



THAIS PREISSER PONTELO

**ACETILAÇÃO DAS HISTONAS E SUA RELAÇÃO COM A
AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA EM OVÓCITOS BOVINOS**

**LAVRAS-MG
2019**

THAIS PREISSER PONTELO

**ACETILAÇÃO DAS HISTONAS E SUA RELAÇÃO COM A AQUISIÇÃO DA
COMPETÊNCIA EM OVÓCITOS BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

Profa. Dra. Margot Alves Dode Nunes
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pontelo, Thais Preisser.

Acetilação das histonas e sua relação com a competência em
ovócitos bovinos / Thais Preisser Pontelo. - 2019.

110 p. : il.

Orientador(a): Marcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Margot Alves Nunes Dode.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Epigenética. 2. Maturação in vitro. 3. Desenvolvimento. I.
Zangeronimo, Marcio Gilberto. II. Dode, Margot Alves Nunes. III.
Título.

THAIS PREISSER PONTELO

**ACETILAÇÃO DAS HISTONAS E SUA RELAÇÃO COM A AQUISIÇÃO DA
COMPETÊNCIA EM OVÓCITOS BOVINOS**

**AVETYLATION OF HISTONES AND ITS RELATION WITH ACQUISITION OF
COMPETENCE IN BOVINE OOCYTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 05 de julho de 2019.

Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira	UNIFAL
Dr. José Rafael Miranda	UFLA
Dra. Margot Alves Nunes Dode	EMBRAPA

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente meu sincero agradecimento a Deus por sempre ter guiado meus passos e por me manter perseverante junto as lutas e batalhas que enfrentei ao longo do caminho. Como já dizia o ditado “A fé move montanhas” que significa que não há nada impossível para aquele cuja confiança está firmada verdadeiramente em Deus.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do DMV/UFLA, por terem me concedido o doutorado em uma instituição tão reconhecida. A Capes, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil, e a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela disponibilidade de laboratórios, equipamentos e recursos que foram fundamentais para realização desse trabalho.

Ao professor e orientador Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo por se dispor a me orientar desde 2010, pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos e conselhos dados. Obrigado por me apoiar e por ter me dado confiança a realização de parte desse trabalho em parceria com a EMBRAPA.

À minha co-orientadora Dr. Margot Alves Nunes Dode por me conferir uma carga enorme de aprendizado ao longo de 2 anos e meio que, com toda certeza, foram fundamentais para minha formação profissional. A senhora será sempre um espelho para mim como excelente profissional que é. Apesar de ser muito rígida possui um coração enorme, dotado de carinho pelos seus alunos.

Ao pesquisador Maurício Machaim por toda colaboração em meus trabalhos e ensinamentos que me foram passados ao longo desses anos de estágio na Embrapa.

Aos técnicos da Embrapa Regivaldo Vieira de Souza e Isabela Girotti Grisi pelos ensinamentos, atenção, disponibilidade sempre em ajudar e atenção. Ajuda de vocês foi indispensável para execução de todo projeto.

Aos membros da banca Dra. Nadja Gomes, Dra. Ester Caixeta, Dr. José Rafael e Dra. Margot Dode por aceitarem compor a banca avaliadora e contribuírem com o trabalho.

Às minhas amigas que Brasília me deu, Taynan e Sarah, que foram fundamentais para minha adaptação na capital e sempre me deram muita força nos momentos mais difíceis longe de casa e da família. Em especial, a minha pequena friend Taynan que participou e esteve presente em todos os passos para a construção dessa tese, desde a ajuda com correções ao longo do texto e execução de todos experimentos. Amo vocês!

Às amigas do condomínio Toscana, Luna Vargas e Marcia Silveira, pelos momentos de companheirismo e muita diversão em Brasília.

Aos que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho, Ligiane Leme, Felipe Manoel Caixeta, Andrei Fidélis, Gabriela Fernandes, Nayara Kussano, Sr. Arlindo estagiários e aos funcionários do frigorífico Qualimáxima (Luziânia-GO) e Nipobras (Formosa-GO e Planaltina –DF). Muito obrigada!

Às minhas amigas de Lavras, Bárbara Azevedo Pereira Torres e Bruna Resende Chaves, que sempre me deram todo o apoio necessário, mesmo estando longe, e me confortaram nos momentos de dificuldade. Amo vocês!

Aos meus pais, Ricardo Geraldo Pontelo e Ana Paula Preisser Pontelo, que sempre me deram apoio, força e motivação. Vocês são o meu alicerce, a base de tudo! Ao meu amor, Rafael Vinícius Cabral de Almeida, que sempre foi meu amigo e companheiro, e que me ampara nos momentos de fraqueza. Vocês são meu porto seguro, amo muito!

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade.
Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia
impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO GERAL

Considerando que em bovinos muitos dos ovócitos aspirados e utilizados para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) ainda não adquiriram a competência para o desenvolvimento deve-se buscar alternativas que possam aumentar essa competência e, conseqüentemente, a eficiência da PIVE. A acetilação de histonas regula a transcrição gênica e parece estar relacionada com a aquisição de competência ovocitária. Entretanto, pouco se sabe se alterando o status de acetilação das histonas é possível alterar o nível de competência de ovócitos. Portanto, objetivou-se determinar o padrão de acetilação de histonas em ovócitos de diferentes competências antes, durante e após a maturação *in vitro* (MIV), e, avaliar se o uso do scriptaid (inibidor de HDAC) antes e após a retomada da meiose afeta a competência de desenvolvimento. No artigo 1, complexo cumulus-ovócito (COCs) foram obtidos a partir de folículos de 1-3mm, considerados menos competentes (IC) e de 6-8mm, mais competentes (CP). Ovócitos de ambos os grupos foram retirados da MIV as 0, 8 e 24h para avaliações de expressão gênica (*HAT1*, *KAT2A*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*) e imunofluorescência. Apesar do nível de acetilação não ter sido diferente em ovócitos de diferentes competências ($P>0.05$), o grupo CP apresentou transcrição do gene *HAT1* de 0 para 8 horas ($P<0.05$), e maior quantidade de transcritos da *HDAC1* às 8 horas em relação ao grupo IC ($P<0.05$). No artigo 2 COCs foram submetidos a pré-maturação (PMIV) por 6 horas na presença ou ausência de scriptaid (inibidor de HDAC). COCs foram distribuídos em 5 grupos: T1- MIV por 22h, T2-PMIV por 6h e MIV por 22h, T3-PMIV com scriptaid por 6h e MIV por 22h, T4-PMIV por 6h e MIV com scriptaid por 22h, e T5-PMIV com scriptaid por 6h e MIV com scriptaid por 22h. Maturação nuclear, expressão gênica, expansão das células do cumulus e desenvolvimento e qualidade embrionária foram analisados. Somente o gene *HAT1* apresentou diferença de expressão em ovócitos de diferentes tratamentos. Em relação ao desenvolvimento embrionário em D7, T4 e T5 apresentaram taxas mais baixas de blastocistos ($P<0.05$) em relação aos outros tratamentos. Não foi observado nenhum efeito quando o scriptaid foi utilizado em ovócitos menos competentes ($P>0.05$). Conclui-se que o padrão de expressão gênica de genes relacionados a acetilação de histonas está relacionado a competência ovocitária. Porém, o uso de scriptaid durante a PMIV e /ou MIV não melhora a competência de desenvolvimento.

