; Carl Zeiss, Zeppelingstrasse, Germany). As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Zeiss MC 80 DX; Carl Zeiss), e os parâmetros utilizados para a captura das imagens foram iguais para todas as amostras. Seis imagens de uma monocamada de fibroblastos escolhidas em campos aleatórios de diferentes lâminas provenientes de 3 repetições foram avaliadas para cada grupo experimental para avaliar a acetilação das histonas. Núcleos individuais foram delimitados utilizando o software ImageJ (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Cerca de 90 núcleos foram delimitados (15 em cada imagem de fibroblastos para cada grupo experimental) e a intensidade média do sinal foi calculada usando o software ImageJ. A intensidade refere-se ao grau de brilho dos pixels (em uma escala de cinza: 0-255; sendo 0 = preto e 255 = branco), onde a maior intensidade de brilho indica maior reatividade imunocitoquímica.

7.9 Análise dos níveis de H3K9ac em Zigotos por microscopia confocal

Para a análise dos zigotos foi utilizado o microscópio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica, Soims, Germany). Nós utilizamos objetiva de 40 x, com resolução de 1024 x 1024, e um laser de argônio, cuja excitação e emissão foi 488 nm e 500–537 nm. Todas as imagens foram capturadas usando o mesmo poder do laser para captura, permitindo a comparação entre os grupos com relação a intensidade. O nível de acetilação foi analisado usando $n > 25$ imagens de presumíveis zigotos para cada grupo experimental. O núcleo dos zigotos foram delimitados utilizando o software ImageJ (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) e a intensidade média relativa de fluorescência calculada.

7.10 Transferência nuclear de células somáticas

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) foi executada conforme descrito anteriormente (SANGALLI et al., 2014). Brevemente, complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de ovários obtidos de abatedouros locais e selecionados baseados em características morfológicas. CCOs foram então submetidos a maturação *in vitro* (MIV), e os oócitos desnudados das células do *cumulus* por pipetagem de maneira suave. Os oócitos com o primeiro corpúsculo polar visível (CP) foram enucleados pela remoção do 1° CP e da placa metafásica (MII) por aspiração gentil usando uma pipeta de vidro de 15- μ m de diâmetro interno (ES transferTip; Eppendorf, Hamburg, Germany). Os oócitos enucleados foram reconstruídos pela injeção de um único fibroblasto dentro do espaço perivitelínico. O produto resultante (citoplasto + fibroblasto) foi fundido em solução de eletrofusão (0.28 M manitol, 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM HEPES e 0.05% BSA em água ultra pura) aplicando-se um pulso de corrente alternada (0.05 kV/cm por 5 s) e dois pulsos de corrente contínua (1.75 kV/cm por 45 μ s). Conjuntos citoplasto+fibroblasto (CF) que fundiram com sucesso foram artificialmente ativados 26 h após o início da

maturação *in vitro*. A ativação artificial foi executada pelo tratamento com 5 μ M de ionomicina por 5 min, lavados em solução de 3% de BSA e tratamento com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 h. Após a ativação, presumíveis zigotos foram lavados 3 vezes em meio SOF, e cultivados por 7 dias em SOF suplementado com 2.5% v/v de SFB, 0.5% albumina sérica bovina (BSA), 0.2 mM de piruvato de sódio e 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina. Para o experimento do tratamento dos Zigotos, ver seção “Tratamento de embriões clonados com BOHB” abaixo. As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas 48 e 168 horas pós ativação (h.p.a.), respectivamente. Em todos experimentos, embriões partenogenéticos foram gerados em paralelo e usados como controle.

7.11 Tratamento de presumíveis zigotos com BOHB

Durante a ativação artificial, os oócitos reconstruídos foram tratados (grupo BOHB) ou não (grupo Controle) com 6 mM de BOHB durante o período de 3 horas de incubação com o 6-DMAP (ver Transferência nuclear de células somática acima). Então, ambos os presumíveis zigotos, controle e tratados foram extensivamente lavados em SOF. Os presumíveis zigotos do grupo controle foram imediatamente cultivados em SOF como descrito acima, enquanto os tratados com BOHB, foram incubados em SOF suplementado com 6 mM de BOHB por um período extra de 9 horas (totalizando 12 horas pós início da ativação artificial). Depois, os presumíveis zigotos tratados foram extensivamente lavados em SOF (Figura 8 abaixo). Ambos os embriões do grupo controle e tratado foram avaliados para as taxas de desenvolvimento (clivagem e blastocistos). Além disso, no final do tratamento (12 horas pós início da ativação) os presumíveis zigotos (controle e tratados) foram, ao invés de cultivados, fixados em PFA a 4% em PBS para serem avaliados por imunocitoquímica (ver acima). Enquanto os blastocistos foram usados para análise de H3K9ac por Western Blotting e expressão gênica. A Figura 8 abaixo ilustra os experimentos realizados com os embriões clonados.

Figura 8 - Tratamento de embriões clonados com BOHB

Fonte: Sangalli, J. R., (2016)

Legenda: Esquema ilustrando o tratamento dos zigotos com BOHB e todos os experimentos subsequentes.

7.12 Produção de embriões por Fertilização *in vitro*

Para produzir embriões por fertilização *in vitro* (FIV), utilizados nos experimentos de expressão gênica, complexos cumulus-oócito (COCs) foram maturados por 24 horas. Ao término da maturação, COCs expandidos foram transferidos para gotas de 100 μ L de meio FIV-TALP suplementado com 6mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 30 μ g/mL de heparina, 18 μ M de penicilamina, 10 μ M hipotaurina, 1.8 μ M epinefrina, e 0.2 mM de piruvato de sódio. Sêmen de um touro Nelore foi utilizado, e espermatozoides móveis foram separados por gradiente de densidade em 45 e 90% (v/v) de Percoll. A concentração final de espermatozoide utilizado foi de 1×10^5 espermatozoides vivos por gota. Os oócitos e os espermatozoides foram co-incubados por 22 horas em incubadora a 38.5°C com 5 % de CO₂ em ar e máxima umidade. No fim do co-cultivo, os presumíveis zigotos foram lavados em FIV-TALP, e transferidos para o meio de cultivo embrionário SOF.

7.13 Análise da expressão gênica nos fibroblastos, blastocistos clonados e fertilizados in vitro

O RNA foi extraído dos embriões clonados (controle e tratado com BOHB) e fertilizados in vitro, assim como dos fibroblastos, utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, com poucas modificações. Para isso, um mix contendo 1000 µl de TRIzol, 25 µg de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX, USA) e 90 µl de água tratada com DEPC (dietileno pirocarbonato) foi adicionado em cada pool de embriões (8 por grupo, por replicata). Para os fibroblastos, 1 mL de TRIzol foi adicionado diretamente na placa. As amostras foram agitadas por vortex por 15 segundos, em seguida mantida por 2-3 minutos em temperatura ambiente. A fração aquosa contendo o RNA foi recuperada por centrifugação das amostras a 12000 x g por 15 minutos. A fração aquosa foi recuperada e transferida para um microtubo de 1.5 ml, e a fração orgânica armazenada a -80°C para extração das proteínas (ver acima). O RNA foi precipitado com a adição de 1 mL de álcool isopropílico na fração aquosa. As amostras foram homogeneizadas por inversão do tubo, incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e 20 minutos a -20°C. Para recuperar o RNA, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Os *pellets* resultante em cada amostra foram lavados com 1 mL de solução de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o etanol removido e os pellets permitidos secarem por ~5 minutos em temperatura ambiente. O RNA foi ressuspendido em 10 µl de água ultrapura, e tratados com DNase I (Invitrogen, cat #18068015) por 15 minutos em temperatura ambiente para evitar contaminação com DNA genômico. Após o tratamento, o RNA foi imediatamente utilizado em uma reação de transcrição reversa para gerar os cDNA usando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Tech cat # 4387406) de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenado a -20°C até o uso.

