Efeito de moduladores epigenéticos na clivagem de embriões bovinos derivados de oócitos submetidos a choque térmico

Luísa Henrique Lamarca dos Santos¹, Alex Cabral Vieira², Carolina Capobiango Romano Quintão³, Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁴

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto Associação de marcadores genéticos e fenotípicos de termorregulação a parâmetros reprodutivos (02.14.08.003.00.03), liderado por Luiz Sérgio de Almeida Camargo (b) e constituirá parte da dissertação de mestrado de Alex Cabral Vieira.

¹Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF/ Juiz de Fora. E-mail: luh_lamarca@yahoo.com.br

² Mestrando em Reprodução Animal UFV/Viçosa. Email: alexufvet@hotmail.com

³Analista, Laboratório de Reprodução Animal/ Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora(MG). Email: carolina.quintao@embrapa.br ⁴ Pesquisador, Laboratório de Reprodução Animal/ Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora(MG). Email: luiz.camargo@embrapa.br

Resumo: Altas temperaturas na maturação do oócito bovino tem sido associadas à alterações na expressão de genes e na organização da cromatina embrionária. Este estudo objetivou analisar o efeito de dois moduladores epigenéticos na clivagem de embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico, como uma análise prévia, para estudos posteriores do possível efeito dessas substâncias no desenvolvimento embrionário. São eles: 1) Scriptaid, com ação inibidora da histona deacetilase e 2) 5- Aza-2'deoxyctidine (AZA): inibidor de metilação de DNA. Oócitos bovinos foram maturados *in vitro* em temperatura convencional (38 °C) por 24h (grupo sem choque térmico: SCT) ou em 41,5 °C por 12h seguida de 38 °C por mais 12h (grupo choque térmico: CT) nas mesmas condições do grupo SCT. Em seguida, os oócitos de ambos os grupos foram fertilizados *in vitro* por 20h e após final da fertilização os possíveis zigotos foram desnudados e, aleatoriamente, expostos a 500 nM Script ou 10 nM de AZA por 0h ou 24h (6 grupos). Foram realizadas cinco repetições e os dados (média ± EPM) analisados por regressão logística (*Pro Logistic*, SAS). Taxas de clivagem no dia 3, após início da fertilização, foram comparadas entre os grupos. Observou-se maiores ($P < 0,05$) taxas de clivagem em todos os grupos SCT (SCT -0h: 67,4 ± 3,8%; SCT + 24h AZA: 60,5 ± 5,7%; SCT + 24h Scriptaid: 76,2 ± 3,3%) quando comparados aos grupos submetidos ao choque térmico (CT -0h: 53,0 ± 10,6%; CT + 24h AZA: 45,3 ± 9,3%; CT + 24h Scriptaid: 53,2 ± 13,8%). Conclui-se que AZA e Scriptaid não exerceram um efeito positivo na clivagem de embriões derivados de oócitos maturados *in vitro* sob condições de CT, porém, no grupo de embriões SCT, com adição de Scriptaid, observou-se uma maior taxa de clivagem, quando comparado aos grupos AZA e controle, nas mesmas condições. Análises posteriores deverão ser realizadas a fim de identificar os efeitos dos moduladores epigenéticos no desenvolvimento embrionário. Apoio financeiro: CNPq e Fapemig.

Palavras-chave: bovino, choque térmico, clivagem, embriões, moduladores, oócito.

Effect of epigenetic modulators on the cleavage of bovine embryos derived from heat-shocked oocytes

Abstract: High temperatures during bovine oocyte maturation have been associated with changes in gene expression and on embryonic chromatin organization. This study aimed to analyze the effect of two epigenetic modulators on the cleavage of embryos derived from oocytes submitted to heat shock, as a prior analysis, for further studies of the possible effect of these substances on embryonic development. These are the substances: 1) Scriptaid, an inhibitor of histone deacetylase and 2) 5-Aza-2'deoxyctidine (AZA), an inhibitor of DNA methylation. Bovine oocytes were matured *in vitro* at conventional temperature (38 °C) for 24h (group with no heat shock: NHS) or at 41.5 °C for 12h followed by 38 °C for a further 12h (heat shock group: HS) under the same conditions of the NHS group. Afterwards, the oocytes from both groups were fertilized *in vitro* for 20 h and after the end of fertilization the presumptive zygotes were denuded and randomly exposed to 500 nM Scriptaid or 10 nM AZA for 0h or 24h (Six groups). Five replicates were performed and data (mean + SEM) was analyzed by logistic regression (*Pro Logistic*, SAS). Cleavage rates at day three post-fertilization