Palavras-chave: Competência ovocitária. Epigenética. Maturação *in vitro*. Pré-maturação

ABSTRACT

Considering that in cattle many of the oocytes aspirated and used for the in vitro production of embryos (PIVE) have not yet acquired the competence for the development one must look for alternatives that can increase this competence and, consequently, the efficiency of the PIVE. Histone acetylation regulates gene transcription and appears to be related to the acquisition of oocyte competence. However, little is known if altering the status of histone acetylation, it is possible to alter the competence level of oocytes. The aim of this study was to determine the histone acetylation pattern in oocytes of different abilities before, during and after in vitro maturation (IVM), and to evaluate whether the use of scriptaid (HDAC inhibitor) before and after meiosis resumption development competence. In article 1, cumulus-oocyte complex (COCs) were obtained from follicles 1-3mm, considered less competent (IC) and 6-8mm, more competent (CP). Oocytes from both groups were removed from the IVM at 0, 8 and 24h for gene expression evaluations (*HAT1*, *KAT2A*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*) and immunofluorescence. Although the acetylation level was not different in oocytes of different abilities ($P > 0.05$), the CP group presented transcription of the *HAT1* gene from 0 to 8 hours ($P < 0.05$), and higher amount of *HDAC1* transcripts at 8 hours in relation to the IC group ($P < 0.05$). In article 2 COCs were submitted to pre-maturation (PIVM) for 6 hours in the presence or absence of scriptaid (HDAC inhibitor). COCs were distributed in 5 groups: T1-MIV for 22h, T2-PIVM for 6h and IVM for 22h, T3-PIVM with scriptaid for 6h and MIV for 22h, T4-PIVM for 6h and MIV with scriptaid for 22h, and T5- PIVM with scriptaid for 6h and MIV with scriptaid for 22h. Nuclear maturation, gene expression, cumulus cell expansion, and embryonic development and quality were analyzed. Only the *HAT1* gene showed expression difference in oocytes from different treatments. In relation to the embryonic development in D7, T4 and T5 presented lower rates of blastocysts ($P < 0.05$) in relation to the other treatments. No effect was observed when the scriptaid was used in less competent oocytes ($P > 0.05$). We conclude that the gene expression pattern of histone acetylation related genes is related to oocyte competence. However, using scriptaid during PIVM and/or IVM does not improve development competence.

Keywords: Oocyte competence. Epigenetics. *In vitro* maturation. Pre-maturation

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1** Esquema do desenvolvimento folicular. O desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas fases, sendo a fase pré-antral, com a formação dos folículos primordiais e posteriormente ativação desses folículos e crescimento dos folículos primários e secundários; e fase antral com a formação do folículo terciário e folículo pré-ovulatório. Durante a fase antral, o crescimento do folículo continua através das fases de recrutamento, seleção, dominância e estágio pré-ovulatório. A cada ciclo reprodutivo da fêmea bovina somente um folículo ovula, e os outros folículos entram em processo de atresia (morte folicular). 16
- Figura 2** Modelo proposto para o reinício da meiose induzido pelo LH em ovócitos. LH se liga ao seu receptor em células da granulosa murais e induz a produção de AMPc através de adenilato ciclase (AC). O nível aumentado de AMPc, em seguida, estimula a atividade de PKA/PKC e, conseqüentemente, a produção de fatores semelhantes ao EGF em células da granulosa. Os fatores EGF induzem a atividade da MAPK que perturba as junções comunicantes entre as células da granulosa e o ovócito. Essa interrupção da bloqueia a transferência de AMPc e GMPc para o ovócito. A redução do nível de GMPc ativa a PDE3A que reduz ainda mais o nível de AMPc através de sua hidrólise. A redução líquida do AMPc ovocitário reduz a atividade da PKA no ovócito. A atividade PKA reduzida ativa a fosfatase CDC25B e inativa a Wee1/Myt1 quinase que resulta na desfosforilação da CDK1 e ativação dos fatores promotores de meiose (MPF). MPF ativo, induz a retomada da meiose 25
- Figura 3** Esquema representando o desenvolvimento folicular até o momento da ovulação (pico de LH) e as modificações na quantidade de RNAm dos ovócitos. (A) Observa-se que a taxa de transcrição é alta no período do crescimento ovocitário e diminui consideravelmente após a ovulação. (B) Ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição da transcrição próximo a ovulação ocorre também um acúmulo de RNAm importante para o desenvolvimento embrionário inicial, diretamente relacionados com a competência ovocitária. (C) Após a ovulação e conseqüentemente com a fecundação ocorre a tradução dos RNAm acumulados, no entanto, se essa fecundação não ocorre no momento correto tem-se uma alta taxa de degradação dos RNAm e o ovócito se torna incompetente para seguir adiante. 29
- Figura 4** Octâmero de histonas formando o nucleossomo e as caudas N das histonas, que são sítios de ligação para modificações pós-traducionais 32
- Figura 5** Modificações pós-traducionais de histonas alterando a expressão gênica 33

SEGUNDA PARTE

- Figure 1** Acetylation pattern of lysine 5, 6, 12 and 16 of histone H4 on bovine oocytes obtained from large follicles (CP) matured *in vitro*, for 0 h (germinal vesicle - VG), 8 h (germinal vesicle breakage - VGBD) and 24 h of maturation (metaphase II - MII).....69
- Figure 2** Average \pm SEM of the immunofluorescence signal of lysine 5, 6, 12 and 16 of histone H4 on bovine oocytes obtained from small follicles (IP) and large follicles (CP) matured *in vitro* for 0h, 8h and 24 h of maturation. ^{a, b, c} Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$)..... 70
- Figure 3** Transcripts levels of HAT1, KAT2A, HDAC1, HDAC2, and HDAC3 quantified by RT-PCR in bovine oocytes from more competent (CP) and less competent (IP) groups at 0, 8 and 24 h of maturation. Each group was analyzed using four pools of oocytes. The data (mean \pm SD) were normalized using the formula $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001), and PPIA was the endogenous control..... 71
- Figure 4** Transcript levels for the genes HAT1, KAT2A, HDAC1, HDAC2, and HDAC3 quantified by RT-PCR in bovine oocytes at each moment of maturation (0, 8 and 24 h), comparing the two treatments as follow: more competent (CP), and less competent (IP). Each group was analyzed using four pools of oocytes. The data (mean \pm SD) were normalized using the formula $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001), and PPIA was the endogenous control..... 73

TERCEIRA PARTE

- Figure 1** Transcripts levels of *HAT1* quantified by RT-PCR of bovine oocytes indifferent treatment groups. When the treatments were submitted to pre-maturation, we used the -6 legend to represent the control group 0 h. PIVM 6 h corresponds to oocytes that were submitted to pre-maturation for 6 h, PIVM + Scrip 6 h corresponds to oocytes submitted to pre-maturation with scriptaid for 6 h, PIVM / IVM 22 h corresponds to the oocytes that were pre-maturated and later matured in MIV medium for 22 h, PIVM + Scrip / 22 h IVM corresponded to oocytes submitted to pre-maturation with scriptaid and then matured for 22 h, PIVM + Scrip/IVM + Scrip corresponds to oocytes that underwent pre-maturation and maturation with addition of scriptaid. 106
- Figure 2** Expansion area of cumulus-oocyte complexes submitted to maturation (IVM) for 22 h (T1), pre-maturation (PIVM) for 6 h plus IVM for 22 h (T2), PIVM with scriptaid for 6 h plus IVM 22 h (T3), PIVM for 6 h plus MIV with scriptaid for 22 h (T4), PIVM for 6 h with scriptaid plus MIV 22 h with scriptaid (T5). Data are expressed as mean \pm standard deviation and were analyzed by ANOVA and then compared by the Tukey test at the 0.05 level of significance.

