Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Juliano Rodrigues Sangalli

**Uso de agentes modificadores de cromatina na transferência nuclear de
células somáticas em bovinos**

Pirassununga
2011

Juliano Rodrigues Sangalli

Uso de agentes modificadores de cromatina na transferência nuclear de células somáticas em bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração:

Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Pirassununga

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S225u   Sangalli, Juliano Rodrigues
            Uso de agentes modificadores de cromatina na
transferência nuclear de células somáticas em bovino /
Juliano Rodrigues Sangalli. -- Pirassununga, 2011.
45 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Transferência nuclear 2. Tricostatina A 3. Ácido
valpróico 4. Hidralazina 5. 5-aza-2'-deoxicitidina
6. Embriões bovinos 7. Metilação 8. Acetilação
9. Bovinos 10. Epigenética. I. Título.

“Dedico este trabalho aos meus pais, João e Sônia, e ao meu irmão Leandro, por sempre me ajudarem a ir em busca dos meus sonhos, por acreditarem em mim, e me ensinarem a ter humildade no coração e respeito pelas pessoas.”

Agradecimentos

À Deus, por me dar força e inteligência todos os dias para lutar pelos meus sonhos.

Ao Professor Flávio Vieira Meirelles (Quati) pela orientação, pelos ensinamentos e por tolerar minha teimosia.

Ao Professor Felipe Perecin (Pêra) por todo o tempo dedicado em me ensinar a micromanipular, pela nossa amizade e por todos os conselhos, ajuda e tudo mais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (Processo nº 2009/06689-5) e auxílio financeiro, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

A todas as pessoas com as quais convivi nestes quase 4 anos de Pirassununga, como os Funcionários, Professores, Técnicos, Alunos e Estagiários.

Ao Léo Motoboy, pela coleta dos ovários e pela nossa amizade.

Aos meus amigos do Bope: Rafão, Marcola, Deba, Pedrim, Renão, Curió, Manú (o Vasco mais gracioso que eu conheci) e Henderson.

Aos meus amigos do LMMD: Kellynha, Rô, Martini, Lá, Cê, Van, Aline, Natália, Annie, Planck, Lijoli, Zézim, Jovem Pena, Moysés, Lígia, Fê do Marquinhos, Paulinho, Atanásio, Naira, Jú do Cajú, Mariane, Jorge & Mateus, Gábi, João (Heidge), Ninão.

“Às vezes a vida te bate com um tijolo na cabeça. Não perca a fé. Estou convencido de que a única coisa que me fez continuar foi que eu amava o que eu fazia. Você precisa encontrar o que você ama. E isso vale para o seu trabalho e para seus amores. Seu trabalho irá tomar uma grande parte da sua vida e o único meio de ficar satisfeito é fazer o que você acredita ser um grande trabalho. E o único meio de se fazer um grande trabalho é amando o que você faz. Caso você ainda não tenha encontrado [o que gosta de fazer], continue procurando. Não pare. Do mesmo modo como todos os problemas do coração, você saberá quando encontrar. E, como em qualquer relacionamento longo, só fica melhor e melhor ao longo dos anos. Por isso, continue procurando até encontrar, não pare”.

“Você não pode conectar os pontos olhando para frente; você só pode conectar os pontos olhando para trás. Assim, você precisa acreditar que os pontos irão se conectar de alguma maneira no futuro. Você precisa acreditar em alguma coisa – no seu intestino, no seu destino, na sua vida, no karma, em qualquer coisa. Este pensamento nunca me deixou na mão, e fez toda a diferença na minha vida”.

“Lembrar que eu estarei morto em breve é a ferramenta mais importante que eu encontrei para me ajudar a fazer grandes escolhas na vida. Por que quase tudo – todas as expectativas externas, todo o orgulho, todo o medo de se envergonhar ou de errar – isto tudo cai diante da face da morte, restando apenas o que realmente é importante. Lembrar que você vai morrer é a melhor maneira para eu saber evitar em pensar que tenho algo a perder. Você já está nu. Não há razão para não seguir o seu coração”.

“Isto foi o mais perto que cheguei da morte e espero que seja o mais perto que eu chegue nas próximas décadas. Tendo passado por isso, posso dizer agora com mais certeza do que quando a morte era apenas um conceito intelectual: ninguém quer morrer. Até mesmo as pessoas que querem ir para o céu não querem morrer para ir para lá. Ainda, a morte é um destino que todos nós compartilhamos. Ninguém conseguiu escapar dela. E assim é como deve ser porque a morte é talvez a melhor invenção da vida. É o agente que faz a vida mudar. É eliminar o velho para dar espaço para o novo. Neste momento, o novo são vocês, mas algum dia não tão

longe, vocês gradualmente serão o velho e darão espaço para o novo. Desculpa eu ser tão dramático, mas é a verdade”.

“Seu tempo é limitado. Por isso, não perca tempo em viver a vida de outra pessoa. Não se prenda pelo dogma, que nada mais é do que viver pelos resultados das ideias de outras pessoas”.

Steve Jobs

SANGALLI, J.R. **Uso de agentes modificadores de cromatina na transferência nuclear de células somáticas em bovinos**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

Resumo

Embora a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) seja uma ferramenta promissora, seu amplo uso é impedido devido às altas taxas de mortalidade durante o desenvolvimento dos animais clonados. Acredita-se que a reprogramação epigenética anormal seja a principal causa desta baixa eficiência. Nós hipotetizamos que agentes modificadores de cromatina (AMCs) atingindo a acetilação das histonas e a metilação do DNA poderiam alterar a configuração da cromatina e torná-la mais facilmente reprogramável. Deste modo, fibroblastos bovinos foram tratados com 5-aza-2'-deoxicitidina (AZA) mais tricostatina A (TSA) ou hidralazina (HH) mais ácido valpróico (VPA) enquanto, em outro experimento, zigotos bovinos clonados foram tratados com TSA. O tratamento dos fibroblastos com AZA+TSA ou HH+VPA aumentou a acetilação das histonas, mas não afetou o nível de metilação do DNA. Entretanto, o tratamento com HH+VPA diminuiu a viabilidade/proliferação celular. O uso destas células como doadoras de núcleo não mostrou efeitos positivos sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantação. Em relação ao tratamento dos zigotos clonados com TSA, o tratamento destes mostrou um aumento nos padrões de acetilação das histonas, mas não reduziu o nível de metilação do DNA. Além disso, este tratamento não resultou em efeito positivo sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantação. Este trabalho fornece evidências de que o tratamento de células doadoras de núcleo ou zigotos clonados com AMCs não tem efeito positivo sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantação de bovinos clonados.

Palavras chave: transferência nuclear, tricostatina A, ácido valpróico, hidralazina, 5-aza-2'-deoxicitidina, embriões bovinos, metilação, acetilação, bovinos, epigenética.

SANGALLI, J.R. **Use of chromatin modifying agents in bovine somatic cell nuclear transfer**. 2011. 45 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

ABSTRACT

Although somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a promising tool, its potential use is hampered by the high mortality rates during the development to term of cloned offspring. Abnormal epigenetic reprogramming of donor nuclei after SCNT is thought to be the main cause of this low efficiency. We hypothesized that chromatin-modifying agents (CMAs) targeting chromatin acetylation and DNA methylation could alter the chromatin configuration and turn them more amenable to reprogramming. Thus, bovine fibroblasts were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) plus trichostatin (TSA) or hydralazine (HH) plus valproic acid (VPA) whereas, in another trial, cloned bovine zygotes were treated with TSA. The treatment of fibroblasts with either AZA+TSA or HH+VPA increased histone acetylation, but did not affect the level of DNA methylation. However, treatment with HH+VPA decreased cellular viability and proliferation. The use of these cells as nuclear donors showed no positive effect on pre- and post-implantation development. Regarding the treatment of cloned zygotes with TSA, treated one-cell embryos showed an increase in the acetylation patterns, but not in the level of DNA methylation. Moreover, this treatment revealed no positive effect on pre- and post-implantation development. This work provides evidence the treatment of either nuclear donor cells or cloned zygotes with CMAs has no positive effect on pre- and post-implantation development of cloned cattle.

Keywords: nuclear transfer, trichostatin A, valproic acid, hydralazine, 5-aza-2'-deoxycytidine, bovine embryos, methylation, acetylation, cattle, epigenetic.