Os genes alvos encontram-se descritos na Quadro 2 abaixo. A média geométrica dos genes *RPL15*, *GUSB* e *PPIA* foram usados como genes endógenos ou de referência. Oligonucleotídeos iniciadores usados para PCR em tempo real foram desenhados usando o programa Primer Express software v.3.1 (Applied Biosystems) ou Primer-BLAST baseado em sequências disponíveis no GenBank

(Quadro 2). A quantificação relativa dos transcritos de mRNA específicos de cada gene foi executado em reações de 15- μ l contendo 0.2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores, 7.5 μ l POWER SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 4.5 μ l de água ultrapura e 2 μ l de cDNA diluído 8 vezes em água ultrapura. Todos os cDNAs específicos de cada gene amplificados para uma determinada amostra foram corridos em duplicata na mesma placa de PCR. O controle negativo foi sempre corrido em paralelo com as amostras usando 2 μ l de água ultrapura ao invés do cDNA. As seguintes condições de ciclagem foram aplicadas para amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos consistindo de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. A fluorescência do SYBR Green foi lida no final de cada passo de extensão (60°C). Experimentos pilotos usando 5 diferentes concentrações de cDNA (extendendo-se de 4 vezes até 64 vezes diluído) foram corridos para ajustar as condições dos experimentos com o PCR em tempo real. A amplificação de um produto único foi confirmada pela análise da curva de *melting*. Os dados são apresentados como $2^{-\Delta C_t}$, onde $\Delta C_t = (C_t \text{ gene de interesse} - C_t \text{ genes de referência (média cúbica)})$. Valores de C_t foram obtidos após retirar-se a média das duplicatas das amostras. Dados de expressão gênica de três replicatas biológicas por grupo são apresentadas para os embriões e 5 replicatas para os fibroblastos. O valor de $2^{-\Delta C_t}$ foi utilizado para a análise estatística (comparação das médias), e os dados são representados graficamente como expressão relativa (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

7.14 Ensaio bioluminescente para a detecção de ATP em zigotos

A mensuração dos níveis de ATP foram realizados em zigotos partenogenéticos tratados ou não com BOHB por 12 horas a partir do início da ativação artificial (protocolo descrito acima). Para isto, *pools* de 3 zigotos foram coletados em 2.5 μ l de PBS e armazenados em freezer -80 até o momento da mensuração. O ATP foi medido utilizando o kit ATP Cell Viability Bioluminescent Assay kit (cat # K254-200) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, um mix contendo 10 μ l de “ATP monitoring enzyme” e 90 μ l de “Nucleotide releasing buffer” foi preparado para cada amostra. Cem microlitros deste mix foi adicionado em cada poço em placa de 96 poços. A placa foi lida em leitor de luminescência

BMG Labtech Fluorstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) para a coleta da luminescência de background, estes dados foram chamados de “Dados A”. Em seguida, 47.5 µl de “Nucleotide releasing buffer” foi adicionado em cada microtubo contendo 3 zigotos partenogênicos, pipetados gentilmente e transferidos para a placa de 96 poços contendo o mix preparado no passo anterior. Após ~2 minutos de incubação, as amostras foram lidas no luminômetro, e os dados coletados chamados de “Dados B”. Uma curva padrão foi gerado em paralelo com as amostras, contendo 6 pontos (1.5, 0.75, 0.375, 0.188, 0.094 e 0.047 µM de ATP). Os valores de absorbância coletados em B foram subtraídos dos valores coletados em A (background) para obter os valores de absorbância corrigidos. Em seguida, foram plotados utilizando a equação desta curva e a concentração de ATP determinada. Dados provenientes de 19 pools de 3 zigotos de cada grupo foram analisados.

Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (RT-PCR)

(continua)

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Número de Acesso	Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados (5'-3')	Produto (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
GPX1	Glutathione peroxidase 1	NM_174076.3	F: CGGGTTCGAGCCCAACT	59	60
			R: GCGCCTTCTCGCCATTC		
IGF2R	Insulin-like growth factor 2 receptor	NM_174352.2	F: CAGGTCTTGCAACTGGTGTATGA	83	60
			R: ACGAAGCTGATGACGCTCTTG		
PPARGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	NM_177945.3	F: TGTGCTCTGTGTCACTGTGG	120	60
			R: GAGCAGCACACTCGATGTCA		
SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble	NM_174615.2	F: AAGATGAAGAGAGGCATGTTGGA	65	60
			R: GATGGCAACACCGTTTTTGTCT		
MT-CO1	Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	NC_006853.1	F: GATCCGTAATAATTACCGCCGTACT	85	60
			R: TTCCGGTCTGTTAATAGCATTGTGA		
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	NM_174602.2	F: CAAGAGAGTCGCAGACGGAG	135	60
			R: CCTGTCAGCTTCTTGCTGGT		
SLC2A3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	NM_174603.3	F: CTGGAAGAGGGGTCTCTGGA	101	60
			R: CAGAGGTGCGGTGACCTTC		
GUSB	glucuronidase, beta	NM_001083436.1	F: AGAGCGAGTACGGAGCAGATG	85	60
			R: AGCAGGCCTTTCTGGTACTCTTC		

(conclusão)

Símbol o do Gene	Nome do Gene	Número de Acesso	Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados (5'-3')	Produto (bp)	Temperatur a de anelamento (°C)	
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	NM_178320.2	F: GGTCCTGGCATCTTGTCAT		94	60
			R: TGCCATCCAACCACTCAGTCT			
<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15	NM_001077866. 1	F: CAAACGCCAGTTCCTAAGG		76	60
			R: TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT			
<i>SCD</i>	Stearoyl-CoA desaturase (delta- 9-desaturase)	NM_173959.4	F: GTGGAGTCACCGAACCTACA		86	60
			R: AAACGTCATTCTGGAACGCCA			
<i>SREBF 1</i>	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1	NM_001113302. 1	F: TGCTGACCGACATAGAAGACAT		81	60
			R: CGTAGGGCGGGTCAATAG			
<i>FOXO3 a</i>	Forkhead box O3	NM_001206083. 1	F: GCAGGGAGCGCGATATTG		76	60
			R: CGGGCACCATGAATCTGAA			
<i>SIRT1</i>	Sirtuin 1	NM_001192980. 1	F: TTGCAACAGCATCTTGCTG		90	60
			R: GACATCGAGGAACCACTGAT			
<i>SIRT3</i>	Sirtuin 3	NM_001206669. 1	F: TGGCGTTGTTTCCTCGTTCA		90	60
			R: CTGGAATACGAGGCCAGCG			
<i>MFN2</i>	Mitofusin 2	NM_001190269. 1	F: GTCGCTGTGCATGAACTGG		126	60
			R: GGTGACAAAGTGCTTGAGCG			
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	NM_001034036	F: CGGAAGGCTACTCCACGTTT		193	60
			R: TCACTGGTAAATTCCTAACACG A			
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_201527.2	F: TCTGTTGGTGTCCAAGGCTC		125	60
			R: AGCAGGGGGATAAGACCTGT			
<i>CPT1A</i>	Carnitine palmitoyltransferas e 1A	NM_001304989. 1	F: TACCGACTCACATCCAGGCG		129	60
			R: CGGAGCAGAGCGGAATCGTA			
<i>CPT1B</i>	Carnitine palmitoyltransferas e 1B	NM_001034349. 2	F: GGATGAGGAGTCTCACCCTAT G		133	60
			R: GCCGTTCTTGAAAGAGATGAGT G			
<i>CPT2</i>	Carnitine palmitoyltransferas e 2	NM_001045889. 2	F: TCGTGCCCCACTATGCACTACC		126	60
			R: CTGTTTTCTGAACTGGCTGTC A			
<i>HDAC1</i>	Histone deacetylase 1	NM_001037444. 2	F: TTACGACGGGGATGTTGGAA		136	60
			R: GGCTTTGTGAGGGCGATAGA			

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

7.15 Análise estatística

A análise estatística foi executada usando o sistema SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC) ou o Software JMP (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram testados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, e analisados como se segue. As taxas de desenvolvimento foram analisadas usando ANOVA de uma via. Os dados de MTT foram analisados por teste de Duncan. Dados de imunocitoquímica em zigotos foram analisados por Teste T de student, e em fibroblastos por teste de Tukey post-hoc. Análise de expressão gênica em embriões foram analisados por ANOVA de uma via, seguido por teste de Tukey post-hoc ou Teste T de student em fibroblastos. Dados de WB normalizados (razão H3K9ac/ACTB) não apresentavam homogeneidade de variâncias e passaram por transformação logarítmica (base 10) para ajustar os parâmetros de normalidade e homocedasticidade. Homogeneidade da variância foi testada por teste de Levene, e a normalidade por Shapiro-Wilk. Os dados transformados foram usados para ANOVA e teste de Tukey. Diferenças com probabilidades (P) < 0.05 foram consideradas significativas. No texto, os valores são apresentados como médias $\pm$ o erro padrão da média (EPM).