were compared among treatments. Higher cleavage rates ($P < 0.05$) were found in all NHS groups (NHS-0h: $67.4 \pm 3.8\%$; NHS + 24hAZA: $60.5 \pm 5.7\%$; NHS + 24hScriptaid: $76.2 \pm 3.3\%$) when compared to heat shock groups (HS-0h: $53.0 \pm 10.6\%$; HS + 24h AZA: $45.3 \pm 9.3\%$; HS + 24h Scriptaid: $53.2 \pm 13.8\%$). It was concluded that AZA and Scriptaid did not have a positive effect on the cleavage of embryos derived from oocytes *in vitro* matured under CT conditions. However, in the SCT embryo group with Scriptaid addition, a higher cleavage rate was observed when compared to AZA and control groups under the same conditions. Further analyzes should be performed to identify the effects of epigenetic modulators on embryonic development.

Financial support: CNPq and Fapemig.

Keywords: bovine, cleavage, embryos, heat shock, modulators, oocyte.

Introdução

Um dos principais setores afetados pelo aumento de temperatura e aquecimento global é a pecuária, uma vez que a reprodução de bovinos é fortemente influenciada pelo clima ambiental. O estresse térmico em oócitos bovinos pode provocar redução na viabilidade do desenvolvimento embrionário, com alterações na expressão gênica (Paludo et al., 2011; Camargo et al., 2012), e nos padrões de organização da cromatina, devido à modificações epigenéticas inadequadas.

O principal efeito epigenético é o estresse oxidativo, com aumento espécies reativas de oxigênio, que influenciam no aumento da metilação do DNA e nas modificações translacionais das histonas, tendo como consequência a remodelação da cromatina. (Pichugin et al., 2010).

Algumas substâncias químicas são capazes de interferir nas alterações epigenéticas e podem ser úteis para entender os eventos envolvidos no desenvolvimento inicial do embrião derivado de um oócito submetido ao choque térmico.

O Scriptaid é um inibidor da enzima histona deacetilase que promove a hiperacetilação da cromatina favorecendo o seu remodelamento e a expressão gênica (Monneret, 2005). Em zigotos clones bovinos, onde o remodelamento da cromatina é um pré-requisito para a reprogramação nuclear, o tratamento por 14h após a ativação embrionária com 500 nM de Scriptaid aumentou a taxa de clivagem e de blastocistos e diminuiu a metilação de histona (H3 K9 m2) em embriões em estágios de 2 a 8 células e em blastocistos (Wang et al., 2011).

A 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) é uma variação do nucleosídeo deoxycytidine com modificação na posição 5 do anel pirimidina, suficiente para inibir as DNA metiltransferases (DNMT). Essa substância consegue prevenir a metilação do DNA (Goffin e Eisenhauer, 2002), promovendo uma hipometilação dependente de replicação e assim, favorecer a expressão de genes silenciados pela metilação (Jabbour et al., 2008).

O objetivo do estudo é avaliar o efeito desses agentes moduladores epigenéticos na clivagem de embriões derivados de oócitos submetidos ao choque térmico na maturação *in vitro*.

Material e Métodos

Ovários obtidos em frigorífico comercial foram utilizados para a obtenção dos oócitos. Folículos, com diâmetro entre 2 a 8 mm com auxílio de seringa descartável e agulha e o conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico. Foram selecionados os complexo-cúmulus oócitos (CCOs) que apresentaram graus I e II de qualidade.

A maturação ocorreu em placas de cultivo contendo 400 μ L de meio TCM199 (Life-Invitrogen), acrescido de antibiótico, piruvato, soro fetal bovino e FSH, em incubadora com 5% de CO₂ em atmosfera com umidade saturada à 38,8 °C por 24 horas (grupo não estressado-SCT). O grupo estressado (CT) foi maturado no mesmo meio, à 41 °C durante as primeiras 12 horas, seguido do cultivo à 38,8 °C por mais 12h, completando as 24h de maturação *in vitro*. Após 24h de maturação, todos os oócitos foram fecundados *in vitro* por 19-20h. O sêmen (de um único touro) foi previamente avaliado quanto à sua motilidade e vigor antes de ser utilizado. As doses foram descongeladas em banho-maria à 37 °C por 30 segundos. A separação dos espermatozoides de maior motilidade foi realizada por diferença de gradiente de densidade pelo método de mini-percoll. Os COCs maturados foram lavados uma vez em meio *Fert Talp* e transferidos para gotas de fecundação de 100 μ L com o sêmen diluído, em uma concentração ajustada de forma a se obter dose fecundante de 2×10^6 espermatozoides/mL. A FIV foi realizada por 19-20 horas em estufa incubadora com 5% de CO₂. Após a FIV, os possíveis zigotos foram desnudados em solução de PBS acrescido de hialuronidase a 1%. Os zigotos desnudos obtidos foram