Sumário

INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Isolamento de células somáticas e cultivo	11
Coleta de oócitos e maturação in vitro	12
Transferência nuclear de células somáticas	13
Transferência de embriões e avaliação das gestações.....	14
Experimento 1: Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com AZA e TSA sobre o desenvolvimento pré- e pós implantacional	14
Experimento 2: Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com HH e VPA sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional	16
Experimento 3: Efeito do tratamento de embriões clonados com TSA sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional	17
Imunodeteção de H3K9ac e 5-metilcitosina	18
Ensaio de proliferação celular usando MTT	19
Análise estatística	20
RESULTADOS.....	20
Aumento da acetilação da H3K9, e manutenção do nível de metilação global dos fibroblastos tratados com AZA+TSA ou HH+VPA.....	21
Aumento da acetilação da H3K9 em células doadoras de núcleo não tem efeito sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos embriões clonados	24
Aumento da acetilação da H3K9 em embriões clonados não tem efeito sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional	28
DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

INTRODUÇÃO

Desde o nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997), a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tornou-se uma ferramenta promissora para muitos campos das ciências biológicas, incluindo a produção de proteínas farmacêuticas valiosas no leite (SCHNIEKE et al., 1997), a medicina regenerativa (GURDON; MELTON, 2008) e a pesquisa em animais de produção (WELLS; OBACK; LAIBLE, 2003). Embora muitos laboratórios ao redor do mundo lançaram projetos de pesquisa para melhor entender os mecanismos fundamentais da reprogramação nuclear, por exemplo (HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2006; PASQUE; MIYAMOTO; GURDON, 2011), o amplo uso da clonagem é impedido devido a baixa eficiência desta técnica, tal que menos que 10% dos embriões produzidos por TNCS transferidos para vacas receptoras são capaz de produzir um animal saudável (CIBELLI, 2007) e somente entre 0 a 4 % destes embriões viáveis são capazes de atingir a idade adulta (WILMUT et al., 2002; GURDON; MELTON, 2008). Entre os muitos fatores que afetam a eficiência da TNCS, a reprogramação epigenética anormal é considerada a principal causa da baixa eficiência (YANG et al., 2007).

A epigenética engloba uma ampla gama de mudanças herdáveis na expressão gênica que não resultam de alterações na sequência do DNA (JAENISCH; BIRD, 2003). Estas incluem metilação do DNA (5-metilcitosina ou 5-mC) e modificações nas caudas das histonas, tais como a metilação, acetilação, fosforilação, sumoilação e ubiquitinação, as quais modulam a interação da sequência do DNA genômico com as suas proteínas ligantes (KOUZARIDES, 2007).

As modificações epigenéticas, junto com mecanismos genéticos, regulam a atividade transcricional em tecidos normais (JAENISCH; BIRD, 2003) e são frequentemente mal reguladas em embriões clonados (MORGAN et al., 2005). Por exemplo, Dean e colaboradores (2001) observaram que a reprogramação epigenética global do núcleo somático é aberrante na maioria dos embriões clonados. Além disso, Wee e colaboradores (2006) sugerem que a reprogramação epigenética aberrante observada em embriões clonados seja devido à persistência dos padrões de acetilação das células somáticas usadas como doadoras de núcleo.

Neste contexto, várias pesquisas tem tentado corrigir estas alterações epigenéticas em embriões clonados por meio do tratamento, seja antes ou após a TNCS com agentes modificadores de cromatina (AMCs) (MONTEIRO et al., 2011).

AMCs, os quais incluem inibidores das histonas deacetilases (HDACi) e das metiltransferases do DNA (DNMT1), surgiram como uma ferramenta valiosa para auxiliar a elucidar os mecanismos fundamentais da reprogramação nuclear e para melhorar a produção de animais clonados (ONO et al., 2010). Estas drogas atingem a metilação do DNA (ex. 5-azacitidina, 5-aza-2'-deoxicitidina [AZA], zebularina e RG108), diminuindo os níveis globais de 5-mC, ou aumentando os padrões globais de acetilação das histonas (ex. tricostatina A [TSA] e butirato de sódio) (KELLY; DE CARVALHO; JONES, 2011). Outros exemplos de AMCs são drogas que são usadas comumente com propósitos farmacológicos, mas que possuem efeitos colaterais epigenéticos. Entre estas, estão drogas como a antihipertensiva hidralazina (HH), a qual inibe a metilação do DNA, e o estabilizante de humor e anti-epilético Ácido Valpróico, um inibidor da histona deacetilase (CSOKA; SZYF, 2009).

Vários estudos tem sido executados para avaliar o uso de AMCs na TNCS. Estes incluem o tratamento com AMCs antes (nas células doadoras de núcleo) ou após (embriões nos estágios iniciais) a transferência nuclear. Como resultados, diferentes grupos tem encontrado uma melhora significativa nas taxas de desenvolvimento pré-implantacional (LI et al., 2008; SHI et al., 2008; AKAGI et al., 2011; COSTA-BORGES; SANTALO; IBANEZ, 2011) e qualidade dos blastocistos (IAGER et al., 2008; CUI et al., 2011; LEE et al., 2011). Além disso, uma melhora no desenvolvimento a termo tem também sido relatado em camundongos e suínos miniatura considerando a produção de animais clonados usando AMCs (KISHIGAMI et al., 2006; ZHAO et al., 2009). Contudo, pouco é conhecido sobre os efeitos dos AMCs sobre o desenvolvimento pós-implantacional de grandes animais. O longo período das gestações e os altos custos de manutenção destas são pontos que contribuem para tornar estes dados escassos para espécies como o bovino. Além disso, os efeitos prejudiciais após uso dos AMCs tem também sido mostrados, especialmente quando células somáticas ou embriões são expostos a altas doses destas drogas (ENRIGHT et al., 2003).

Devido à relevância do bovino para a produção de alimentos e como um modelo para humanos, novos estudos são necessários para elucidar os efeitos dos AMCs sobre o desenvolvimento pós-implantacional dos embriões clonados. Por isso,

nós executamos uma série de experimentos para testar se o tratamento de células doadoras de núcleo ou oócitos reconstruídos com AMCs poderiam afetar o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos bovinos clonados. Nós hipotetizamos que a associação entre drogas atingindo a cromatina e a metilação do DNA poderia alterar a configuração da cromatina e torná-la mais facilmente reprogramável. Células somáticas usadas como doadoras de núcleo foram tratadas com AZA + TSA ou HH + VPA, enquanto zigotos foram tratados exclusivamente com TSA. HH e VPA foram escolhidos como um tratamento menos agressivo devido à alta toxicidade da AZA e da TSA sobre a viabilidade e proliferação celular. Nós esperamos com estes tratamentos encontrar uma redução nos níveis de metilação global (devido a AZA ou HH) e um aumento nos padrões globais de acetilação das histonas (devido a TSA ou VPA) das células e embriões, que por sua vez poderão facilitar a reprogramação nuclear e melhorar as taxas de desenvolvimento na TNCS.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA) a menos que citado de outra maneira. De um modo geral, os procedimentos *in vitro* foram executados em incubadoras umidificadas mantidas a 38,5°C em ar com 5% CO₂. Fibroblastos e embriões foram cultivados nas mesmas condições, mas em uma incubadora com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction).

Isolamento de células somáticas e cultivo

Um total de 9 linhagens de fibroblastos foram usadas como doadoras de núcleo. Estas foram derivadas de 1 touro Nelore (*Bos indicus*) , 6 vacas Nelore e 2 vacas Girolando (Gir x Holstein; *B. indicus* x *B. taurus*), com a idade extendendo-se

de 1,5 a 16 anos. Resumidamente, biópsias de pele (1-2 cm²) foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de lâminas de bisturi e digeridos 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 ressuspendido em Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina. As células foram plaqueadas em placas de petri de 35 mm e mantidas por 6 dias na incubadora. Após isto, as células foram tripsinizadas da placa usando Tryple Express (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ressuspensas em IMDM suplementado com 20% SFB, 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina, colocadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Os ovários foram obtidos de um abatedouro local e transportado para o laboratório dentro de 3 h, em solução salina a 0,9% a 25-30°C e suplementado com 100 U/ml penicilina e 100 U/ml estreptomicina. Complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos entre 2-8 mm usando uma agulha de 18-gauge acoplada a uma seringa de 10 mL. Os CCOs recuperados que possuíam citoplasma homogêneo e ao menos 3 camadas de células do cumulus foram selecionados e lavados em Tissue Culture Medium-199 (TCM-199; GIBCO BRL) tamponado com HEPES e suplementado com 10% SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina. Grupos de 15-20 CCOs foram cultivados sob óleo mineral, em gotas de 90 µl de TCM-199 tamponado com Bicarbonato e suplementado com 10% SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio, 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina, 0,5 µg/ml de hormônio folículo estimulante (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, Canada), 50 µg/ml de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor; Lab Calier, Barcelona, Spain) e 1 µg/ml de estradiol por 17-18 h em uma incubadora. Após a maturação *in vitro* (MIV), as células do cumulus dos oócitos foram removidas através de pipetagem em solução de hialuronidase a 0,2% e os oócitos selecionados

baseados na presença do primeiro corpúsculo polar (1º CP) para ser usado para TNCS.

Transferência nuclear de células somáticas

A TNCS foi executada como descrito por De Bem et al. (2011), com algumas modificações. Resumidamente, um criotubo contendo fibroblastos congelados foi descongelado imergindo-o em água aquecida a 37°C, as células foram lavadas em IMDM suplementado com 10% SFB e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina, e plaqueadas em placas de petri de 35 mm com cerca de 25% de confluência. Após a confluência (aproximadamente dois dias pós plaqueamento), as células foram cultivadas por outro período de dois dias para manter o ciclo celular no estágio G0/G1 via inibição por contato. Para uma rotina experimental, fibroblastos de uma única cultura e na mesma passagem celular foram usados como doadores de núcleo para todos os tratamentos.