The data were obtained from the value of the initial mean area (0 hour) of the cumulus-oocyte-complexes (CCOs) subtracted from the value of the final mean area of the CCOs after IVM (22 h).....107

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Table 1 Primer sequences, amplicon sizes in base pairs, annealing temperatures, and reference GenBank accession numbers.	68
--	----

TERCEIRA PARTE

Table 1 Primer sequences, amplicon sizes in base pairs, annealing temperatures, and reference GenBank accession numbers.	103
--	-----

Table 2 Meiotic stage at 0, 8 , 14 and 22 h of maturation of oocytes from the control group (no pre-maturation and no scriptaid) and of oocytes that had been submitted to a pre-maturation (IVM) for 6 h with 100nM of Type C natriuretic peptide added or not of 500nM scriptaid (Scrip) and then were matured (IVM) in medium supplemented with or without 500nM scriptaid	Erro! Indicador não definido.
--	--------------------------------------

Table 3 Effect of addition of scriptaid on PIVM and/or IVM on the rate of cleavage (D2) and rate of blastocysts in D6 and D7 on development of bovine embryos produced <i>in vitro</i>	108
---	-----

Table 4 Effect of the addition of 500nM of Scriptaid during pre-maturation (PIVM) and/or maturation (IVM) on the amount of cells of the internal cell mass (ICM) and trophoectoderma (TE).....	108
--	-----

Table 5 Effect of addition of scriptaid on PIVM of less competent oocytes (obtained from 1-3 mm follicles) on the rate of cleavage (D2) and rate of blastocysts in D6 and D7 on development of bovine embryos produced <i>in vitro</i>	109
---	-----

Table 6 Effect of the addition of scriptaid during PIVM of less competent oocytes (obtained from 1-3 mm follicles) on the amount of cells of the internal cell mass (ICM) and trophoectoderma (TE).....	110
--	-----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Ovogênese	15
2.2 Foliculogênese	16
2.3 Maturação ovocitária	20
2.3.1 Maturação nuclear	21
2.3.2 Maturação citoplasmática	25
2.4 Competência ovocitária	28
2.5 Pré-maturação <i>in vitro</i> (PMIV)	30
2.6 Acetilação de histonas	31
2.7 Histonas acetiltransferases e Histonas desacetilases (HDACs)	35
2.8 Inibidores de histona desacetilase	38
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
SEGUNDA PARTE	53
ARTIGO 1 – Normas da Revista <i>Reproduction Fertility and Development</i>	53
(Versão submissão)	53
ARTIGO 2 – Normas da Revista <i>Molecular Reproduction and Development</i>	75
(Versão submissão)	75

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O uso de biotecnologias da reprodução em animais, principalmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem aumentado significativamente nas espécies de importância econômica. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de embriões PIVE do mundo, porém a eficiência da técnica ainda é considerada baixa. Dos ovócitos que são utilizados na PIVE, 75 a 80% são fecundados. No entanto, somente 40% desses se tornam embriões, e quando são transferidos para uma receptora somente 30 a 40% geram prenhezes. Sabe-se que a maturação *in vitro* (MIV) é uma das etapas da PIVE responsável por essa baixa eficiência. Isso se deve à heterogeneidade dos ovócitos imaturos utilizados nessa técnica. Os ovócitos são obtidos de diferentes tamanhos de folículos, o que constitui uma população muito heterogênea que varia de acordo com o grau de condensação de cromatina e desenvolvimento de competência.

A competência ovocitária se refere a capacidade do ovócito completar a divisão meiótica, ser fecundado, desenvolver embrião e levar a gestação adiante. Para que essa competência seja adquirida, o acúmulo de RNAm estocados durante o crescimento e fase final do desenvolvimento folicular precisa ser adequado. A retirada dos ovócitos do ambiente folicular faz com que esses retomem a meiose espontaneamente, iniciando a maturação nuclear, sendo que, muito desses ovócitos não acumularam a quantidade suficiente de RNAm para suportar as próximas etapas. Uma das alternativas que vem sendo utilizada atualmente para superar este problema é a utilização de um período de pré-maturação (PIVM) que pode proporcionar aos ovócitos um tempo extra para a aquisição de competência, permitindo a adequada formação de transcritos e reorganização citoplasmática.

Marcas epigenéticas como acetilação e metilação de DNA estão relacionadas às modificações na configuração da cromatina. A acetilação de histonas tem um papel fundamental durante a maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário pois está diretamente relacionada com a expressão gênica e as configurações de cromatina. Sendo assim, um estado mais acetilado das histonas permite maior transcrição gênica. A acetilação de histonas parece estar relacionada com a competência visto que o *status* da acetilação de histonas e qualidade do ovócito também foi sugerida em humanos (VAN DEN BERG, *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012) e ratos (DING *et al.*, 2012) e que ovócitos considerados mais competentes

têm níveis mais baixos de mRNA de HDAC2 do que aqueles considerados menos competentes (BESSA, *et al.*, 2013).

Nesse contexto, as hipóteses desse estudo foram que (1) ovócitos mais competentes possuem maior nível de acetilação das histonas quando imaturos comparado aos menos competentes; (2) a adição de um inibidor de HDAC na PMIV e/ou MIV melhora a competência de desenvolvimento de ovócitos bovinos. Para testar essas hipóteses, o presente estudo teve como objetivo determinar o padrão de acetilação de histonas em ovócitos de diferentes competências antes, durante e após a MIV, bem como avaliar o uso do scriptaid (inibidor de HDAC) antes e após a retomada da meiose na competência de desenvolvimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovogênese

De forma resumida pode-se dizer que o processo de formação dos ovócitos é composto por sete etapas: primeiramente se tem a formação das células germinativas primordiais (CGPs); posteriormente migração das CGPs para as futuras gônadas; colonização dessas gônadas pelas CGPs; proliferação e diferenciação das CGPs em ovogônias; início da meiose; e termina com a formação do ovócito secundário e fecundação (VAN DEN HURK, ROBERT E ZHAO, JIA, 2005).

Sendo assim, a ovogênese consiste na formação de células haploides a partir das CGPs diploides envolvendo várias divisões mitóticas e duas divisões meióticas. As CGPs (2n) migram para as gônadas femininas ainda indiferenciadas, no qual iniciam o processo de diferenciação para ovogônias (2n). Estas células se proliferam por divisões mitóticas, mantendo-se ainda diploides e possuem um número predeterminado de divisões mitóticas. Depois de sucessivas mitoses, entram em processo de meiose iniciando o processo de diferenciação para ovócitos primários (2n), no qual ocorre duplicação do DNA (GONÇALVES *et al.*, 2008; ALBERTS *et al.*, 2010). Assim, as ovogônias aumentam de tamanho e entram em prófase I da primeira meiose, cujo início ocorre entre os dias 75 e 80 pós-concepção em bovinos (ERICKSON, 1966), diferenciando-se, assim, em ovócitos primários (MONIRUZZAMAN E MIYANO, 2010).