8 RESULTADOS

8.1 O Ácido β -Hidroxibutírico aumenta o metabolismo em fibroblastos bovinos

Para ganharmos “insights” sobre os efeitos do BOHB sobre o metabolismo celular, nós iniciamos os experimentos utilizando o ensaio do MTT. O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 4-diphenyl-tetrazolium bromide) é um ensaio para avaliar a atividade metabólica celular. O princípio deste ensaio consiste na adição do sal amarelo de tetrazólio no cultivo celular, o qual é reduzido em cristais de formazan de cor roxa por oxidoreduases celulares dependentes de NADPH. A reação de redução é diretamente proporcional a atividade metabólica celular, ou seja, células com maior atividade metabólica, produzem mais cristais de formazan (MOSMANN, 1983). Estes cristais são dissolvidos com DMSO, e a absorbância medida em espectrofotômetro. Os valores de absorbância nas células tratadas são comparados em relação ao controle para avaliar se o tratamento estimula ou diminui o metabolismo e/ou proliferação celular.

Visto que a biologia dos ruminantes é diferente de primatas e roedores em relação aos níveis de glicose circulantes, para o cultivo dos fibroblastos bovinos nós decidimos utilizar o meio de cultivo DMEM suplementado com 400 mg/L de glicose, que é aproximadamente a concentração encontrada no sangue periférico em bovinos (MAPLESDEN; MCSHERRY; STONE, 1960). A concentração de glicose padrão das formulações comerciais normalmente variam entre 1 g/L - 4,5 g/L, equivalente a ~5.5 – 25 mM. As células foram tratadas com doses crescentes de BOHB (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mM), e apesar de não apresentarem comportamento crescente linear, as doses maiores (5 e 6 mM) apresentaram aumento significativo em relação as células controle (Figura 9). Estes achados indicam que o corpo cetônico aumenta globalmente o metabolismo em fibroblastos bovinos cultivados na sua presença. Suportando os achados que o aumento do metabolismo seja em parte decorrente hiperacetilação causada pela inibição das desacetilases, nós utilizamos a TSA como controle positivo e esta aumentou pronunciadamente a atividade metabólica celular. Interessantemente, o tratamento de células de humanos

(HEK293 e Chang human liver cells) com TSA foi demonstrado afetar a atividade de várias enzimas do metabolismo intermediário, sendo que a hiperacetilação causada em algumas enzimas dobram a sua atividade catalítica (ZHAO et al., 2010). Isto ocorre porque a acetilação desempenha um papel central na regulação do metabolismo. Virtualmente todas as enzimas responsáveis pela glicólise, gliconeogênese, ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo da ureia, metabolismo dos ácidos graxos e metabolismo do glicogênio são acetiladas. Sendo que a acetilação altera a atividade (ativando ou inibindo) ou a estabilidade destas enzimas. Visto que a acetilação é dependente da disponibilidade de nutrientes extracelulares, a acetilação é um mecanismo que os organismos utilizam para conectar a epigenética com o metabolismo celular (KATADA; IMHOF; SASSONE-CORSI, 2012).

Figura 9 - O Ácido β -Hidroxibutírico aumenta o metabolismo em fibroblastos bovinos

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Gráfico ilustrando a alteração no metabolismo celular, conforme medido pelo ensaio de MTT. Fibroblastos bovinos foram tratados com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mM de BOHB, assim como 1 μ M de TSA. Valores de absorbância e erro padrão da média são mostrados na figura.

8.2 Fibroblastos bovinos aumentam os níveis globais de acetilação da H3K9 após o tratamento com o corpo cetônico BOHB

Com o intuito de investigar se o corpo cetônico BOHB apresenta atividade inibitória sobre as HDACs, nós executamos o tratamento dos fibroblastos bovinos e mensuramos os níveis globais de H3K9ac através do Western blot. Após quatro repetições, nós observamos que o tratamento por 12 h com o BOHB leva a um aumento de $\sim 1.5 \times$ nos níveis de acetilação ($P < 0.05$). Este resultado confirma a atividade inibitória do corpo cetônico sobre as HDACs em bovinos. As células tratadas com TSA (controle positivo), um potente inibidor das HDACs, aumentou pronunciadamente os níveis de H3K9ac ($\sim 2.6 \times$; $P < 0.05$) comparadas as células controle (Figura 10). Estes dados demonstram que o BOHB apresenta atividade inibitória nas HDACs em bovinos, porém com potência menor quando comparado a TSA.

Figura 10 - Fibroblastos bovinos aumentam os níveis de acetilação da H3K9ac após tratamento com BOHB

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Gráfico mostrado a intensidade média relativa da acetilação da H3K9 de células controle e tratadas com BOHB ou TSA. (B) Imunoblots para a H3K9ac de células controle, e tratadas com 6 mM de BOHB ou 1 μ M de TSA. (B)

Nós posteriormente confirmamos o resultado de Western Blotting através de imunofluorescência, onde células tratadas conforme descrito acima foram imunomarcadas com anticorpo anti-H3K9ac e quantificadas. Os dados na figura 11

abaixo mostram que células tratadas com o BOHB apresentam ~1,18 vezes mais acetilação (55.24 ± 19.30) comparado ao grupo controle (46.98 ± 15.61). Assim como na quantificação por WB, células tratadas com TSA apresentaram maior imunoreatividade (~1,86 vezes; 87.17 ± 22.14). É interessante notar que os bovinos mesmo apresentando fisiologia diferente em relação aos humanos, por exemplo, bovinos são ruminantes e utilizam corpos cetônicos predominantemente como fontes de energia, ambos utilizam o mesmo metabólito endógeno para regular HDACs. A acetilação é um mecanismo de regulação do metabolismo que estende-se desde procariotos até humanos (CHOUDHARY et al., 2014). Entretanto, cada organismo provavelmente responde de maneira diferente as flutuações nos níveis intracelulares deste metabólito.

Figura 11 - Fibroblastos bovinos aumentam os níveis de acetilação da H3K9ac após tratamento com BOHB

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Desenho esquemático ilustrando o tratamento das células por 12 h com os HDACis BOHB e TSA. (B) Gráfico mostrando intensidade média relativa da H3K9ac em células controle e tratadas com BOHB e TSA. Imunofluorescência para H3K9ac em fibroblastos controle (C-D), tratados com BOHB (E-F) e TSA (G-H).

8.3 Fibroblastos bovinos cultivados com BOHB diminuem a transcrição dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 e da enzima SCD

Para ganharmos insights sobre os efeitos do tratamento com o BOHB sobre a expressão gênica, nós avaliamos a expressão de genes responsáveis por diversas categorias celulares como eliminação de radicais livres (SOD1, SOD2, GPX1), transporte de glicose (GLUT1 e GLUT3), fatores de transcrição envolvidos no metabolismo celular (PPARA, PPARGC1A, NFkBp65, FOXO3a, SREBF1), deacetilases (HDAC1, SIRT1, SIRT3), metabolismo lipídico (SCD, CPT1A, CPT1B, CPT2), mitocondrial (MTCO1 e MFN2) e fator de crescimento (IGF2R). Dentre todos os genes analisados, nós observamos redução dos transportadores de GLUT1 e GLUT3, assim como do gene da enzima chave no metabolismo de ácidos graxos insaturados SCD nas células tratadas com BOHB (Figura 12). O efeito nestes genes analisados não foi pronunciado, provavelmente em virtude da velocidade com que as células em cultivo respondem para reprogramar o metabolismo. Outra explicação é que como virtualmente todas as enzimas do metabolismo intermediário são reguladas por acetilação, a célula lida com as alterações causadas pelo tratamento com o BOHB alterando a atividade das enzimas regulando o metabolismo, sem necessariamente alterar a transcrição gênica.

Figura 12 - Fibroblastos bovinos cultivados com BOHB diminuem a transcrição dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 e da enzima SCD

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Dados mostram a expressão gênica relativa ($2^{-\Delta Ct}$) entre as amostras. Para a normalização foi utilizado a média geométrica dos endógenos RPL15, GUSB e PPIA.