Grupos de 20-30 oócitos com o 1º CP foram mantidos em uma incubadora por 20 minutos em meio de cultivo embrionário (CR2aa; (WATANABE et al., 1999)) suplementado com 2% SFB, 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina (nomeado CR2aa+) mais 10 µg/ml Hoechst 33342 e 7,5 µg/ml de citocalasina B. Depois, os oócitos foram transferidos para uma gota de 100-µL de TCM-199 tamponado com HEPES e suplementado com 10% SFB, 0,2 mM de sódio piruvato, 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina e 7,5 µg/mL citocalasina B. A microcirurgia foi executada usando um microscópio invertido (Leica DMI RB; Leica, Wetzlar, Germany) equipado com micromanipuladores e microinjetores (Narishige, Tokyo, Japan). O 1ºCP e a placa metafásica (MII) foram removidos dos oócitos por aspiração usando uma pipeta de vidro com 15-µm de diâmetro interno, (ES transferTip; Eppendorf, Hamburg, Germany). A Remoção do 1ºCP e da placa metafásica (MII) foi confirmada pela exposição da biópsia citoplasmática a luz ultravioleta.

Os oócitos enucleados foram reconstruídos pela injeção de um fibroblasto no espaço perivitelínico usando o mesmo sistema de micromanipulação descrito acima.

O oócito reconstruído foi colocado em uma câmara de fusão (Eppendorf) preenchido com solução de eletrofusão (0,28 M manitol, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,5 mM HEPES e 0,05% BSA em água ultra pura) e submetido a 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) para promover a fusão entre o fibroblasto e o citoplasto recipiente. Os conjuntos célula doadora mais citoplasto fundidos foram ativados 26 h pós início da MIV pela exposição destes por 5 minutos em 5 μ M de ionomicina em TCM-199 tamponado com HEPES e suplementado com 0,1% BSA (livre de ácidos graxos), 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 μ g/ml de sulfato de amicacina, seguido por incubação por 4 minutos em TCM-199 tamponado com HEPES mais 3% de BSA, e depois por 4 horas em 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) em CR2aa+ (SUSKO-PARRISH et al., 1994). Seguindo, os presumíveis zigotos foram lavados três vezes em CR2aa+ e colocados em grupos de 15-20 em gotas de 90- μ l de CR2aa+ sob óleo mineral para serem cultivados por 7 dias. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas 48 e 168 horas pós-ativação (hpa), respectivamente. Em todas as rotinas, embriões partenogênicos foram gerados segundo os procedimentos descritos acima e usados como controle.

Transferência de embriões e avaliação das gestações

Blastocistos no dia 7 de desenvolvimento foram individualmente transferidos via transcervical para o útero de vacas receptoras previamente sincronizadas (NASSER et al., 2004). Estas vacas receptoras foram avaliadas para verificar a ocorrência de gestações por visualização dos batimentos cardíacos fetais nos dias 30, 60 e 90 de gestação; as gestações foram acompanhadas até o desenvolvimento a termo. A taxa de aborto foi avaliada mensalmente.

Experimento 1: Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com AZA e TSA sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional

Neste experimento nós pretendíamos reduzir o nível global de metilação e aumentar o padrão global de acetilação das histonas pelo tratamento das células doadoras de núcleo com AZA e TSA. Fibroblastos tratados com AZA e TSA foram usados como doadores de núcleo na TNCS para avaliar seus efeitos sobre as taxas de desenvolvimento. Deste modo, fibroblastos foram cultivados por 96 horas como descrito acima (veja Transferência nuclear de células somáticas). Quando as células alcançaram cerca de 50% de confluência (24 h pós plaqueamento) elas foram tratadas (AZA +TSA) ou não (Controle) com 10 nM de AZA suplementada no meio de cultivo celular. Além disso, as células tratadas tiveram 50 nM de TSA adicionado ao meio de cultura 84 horas pós plaqueamento, ou seja 12 horas antes do fim do cultivo celular. Portanto, as células tratadas foram submetidas ao tratamento com AZA e TSA por 72 e 12 horas respectivamente (Figura 1). Nós escolhemos tratar as células por estes períodos baseados em um trabalho anterior (DING et al., 2008). As células controle foram mantidas em cultivo pelo mesmo período que as células tratadas, mas sem a adição de AZA e TSA. Os fibroblastos do grupo controle e tratado foram utilizados como doadores de núcleo na TNCS (ver Transferência nuclear de células somáticas) ou usadas para imunocitoquímica. No último caso, fibroblastos foram fixados em PBS com 0,1% de polivinilpirrolidona (PBS-PVP) com 4 % de paraformaldeído após as 96 horas de cultivo. Os embriões derivados das células controle e tratadas foram avaliados para as taxas de desenvolvimento (ver Transferência nuclear de células somáticas) e os blastocistos viáveis foram transferidos para vacas receptoras sincronizadas (ver acima) para avaliar as taxas de desenvolvimento pós-implantacional. Alternativamente, os fibroblastos foram avaliados quanto a taxa de proliferação/viabilidade, plaqueando 6×10^3 células por poço em placas de 96 poços, e cultivadas como descrito acima e usadas para o ensaio de MTT (ver abaixo).

Figura 1. Esquema ilustrando os Experimentos 1 e 2 (ver abaixo).

Experimento 2: Efeito do tratamento de células doadoras de núcleo com HH e VPA sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional

Como no experimento 1, neste experimento nós procuramos reduzir o nível global de metilação do DNA e aumentar o padrão global de acetilação das histonas das células doadoras de núcleo para avaliar os efeitos sobre as taxas de desenvolvimento após a TNCS. Entretanto, neste caso os fibroblastos foram tratados com 40 mM de HH (24 horas pós plaqueamento) e 2 mM de VPA (84 horas pós plaqueamento) ao invés de AZA+TSA (ver Figura 1 acima). Embora estas drogas possuam o mesmo efeito sobre a metilação e a acetilação das histonas nas células, elas foram julgadas serem menos tóxicas que AZA + TSA. Por isso, fibroblastos foram tratados (HH + VPA) ou não (Controle) como descrito acima (experimento 1) e usadas para a TNCS (taxas de desenvolvimento pré e pós-implantação), imunocitoquímica ou ensaio de MTT.

Experimento 3: Efeito do tratamento de embriões clonados com TSA sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional

Nosso objetivo neste experimento foi aumentar o padrão global de acetilação das histonas do núcleo doador após a TNCS, por meio do tratamento dos oócitos reconstruídos com TSA, e avaliar seus efeitos sobre as taxas de desenvolvimento. Durante a ativação, os oócitos reconstruídos foram tratados (Grupo TNCS+TSA) ou não (Grupo Controle - TNCS) com 50 nM de TSA durante o período de 4 horas de incubação com o 6-DMAP (ver Transferência nuclear de células somáticas). Então, ambos os oócitos, controle e tratados foram extensivamente lavados em CR2aa+. Os oócitos controles foram imediatamente cultivados em CR2aa+ como descrito acima (ver Transferência nuclear de células somáticas), enquanto os oócitos tratados foram incubados em CR2aa+ suplementado com 50 nM de TSA por um período extra de 9 horas. Depois, os oócitos tratados foram extensivamente lavados em CR2aa+ como os oócitos controle (Figura 2). Ambos os embriões do grupo controle e tratado foram avaliados para as taxas de desenvolvimento (ver Transferência nuclear de células somáticas) e os blastocistos viáveis foram transferidos para vacas receptoras sincronizadas (NASSER et al., 2004) para avaliar as taxas de desenvolvimento pós-implantação. Além disso, no final do tratamento os presumíveis zigotos (controle e tratados) foram, ao invés de cultivado, fixados em PBS-PVP suplementado com 4% de paraformaldeído para ser avaliado por imunocitoquímica.

Figura 2. Esquema ilustrando o Experimento 3.

Imunodetecção de H3K9ac e 5-metilcitosina

Os embriões no estágio de zigoto e as células doadoras foram avaliados considerando o nível global de metilação e de acetilação do resíduo de lisina 9 na histona H3 (H3K9ac) como relatado anteriormente (GIRALDO et al., 2007; DING et al., 2008; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; WANG, L. J. et al., 2011), com algumas modificações. Resumidamente, as amostras fixadas foram lavadas em PBS-PVP, permeabilizada por 20 minutos em PBS-PVP com 1% de Triton X-100, lavadas em PBS-PVP contendo 0,1% de Tween 20 (TW-PBS) e incubada por 15 min em 4 N HCl. Após isso, as amostras foram extensivamente lavadas em TW-PBS e os sítios de ligação não específicos foram bloqueados por incubação overnight a 4°C em uma solução de bloqueio consistindo de PBS-PVP contendo 0,4% de BSA. As amostras foram então incubadas por 3 horas a 37°C com os anticorpos primários anti-mouse 5-mC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e o anti-rabbit H3K9ac (Millipore, Bedford, MA, USA) diluídos na concentração de 1:1000. Depois, as amostras foram lavadas em TW-PBS e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente (protegido da luz) com os anticorpos secundários goat anti-rabbit

conjugado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e o rabbit anti-mouse conjugado com rodamina (Santa Cruz Biotechnology) diluídos na concentração de 1:500. Após várias lavagens em TW-PBS, os embriões ou as células doadoras foram montados sobre lâminas de microscopia cobertos com lamínulas usando um protetor de fluorescência Prolong Antifade (Invitrogen). Um microscópio de epifluorescência (Axioplan; Carl Zeiss, Zeppelingstrasse, Germany) foi usado para avaliar a metilação do DNA e a acetilação das histonas. Como controle negativo, a incubação com o anticorpo primário foi feita somente com a solução de PBS (usada para diluir o anticorpo).

Imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Zeiss MC 80 DX; Carl Zeiss) e os mesmos parâmetros foram utilizados para todas as imagens quando considerando o mesmo grupo (ex. metilação ou acetilação). As imagens tiveram a intensidade de pixels analisadas usando o software ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Neste caso, 15 imagens de embriões individuais e 10 imagens de fibroblastos por grupo foram analisadas considerando o status de metilação e acetilação. Os núcleos foram recortados individualmente em cada imagem de fibroblastos (excluindo-se os núcleos sobrepostos ou cruzados) usando o Adobe Photoshop v. 7 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Cerca de 30 núcleos foram recortados em cada imagem de fibroblastos. O background foi subtraído da intensidade de pixels em todas as imagens analisadas e a intensidade de sinal médio foi calculado usando o software ImageJ (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). A intensidade se refere ao grau de brilho dos pixels coloridos (em uma escala de cinza: 0-255; sendo 0=preto e 255= branco), onde maior intensidade de brilho indica maior reatividade na imunocitoquímica.

Ensaio de proliferação celular usando MTT

A viabilidade e proliferação dos fibroblastos foram avaliadas usando o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 4-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT). Este método é baseado em um ensaio colorimétrico, onde a redução dos sais amarelos de tetrazolium pela atividade metabólica celular forma cristais insolúveis de formazan de

coloração roxa que se acumulam em células viáveis (MOSMANN, 1983). Resumidamente, 100 µl de solução de MTT (0,5 mg/ml concentração final) foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços (ver experimento 1 e 2) e deixados por 3 horas em uma incubadora umidificada com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ a 38,5°C. Após isto, o excesso de MTT foi removido e 200 µl de isopropanol ácido (0,04 M HCl em isopropanol absoluto) foi adicionado dentro de 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) com 570 nm de comprimento de onda. Os valores de absorbância são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle.

Análise estatística

A análise estatística foi executada usando o SAS System (V8; Cary, NC, USA). Os dados de imunocitoquímica e o MTT foram analisados por one-way ANOVA seguidos por Tukey posthoc test. As taxas de desenvolvimento pré- e pós-implantação foram analisadas usando o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fischer. Sete linhas celulares foram analisadas considerando os dois tratamentos (AZA+TSA e HH+VPA) e o grupo controle para imunocitoquímica e o ensaio de MTT. Vinte-sete rotinas de produção de embriões, consistindo de 9 rotinas considerando o experimento 1, 5 rotinas considerando o experimento 2 e 13 rotinas considerando o experimento 3, foram executadas. Diferenças com probabilidades (P) < 0,05 foram consideradas significantes. No texto, os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

Aumento da acetilação da H3K9, e manutenção do nível de metilação global dos fibroblastos tratados com AZA+TSA ou HH+VPA

A fim de reduzir o nível de metilação global e aumentar os padrões de acetilação das histonas, os fibroblastos foram tratados com AZA+TSA ou HH+VPA. Como determinados por imunocitoquímica, ambos os coquetéis foram eficientes em aumentar a acetilação da H3K9, mas não em reduzir o nível de metilação das citosinas (Figura 3). Comparado com as células controle, os fibroblastos tratados com AZA+TSA mostraram um aumento da acetilação da H3K9 de cerca de 1,6 vezes enquanto que os fibroblastos tratados com HH+VPA mostraram um aumento de cerca de 1,4 vezes ($P < 0.0001$). De outra maneira, ambos tratamentos não diferiram em relação as células controle considerando a metilação das citosinas. Alterações na morfologia celular foram observadas considerando o tratamento com HH + VPA (Figura 3). Este tratamento resultou em células mais achatadas e alongadas comparado as células controle e tratadas com AZA + TSA. Similarmente, o tratamento com HH + VPA parece aumentar o tamanho do núcleo celular (Figura 3) comparado aos outros dois grupos (controle e AZA+TSA).

Figura 3. Aumento da acetilação da H3K9, e manutenção do nível de metilação do DNA após o tratamento dos fibroblastos com AZA+TSA ou HH+VPA. (a) Intensidade média relativa da acetilação da H3K9 (H3K9ac) das células controle não tratadas e tratadas com AZA+TSA ou HH+VPA. Barras com letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). (b) Intensidade média relativa da 5-metilcitosina (5-mC) das células controle não tratadas e tratadas com AZA+TSA ou HH+VPA. (c-e) Microscopia de Luz (c) e reação de imunofluorescência para H3K9ac (d) e 5-mC (e) de células controle não tratadas. (f-h) Microscopia de luz (f) e reação de imunofluorescência para H3K9ac (g) e 5-mC (h) das células tratadas com AZA+TSA. (i-k) Microscopia de luz (i) e reação de imunofluorescência para H3K9ac (j) e 5-mC (k) das células tratadas com

HH+VPA. Cabeças de setas indicam o achatamento e alongamento causados nas células pelo tratamento com HH+VPA. Todas as imagens foram capturadas no mesmo aumento (200 X).

Uma vez que o tratamento com HH+VPA foi esperado ser menos tóxico para a proliferação celular e viabilidade, os tratamentos foram avaliados pelo ensaio de MTT (Figura 4). Em contraste ao que foi esperado, o ensaio de MTT mostrou proliferação/viabilidade reduzida ($P = 0,001$) por cerca de 60% nas células tratadas com HH+VPA ($41 \pm 9\%$) comparado as células não tratadas ($100 \pm 20\%$) ou o tratamento com AZA+TSA ($100 \pm 16\%$). Este resultado é ilustrado pela baixa quantidade de cristais de formazan formados nas células tratadas com HH+VPA após a incubação com MTT enquanto as células controle coraram em roxo devido a sua capacidade de reduzir o composto (Figura 4). Ainda, diferenças não foram encontradas entre AZA+TSA e células controles. Em resumo, o tratamento com AZA+TSA foi mostrado ser tão efetivo como o tratamento com HH+VPA, mas menos tóxico que este.

Figura 4. Diminuição da proliferação e viabilidade pelo tratamento dos fibroblastos com HH+VPA. (a) Porcentagem de proliferação/viabilidade de células controle não tratadas e tratadas com AZA+TSA ou HH+VPA conforme avaliada pelo ensaio de MTT. Barras com letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). (b-d) Microscopia de luz de células não tratadas (b), tratadas com AZA+TSA (c) ou tratadas com HH+VPA (d) após incubação com a solução de MTT. As células tratadas com HH+VPA coraram menos que as células controle e as células tratadas com AZA+TSA devido a sua incapacidade de reduzir o composto MTT. Todas as imagens foram capturadas no mesmo aumento (200x).

Aumento da acetilação da H3K9 em células doadoras de núcleo não tem efeito sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos embriões clonados

Uma vez que o tratamento dos fibroblastos com AMCs resultou em um aumento significativo da acetilação da H3K9, nós decidimos avaliar o uso destas células como doadoras de núcleo na TNCS. Deste modo, dois experimentos foram

conduzidos. Em um primeiro experimento, as células tratadas com AZA+TSA foram submetidas à TNCS, mas não foi encontrado efeito sobre as taxas de fusão e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Tabela 1). Nove rotinas experimentais de produção de embriões foram executadas neste experimento, totalizando 529 embriões cultivados. As taxas de clivagem e blastocistos (77.69% e 19.09%, respectivamente) foram similares entre ambos os grupos resultando em 45 e 56 blastocistos referindo se aos grupos Controle e AZA+TSA, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tratamento das células doadoras de núcleo com AZA+TSA sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional dos embriões clonados

Grupos	Oócitos	Embriões fundidos	Clivagem	Blastocistos
	N	N (%)	N (%)	N (%)
Controle	352	260 (73,86)	194 (74,61)	45 (17,31)
AZA+TSA	351	269 (76,63)	217 (80,66)	56 (20,81)

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

Estes resultados sugerem que não há efeito sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantação quando considerando o tratamento de células doadoras de núcleo com AZA+TSA. Ainda, uma vez que o tratamento poderia ter afetado a qualidade embrionária, antes que as taxas de desenvolvimento, os blastocistos produzidos foram transferidos para vacas receptoras para avaliar o desenvolvimento pós-implantacional (Tabela 2). Quarenta e um e 50 blastocistos, representativos dos grupos controle e AZA+TSA, respectivamente, foram transferidos para vacas receptoras, mas não foi encontrado efeito sobre as taxas de gestações em qualquer estágio de desenvolvimento embrionário e fetal, ou mesmo após o desenvolvimento a termo.