A prófase I é dividida em cinco estágios sequenciais: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. No entanto, os ovócitos ficam retidos no estágio de diplóteno até o início da ovulação, quando por ação de gonadotrofinas ou quando o ovócito é retirado do ambiente

folicular, tem-se a retomada da meiose. O ovócito maturado atinge o estágio de MII no qual se tem a segunda parada da meiose. Essa só irá se completar quando ocorrer a fecundação (VAN DEN HURK, ROBERT E ZHAO, JIA, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2008).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular que se inicia com a formação do folículo primordial e termina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK, ROBERT E ZHAO, JIA, 2005). Em outras palavras, a foliculogênese inicia-se após o começo da ovogênese e termina antes dessa última, e pode ser dividida em duas fases: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários e; 2) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (Fernandes *et al.*, 2009) (Figura 1). A classificação dos folículos se dá de acordo com a quantidade e formato das células sendo que os folículos primordiais, primários e secundários em bovinos aparecem por volta de 90, 140 e 210 dias no ovário fetal (FAIR, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2008).

Figura 1 - Esquema do desenvolvimento folicular. O desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas fases, sendo a fase pré-antral, com a formação dos folículos primordiais e posteriormente ativação desses folículos e crescimento dos folículos primários e secundários; e fase antral com a formação do folículo terciário e folículo pré-ovulatório. Durante a fase antral, o crescimento do folículo continua através das fases de recrutamento, seleção, dominância e estágio pré-ovulatório. A cada ciclo reprodutivo da fêmea bovina somente um folículo ovula, e os outros folículos entram em processo de atresia (morte folicular).



Fonte: LIMA et al. (2016)

Os folículos primordiais são formados após a colonização das gônadas primitivas pelas CGPs e sua diferenciação em ovogônias, sendo constituídos de uma camada de células somáticas achatadas oriundas do epitélio celômico (BRAW-TAL E YOSSEFI, 1997), que podem ser denominadas células da pré-granulosa. Esses folículos constituem o *pool* de reserva folicular, constituindo cerca de 95% da população folicular dos ovários de mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Quando os folículos saem desse pool de reserva, dão início à fase de crescimento, que pode ser denominada ativação folicular.

A ativação folicular ocorre devido a uma série de fatores de crescimento como fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento transformante α (TGF α), fator de crescimento transformante β (TGF β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), proteína morfogenética óssea (BMP-15), Kit ligand (KL) e seu receptor (FIGUEIREDO *et al.*, 2002; FORTUNE, 2003; OKTEM e OKTAY, 2008; MONIRUZZAMAN e MIYANO, 2010). Após a ativação folicular, ocorrem várias alterações como modificação do formato das células da granulosa de achatado para cúbico, proliferação das células da granulosa e aumento do tamanho do ovócito alterando a classificação do folículo de folículo primordial para folículo primário (GOUGEON e BUSSO, 2000).

Para que o desenvolvimento folicular e ovocitário progridam é necessária uma comunicação bidirecional entre o ovócito e as células somáticas circundantes (EPPIG, 2001). Sendo assim, durante o crescimento ovocitário ocorre a formação das junções *gap*, que são canais intercelulares os quais permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, mensageiros secundários e alguns metabólitos de uma célula para outra. As junções comunicantes são compostas por conexinas, sendo a conexina 43 uma das mais importantes e mais abundantes no ovário, a qual é expressa nas células da granulosa desde o início da foliculogênese (ACKERT *et al.*, 2001).

O folículo composto por um ovócito primário envolto por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico é denominado folículo secundário ou folículo pré-antral. Nesse momento o núcleo começa a assumir uma posição mais central, as organelas migram para a periferia (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) e tem-se a formação dos grânulos corticais no citoplasma do ovócito. O ovócito atinge uma fase de crescimento intensivo aumentando seu volume devido ao acúmulo de água, íons, carboidratos, proteínas e lipídeos (FAIR *et al.*, 1997). As células da granulosa circundantes se tornam mais proliferativas e uma camada da teca externa se desenvolve a partir de células do estroma intersticial (VAN DEN HURK, ROBERT

e ZHAO, JIA, 2005). Além do mais, nessa fase da foliculogênese, ocorre a formação de uma camada acelular formada por glicoproteínas, denominada zona pelúcida (ZP), que forma uma camada protetora ao redor do ovócito. Essa é composta por três glicoproteínas, ZP1, ZP2 e ZP3 sendo que a expressão da ZP2 pode ser visualizada desde a formação dos folículos primordiais, ao contrário da ZP1 e ZP3 (SOYAL *et al.*, 2000).

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o número de folículos secundários em desenvolvimento, o tamanho, o número de células e a taxa de atresia sofrem influência das gonadotrofinas, sendo que o FSH parece ser o mais importante para o crescimento dos folículos nessa fase (VAN DEN HURK *et al.*, 1997; VAN DEN HURK *et al.*, 2000). No entanto, apesar de responderem aos estímulos gonadotróficos, esses folículos conseguem desenvolver para o próximo estágio (folículo antral) com mínima quantidade de FSH circulante ou mesmo com receptores de FSH alterados (MCGEE e HSUEH, 2000; VAN DEN HURK *et al.*, 2000). Estudos em ratos sugerem que o hormônio luteinizante (LH) seja mais importante para o desenvolvimento desses folículos visto que receptores de LH são expressos nas células da teca de folículos secundários e desencadeia a biossíntese de andrógenos, que são capazes de estimular a formação de receptores de FSH nas células da granulosa e assim ampliar os efeitos do FSH nos folículos secundários (VAN DEN HURK *et al.*, 1997; VAN DEN HURK *et al.*, 2000). Alguns fatores de crescimento também estão associados à sobrevivência e desenvolvimento desses folículos pré-antrais, tanto em ratos como nas outras espécies domésticas, como por exemplo o hormônio anti-Mülleriano (AMH), GDF9, BMP15, KL, EGF, IGF, TGF, FGF-2, FGF-7 (VAN DEN HURK *et al.*, 1997; MCNATTY *et al.*, 1999; VAN DEN HURK *et al.*, 2000).

Após o crescimento dos folículos secundários e o surgimento de várias camadas da granulosa em volta do ovócito se tem a formação de uma cavidade repleta de líquido que é denominada antro (DRIANCOURT, 2001). O líquido da cavidade antral é rico em substâncias derivadas do sangue, como as gonadotrofinas, e de secreções das células foliculares como esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas. Sugere-se que a multiplicação das células e a formação do antro são estimuladas por hormônios gonadotróficos. Estudos *in vitro* em roedores mostraram que o FSH (HARTSHORNE, 1997; MAO *et al.*, 2002), o LH (CORTVRINDT *et al.*, 1998), a ativina (ZHAO *et al.*, 2001) e KL (DRIANCOURT *et al.*, 2000) podem estar relacionados com a formação da cavidade antral. Já em bovinos, um estudo *in vitro* com folículos pré-antrais mostrou que o EGF possui um efeito estimulante no surgimento dessa cavidade (GUTIERREZ *et al.*, 2000).