8.4 Zigotos de embriões clonados tratados com BOHB apresentam maior acetilação das histonas

Uma vez que nós confirmamos o efeito do BOHB como inibidor de HDAC, nós decidimos realizar um série de experimentos com embriões clonados através de TNCS para avaliar se o corpo cetônico poderia afetar o epigenoma ou desenvolvimento embrionário. Além disso, uma vez que a compactação da cromatina funciona como uma barreira para a correta reprogramação nuclear em embriões clonados (PASQUE et al., 2011), o BOHB poderia servir como uma ferramenta para melhorar este processo. As primeiras horas de desenvolvimento embrionário são um período altamente suscetível a insultos ambientais, e propenso a mudanças. Isto ocorre porque após a fertilização (neste experimento a ativação artificial), desencadeia mudanças drásticas no epigenoma visando reprogramar o núcleo (REIK, 2007). Nós decidimos tratar os presumíveis zigotos produzidos por TNCS com 6 mM de BOHB nas primeiras 12h de desenvolvimento embrionário. Após as 12h de tratamento, nós coletamos os zigotos e analisamos por imunocitoquímica os níveis de H3K9ac (Figura 13). Nós observamos aumento de ~1,34 nos níveis globais de H3K9ac ($P = 0.0005$) entre o grupo tratado com BOHB (80.97 ± 4.39) em relação ao controle (60.30 ± 3.40). Estes dados demonstram que o tratamento com um metabólito endógeno pode alterar uma marca epigenética em presumíveis zigotos, e modificar o desenvolvimento embrionário.

Figura 13 - Zigotos de embriões clonados tratados com BOHB apresentam maior acetilação das histonas

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Intensidade média relativa da H3K9ac nos zigotos dos grupos controle e tratado com BOHB. (B) Imunocitoquímica para H3K9ac de zigotos 12 h.p.a clonados do grupo controle (marcados com a letra A no canto superior esquerdo das imagens) e do grupo BOHB (letra B). Imagens ilustrativas, para as análises foram utilizados $n > 25$ zigotos por grupo. Todas imagens foram tiradas em objetiva de mesmo aumento (40x) utilizando microscopia confocal, e utilizando o mesmo poder do laser para captura das imagens, permitindo a comparação entre os grupos. Magnificação (400X).

8.5 Efeito do tratamento de zigotos clonados com o BOHB sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional

Uma vez que os zigotos tratados com BOHB apresentaram aumento na H3K9ac, e esta marca é associada com expressão gênica global e cromatina aberta, nós cultivamos os zigotos pelo período de 7 dias, até o estágio de blastocisto, para investigar se a exposição dos zigotos ao BOHB afeta o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos. Um total de 476 embriões clonados foram produzidos em 7 rotinas experimentais, sendo 239 do grupo controle e 237 do grupo tratado com BOHB. Embora marginalmente superior a produção de blastocistos no grupo tratado ($40,49 \pm 4,64$) em relação ao controle ($31,81 \pm 3,34$), não foram observadas diferenças nas taxas clivagem ($P=0.894$) e blastocisto ($P=0.0975$) entre os grupos experimentais (Tabela 3). O tratamento com HDACis tem se mostrado

efetivo em aumentar o desenvolvimento embrionário após SCNT, principalmente em camundongos. Mas nós e outros grupos falhamos em observar qualquer melhora utilizando estes HDACis em bovinos. E mesmo neste experimento, onde um metabólito endógeno foi utilizado, consequentemente dotado de menos ou nenhum *side-effects*, nós não observamos aumento significativo na produção embrionária.

Tabela 3 - Efeito do tratamento de zigotos clonados com BOHB sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional

Grupos	Oócitos reconstruídos N	Embriões Fundidos N (% $\pm$ EPM)	Zigotos cultivados por grupo (N)	Clivagem N (% $\pm$ EPM)	Blastocistos D7 N (% $\pm$ EPM)
Controle	660	476 (71,90 $\pm$ 4,13)	239	177 (74,48 $\pm$ 1,67)	74 (31,81 $\pm$ 3,34)
BOHB			237	177 (75,01 $\pm$ 3,50)	95 (40,49 $\pm$ 4,64)

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Valores dentro da mesma coluna não diferiram estatisticamente. Taxa de Fusão: número de embriões fundidos / número de oócitos reconstruídos. Taxa de Clivagem: número de embriões clivados / número de zigotos cultivados por grupo. Taxa de blastocisto: número de blastocistos / Número de zigotos cultivados por grupo. Dados representam o resultado de 7 rotinas experimentais.

8.6 Tratamento com o BOHB durante o estágio de zigotos altera a expressão gênica em embriões no estágio de blastocisto

O desenvolvimento embrionário inicial é dinâmico e os eventos acontecem de maneira orquestrada, ou seja a alteração da expressão gênica, de uma marca epigenética ou qualquer outra variável neste período podem desencadear uma reação em cascata e afetar a embriogênese. Como observamos alteração nos níveis globais de H3K9ac nos zigotos, nós decidimos utilizar a expressão gênica como ferramenta para monitorar se a exposição transitória dos zigotos afetou genes importantes para o metabolismo, eliminação de radicais livres ou epigenoma embrionário (Figura 14). Uma vez que os embriões fertilizados *in vitro* apresentam melhor potencial de desenvolvimento e se assemelham mais aos *in vivo*, nós analisamos também a expressão destes como comparativo. Dentre os genes analisados, o transportador de glicose GLUT1 apresentou decréscimo na expressão nos embriões tratados com BOHB em relação aos IVF, porém não diferindo dos controles clonados. O decréscimo de expressão no GLUT1 também foi observado

nos fibroblastos tratados, sugerindo que a exposição ao corpo cetônico pode afetar os mecanismos transcricionais do transporte de glicose no organismo. De modo contrário, o SREBF1 apresentou aumento na expressão nos embriões clones tratados com BOHB em relação aos IVF, não diferindo dos TNCS controle. O SREBF1 é um fator de transcrição cuja função é regular o metabolismo e síntese de lipídeos, e visto que o BOHB é um ácido graxo e fonte de carbono, a adição ao meio de cultivo embrionário pode ter afetado vias de metabolismo/síntese de lipídeos, mas isso merece investigação futura. Curiosamente, entre os genes investigados, o único que apresentou diferença entre os embriões clonados foi o FOXO3a. Este gene é implicado em resposta celular ao stress oxidativo, e o tratamento de células HEK293 com altas doses de BOHB (10 mM) foi demonstrado causar hiperacetilação no promotor do FOXO3a e ativação gênica (SHIMAZU et al., 2013). Nossos dados sugerem que o tratamento dos zigotos com o BOHB pode ter alterado os níveis de acetilação no promotor do FOXO, levando a ativação gênica. Infelizmente é uma hipótese difícil de ser testada, visto que um blastocisto clonado possui ~100 células, impossibilitando a execução de técnicas para investigar isso, como exemplo a imunoprecipitação de cromatina (ChIP), que requer número muito maior de células. É importante observar também que o gene da HDAC1 não apresentou alteração na expressão , apesar do aumento de acetilação dos zigotos. Isto sugere que os efeitos do BOHB sobre as HDACs ocorrem pós-transcricionalmente (Figura 14).

Figura 14 - Tratamento com o BOHB durante o estágio de zigotos altera a expressão gênica em embriões no estágio de blastocisto

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Análise da expressão gênica em blastocistos coletados no dia 7 de cultivo in vitro. A abundância dos transcritos é apresentada em relação aos genes de referência GUSB, PPIA e RPL15. Diferentes letras denotam diferenças entre os transcritos ($P < 0.05$).

8.7 Tratamento de zigotos clonados com o Ácido β -Hidroxibutírico leva a um aumento dos níveis de H3K9ac nos blastocistos

Depois de avaliar a expressão gênica nos blastocistos, nós combinamos a fração orgânica do TRIzol de 3 *pools* de embriões clones controles ou tratados com BOHB para a extração proteica. O objetivo era investigar se os níveis de H3K9ac se mantinham alterado, visto que havíamos observado diferença no estágio de zigoto, conforme avaliado por microscopia confocal. A proteína resultante dos 3 pools foram aplicadas no gel e após o Western Blot, nós observamos um aumento de aproximadamente 3,49 vezes na quantidade de H3K9ac nos blastocistos tratados em relação aos controles (Figura 15). A acetilação é uma modificação dinâmica e se altera rapidamente quando ocorre flutuações nos níveis de nutrientes e metabólitos dentro das células. Atualmente não há um modelo estabelecido de herança mitótica de marcas epigenéticas. Desde o tratamento no estágio de zigoto, até o estágio de blastocisto ocorrem pelo menos 7 ciclos de divisão celular, e no presente momento, não é claro para nós como o tratamento inicial poderia ter levado a hiperacetilação dos blastocistos. A ativação do FOXO3a conforme demonstrado acima sugere que de alguma maneira a hiperacetilação das histonas induzidas no tratamento se mantêm e exercem efeitos regulatórios durante o desenvolvimento embrionário inicial.