Tabela 2 - Efeito do tratamento das células doadoras de núcleo com AZA+TSA sobre o desenvolvimento pós-implantacional dos clones

Grupos	Embriões transferidos	Gestações			Nascimentos
	N	N (%)			N (%)
		Dia 30	Dia 60	Dia 90	
Controle	41	7 (17,1)	5 (12,2)	4 (9,7)	1 (2,4)
AZA+TSA	50	8 (16,0)	3 (6,0)	3 (6,0)	0

Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente

Taxas de gestações e nascimentos: número de gestações/número de embriões transferidos

Embora o tratamento das células doadoras de núcleo com AZA+TSA não mostrou efeito sobre o desenvolvimento dos bovinos clonados, somente o grupo controle resultou no nascimento de um bezerro viável aos 285 dias de gestação. Uma gestação no grupo AZA+TSA permaneceu viável até o dia 270, entretanto a vaca receptora mostrou sinais de hidropsia das membranas fetais e o bezerro morreu, devido à incompleta maturação pulmonar e atelectasia, logo após a cesárea.

Em um segundo experimento, os fibroblastos mostrando aumento da acetilação da H3K9, mas devido ao tratamento com HH+VPA, foram submetidos à TNCS para avaliar as taxas de desenvolvimento (Tabela 3). Cinco rotinas de TNCS foram executadas para testar os efeitos do tratamento com HH+VPA sobre as taxas de desenvolvimento, totalizando 309 embriões cultivados e 60 blastocistos. Em contraste ao que foi observado no primeiro experimento, o uso destas células como doadoras de núcleo resultou em melhor ($P=0,02$) taxa de fusão (81,63%) comparado ao grupo controle (71,98%). Contudo, este efeito positivo do tratamento com HH+VPA não foi confirmado considerando as taxas de clivagem e de blastocistos (Tabela 3). Além disso, comparado ao grupo controle, o tratamento comprometeu ($P=0,02$) o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (24,83% VS. 14,37%, respectivamente).

Tabela 3 - Efeito do tratamento das células doadoras de núcleo com HH+VPA sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional de embriões clonados

Grupos	Oócitos N	Embriões fundidos N (%)	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)
Controle	207	149 (71,98) ^a	118 (79,19)	37 (24,83) ^a
HH+VPA	196	160 (81,63) ^b	123 (76,87)	23 (14,37) ^b

Valores com diferentes sobrescritos (a, b) dentro da mesma coluna são significativamente diferentes (P = 0,02)

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

Para posteriormente avaliar o efeito deste tratamento sobre o desenvolvimento pós-implantacional, 49 blastocistos foram transferidos em vacas receptoras (Tabela 4). Ainda, não foi observado efeito do tratamento com HH+VPA sobre as taxas de gestações aos 30 dias, apesar do grupo controle ser marginalmente superior ao grupo tratado (P = 0,24). Além disso, nenhuma gestação permaneceu no grupo tratado nos dias 60 e 90 de gestação, enquanto 10% e 6,7% das gestações permaneceram no grupo controle, respectivamente. Contudo, nenhuma gestação desenvolveu a termo, sendo as que permaneceram no grupo controle foram perdidas entre os dias 180 a 210 de desenvolvimento.

Tabela 4 - Efeito do tratamento das células doadoras de núcleo com HH+VPA sobre o desenvolvimento pós-implantacional dos clones

Grupos	Embriões transferidos	Gestações N (%)			Nascimentos N (%)
		Dia 30	Dia 60	Dia 90	
Controle	30	5 (16,7)	3 (10,0)	2 (6,7)	0
HH+VPA	19	1 (5,26)	0	0	0

Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente

Taxas de gestações e nascimentos: número de gestações/número de embriões

Em resumo, estes resultados indicam que apesar de um aumento da acetilação da H3K9 dos fibroblastos, o uso destas células como doadoras de núcleo na TNCS não melhorou o desenvolvimento pré- e pós-implantacional de bovinos clonados.

Aumento da acetilação da H3K9 em embriões clonados não tem efeito sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional

Após demonstrar que o uso de células doadoras de núcleo com aumento da acetilação da H3K9 não melhorou as taxas de desenvolvimento na TNCS, nós escolhemos tratar os zigotos com TSA a partir do momento da ativação para avaliar seus efeitos sobre o posterior desenvolvimento. Os oócitos reconstruídos foram então tratados com TSA durante a ativação e nas 9 horas seguintes a ativação. Este protocolo aumentou a acetilação da H3K9 em zigotos avaliada por imunocitoquímica (Figura 5). Os zigotos tratados com TSA mostraram uma marcação mais intensa para a acetilação da H3K9 comparada aos controles, ou seja, os zigotos clonados não tratados e os zigotos partenogenéticos ($P < 0,0001$). Em contrapartida, a metilação das citosinas não mostrou diferença entre os grupos (Figura 5). Juntos, estes resultados sugerem que o tratamento dos zigotos com TSA aumenta a acetilação das histonas, mas não afeta a metilação das citosinas.

Figura 5. Aumento da acetilação da H3K9, e manutenção do nível de metilação do DNA pelo tratamento dos zigotos clonados com TSA. (a) Intensidade média relativa da H3K9ac dos embriões partenogenéticos não tratados (partenogênese), embriões clonados não tratados (TNCS) e embriões tratados com TSA (TNCS+TSA). Barras com letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). (b) Intensidade média relativa da 5-metilcitosina (5-mC) de embriões partenogenéticos não tratados (partenogênese), embriões bovinos clonados não tratados (TNCS) e embriões clonados tratados com TSA (TNCS+TSA). (c-d) Reação de imunofluorescência para H3K9ac (c) e 5-mC (d) dos embriões partenogenéticos não tratados. (e-f) Reação de imunofluorescência para H3K9ac (e) e 5-mC (f) dos embriões clonados não tratados. (g-h) Reação de imunofluorescência para a H3K9ac (g) e 5-mC (h) dos embriões tratados com TSA. A cabeça da seta indica a marcação do corpúsculo polar. Todas as imagens foram capturadas no mesmo aumento (200 X).

Como o tratamento com TSA foi efetivo em aumentar a acetilação da H3K9, nós posteriormente investigamos seus efeitos sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional. Um total de 736 zigotos, representativos de 13 rotinas experimentais, foram cultivados para avaliar o efeito do tratamento dos zigotos clonados com TSA sobre as taxas de desenvolvimento. Como mostrado na Tabela 5, não foi encontrado efeito do tratamento considerando as taxas de clivagem (80,76%) e blastocistos (24,12%) comparados aos embriões clonados não tratados (79,56% e 26,15%, respectivamente).

Tabela 5 - Efeito do tratamento dos zigotos clonados com TSA sobre as taxas de desenvolvimento pré-implantacional

Grupo	Embriões cultivados	Clivagem	Blastocistos
	N	N (%)	N (%)
Controle	367	292 (79,56)	96 (26,15)
TSA	369	298 (80,76)	89 (24,12)

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

Considerando os 185 blastocistos produzidos neste experimento, 121 foram transferidos para vacas receptoras para avaliar as taxas de gestação e de nascimento (Tabela 6). Não foi observado efeito do tratamento com TSA nos dias 30, 60 e 90 de gestação. No dia 90, 4 gestações foram confirmadas em cada grupo, mas somente 1 feto por grupo desenvolveu a termo (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do tratamento dos zigotos clonados com TSA sobre as taxas de desenvolvimento pós-implantacional

Grupos	Embriões transferidos	Gestações			Nascimentos
	N	N (%)			N (%)
		Dia 30	Dia 60	Dia 90	
Controle	60	14 (23,3)	4 (6,6)	4 (6,6)	1 (1,6)
TSA	61	9 (14,7)	4 (6,5)	4 (6,5)	1 (1,6)

Valores dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente

Taxa de Gestação: número de gestações/número de embriões transferidos

Os bezerros nasceram através de cesárea, mas ambos morreram poucas horas após o nascimento, apesar do cuidado neonatal intensivo (MEIRELLES et al., 2010). O bezerro do grupo controle mostrou incompleta maturação pulmonar e morreu devido à dificuldade respiratória. O bezerro do grupo tratado apresentava o cordão umbilical aumentado de tamanho, e morreu devido à ruptura dos vasos sanguíneos e consequente hemorragia do cordão umbilical. Estes resultados sugerem que o tratamento com TSA nos zigotos não tiveram efeitos, comparados ao grupo controle, sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos bovinos clonados.