Os folículos antrais ou folículos terciários são caracterizados pelo desenvolvimento da teca interna e externa, aumento da vascularização (FAIR *et al.*, 1997) e diferenciação das células da granulosa em duas populações celulares de funções distintas. São formadas as células da granulosa mural, que tem como principal função a produção de esteroides e estão localizadas internamente na parede folicular, e as células do cumulus, que se encontram em volta do ovócito e estão diretamente ligadas a ele, fornecendo nutrientes, e transportando moléculas inibitórias ou estimulatórias para retomada da meiose (MCNATTY *et al.*, 2004; SCARAMUZZI *et al.*, 2011).

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância. Essas fases ocorrem de acordo com as ondas foliculares, geralmente de 2 a 3 ondas em bovinos (RAJAKOSKI, 1960; SAVIO *et al.*, 1988; WEBB *et al.*, 1999). Os folículos responsivos ao FSH começam a crescer até atingir cerca de 3mm de diâmetro e são recrutados nesse momento. À medida que o folículo cresce, o ovócito também aumenta seu diâmetro e tem-se uma modificação, proliferação e redistribuição das organelas citoplasmáticas. Quando os folículos atingem cerca de 8 a 9 mm em *Bos taurus* (GINTHER *et al.*, 1999; KULICK *et al.*, 1999) e cerca de 6 mm em *Bos indicus* (SARTORELLI *et al.*, 2003; SARTORELLI *et al.*, 2005) há uma rápida divergência em que apenas um dos folículos aumenta rapidamente de tamanho, tornando-se maior que os outros folículos, concomitantemente com a diminuição nos níveis plasmáticos de FSH, dando origem a um folículo dominante (SAVIO *et al.*, 1988; GINTHER *et al.*, 1996).

Quando o folículo se torna dominante, ocorrem várias alterações ultra estruturais dentro do ovócito que incluem um aumento no conteúdo lipídico, uma diminuição no tamanho dos complexos de Golgi e um aumento mais superficial da localização dos grânulos corticais. Anterior ao momento da ovulação, antes do pico de LH, ocorre uma redução ainda maior dos complexos de Golgi, a membrana nuclear se torna ondulada e o nucléolo apresenta vacuolização e se desenvolve. Além disso, ocorre alongamento das células da corona radiata, resultando em retração para uma posição mais na superfície da membrana do ovócito (ASSEY *et al.*, 1994) e o tamanho do espaço perivitelino é aumentado. Essas alterações são designadas por pré-maturação ou capacitação (HYTTEL *et al.*, 1997). O folículo dominante expressa receptores de LH nas células da granulosa, e mesmo com concentrações baixas de FSH, esse continua seu crescimento, o que o diferencia dos folículos subordinados (BAO e GARVERICK, 1998; FORTUNE *et al.*, 2001). Além do mais, sugere-se que a produção de estradiol intrafolicular, IGF-1 e ativinas estão relacionadas à capacidade do folículo dominante de responder às

gonadotrofinas (BEG e GINTHER, 2006). O diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório em zebuínos está em torno de 10 a 12 mm (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; PINHEIRO *et al.*, 1998; BORGES *et al.*, 2003), menor do que o frequentemente relatado para taurinos (15 a 20 mm) (MURPHY *et al.*, 1990; ADAMS *et al.*, 1992; ROBERTS *et al.*, 1994; WOLFENSON *et al.*, 2004).

Na ausência de LH o folículo dominante regride e é desencadeado o recrutamento de uma nova onda folicular. Se houver um aumento de LH, o folículo dominante continua a crescer e o ovócito contido nele sofre a maturação final, culminando na ruptura do folículo e a ovulação de um ovócito maturo. Essa maturação se caracteriza pela expansão das células do cumulus, aumento do espaço perivitelino e perda do contato entre as células da corona radiata e membrana do ovócito. O citoplasma do ovócito aumenta de conteúdo e o compartimento de Golgi apresenta-se reduzido. Os grânulos corticais estão alinhados próximos à membrana do ovócito, ocorre a quebra da carioteca e retomada da meiose. Os cromossomos dos ovócitos se condensam e tem-se a progressão dos estágios finais da meiose I até a parada na metáfase da meiose II (HYTTEL *et al.*, 1986; HYTTEL *et al.*, 1989; HYTTEL *et al.*, 1997).

2.3 Maturação ovocitária

A maturação ovocitária se caracteriza por uma série de transformações no núcleo e no citoplasma do ovócito que ocorrem durante a sua progressão da prófase I até o estágio de metáfase da segunda meiose. Uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações ocorre envolvendo várias proteínas que participam do reinício e da regulação da meiose durante a maturação ovocitária. Somente ovócitos competentes têm capacidade de alcançar a completa maturação, ser fecundado e formar um embrião que seja apto a levar a gestação em diante (SIRARD, *et al.*, 2006; FARIN *et al.*, 2007).

As alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante a maturação podem ser divididas em maturação nuclear e citoplasmática. A maturação nuclear se inicia quando o ovócito retoma a meiose saindo do estágio de vesícula germinativa (VG) e termina quando atinge a MII. A maturação citoplasmática compreende todas as alterações estruturais e reorganização das organelas citoplasmáticas bem como a síntese de proteínas e armazenamento de RNAm (SIRARD, 2001).

2.3.1 Maturação nuclear

Como já relatado, os ovócitos de mamíferos são produzidos desde a vida fetal e ficam retidos em prófase da primeira divisão meiótica até a ovulação. A maturação nuclear compreende um ciclo em que o núcleo sai do estágio de prófase I e progride para a metáfase II da meiose sendo que a retomada da meiose *in vivo* ocorre após o pico de LH, e *in vitro*, espontaneamente após a retirada dos ovócitos do ambiente folicular (PINCUS e ENZMANN, 1935; LONERGAN *et al.*, 1994; GONÇALVES *et al.*, 2007; VARAGO *et al.*, 2008).

Na maturação nuclear *in vivo*, a liberação do LH não atua diretamente no ovócito, visto que este não apresenta receptores para essa gonadotrofina. Sua ação é mediada através de fatores parácrinos secretados pelas células somáticas responsivas ao LH (células da granulosa), e pelo transporte de substâncias indutoras da meiose das células da granulosa/cumulus para os ovócitos por meio das junções *Gap* (GILULA *et al.*, 1978). A retomada da meiose é atribuída a interrupção da transferência de fatores inibidores da maturação do ovócito, decorrente da expansão das células do cumulus com consequente perda da comunicação intercelular entre os COCs e as células da granulosa murais do folículo (DEKEL, 1996). Essa expansão é causada pela produção de ácido hialurônico produzido pelas células do cumulus. A expansão é dependente da estimulação de peptídeos semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), induzidos por LH, através da ativação da proteína quinase A (PKA) e em resposta a altos níveis de Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (AMPC) produzidos pelas camadas externas das células da granulosa (SANCHEZ e SMITZ, 2012). Através desses estímulos, os níveis de transcrição dos genes que estão envolvidos na expansão das células do cumulus aumentam como sintase de ácido hialurônico 2 (Has2), proteína relacionada a pentraxina (Ptx3) e proteína induzida por TNF alfa 6 (Tnfaip6) (OCHSNER *et al.*, 2003; ASHKENAZI *et al.*, 2005). Além do mais, quando os fatores EGF-like são liberados, ativam seus receptores (EGFR) nas células da granulosa e do cumulus e estimulam a via MAPK/ERK dando início a retomada da meiose (FREIMANN *et al.*, 2004).