Figura 15 - Tratamento de zigotos clonados com o Ácido β -Hidroxibutírico leva a um aumento dos níveis de H3K9ac nos blastocistos

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Gráfico ilustrando a diferença nos níveis de H3K9ac entre os grupos controle e tratado. A quantidade da HK9ac foi calculada em relação a proteína de referência, aqui representada pela β -Actina. (B) Imunoblots representativo da marcação com H3K9ac em blastocistos clonados do grupo controle e tratado com BOHB.

8.8 Blastocistos partenogênicos tratados com BOHB no estágio de zigoto não possuem aumento nos níveis globais de H3K9ac

Para verificar se o aumento de acetilação observado nos blastocistos clonados também ocorria em embriões partenogênicos, nós produzimos embriões partenogênicos, tratamos com o BOHB nas 12 primeiras horas pós ativação (assim como nos clonados) e cultivamos até o estágio de blastocisto. O modelo partenogênético oferece a vantagem de ser fácil de produzir em maiores quantidades para realizar repetições biológicas no Western Blot. Primeiro, nós analisamos as taxas de desenvolvimento, e após 3 repetições não observamos diferença nas taxas de clivagem ($P=0.6107$) e desenvolvimento à blastocisto ($P=0.6520$), ver Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito do tratamento dos zigotos partenogênicos com BOHB sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional

Grupo	Zigotos cultivados (N)	Taxa de Clivagem N (% $\pm$ EPM)	Blastocistos D7 N (% $\pm$ EPM)
Controle	148	121 (80,93 $\pm$ 4,22)	76 (50,64 $\pm$ 6,76)
BOHB	148	115 (75,45 $\pm$ 8,99)	71 (46,26 $\pm$ 5,94)

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente. Taxa de clivagem: número de embriões clivados / número de zigotos cultivados. Taxa de Blastocisto: número de blastocistos / número de embriões cultivados. Dados de três replicatas biológicas.

Nós coletamos 5 *pools* contendo 10 embriões/cada para quantificar os níveis de H3K9ac. Nós realizamos 4 Western Blot (Figura 16) e embora marginalmente superior (~ 1.40 vezes) a intensidade relativa de H3K9ac em embriões tratados (5.21 ± 1.43) em relação aos controles (3.72 ± 1.18), não observamos diferença estatística ($P=0.4462$) entre os grupos. Embriões clonados e partenogênicos mecanisticamente compartilham semelhanças durante o processo de reprogramação nuclear. Entretanto, os embriões clonados inerentemente falham em completamente reprogramar a memória da célula somática das quais são originários, herdando em algumas ocasiões padrões de modificações das histonas das células somáticas (WEE et al., 2006). Por sua vez, os partenos se desenvolvem somente a partir do material genético presente no oócito, o qual possui uma organização de cromatina diferente de células somáticas. Isto em parte pode explicar a diferença observada em relação a retenção de H3K9ac nos embriões tratados no estágio inicial.

Figura 16 - Blastocistos partenogenéticos tratados com BOHB no estágio de zigoto não possuem aumento nos níveis globais de H3K9ac

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: (A) Gráfico mostrando a intensidade relativa de H3K9ac normalizada pela ACTB. (B) Imunoblots para H3K9ac e ACTB. Linhas vermelhas separam diferentes blots realizados. Letra C e B abaixo identificam as amostras Controle e BOHB, respectivamente. (C) Figura ilustrando imunocitoquímica para H3K9ac em um blastocisto partenogenético.

8.9 Zigotos partenogenéticos tratados com BOHB nas primeiras horas de desenvolvimento não apresentam alteração na produção de ATP

O ATP é a principal fonte de energia para a maioria dos processos celulares, como divisão, motilidade celular, reações biosintéticas, entre outros. Como a atividade metabólica, e o conteúdo de ATP é correlacionado com o potencial de desenvolvimento embrionário (STOJKOVIC et al., 2001), nós mensuramos os níveis de ATP em zigotos partenogenéticos tratados ou não com BOHB para avaliar se este afetava o metabolismo embrionário. A escolha dos embriões partenos foi por estes serem mais homogêneos em relação aos clonados, visto que o processo de enucleação remove parte do citoplasma. E se utilizássemos embriões fertilizados *in*

vitro o tratamento com o BOHB nas horas iniciais poderia interferir com a fertilização; além disso os espermatozóides penetram em momentos distintos em cada oócito, afetando a interpretação do efeito do corpo cetônico nas primeiras horas de desenvolvimento embrionário. Nós coletamos 19 pools para cada grupo, contendo 3 zigotos em cada pool para minimizar a variação no conteúdo de ATP que cada zigoto individual possui. Após a mensuração, nós não notamos diferença ($P=0.6325$) no conteúdo de ATP nos oócitos tratados com BOHB ($0.008936 \pm 0.0005003 \mu\text{M}$ de ATP) em relação aos controles ($0.008610 \pm 0.0004529 \mu\text{M}$ de ATP), ver Figura 17. Estes dados demonstram que o corpo cetônico BOHB não possui efeito tóxico mesmo em altas concentrações (6 mM) quando adicionado ao cultivo embrionário, assim como também não afeta a produção de ATP nos zigotos.

Figura 17 - Quantidade de ATP em zigotos partenogenéticos

Fonte: Sangalli, J. R. (2016)

Legenda: Quantidade de ATP em zigotos partenogenéticos tratados ou não com o BOHB imediatamente após a ativação artificial

9 DISCUSSÃO

Os achados deste estudo suportam a noção de que o epigenoma e o metabolismo estão intimamente conectados, e que é possível alterar a expressão gênica e ao menos uma marca epigenética em embriões clonados utilizando um metabólito endógeno durante o cultivo *in vitro*. Mais interessante, nós observamos que o tratamento de embriões com BOHB na fase de zigoto leva a um aumento nos níveis de H3K9ac, e este perdurou até o estágio de blastocisto. Estes achados sugerem que as horas iniciais de desenvolvimento são sensíveis a alterações no ambiente de cultivo. Estes dados também mostram que um série de eventos interconectados, como o aumento na expressão de um fator de transcrição relacionado a eliminação de radicais livres, assim como da acetilação, ocorrem após a exposição a um metabólito endógeno.

A fim de avaliar o efeito do BOHB sobre o metabolismo celular, nós realizamos uma curva dose-reposta com diferentes concentrações de BOHB, e observamos um ligeiro aumento no metabolismo celular. Nós especulamos que o aumento possa ser causado pelo fato do ensaio de MTT ser baseado em desidrogenases mitocondriais, e a adição de BOHB ao meio de cultivo afetar a atividade destas. Virtualmente todas as enzimas do metabolismo intermediário são reguladas por acetilação. Sendo esta modificação pós-traducional responsável por modificar a atividade enzimática, ativando, inibindo ou desestabilizando (ZHAO et al., 2010). Alternativamente, conforme demonstrado em *C. elegans*, o BOHB pode aumentar a eficiência energética estabilizando a cadeia transportadora de elétrons (ETC I) (EDWARDS et al., 2014).

Nosso objetivo era investigar o efeito do BOHB como agente hiperacetilante em uma espécie ruminante, neste caso o bovino. Estes apresentam uma particularidade, pois os corpos cetônicos são produzidos como produtos normais do seu metabolismo, e utilizados como fonte de energia em condições fisiológicas (BERGMAN, 1971). Diferentemente dos onívoros como camundongos e humanos, que apresentam elevação nos níveis de BOHB somente após jejum, exercício extenuante e em condições patológicas, como a cetoacidose diabética (CAHILL, 2006). Os bovinos também são sensíveis a elevação dos corpos cetônicos, e quando isto ocorre, apresentam sintomas de uma condição clínica chamada cetose.

Esta condição impacta diretamente a indústria leiteira, pois diminui a produção de leite, além de afetar a reprodução. Esta ocorre quando as concentrações sanguíneas se elevam acima de $\sim 1,2$ mM (WALSH et al., 2007). Em nosso experimento, através da exposição de células e embriões ao BOHB durante o cultivo *in vitro*, nós tínhamos com objetivo ganhar insights sobre o papel deste metabólito sobre o metabolismo e epigenoma bovino.