DISCUSSÃO

Apesar do grande número de espécies nas quais a TNCS tem sido aplicada com sucesso, a TNCS é ainda uma técnica pouco eficiente (ex. cerca de quatrocentos oócitos bovinos imaturos são necessários para produzir um bezerro) (WILMUT et al., 2002; CIBELLI, 2007; GURDON; MELTON, 2008; MEIRELLES et al., 2010). Neste contexto, muitos esforços tem sido empregados, seja para melhorar sua eficiência, assim como para entender os mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação celular. Modificações epigenéticas específicas estabelecidas nas células somáticas, são responsáveis por direcionar a diferenciação de acordo com a

função celular (ex. leucócitos, fibroblastos e neurônios (JAENISCH; BIRD, 2003). Em relação a isso, o núcleo de uma célula doadora deve ser reprogramado a fim de restabelecer a totipotência e produzir todos os diferentes tipos de células em um indivíduo clonado (HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2006). No caso da TNCS, a reprogramação nuclear é mediada pelo citoplasma do oócito que contém fatores específicos necessários para este processo (GURDON, 2006). Entretanto, a capacidade do ooplasma para vigorosamente remodelar o núcleo somático para uma cromatina zigótica totipotente é muitas vezes incompleta e, por isso, a reprogramação defeituosa tem sido frequentemente pensada ser responsável pela baixa produção da TNCS (YANG et al., 2007). A reprogramação epigenética anormal, incluindo a persistência dos padrões de acetilação das células somáticas, tem sido relatadas ter uma alta frequência de ocorrência em embriões clonados (WEE et al., 2006). Também, há evidências que a falha dos embriões oriundos de TNCS desenvolverem normalmente pode ser atribuída, ao menos parcialmente, ao uso de núcleos doadores de células diferenciadas e hipermetiladas, levando a persistência dos padrões de metilação das células somáticas nos embriões clonados (DEAN et al., 2001). Embora alguns destes padrões anormais possam ser corrigidos pelo tratamento com AMCs (IAGER et al., 2008; JEON et al., 2008; ZHAO et al., 2009; ONO et al., 2010), a eficiência destes agentes para a produção de bezerros clonados é ainda desconhecida. A interrelação entre os estados da cromatina e a metilação do DNA sugere que há um “crosstalk” entre as drogas que agem na cromatina e aquelas que atuam na metilação do DNA (SZYF, 2009). Deste modo, nós hipotetizamos que a associação de drogas que atuam nas modificações das histonas e na metilação do DNA poderia alterar a configuração da cromatina e torná-la mais acessível aos fatores de reprogramação. Por isso, nós tratamos as células doadoras de núcleo ou os zigotos clonados com AMCs (drogas hiperacetilantes e drogas demetilantes) para avaliar seus efeitos sobre o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos bovinos clonados produzidos por TNCS. Nossos resultados mostram que, embora todos os tratamentos aumentaram o nível de acetilação global das células doadoras de núcleo, assim como dos zigotos clonados, o desenvolvimento pré- e pós-implantacional dos bovinos clonados não melhoraram pelo tratamento.

Vários estudos tem sido executados para melhorar a eficiência da TNCS tentando tornar a cromatina da célula doadora mais facilmente reprogramada

(ENRIGHT et al., 2003; ENRIGHT et al., 2005; DING et al., 2008; JEON et al., 2008; DAS et al., 2011). Estes tem sido feitos tratando as células doadoras de núcleo com AMCs, tais como os inibidores das HDAC e das DNMT1. Estas drogas modificam a atividade das enzimas HDAC (BRADNER et al., 2010) ou atuam na metilação do DNA, aumentando os padrões de acetilação global das histonas e diminuindo o nível global de metilação do DNA (KELLY; DE CARVALHO; JONES, 2011). Em nosso estudo, o tratamento das células somáticas com AZA+TSA foi efetivo em aumentar os níveis de acetilação das histonas (como avaliado por imunocitoquímica da acetilação da H3K9), mas não em reduzir a metilação do DNA (como avaliado por imunocitoquímica da 5-mC). A inabilidade para alterar o nível de metilação do DNA é provavelmente devido às características da AZA como inibidor da DNMT1. Este composto necessita ser incorporado no DNA durante a síntese do DNA. Ao realizar a reação de metilação, a DNMT1 fica presa por ligação covalente a 5-aza-2'-deoxicitidina durante a passagem da forquilha de replicação, resultando em perda passiva da metilação do DNA na fita nascente (SZYF, 2009). Por isso as células precisam estar ciclando para serem demetiladas pela ação da AZA. Uma vez que em nosso experimento as células somáticas foram expostas a AZA por somente um ou dois ciclos celulares antes de se tornarem quiescentes (devido à inibição por contato quando alcançaram confluência), é provável que a metilação das células não foi significativamente afetada devido ao curto período de tratamento executado. Alternativamente, a imunocitoquímica executada para detectar 5-mC pode não ter sido sensível o bastante para quantificar os efeitos da AZA. A estimativa da intensidade de fluorescência relativa da 5-mC e das modificações das histonas emitidas do núcleo é um de vários, embora de algum modo insensível, meios que tem sido usados, em uma variedade de contextos, para estimar a metilação global do DNA e a acetilação das histonas de células e embriões (ENRIGHT et al., 2005; IAGER et al., 2008; JEON et al., 2008; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; DAS et al., 2011; WANG, L. J. et al., 2011). Além disso, como sugerido por Enright et al. (2005), a baixa dose de AZA usada neste trabalho pode ter prevenido um efeito significativo da droga sobre o nível global de metilação do DNA. As doses usadas foram baseadas em estudos anteriores, os quais tinham mostrado que o uso de altas doses levam a demetilação do DNA, mas prejudicam o desenvolvimento embrionário (ENRIGHT et al., 2003; ENRIGHT et al., 2005; DING et al., 2008). De modo alternativo, drogas mais efetivas podem ser usadas para induzir a demetilação nas

células. Por exemplo, Jeon e colaboradores (2008) mostraram que o S-adenosilhomocisteína (SAH) induz demetilação global do DNA em células doadoras de núcleo devido a sua maior afinidade para o sítio ativo da DNMT1 que o S-adenosilmetionina (SAM). Por outro lado, a TSA, usada para aumentar os padrões globais de acetilação das histonas, não depende do ciclo celular. TSA age diretamente inibindo as histone deacetilases (HDACs), levando a um aumento nos níveis de acetilação da H3K9 como observado em nosso presente estudo. A concentração da TSA utilizada neste estudo, foi também baseada em artigos anteriores (ENRIGHT et al., 2005; DING et al., 2008; IAGER et al., 2008; AKAGI et al., 2011).

Devido à esperada alta toxicidade de AZA+TSA, um coquetel alternativo, suposto ser menos tóxico (HH+VPA) foi também usado para tratar células somáticas. Ambas as drogas HH e VPA são comumente usadas com propósitos farmacológicos em humanos, mas com efeitos colaterais epigenéticos (CSOKA; SZYF, 2009). VPA é um potente inibidor das HDACs, o qual tem sido usado para aumentar a eficiência de reprogramação em células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (HUANGFU et al., 2008) e desenvolvimento a termo de camundongos clonados (COSTA-BORGES; SANTALO; IBANEZ, 2011). VPA tem também sido mostrado possuir efeito de induzir a demetilação ativa independente de replicação em cultivos celulares (DETICH; BOVENZI; SZYF, 2003). Em relação à HH, ela é um inibidor estável da metilação do DNA (CSOKA; SZYF, 2009; SONG; ZHANG, 2009), e tem mecanismo de ação similar a AZA (SINGH et al., 2009), entretanto tem a vantagem, comparado a AZA, de ser menos tóxica tanto *in vitro*, como *in vivo* (SONG; ZHANG, 2009). HH tem também sido mostrada ser efetiva em impedir a metilação do DNA em várias linhagens tumorais (CHUANG et al., 2005; SEGURA-PACHECO et al., 2006; SONG; ZHANG, 2009). Considerando o presente estudo, ambos os coquetéis (AZA+TSA ou HH+VPA) foram similarmente efetivos em aumentar os padrões de acetilação das histonas, mas não em diminuir a metilação do DNA. Ainda, inesperadamente o coquetel com HH+VPA foi encontrado ser mais tóxico para os fibroblastos que o coquetel contendo AZA+TSA. Esta conclusão é baseada sobre os seus efeitos na proliferação e viabilidade (conforme medido pelo ensaio de MTT (MOSMANN, 1983)), assim como sobre a morfologia celular (aparência alongada e achatada). Enquanto as células tratadas com AZA+TSA apresentaram-se similares a células não tratadas, um decréscimo de

proliferação/viabilidade de cerca de 60% foi encontrado nas células tratadas com HH+VPA. Devido a falta de dados considerando seu uso na TNCS, a concentração de HH usada no presente estudo foi baseado em estudos considerando seus efeitos sobre células tumorais (CHUANG et al., 2005; CHAVEZ-BLANCO et al., 2006; SONG; ZHANG, 2009). A concentração de VPA foi baseada em trabalhos prévios relacionados a seus usos em TNCS em suínos (MIYOSHI et al., 2010), camundongos (ONO et al., 2010; COSTA-BORGES; SANTALO; IBANEZ, 2011), assim como em iPSCs em camundongos (HUANGFU et al., 2008). Como observado, a dose escolhida pode ter levado a uma extensiva perda de metilação do DNA, a qual em consequência pode ter resultado em desregulação epigenética, expressão gênica aberrante e apoptose dependente da p53 como demonstrado anteriormente (JACKSON-GRUSBY et al., 2001). O uso concomitante de VPA e HH tem sido mostrado ter forte efeito inibitório do crescimento em linhas de células tumorais (CHAVEZ-BLANCO et al., 2006), o qual pode explicar o decréscimo na proliferação/viabilidade celular observado em nosso estudo. Além disso, as alterações observadas na morfologia celular sugerem um efeito destas drogas sobre o citoesqueleto, uma vez que as HDACs são responsáveis pela dinâmica dos microtúbulos (HUBBERT et al., 2002).