Já *in vitro*, tem-se a retomada espontânea da meiose visto que os ovócitos são retirados do ambiente folicular, perdendo o contato ovócito-células da granulosa e como consequência interrupção da transferência de fatores que inibem a quebra da vesícula germinativa (GVBD) no ovócito (BYSKOV *et al.*, 1997). Sendo assim, com a retomada da meiose, a maturação nuclear se inicia, ocorrendo um bloqueio da maturação citoplasmática e do acúmulo de transcritos, sendo que muitas vezes esse ovócito ainda não estocou quantidade suficiente de

RNA_m para a progressão das fases posteriores. Portanto, pode ocorrer uma assincronia da maturação nuclear com a citoplasmática, fazendo com que a aquisição da competência fique prejudicada (SANCHEZ e SMITZ, 2012).

Portanto, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, quando se tem a retomada da meiose, dá-se início a maturação nuclear, que irá corresponder à reorganização da rede de microtúbulos para o deslocamento dos cromossomos, condensação da cromatina, dissolução do envelope nuclear e separação dos cromossomos. Esses eventos levam a uma progressão de prófase I para metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de MII (CHA e CHIAN, 1998).

Para que o reinício da meiose aconteça e a progressão da maturação ocorra em ovócitos de diversas espécies de mamíferos é necessária a síntese e ativação de várias proteínas já descobertas atualmente. Resumidamente, esse processo é regulado pela fosforilação e desfosforilação proteica, mediada pelas proteínas quinases e fosfatases, respectivamente (WEHREND e MEINECKE, 2001). As principais moléculas que estão envolvidas no controle do bloqueio meióticos são o AMPc, Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), Peptídeo Natriurético Precursor C (NPPC), Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), Fator promotor de maturação (MPF).

A concentração intraovocitária de AMPc está diretamente correlacionada com o bloqueio meiótico (KAWAMURA *et al.*, 2004). O AMPc é um segundo mensageiro celular derivado a partir da quebra da adenosina trifosfato (ATP) pela enzima adenilato ciclase (AC). Esta fica localizada nas membranas celulares e pode ser ativada ou inibida por meio das proteínas G. As proteínas G ficam acopladas aos receptores de membrana celular e estão envolvidas na cascata de segundos mensageiros. Podem ser ativadas por meio de estímulos hormonais e os receptores 3 e 12 acoplados a proteína G estão presentes na membrana plasmática do ovócito, regulando a atividade da AC (TRIPATHI *et al.*, 2010).

O AMPc uma vez sintetizado pela AC é rapidamente degradado por uma ou mais fosfodiesterases (PDE). Atualmente, mais de 10 classes de enzimas PDEs, tais como PDE3A, PDE5, PDE9A, PDE4, PDE8 foram descritas. A PDE3A é a única enzima específica do ovócito que hidrolisa o AMPc em 5' AMP provocando a reativação meiótica (SASSEVILLE *et al.*, 2009). A deficiência de PDE3A no ovócito inibe a maturação, sugerindo assim que o bloqueio meiótico é mantido pela presença do AMPc (MASCIARELLI *et al.*, 2004). Em camundongos (RICHARD *et al.*, 2001), em suínos (HIRADATE *et al.*, 2014), em gatos (ZHONG *et al.*, 2016) e bovinos (FRANCIOSI *et al.*, 2014; CAIXETA *et al.*, 2017) o uso de inibidores específicos da

PDE3A demonstraram que a degradação do AMPc é um fator importante na retomada da meiose.

A alta concentração intracelular de AMPc, promove a regulação de proteínas como a PKA, também denominada proteína quinase A dependente de AMPc (DOWNS e HUNZICKER-DUNN, 1995). As PKAs podem ser divididas em tipo I e tipo II dependendo do predomínio de subunidades reguladoras. As PKAs tipo I estão presentes no interior dos ovócitos e estão relacionadas com o bloqueio meiótico. Já as PKAs tipo II foram detectadas nas células do cumulus e estão relacionadas ao reinício meiótico e expansão das células do cumulus (DOWNS e HUNZICKER-DUNN, 1995). A PKA tipo I promove a fosforilação do complexo CDK1/Ciclina B e inativa o MPF, mantendo o bloqueio meiótico (MEHLMANN, 2005).

O AMPc fica armazenado nos COC's, tanto em ovócitos, quanto nas células do cumulus. Porém, esses compartimentos atuam associados sendo que, um aumento no AMPc nas células somáticas é de alguma maneira traduzido em diminuição nos níveis de AMPc no ovócito. O GMPc também é produzido pelas células do cumulus após ativação da guanilil ciclase acoplada ao receptor do peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) (ROBINSON *et al.*, 2012) e chega no ambiente intraovocitário junto com o AMPc através da comunicação bidirecional das junções "gap". A atividade de NPR2 é induzida pelo seu ligante NPPC, que é sintetizado principalmente pelas células da granulosa mural (ZHANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). O GMPc é responsável por impedir a ativação da enzima PDE5A, que promove a degradação do AMPc nas células do cumulus, favorecendo assim a manutenção do fluxo de AMPc para o interior do ovócito. Quando o GMPc chega no citoplasma do ovócito impede a ativação da PDE3A que é responsável pela hidrólise do AMPc, favorecendo assim a manutenção dos altos níveis de AMPc intraovocitários (CONTI *et al.*, 2002). Portanto, os elevados níveis de AMPc ativam a proteína quinase A (PKA), que fosforila a subunidade catalítica (CDK1) do fator promotor da maturação (MPF), inativando-o e mantendo o bloqueio meiótico (TRIPATHI *et al.*, 2010).

Outras proteínas que estão envolvidas com o reinício da meiose e progressão da maturação nuclear são as MAPKs, pertencentes à família das proteínas quinases serina-treonina conhecidas também como quinases reguladas por sinal extracelular (GRAVES *et al.*, 1995; SCHMITT e NEBREDA, 2002). Tanto nos ovócitos como nas células do cumulus a MAPK é ativada pela fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina pela MEK, também designada MAPKK (proteína quinase ativadora da MAPK). A MEK também é ativada pela fosforilação

mediada por diferentes vias sendo pelas proteínas MOS no ovócito, e RAS/RAF nas células do cumulus (SILVA, 2008; CROCOMO *et al.*, 2013).