Nós cultivamos fibroblastos bovinos com 6 mM de BOHB, sendo estes valores maiores do que os presentes mesmo numa condição de cetose, sendo estes experimentados por bovinos somente em condições como torção do abomaso. Nós decidimos realizar os experimentos com a concentração de 6 mM, pois as principais HDACs apresentam IC_{50} na faixa de 2 - 5 mM (SHIMAZU et al., 2013; NEWMAN; VERDIN, 2014b). Além disso, esta dose se mostrou adequada pois não apresentou efeito tóxico quando avaliada por MTT. Nós observamos que o BOHB possui efeito inibitório sobre as HDACs, medido pelo aumento global nos níveis da H3K9ac, avaliado por imunofluorescência e confirmado por *western blot*. É digno notar que, embora estatisticamente significativo, este incremento de $\sim 1,5$ vezes é muito menos pronunciado que o observado em células humanas (HEK293) cultivadas *in vitro*, onde o tratamento leva a um efeito exponencial sobre os níveis de acetilação (SHIMAZU et al., 2013).

Para avaliar o efeito do BOHB sobre o genes reguladores do metabolismo, nós analisamos a expressão de genes reguladores do metabolismo lipídico, fatores de transcrição, histonas deacetilases, entre outros. Curiosamente, nós observamos alterações significativas em poucos genes, entre eles o transportador ubíquo de glicose SLC2A1, também conhecido como GLUT1. A dieta cetogênica tem sido utilizada por longo tempo em crianças sofrendo de epilepsia e tonturas causadas por mutação no GLUT1 (KLEPPER; VOIT, 2002). Além de funcionar como uma fonte alternativa para o cérebro, é interessante notar que o BOHB também tem a capacidade de regular o transportador de glicose transcricionalmente. Em nosso experimento ambos os cultivos apresentavam a mesma disponibilidade de glicose, porém com expressão reduzida no grupo tratado. Outro gene com redução na expressão foi o SCD, enzima que desempenha papel chave no metabolismo lipídico catalisando a formação de ácidos graxos monoinsaturados. É digno notar que vacas com cetose induzida nutricionalmente também possuem menor expressão de SCD, e visto que está exerce função protetora, a diminuição desta pode contribuir para a

lipidose hepática comumente observada em vacas nesta condição (LOOR et al., 2007). Estes dados sugerem que o tratamento de fibroblastos com somente um corpo cetônico, o BOHB, pode mimetizar parcialmente a cetose observada nos animais in vivo, contribuindo para dissecar o efeito de cada metabólito contribuindo com esta patologia.

A compactação da cromatina funciona como uma barreira impedindo a eficiente reprogramação nuclear após TNCS. Em camundongos uma grande melhora é observada após o tratamento de zigotos iniciais com HDACis (KISHIGAMI et al., 2006). Como uma aplicação biotecnológica deste metabólito, nós decidimos usar esta droga para tratar os presumíveis zigotos clonados nas horas iniciais de desenvolvimento para avaliar o efeito sobre o desenvolvimento embrionário. Embriões são suscetíveis a alterações no ambiente de cultivo nos estágios iniciais de desenvolvimento, pois é um período crítico em que ele está reprogramando todo o seu epigenoma para estabelecer um novo programa de desenvolvimento. Neste momento eles são propensos a sofrerem alterações epigenéticas e até mesmo herdarem estas alterações ao longo de todo o desenvolvimento. Nós tratamos os zigotos por 12 horas a partir do início da ativação e fixamos os zigotos para observar os níveis de acetilação. Nós observamos aumento de H3K9ac nos embriões clonados tratados com BOHB, mostrando que um metabólito endógeno adicionado ao cultivo é capaz de globalmente afetar uma marca epigenética nos zigotos.

Como a inibição das deacetilases em zigotos é associada a melhores taxas de desenvolvimento a blastocisto, nós realizamos 7 rotinas de clonagem para avaliar se este efeito resultava em uma melhoria nas taxas de desenvolvimento embrionário pré-implantacional. O tratamento dos zigotos com o BOHB levou a um ligeiro aumento nas taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto no grupo tratado em relação ao controle (40,49% vs 31,81%, respectivamente) porém não estatisticamente significativa ($P=0.0975$).

É sabido que os oócitos possuem uma capacidade de modificar as marcas epigenéticas durante o processo de reprogramação desencadeado pela fertilização. Provavelmente pela evolução do oócito como uma ferramenta de modificar as marcas trazidas pelo espermatozóide, para iniciar um novo programa de desenvolvimento (JULLIEN et al., 2011). Entretanto, de maneira surpreendente, nós observamos que os zigotos tratados com o BOHB apresentaram maior H3K9ac em relação aos não tratados e ligeiro aumento nas taxas de desenvolvimento a

blastocisto. Nós decidimos então avaliar os níveis de H3K9ac, assim como a expressão de genes relacionados ao metabolismo, epigenoma e stress oxidativo nos blastocistos.

Uma vez que blastocistos clonados possuem apenas pouco mais que uma centena de células, nós fizemos pools de blastocistos provenientes de 3 rotinas experimentais (aproximadamente ~24 blastocistos) e aplicamos toda a proteína recuperada no gel. Nós utilizamos a β -actina como referência para normalizar a quantidade de proteína aplicada no gel, e observamos que os blastocistos tratados com BOHB no estágio de zigoto apresentavam níveis de H3K9ac ~3,5 vezes maior que embriões provenientes do grupo controle. Estes dados são surpreendentes, e levantam várias questões, por exemplo: como a breve exposição de zigotos a um HDACi leva a um aumento nos níveis de H3K9ac nos blastocistos ? visto que estes passam por pelo menos 7 ciclos celulares e sofrem uma massiva onda de reprogramação global do epigenoma (REIK, 2007). Como poderia esta breve exposição ser sentida pelos embriões? Quais vias metabólicas são alteradas e através de quais mecanismos epigenéticos? É bem conhecido que as histonas tem um “turnover” dinâmico, e por serem menos estáveis que outras marcas epigenéticas como a metilação, são menos prováveis carregarem informação epigenética (RICE; ALLIS, 2001). Entretanto, em camundongos o tratamento de zigotos com um HDACi (TSA) levou a persistência dos padrões de acetilação durante o desenvolvimento embrionário inicial (VERMILYEA; O’NEILL; TURNER, 2009). Assim como também há vários modelos mostrando que as modificações pós-traducionais das histonas podem ser herdadas nas células filhas ou mesmo afetar várias gerações (CAMPOS; STAFFORD; REINBERG, 2014). Deste modo explicando como a breve exposição ao BOHB poderia ter causado um efeito duradouro nos níveis de H3K9ac nos blastocistos aqui neste experimento.

A acetilação das histonas é estreitamente relacionada a transcrição gênica (VERDIN; OTT, 2014). Como observamos um aumento nos embriões tratados como BOHB, nós decidimos avaliar a expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo, epigenoma e stress oxidativo nos blastocistos. Como é sabido que os embriões fertilizados *in vitro* apresentam um melhor potencial de desenvolvimento a termo comparado aos embriões clonados, nós utilizamos embriões produzidos por FIV como parâmetro para interrogar a alteração na expressão gênica nos embriões clonados controle e tratados. O GLUT1 facilita o transporte de glicose através da

membrana celular e apresenta níveis menores de transcritos em embriões produzidos *in vitro* comparado aos produzidos *in vivo*. Assim como nos fibroblastos, nós observamos uma redução significativa na quantia de transcritos nos embriões tratados com BOHB, em relação aos FIV, indicando que a suplementação no cultivo inicial possa ter um efeito duradouro na regulação deste gene. Como o BOHB é um inibidor das HDACs, nós decidimos investigar se o mecanismo de hiperacetilação poderia estar relacionado a regulação transcricional da HDAC1. Nós não observamos diferença, sugerindo que o efeito do inibidor do BOHB não é através de mecanismos transcricionais e sim quelando os íons zinco essenciais para a atividade das HDACs, conforme demonstrado anteriormente (NEWMAN; VERDIN, 2014b). O gene IGF2R, associado a síndrome da cria gigante em embriões clonados (YOUNG et al., 2001), e encontrado menos expressos em fígado de vacas com cetose induzida nutricionalmente (LOOR et al., 2007) não apresentou diferença entre os grupos investigados. Em relação aos genes chaves para o metabolismo e homeostase lipídica, o ativador transcricional SREBF1 apresentou aumento no grupo tratado com o BOHB em relação aos FIV; já o SCD não diferiu entre os grupos. Estes genes apresentam diminuição em condições de cetose (LOOR et al., 2007), fato não observado aqui neste experimento.