Alternativamente a executar o tratamento nas células doadoras de núcleo, os zigotos clonados foram expostos a TSA durante as 13 primeiras horas pós-ativação. Neste caso, somente um agente hiperacetilante foi empregado devido esta abordagem ter sido mostrada ser eficiente em camundongos (KISHIGAMI et al., 2006) e suínos (ZHAO et al., 2010). O tratamento com TSA pode, entretanto, resultar em demetilação do DNA uma vez que a inibição das HDACs ajuda a recrutar proteínas responsáveis pela demetilação do DNA (JONES et al., 1998; KOUZARIDES, 2007). Alternativamente, alguns inibidores das HDACs, os quais compartilham mecanismos de ação com a TSA (BRADNER et al., 2010), facilitam a demetilação ativa do DNA independente da replicação deste (DETICH; BOVENZI; SZYF, 2003). TSA tem sido usada extensivamente durante os estágios iniciais de desenvolvimento de embriões bovinos clonados para melhorar a reprogramação nuclear (IAGER et al., 2008; AKAGI et al., 2011; CUI et al., 2011; LEE et al., 2011). Como sugerido por Ding et al. (2008), a mesma dose de TSA usada para tratar as células somáticas foi empregada nos zigotos clonados. De modo semelhante aos resultados obtidos nas células somáticas, esta dose mostrou ser efetiva em

aumentar os padrões de acetilação global das histonas (como avaliado por imunocitoquímica da acetilação da H3K9), apesar do curto período de tratamento executado, mas não em diminuir o nível de metilação (avaliado por imunocitoquímica da 5-mC). Como considerado acima, a ausência de efeitos da TSA sobre a metilação do DNA pode ser devido ao curto período de tratamento ou devido a sensibilidade da imunocitoquímica usada para detectar 5-mC.

Após avaliar a efetividade dos três tratamentos executados sobre a acetilação das histonas e metilação do DNA, nós avaliamos os efeitos destes tratamentos sobre as taxas de desenvolvimento dos embriões bovinos clonados. Para isso, as células somáticas tratadas foram usadas como doadoras de núcleo e os oócitos reconstruídos produzidos foram cultivados para avaliar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Similarmente, zigotos clonados que foram tratados com TSA foram cultivados para avaliar as taxas de desenvolvimento. Sem considerar o tratamento executado, não foi observado efeito positivo sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento a blastocisto. Além disso, o tratamento de células doadoras de núcleo com HH+VPA diminuiu a taxa de desenvolvimento até blastocisto. Embora vários estudos anteriores tenham indicado que o tratamento das células doadoras de núcleo ou embriões clonados nos estágios iniciais com AMCs é positivo para o desenvolvimento pré-implantacional, vários fatores parecem ser envolvidos, incluindo a droga (WANG, L. J. et al., 2011), a dose (IAGER et al., 2008; AKAGI et al., 2011), período de tratamento (DING et al., 2008) e espécies consideradas (ENRIGHT et al., 2005; SHI et al., 2008; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; COSTA-BORGES; SANTALO; IBANEZ, 2011). Por exemplo, Ding et al. (2008) observou um efeito sobre o desenvolvimento a blastocistos dos embriões bovinos clonados quando as células doadoras de núcleo foram tratadas com AZA+TSA. Contudo, Enright et al. (2005) relatou que o tratamento das células doadoras de núcleo somente com AZA não aumentou o potencial de desenvolvimento dos embriões bovinos clonados. Os mesmos autores, encontraram em outro estudo (ENRIGHT et al., 2003) que maiores doses de AZA foram efetivas em induzir demetilação do DNA, mas isto diminuiu o desenvolvimento a blastocisto cerca de seis vezes. Em concordância com isto, nós encontramos um efeito negativo sobre as taxas de blastocisto quando as células doadoras de núcleo foram tratadas com HH+VPA. Considerando o efeito deste tratamento sobre a proliferação/viabilidade celular (ver acima), é possível que as pobres taxas de desenvolvimento dos embriões clonados

gerados com estas células foram devido às altas doses de HH e VPA usadas. Como discutido acima, as doses de HH e VPA foram escolhidas baseado em experimentos de cultivo celular *in vitro* e, por isso, pode estar acima do limite tolerado pelos fibroblastos ou pelo fato destes não tolerarem perda de metilação e passarem por apoptose (JACKSON-GRUSBY et al., 2001). Com relação ao tratamento dos zigotos com TSA, nossos dados estão de acordo com aqueles de Lager et al. (2008). Estes autores encontraram que apesar de uma melhora na acetilação de embriões bovinos clonados, não foi observado efeito sobre o desenvolvimento pré-implantacional comparado aos fertilizados *in vitro*. Por isso, considerando o grande número de embriões produzidos neste presente estudo, nós fornecemos evidências que tratamentos que melhoram o desenvolvimento dos embriões clonados em camundongos (KISHIGAMI et al., 2006), não tem a mesma efetividade em bovinos. Entretanto, nós não podemos descartar a hipótese que os tratamentos com AMCs melhoraram a qualidade embrionária (WANG, Y. et al., 2011), antes que as taxas de desenvolvimento embrionário. Também, drogas mais efetivas em causar demetilação do DNA podem ser usadas em células doadoras de núcleo para melhorar as taxas de desenvolvimento pré-implantacional (JEON et al., 2008).

Até o presente momento, não há marcadores pré-implantacional confiáveis indicativos de competência de desenvolvimento pós-implantação. Como o meio mais efetivo de investigar os efeitos dos AMCs sobre a qualidade embrionária é testar seu potencial de desenvolvimento a termo, os blastocistos produzidos nos três experimentos descritos acima foram transferidos para vacas receptoras para avaliar as taxas de gestação e de nascimento. No total, 261 transferências de embriões foram executadas, mas não foi encontrado efeito sobre as taxas de gestações avaliadas nos dias 30, 60 e 90 do desenvolvimento. Além disso, somente uma gestação desenvolveu a termo após o tratamento dos zigotos clonados com TSA e os outros dois bezerros foram a termo eram do grupo controle. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados durante o desenvolvimento pré-implantacional (ver acima). Os efeitos dos AMCs sobre o desenvolvimento pós-implantacional tem sido investigados em várias espécies tais como camundongos, onde eles mostraram um efeito positivo sobre as taxas de gestação e nascimentos (KISHIGAMI et al., 2006; COSTA-BORGES; SANTALO; IBANEZ, 2011). De outro modo, os efeitos positivos do tratamento com AMCs não foram confirmados ou são contraditórios em outras espécies, incluindo coelhos (MENG et al., 2009) e suínos

(LI et al., 2008; ZHAO et al., 2009; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; ZHAO et al., 2010), respectivamente. O tratamento dos embriões clonados em estágios iniciais com TSA impediu o desenvolvimento além do dia 19 em coelhos (MENG et al., 2009). Por sua vez, embora Li e colaboradores (2008) obtiveram um leitão morto após cesárea, outros grupos encontraram um efeito positivo usando inibidores das HDAC em embriões de suínos clonados e obtiveram leitões viáveis (ZHAO et al., 2009; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; ZHAO et al., 2010). Com relação aos bovinos, há somente um relato recente sobre os efeitos dos AMCs sobre o desenvolvimento pós-implantacional de clones (WANG, Y. S. et al., 2011). Estes autores encontraram um aumento significativo na taxa de nascimento, de 2,6% no grupo controle para 13,4% no grupo tratado, após tratar ambos, as células doadoras de núcleo e os embriões nos estágios iniciais com 10nM de AZA e 50nM de TSA. Comparado aos nossos dados, o artigo de Wang et al. (2011) sugere que o tratamento com ambas AZA e TSA nas células doadoras e embriões nos estágios iniciais é melhor que tratá-los isolados. Entretanto, como discutido acima, o mesmo grupo de pesquisa (DING et al., 2008) encontrou que mesmo quando estes tratamentos são executados ou nas células doadoras de núcleo ou nos embriões em estágios iniciais, um efeito positivo sobre o desenvolvimento pré-implantacional é observado, os quais contrastam com nossos dados mostrando ausência de efeito do tratamento de AZA e TSA sobre o desenvolvimento pré-implantacional. Permanece não claro para nós porque os resultados deste grupo (DING et al., 2008; WANG, Y. S. et al., 2011) difere dos nossos, mas isso pode ser explicado pelas diferenças na raça e idade dos animais usados para derivar células doadoras de núcleo. Concluindo, nosso trabalho fornece evidências de que o tratamento de células doadoras de núcleo ou embriões bovinos clonados nos estágios iniciais de desenvolvimento com diferentes tipos de AMCs não tem efeito positivo sobre o desenvolvimento pré- e pós implantacional. Entretanto, novos estudos que avaliem outras doses e momentos do tratamento (ex. Tratar células doadoras de núcleo e embriões iniciais) são necessários para esclarecer os efeitos dos AMCs sobre a produção de bovinos clonados. Este trabalho é relevante para os campos da reprogramação celular e produção de animais clonados por TNCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, S.; MATSUKAWA, K.; MIZUTANI, E.; FUKUNARI, K.; KANEDA, M.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, S. Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. **J Reprod Dev**, v. 57, n. 1, p. 120-126, 2011.