cultivados em poços com 400 µL de meio CR₂aa, suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), em incubadora com 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ e divididos nos seguintes tratamentos: SCT -0h (n=258); SCT + 24h AZA (n=261); SCT + 24h Scriptaid (n=242); CT -0h (n=263); CT + 24h AZA (n=276); CT + 24h Scriptaid (n=255). No terceiro dia após a FIV (D3), foi avaliada a clivagem de todos os grupos.

Foram realizadas cinco repetições e os dados (média ± EPM) analisados por regressão logística (*Pro Logistic*, SAS).

Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que as taxas de clivagem foram maiores para todos os grupos não estressados (independente de tratamento), sendo que o grupo SCT + 24h Scriptaid, apresentou a maior taxa de clivagem, conforme demonstrado na Tabela 1.

Observa-se que não há uma somatória de efeitos (estresse + AZA ou Scriptaid) que pudesse fazer uma queda mais acentuada nas taxas de clivagem dos embriões tratados com AZA ou Scriptaid. Parece que os efeitos do estresse durante a MIV sobrepõem os efeitos dos tratamentos com os moduladores epigenéticos nos resultados de clivagem. Os dados sugerem que o efeito do estresse pode ser mais severo que os efeitos do AZA e Scriptaid.

Tabela 1. Taxas de clivagem embrionária de acordo com a exposição de AZA (10 nM) ou Scriptaid (500 nM), por 24h, a partir de oócitos maturados sob choque térmico (CT) ou sem choque térmico (SCT)

Tratamento	N	Clivagem (%) (Média +EPM)
SCT-0h	258	67,49 ± 3,8 ^b
CT-0h	263	53,01 ± 10,6 ^{cd}
SCT+24hAZA	261	60,58 ± 5,7 ^{bc}
CT+24hAZA	276	45,37 ± 9,3 ^d
SCT+24hScriptaid	242	76,23 ± 3,3 ^a
CT+24hScriptaid	255	53,26 ± 13,8 ^c

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05). EPM: Erro padrão das médias

Conclusões

Conclui-se que a adição de AZA ou Scriptaid no meio de cultivo de embriões oriundos de oócitos sob choque térmico, não conseguiu mitigar o efeito da alta temperatura sobre os resultados de clivagem embrionária. Análises posteriores deverão ser realizadas a fim de identificar os efeitos dos moduladores epigenéticos no desenvolvimento embrionário, expressão gênica e organização da cromatina, de embriões produzidos a partir de oócitos submetidos ao choque térmico.

Agradecimentos

Agradeço a Embrapa Gado de Leite por ter me proporcionado tamanha experiência e aprendizado, a minha orientadora Carolina Capobiango Romano Quintão por me conceder a bolsa e pelo acompanhamento, cuidado, treinamento e toda compreensão durante o período de estágio.

Referências

CAMARGO, L. S. A.; PALUDO, F.; WOHLRES-VIANA, S. et. al. Effect of elevated temperature on gene expression of bovine embryos. In: PLANET UNDER PRESSURE 2012. **Book of Abstracts**. Londres, 2012. 1p. (<http://www.planetunderpressure2012.net/index.asp>)

GOFFIN, J.; EISENHAUER, E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. **Ann. Oncol.**, v. 13, p. 1699- 1716, 2002.

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

MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 1-13, 2005.

PALUDO, F.; PEREIRA, M. M.; QUINTÃO, C. C. R.; GIOSO, M. M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Effect of heat stress on development of *in vitro*-fertilized and parthenogenetic bovine embryos. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2011, Orlando. **Reproduction, Fertility and Development**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2011. v. 23. p. 203-204.

PICHUGIN, A.; LE BOURHIS, D.; ADENOT, P.; LEHMANN, G.; AUDOUARD, C.; RENARD, J.P.; VIGNON, X.; BEAUJEAN, N. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. **Reproduction**, v. 139, p. 129-137, 2010.

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. 13, p. 431-439, 2011.