É sabido que os embriões *in vitro* são cultivados em ambiente com alto estresse oxidativo, devido a alta tensão de oxigênio presente na incubadora, meio de cultivo embrionário rico em nutrientes, entre outros fatores. O BOHB tem sido usado como tratamento em doenças neurológicas degenerativas devido ao seu papel protetor contra radicais livres (KASHIWAYA et al., 2000). Para investigar se o papel protetor contra radicais livres exercido pelo BOHB em ocorre através do incremento da expressão de enzimas com papéis antioxidantes, nós avaliamos o gene SOD1 (responsável por eliminar radicais superóxidos livres do organismo) e GPX1 (protege o organismo contra danos oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e peróxidos de hidrogênio); Nós vimos que os genes da GPX e SOD1 apresentaram se aumentados nos embriões clonados, e com o gene SOD1 diferindo estatisticamente entre o tratado com BOHB e os FIV, reforçando a ideia de que os embriões clonados são mais afetados pelo estresse oxidativo (ex. excessiva manipulação durante a clonagem, eletrofusão), e que o BOHB pode exercer um mecanismo protetor estimulando a expressão de SOD1, embora entre os grupos clonados não houve diferença.

Em camundongos com infusão contínua de BOHB, após a análise do transcriptoma, uma série de genes diferencialmente expressos estavam downstream do fator de transcrição FOXO3A. E através de ChIP da região promotora do FOXO3a, eles observaram que o aumento transcrricional era decorrente da hiperacetilação causada pelo BOHB no promotor deste gene (SHIMAZU et al., 2013). Suportando este fato de que o BOHB oferece proteção contra o estresse através do gene FOXO3a, nós observamos que o tratamento com BOHB aumentou a expressão gênica, e os embriões tratados possuem nível similar deste transcrito em relação aos embriões FIV, e maior que os embriões clones não tratados. É curioso que o FOXO3A é homólogo do DAF-16, que sabidamente aumenta o lifespan em *C. elegans* através da regulação de vias protetoras contra radicais livres e da via IGF (EIJKELENBOOM; BURGERING, 2013). A restrição calórica e jejum intermitente são condições onde os níveis de corpos cetônicos estão elevados e sabidamente exercem função protetora. Desta maneira o BOHB pode ser uma molécula fundamental conectando o ambiente extracelular com o metabolismo, ou seja, o elo de ligação (VAQUERO; REINBERG, 2009).

Ainda, nós falhamos em reproduzir o efeito hiperacetilante do BOHB quando tratamos zigotos partenogênicos com BOHB. Embriões partenogênicos e embriões clonados compartilham mecanismos de reprogramação, mas também possuem muitas outras diferenças na cinética de reprogramação, o que pode explicar estas observações (GAO et al., 2007). Nós também medimos o ATP, usando o modelo parteno para interrogar se o BOHB afetaria o metabolismo embrionário, e não observamos diferença. Demonstrando que mesmo em condições bem acima da fisiológica, este não compromete o desenvolvimento embrionário *in vitro*. O declínio da fertilidade de vacas leiteiras *in vivo* em condições de cetose provavelmente ocorre devido a uma somatório de fatores, como alterações hormonais, metabólicas, de ácidos graxos não-esterificados (NEFAs), entre outros (LEROY et al., 2006). E que corpo cetônico BOHB provavelmente age como uma molécula protetora, estimulando um padrão transcrricional para o organismo lidar com o estresse, e não sendo um veneno metabólico, conforme anteriormente julgado pela maioria dos clínicos (CAHILL, 2006).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, nossos dados mostram que o uso de células cultivadas *in vitro* são uma ferramenta adequada para interrogar como um metabólito endógeno pode afetar o epigenoma e o metabolismo do organismo como um todo. E mesmo com a biologia dos ruminantes ter evoluído para usar os corpos cetônicos como fonte primária de energia, os bovinos também utilizam esta molécula como inibidor endógeno das HDACs. Além disso, o tratamento dos zigotos clonados mostrou que o BOHB é capaz de alterar uma marcação epigenética nos zigotos, assim como os níveis de H3K9ac nos blastocistos clonados e alguns genes investigados. Como perspectivas futuras, nós vemos o BOHB como uma molécula promissora pois apresenta: 1- atividade varredora de radicais livres (SHIMAZU et al., 2013); 2- pode servir como um modelo *in vitro* para mimetizar humanos concebendo em situações de fome no mundo (FEUER et al., 2014); 3- tem efeitos antidiabéticos, e é conhecido que pessoas e animais produzidos por fertilização *in vitro* tem maiores chances de desenvolver diabetes na idade adulta (NEWMAN; VERDIN, 2014a); 4- Ser utilizado como modelo de estudos em bovinos de como vacas em cetose podem afetar o desenvolvimento embrionário inicial (LEROY et al., 2006); e uma enormidade de outras aplicações.

REFERÊNCIAS

BAIRD, G. D. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 1, p. 1–10, 1982.

BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON, D. J.; WELLS, D. N.; BROADHURST, R.; DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Trophectoderm Lineage Determination in Cattle. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 244–255, 2011.

BERGMAN, E. N. Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 6, p. 936–48, 1971.

BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, a; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**: CB, v. 11, n. 19, p. 1542–6, 2 out. 2001.

CAHILL, G. F. Fuel metabolism in starvation. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 1–22, jan. 2006.

CAMPOS, E. I.; STAFFORD, J. M.; REINBERG, D. Epigenetic inheritance: histone bookmarks across generations. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 11, p. 664–74, nov. 2014.

CHOUDHARY, C.; WEINERT, B. T.; NISHIDA, Y.; VERDIN, E.; MANN, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 536–50, 2014.

EDWARDS, C.; CANFIELD, J.; COPES, N.; REHAN, M.; LIPPS, D.; PATRICK, C. - beta - hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans*. **Aging**, v. 6, n. 8, p. 621–644, 2014.

EIJKELENBOOM, A.; BURGERING, B. M. T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 83–97, 17 jan. 2013.

FEUER, S. K.; LIU, X.; DONJACOUR, A.; LIN, W.; SIMBULAN, R. K.; GIRITHARAN,

G.; PIANE, L. D.; KOLAH, K.; AMERI, K.; MALTEPE, E.; RINAUDO, P. F. Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1956–69, maio 2014.

GAO, T.; ZHENG, J.; XING, F.; FANG, H.; SUN, F.; YAN, A.; GONG, X.; DING, H.; TANG, F.; SHENG, H. Z. Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Cell Research**, v. 17, n. 2, p. 135–50, fev. 2007.

GÖTTLICHER, M.; MINUCCI, S.; ZHU, P.; KRÄMER, O. H.; SCHIMPF, A.; GIAVARA, S.; SLEEMAN, J. P.; LO COCO, F.; NERVI, C.; PELICCI, P. G.; HEINZEL, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 6969–78, 17 dez. 2001.

GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reaction oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175–189, 2001.

GURDON, J. B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 1–22, jan. 2006.

GURDON, J. B.; MELTON, D. a. Nuclear reprogramming in cells. **Science** (New York, N.Y.), v. 322, n. 5909, p. 1811–5, 19 dez. 2008.

HOSSEINI, S. M.; DUFORT, I.; NIEMINEN, J.; MOULAVI, F.; GHANAEI, H. R.; HAJIAN, M.; JAFARPOUR, F.; FOROUZANFAR, M.; GOURBAI, H.; SHAHVERDI, A. H.; NASR-ESFAHANI, M. H.; SIRARD, M.-A. Epigenetic modification with trichostatin A does not correct specific errors of somatic cell nuclear transfer at the transcriptomic level; highlighting the non-random nature of oocyte-mediated reprogramming errors. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 16, 2016.

INOUE, K.; KOHDA, T.; SUGIMOTO, M.; SADO, T.; OGONUKI, N.; MATOBA, S.; SHIURA, H.; IKEDA, R.; MOCHIDA, K.; FUJII, T.; SAWAI, K.; OTTE, A. P.; TIAN, X. C.; YANG, X.; ISHINO, F.; ABE, K.; OGURA, A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. **Science** (New York, N.Y.), v. 330, n. 6003, p. 496–499, 2010.