BRADNER, J. E.; WEST, N.; GRACHAN, M. L.; GREENBERG, E. F.; HAGGARTY, S. J.; WARNO, T.; MAZITSCHKE, R. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 3, p. 238-243, 2010.

CHAVEZ-BLANCO, A.; PEREZ-PLASENCIA, C.; PEREZ-CARDENAS, E.; CARRASCO-LEGLEU, C.; RANGEL-LOPEZ, E.; SEGURA-PACHECO, B.; TAJA-CHAYEB, L.; TREJO-BECERRIL, C.; GONZALEZ-FIERRO, A.; CANDELARIA, M.; CABRERA, G.; DUENAS-GONZALEZ, A. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. **Cancer Cell Int**, v. 6, n., p. 2, 2006.

CHUANG, J. C.; YOO, C. B.; KWAN, J. M.; LI, T. W.; LIANG, G.; YANG, A. S.; JONES, P. A. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 10, p. 1515-1520, 2005.

CIBELLI, J. Developmental biology. A decade of cloning mystique. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 990-992, 2007.

COSTA-BORGES, N.; SANTALO, J.; IBANEZ, 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. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 4, p. 437-446, 2011.

CSOKA, A. B.; SZYF, M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. **Med Hypotheses**, v. 73, n. 5, p. 770-780, 2009.

CUI, X. S.; XU, Y. N.; SHEN, X. H.; ZHANG, L. Q.; ZHANG, J. B.; KIM, N. H. Trichostatin a modulates apoptotic-related gene expression and improves embryo viability in cloned bovine embryos. **Cell Reprogram**, v. 13, n. 2, p. 179-189, 2011.

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. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 1, p. 95-104, 2011.

DE BEM, T. H.; CHIARATTI, M. R.; ROCHETTI, R.; BRESSAN, F. F.; SANGALLI, J. R.; MIRANDA, M. S.; PIRES, P. R.; SCHWARTZ, K. R.; SAMPAIO, R. V.; FANTINATO-NETO, P.; PIMENTEL, J. R.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; ADONA, P. R.; LEAL, C. L. Viable Calves Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer Using Meiotic-Blocked Oocytes. **Cell Reprogram**, v., n., p., 2011.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.

DETICH, N.; BOVENZI, V.; SZYF, M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 30, p. 27586-27592, 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. 622-630, 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. **Biol Reprod**, v. 69, n. 3, p. 896-901, 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. **Biol Reprod**, v. 72, n. 4, p. 944-948, 2005.

GIRALDO, A. M.; LYNN, J. W.; PURPERA, M. N.; GODKE, R. A.; BONDIOLI, K. R. DNA methylation and histone acetylation patterns in cultured bovine fibroblasts for nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 12, p. 1514-1524, 2007.

GURDON, J. B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, n., p. 1-22, 2006.

GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1811-1815, 2008.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1061-1067, 2006.

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. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 7, p. 795-797, 2008.

HUBBERT, C.; GUARDIOLA, A.; SHAO, R.; KAWAGUCHI, Y.; ITO, A.; NIXON, A.; YOSHIDA, M.; WANG, X. F.; YAO, T. P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 455-458, 2002.

IAGER, A. E.; RAGINA, N. P.; ROSS, P. J.; BEYHAN, Z.; CUNNIFF, K.; RODRIGUEZ, R. M.; CIBELLI, J. B. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. **Cloning Stem Cells**, v. 10, n. 3, p. 371-379, 2008.

JACKSON-GRUSBY, L.; BEARD, C.; POSSEMATO, R.; TUDOR, M.; FAMBROUGH, D.; CSANKOVSKI, G.; DAUSMAN, J.; LEE, P.; WILSON, C.; LANDER, E.; JAENISCH, R. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 31-39, 2001.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, v. 33 Suppl, n., p. 245-254, 2003.

JEON, B. G.; COPPOLA, G.; PERRAULT, S. D.; RHO, G. J.; BETTS, D. H.; KING, W. A. S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. **Reproduction**, v. 135, n. 6, p. 815-828, 2008.

JONES, P. L.; VEENSTRA, G. J.; WADE, P. A.; VERMAAK, D.; KASS, S. U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, v. 19, n. 2, p. 187-191, 1998.

KELLY, T. K.; DE CARVALHO, D. D.; JONES, P. A. Epigenetic modifications as therapeutic targets. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1069-1078, 2011.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N. V.; WAKAYAMA, S.; BUI, H. T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique

by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 1, p. 183-189, 2006.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

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. **J Reprod Dev**, v. 57, n. 1, p. 34-42, 2011.

LI, J.; SVARCOVA, O.; VILLEMOES, K.; KRAGH, P. M.; SCHMIDT, M.; BOGH, I. B.; ZHANG, Y.; DU, Y.; LIN, L.; PURUP, S.; XUE, Q.; BOLUND, L.; YANG, H.; MADDOX-HYTTEL, P.; VAJTA, G. High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 800-808, 2008.

MARTINEZ-DIAZ, M. A.; CHE, L.; ALBORNOZ, M.; SENEDA, M. M.; COLLIS, D.; COUTINHO, A. R.; 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. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 1, p. 85-94, 2010.

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

MENG, Q.; POLGAR, Z.; LIU, J.; DINNYES, A. Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 1, p. 203-208, 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. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2010.

MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, L. Z.; SARAIVA, N. Z.; MERCADANTE, M. E.; LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; GARCIA, J. M. Chromatin modifying agents in the in vitro production of bovine embryos. **Vet Med Int**, v. 2011, n., p., 2011.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet**, v. 14 Spec No 1, n., p. R47-58, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, M. A.; BO, 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. 1577-1584, 2004.

ONO, T.; LI, C.; MIZUTANI, E.; TERASHITA, Y.; YAMAGATA, K.; WAKAYAMA, T. Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. **Biol Reprod**, v. 83, n. 6, p. 929-937, 2010.

PASQUE, V.; MIYAMOTO, K.; GURDON, J. B. Efficiencies and mechanisms of nuclear reprogramming. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 75, n., p. 189-200, 2011.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2130-2133, 1997.

SEGURA-PACHECO, B.; PEREZ-CARDENAS, E.; TAJA-CHAYEB, L.; CHAVEZ-BLANCO, A.; REVILLA-VAZQUEZ, A.; BENITEZ-BRIBIESCA, L.; DUENAS-GONZALEZ, A. Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine. **J Transl Med**, v. 4, n., p. 32, 2006.

SHI, L. H.; MIAO, Y. L.; OUYANG, Y. C.; HUANG, J. C.; LEI, Z. L.; YANG, J. W.; HAN, Z. M.; SONG, X. F.; SUN, Q. Y.; CHEN, D. Y. Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. **Dev Dyn**, v. 237, n. 3, p. 640-648, 2008.

SINGH, N.; DUENAS-GONZALEZ, A.; LYKO, F.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular modeling and molecular dynamics studies of hydralazine with human DNA methyltransferase 1. **ChemMedChem**, v. 4, n. 5, p. 792-799, 2009.

SONG, Y.; ZHANG, C. Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 605-613, 2009.

SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NORTHEY, D. L.; SCHUTZKUS, V.; FIRST, N. L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Dev Biol**, v. 166, n. 2, p. 729-739, 1994.

SZYF, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, n., p. 243-263, 2009.

WANG, L. J.; ZHANG, H.; WANG, Y. S.; XU, W. B.; XIONG, X. R.; LI, Y. Y.; SU, J. M.; HUA, S.; ZHANG, Y. Scriptaid Improves In Vitro Development and Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos. **Cell Reprogram**, v., n., p., 2011.

WANG, Y.; SU, J.; WANG, L.; XU, W.; QUAN, F.; LIU, J.; ZHANG, Y. The Effects of 5-Aza-2'- Deoxycytidine and Trichostatin A on Gene Expression and DNA Methylation status in Cloned Bovine Blastocysts. **Cell Reprogram**, v., n., p., 2011.

WANG, Y. S.; XIONG, X. R.; AN, Z. X.; WANG, L. J.; LIU, J.; QUAN, F. S.; HUA, S.; ZHANG, Y. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2/-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 819-825, 2011.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B. The influence of B2 and a modified CR-2 medium on the in vitro production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 259-259, 1999.

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. **J Biol Chem**, v. 281, n. 9, p. 6048-6057, 2006.

WELLS, D. N.; OBACK, B.; LAIBLE, G. Cloning livestock: a return to embryonic cells. **Trends Biotechnol**, v. 21, n. 10, p. 428-432, 2003.

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. 810-813, 1997.

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. 583-586, 2002.

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. **Nat Genet**, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

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. **Biol Reprod**, v. 81, n. 3, p. 525-530, 2009.

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. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 1, p. 75-83, 2010.