IUSO, D.; CZERNIK, M.; TOSCHI, P.; FIDANZA, A.; ZACCHINI, F.; FEIL, R.; CURTET, S.; BUCHOU, T.; SHIOTA, H.; KHOCHBIN, S.; PTAK, G. E.; LOI, P. Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei

into Spermatid-like Structures. **Cell Reports**, v. 13, n. 9, p. 1765–1771, 2015.

JULLIEN, J.; PASQUE, V.; HALLEY-STOTT, R. P.; MIYAMOTO, K.; GURDON, J. B. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 7, p. 453–9, jul. 2011.

KASHIWAYA, Y.; TAKESHIMA, T.; MORI, N.; NAKASHIMA, K.; CLARKE, K.; VEECH, R. L. D- β -Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5440–5444, 2000.

KATADA, S.; IMHOF, A.; SASSONE-CORSI, P. Connecting threads: epigenetics and metabolism. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 24–28, 20 jan. 2012.

KELLY, T. K.; DE CARVALHO, D. D.; JONES, P. A. Epigenetic modifications as therapeutic targets. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1069–1078, 13 out. 2010.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N. Van; WAKAYAMA, S.; BUI, H.-T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 1, p. 183–9, 3 fev. 2006.

KLEPPER, J.; VOIT, T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: Impaired glucose transport into brain - A review. **European Journal of Pediatrics**, v. 161, n. 6, p. 295–304, 2002.

LEROY, J.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; SOOM, A. Van; KRUIF, A. De. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and b - hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 123, p. 119–123, 2006.

LOOR, J. J.; EVERTS, R. E.; BIONAZ, M.; DANN, H. M.; MORIN, D. E.; OLIVEIRA, R.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; DRACKLEY, J. K.; LEWIN, H. A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 1, p. 105–116, 2007.

MAPLESDEN, D. C.; MCSHERRY, B. J.; STONE, J. B. Blood sugar levels in normal cows before and after treatment with prednisolone and dexamethasone. **The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne**, v. 1, n. 7, p.

309–12, 1960.

MATOKA, S.; LIU, Y.; LU, F.; IWABUCHI, K. a; SHEN, L.; INOUE, A.; ZHANG, Y. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 884–95, 6 nov. 2014.

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. Chromatin modifying agents in the in vitro production of bovine embryos. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, jan. 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NEWMAN, J. C.; VERDIN, E. β -hydroxybutyrate: Much more than a metabolite. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 106, n. 2, p. 173–181, 2014a.

NEWMAN, J. C.; VERDIN, E. Ketone bodies as signaling metabolites. **Trends in Endocrinology and Metabolism**: TEM, v. 25, n. 1, p. 42–52, jan. 2014b.

PASQUE, V.; JULLIEN, J.; MIYAMOTO, K.; HALLEY-STOTT, R. P.; GURDON, J. B. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. **Trends in Genetics**: TIG, v. 27, n. 12, p. 516–25, dez. 2011.

PEAT, J. R.; REIK, W. Incomplete methylation reprogramming in SCNT embryos. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 965–6, set. 2012.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–32, 24 maio 2007.

RICE, J. C.; ALLIS, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 263–73, jun. 2001.

SANGALLI, J. R.; CHIARATTI, M. R.; DE BEM, T. H. C.; DE ARAÚJO, R. R.; BRESSAN, F. F.; SAMPAIO, R. V.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; KING, W. A.; MEIRELLES, F. V. Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. **PloS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101022, jan. 2014.

SANGALLI, J. R.; DE BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. D. J.; DE ARAÚJO, R. R.; VALIM PIMENTEL, J. R.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. Treatment of Nuclear-Donor Cells or Cloned Zygotes with Chromatin-Modifying Agents Increases Histone Acetylation But Does Not Improve Full-Term Development of Cloned Cattle. **Cellular Reprogramming**, p. 1–13, 2012.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos. **Current Biology**, v. 13, p. 1116–1121, 2003.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHIMAZU, T.; HIRSCHHEY, M. D.; NEWMAN, J.; HE, W.; SHIRAKAWA, K.; LE MOAN, N.; GRUETER, C. A.; LIM, H.; SAUNDERS, L. R.; STEVENS, R. D.; NEWGARD, C. B.; FARESE, R. V.; DE CABO, R.; ULRICH, S.; AKASSOGLOU, K.; VERDIN, E. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. **Science** (New York, N.Y.), v. 339, n. 6116, p. 211–4, 11 jan. 2013.

SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A. K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A. C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 47, p. 107–14, ago. 2012. Supplement, 4.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.

TACHIBANA, M.; AMATO, P.; SPARMAN, M.; GUTIERREZ, N. M.; TIPPNER-HEDGES, R.; MA, H.; KANG, E.; FULATI, A.; LEE, H.-S.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MASTERSON, K.; LARSON, J.; EATON, D.; SADLER-FREDD, K.; BATTAGLIA, D.; LEE, D.; WU, D.; JENSEN, J.; PATTON, P.; GOKHALE, S.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D.; MITALPOV, S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1228–38, jun. 2013.

VAQUERO, A.; REINBERG, D. Calorie restriction and the exercise of chromatin.

Genes & Development, v. 23, n. 16, p. 1849–1869, 2009.

VERDIN, E.; OTT, M. 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, Metabolism and Beyond. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 258–264, 2014.

VERMILYEA, M. D.; O'NEILL, L. P.; TURNER, B. M. Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. **PloS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6086, jan. 2009.

WALSH, R. B.; WALTON, J. S.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2788–96, 2007.

WATHES, D. C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D. G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. 232–241, 2007.

WEE, G.; KOO, D.-B.; SONG, B.-S.; KIM, J.-S.; KANG, M.-J.; MOON, S.-J.; KANG, Y.-K.; LEE, K.-K.; HAN, Y.-M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 6048–6057, 3 mar. 2006.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; SOUSA, P. A. De; KING, T. J.; PATERSON, L. A. Somatic cell nuclear transfer. **Nature** v. 419, p. 583–586, 2002.

YAMANAKA, S.; BLAU, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 704–12, 10 jun. 2010.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J.-P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295–302, mar. 2007.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–154, 2001.

ZHAO, S.; XU, W.; JIANG, W.; YU, W.; LIN, Y.; ZHANG, T.; YAO, J.; ZHOU, L.; ZENG, Y.; LI, H.; LI, Y.; SHI, J.; AN, W.; HANCOCK, S. M.; HE, F.; QIN, L.; CHIN, J.; YANG, P.; CHEN, X.; LEI, Q.; XIONG, Y.; GUAN, K.-L. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. **Science** (New York, N.Y.), v. 327, n. 5968, p. 1000–4, 19 fev. 2010.

10 CONCLUSÕES

Neste trabalho nós investigamos o efeito de 2 inibidores das histonas deacetilases, o Ácido Valpróico e o Ácido β -Hidroxibutírico, sendo um farmacológico e o outro um metabólito endógeno. Nosso objetivo primário era alterar os níveis de acetilação global da cromatina, objetivando facilitar o processo de reprogramação nuclear. Após os experimentos nós observamos que não foi possível incrementar as taxas de desenvolvimento tanto pré-, como pós-implantacional em bovinos. Estas observações diferem marcadamente das observadas em camundongo, onde a inibição das deacetilases leva à um aumento significativo nas taxas de desenvolvimento, e hoje em dia faz parte da maioria dos protocolos para clonar camundongos. Aqui, nós observamos que um metabólito endógeno, o Ácido β -Hidroxibutírico tem a capacidade de alterar o epigenoma e o metabolismo de células e embriões bovinos. Visto que este faz parte da fisiologia normal dos ruminantes, e apresenta-se elevado em situações de estresse metabólico, como na cetose das vacas leiteiras, o entendimento de todas as suas funções intracelulares são necessários e merecem futuras investigações. Nós vislumbramos a utilização do BOHB como fonte de carbono e também como molécula protetora no meio de cultivo embrionário. O próximo passo será dissecar os mecanismos do BOHB em células e embriões bovinos, assim como todas as vias não canônicas estimuladas pela inibição das deacetilases, como autofagia, resistência ao estresse, resposta ao estresse térmico, regulação do ciclo celular, reparo dos danos do DNA, entre outras.