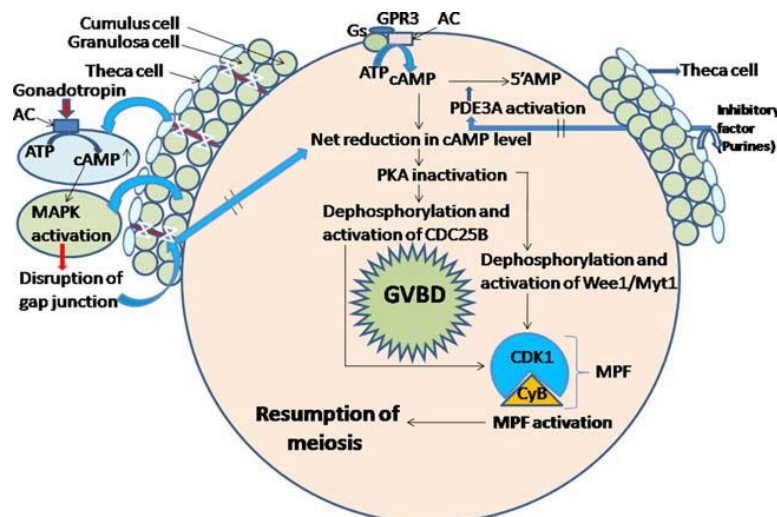
Apesar de muitos estudos relatarem que a MAPK não é fundamental para se ter a GVBD a ativação artificial dessa pode induzir ou promover a GVBD. Em ovócitos bovinos, a injeção de transcritos do gene MOS provoca uma rápida ativação da MAPK que resulta em aceleração da retomada da meiose, sugerindo assim um efeito positivo dessa proteína na quebra da vesícula germinativa (FISSORE *et al.*, 1996). Apesar de não saber ao certo se a MAPK intraovocitária é realmente importante para a retomada da meiose sabe-se que ela é necessária para formação do fuso, transição da MI para MII, e parada em MII (SUN *et al.*, 1999).

A queda dos níveis intraovocitários de AMPc é decorrente da ação do LH sobre as junções *Gap*. Esse hormônio gonadotrófico ativa a via MAPK, a qual promove a fosforilação da conexina 43 e induz uma diminuição na permeabilidade da comunicação entre ovócito e células somáticas (NORRIS *et al.*, 2008). A conexina 43 é o maior componente da junção *Gap* e pode ser fosforilada por diversas quinases, como a PKA, PKC, glicogênio sintetase quinase 3 e MAPK, sendo que essa fosforilação resulta em interrupção das junções *Gap* (SELA-ABRAMOVICH, 2005). Portanto, a redução da comunicação entre ovócito e células do cumulus, impede o influxo de AMPc e GMPc a partir das células da granulosa para o ovócito, aumentando a atividade ovocitária da fosfodiesterase e também, por consequência, reduzindo a concentração de AMPc no ovócito (Figura 3) (TRIPATHI *et al.*, 2010).

Todos esses eventos descritos durante a maturação ovocitária culminam com a ativação do MPF. Esse fator é composto por uma subunidade catalítica, quinase dependente de ciclina denominada cdk1 ou p34^{cdc2}, que controla a divisão celular, e uma subunidade reguladora, a ciclina B1 (TRIPATHI *et al.*, 2010). Em sua forma inativa, pré-MPF, a subunidade catalítica se apresenta fosforilada nos resíduos Thr14 (treonina-14) e Tyr 15 (tirosina-15) (GAUTIER *et al.*, 1988). Quando o MPF está inativado, o ovócito se mantém em prófase I (VON STETINA e ORR-WEAVER, 2011). Níveis elevados do AMPc no interior do ovócito tem sido indicado como um dos fatores essenciais para manter a atividade do MPF inativado durante a primeira parada meiótica (TRIPATHI *et al.*, 2010). Isso ocorre devido a ativação de uma quinase específica (Wee1), a qual inibe diretamente a atividade da Cdk1, além de inativar a fosfatase Cdc25, que é ativadora da Cdk1.

Figura 2 - Modelo proposto para o reinício da meiose induzido pelo LH em ovócitos. LH se liga ao seu receptor em células da granulosa murais e induz a produção de AMPc através de adenilato ciclase (AC). O nível aumentado de AMPc, em seguida, estimula a atividade de PKA/PKC e, conseqüentemente, a produção de fatores semelhantes ao EGF em células da granulosa. Os fatores EGF induzem a atividade da MAPK que perturba as junções comunicantes entre as células da granulosa e o ovócito. Essa interrupção da bloqueia a transferência de AMPc e GMPc para o ovócito. A redução do nível de GMPc ativa a PDE3A que reduz ainda mais o nível de AMPc através de sua hidrólise. A redução líquida do AMPc ovocitário reduz a atividade da PKA no ovócito. A atividade PKA reduzida ativa a fosfatase CDC25B e inativa a Wee1/Myt1 quinase que resulta na desfosforilação da CDK1 e ativação dos fatores promotores de meiose (MPF). MPF ativo, induz a retomada da meiose

LH: hormônio luteinizante, AMPc: monofosfato cíclico de adenosina, AC: Adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, PKC: proteína quinase C, EGF: fator de crescimento epidermal, MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno, GMPc: monofosfato de guanosina cíclica, PDE3A: fosfodiesterase 3A, CDC25B: ciclo de divisão celular 25 homólogo B, CDK1: ciclina dependente de quinase 1



Fonte: Tripathi *et al.* (2010).

2.3.2 Maturação citoplasmática

Apesar da maturação citoplasmática e a maturação nuclear serem eventos distintos, elas precisam estar interligadas para que a maturação e competência ovocitária ocorram por completo. Ovócitos que possuem a maturação nuclear completa em tempo correto, mas que ainda não possuem as alterações citoplasmáticas necessárias, não serão fecundados ou não conseguirão sustentar o desenvolvimento embrionário (MEIRELLES *et al.*, 2004). A maturação citoplasmática é necessária para o ovócito adquirir condições de bloqueio a polispermia, descondensar a cabeça do espermatozoide e formar pró-núcleos após a fecundação. Sendo assim, ocorre a redistribuição de organelas celulares, a migração das mitocôndrias para uma

posição perinuclear e o acúmulo de grânulos no córtex do ovócito (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Durante a maturação ovocitária o retículo endoplasmático se reorganiza e migra para a região periférica do citoplasma do ovócito (KLINE, 2000). Essa reorganização leva os íons de cálcio mais próximo ao seu sítio de ação, com função de atuar no bloqueio a polispermia durante a fecundação (MACHACA, 2007). Os grânulos corticais dos mamíferos, advindos do complexo de golgi durante o crescimento do ovócito, também passam por esse processo de reorganização, migrando de toda extensão do citoplasma para a periferia do ooplasma, próximo a membrana plasmática (WESSEL *et al.*, 2001). Os grânulos corticais também ajudam no controle da polispermia visto que quando o ovócito é fecundado, ocorre exocitose destes grânulos que promovem modificações na zona pelúcida do ovócito, fazendo com o que o mesmo não seja fecundado por outro espermatozoide (HALEY e WESSEL, 2004).

As mitocôndrias pelo fato de sintetizarem ATP são extremamente importantes para o fornecimento de energia durante toda a maturação (STOJKOVIC *et al.*, 2001) e por isso, o movimento dessas para regiões que requerem alto consumo de energia é extremamente importante. O ATP que é sintetizado por elas é necessário para a síntese de proteínas que darão suporte a conclusão dos processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (KRISHER e BAVISTER, 1998; STOJKOVIC *et al.*, 2001). Em suínos e bovinos foi observado uma extensa movimentação das mitocôndrias para o interior do citoplasma durante a maturação dos ovócitos em grupos com alta competência ovocitária (STOJKOVIC *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2001; BREVINI *et al.*, 2005; SOMFAI *et al.*, 2012).

Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de RNAr (RNA ribossomal), pelo processamento dos transcritos e pela adição de inúmeras proteínas ribossomais às suas duas subunidades. O sítio de formação de subunidades dos ribossomos é o nucléolo, que permanece de forma descondensada durante o crescimento ovocitário ou ativação do genoma embrionário, sendo que, os ribossomos apresentam alta atividade de síntese proteica. Quando o ovócito atinge o estágio de MII apresenta níveis basais de tradução de proteínas que pode ser explicado pela presença de um nucléolo afuncional, uma vez que a cromatina está condensada em forma de cromossomos, e assim não há transcrição de RNAr (FAIR *et al.*, 2001; HYTTEL *et al.*, 2001; TOMEK *et al.*, 2002).

Além da reorganização das organelas nessa etapa ocorre transcrição, armazenamento e processamento dos RNAm, que serão posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas advindas dos RNAm são muito importantes para os processos de

maturação, fecundação, formação dos prónucleos e embriogênese inicial e, portanto, são estocadas até a sua utilização (CROCOMO *et al.*, 2013). O RNAm transcrito durante a maturação citoplasmática do ovócito é acumulado em uma forma estável, porém transitoriamente inativa (SIRARD, 2001; TOMEK *et al.*, 2002). A transcrição e a poliadenilação se inicia no núcleo sendo que posteriormente o transporte do RNAm é feito para o citoplasma por meio de um encurtamento da cauda poli-A (Splicing). O prolongamento citoplasmático da cauda poli-A através da adição de adenina está relacionado a tradução desse RNAm e a deânulação leva a degradação do RNAm. No entanto, o ovócito encurta a cauda poli-A (mecanismo de proteção) para ficar inativo e não ser degradado (TOMEK *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2009). Os RNAm ficam estocados no ovócito até sejam recrutados para a tradução, por meio de sinais específicos durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial (FULKA JR *et al.*, 1998). Sendo assim, falhas no armazenamento, processamento e recrutamento do RNAm materno irão interferir na competência ovocitária.

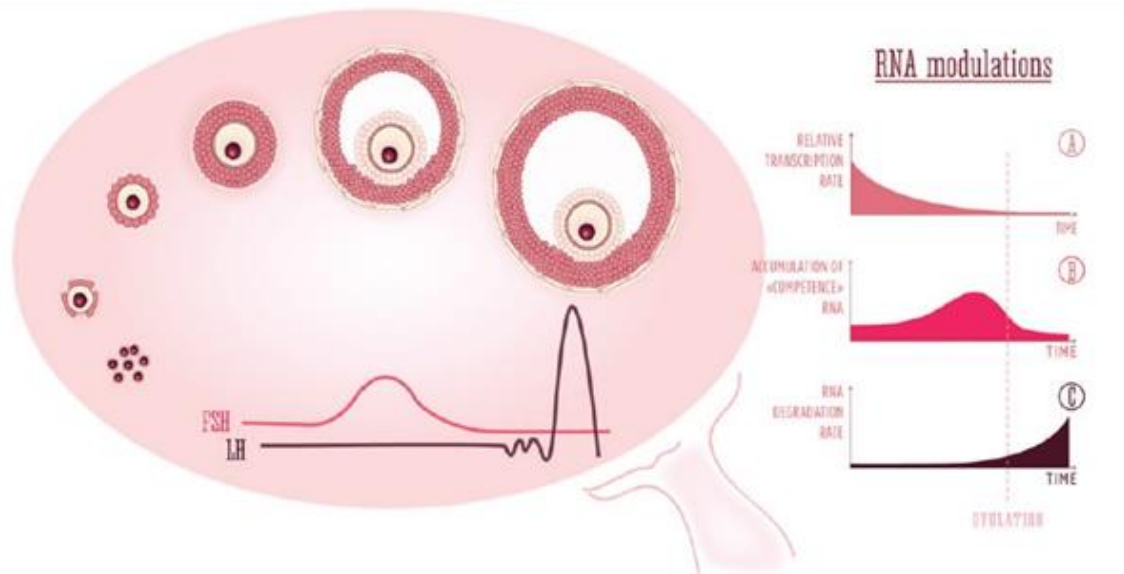
A competência é adquirida progressivamente durante o crescimento do ovócito, entretanto o momento em que ela se completa e quais os mecanismos envolvidos ainda não estão claros. Mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência dos ovócitos, já que durante o crescimento ovocitário há um alto grau de atividade transcricional (SONG e WESSEL, 2005). A síntese de transcritos é maior nas primeiras fases de desenvolvimento, período que coincide com a proliferação das células foliculares. Porém a transcrição no ovócito diminui marcadamente antes da retomada da meiose e, a partir deste ponto, continua em nível bem menor. Isso sugere que as proteínas e transcritos que foram estocados não são substituídos, pelo contrário, são gradualmente traduzidos ou degradados sendo importantes na fecundação e desenvolvimento embrionário, até o momento em que o embrião seja capaz de ativar seu genoma (SIRARD *et al.*, 2006; SANCHEZ e SMITZ, 2012). Portanto, a competência do ovócito também pode ser determinada pela quantidade de RNAm de origem materna que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Estes estoques podem ser diferentes quando são comparados ovócitos competentes e incompetentes, o que já tem sido demonstrado por vários autores (DODE *et al.*, 2006; CAIXETA *et al.*, 2009; RACEDO *et al.*, 2009; BESSA *et al.*, 2013).

2.4 Competência ovocitária

Competência ovocitária se refere a capacidade do ovócito completar a divisão meiótica, garantir uma fecundação monospermica, descondensar a cabeça do espermatozoide, transpor a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir seu desenvolvimento (COTICCHIO *et al.*, 2004). Já se sabe que o tamanho dos folículos é uma forma de avaliar a competência dos ovócitos provenientes desses, visto que, ovócitos obtidos de folículos de maior diâmetro apresentam melhor potencial de desenvolvimento do que os provenientes de folículos de menor diâmetro (LONERGAN *et al.*, 1994; DODE *et al.*, 2000; KAUFFOLD *et al.*, 2005). Em folículos de até 3 mm de diâmetro são encontrados ovócitos que possuem um diâmetro de 110 µm e que ainda não atingiram seu crescimento por completo. Já ovócitos obtidos de folículos entre 3 a 8mm são considerados mais competentes em relação aos outros pois possuem seu crescimento completo e a transcrição está praticamente inativada, o que sugere que esse ovócito já tenha estocado quantidade de RNAm suficiente para as etapas subsequentes (Figura 3) (HYTTEL *et al.*, 1997; DIELEMAN *et al.*, 2002).

Além disso, os ovócitos de mamíferos podem ser classificados de acordo com o grau de condensação da cromatina e sabe-se que essa classificação está relacionada com a competência ovocitária. Em bovinos, os ovócitos apresentam quatro diferentes padrões de configuração de cromatina no estágio de vesícula germinativa, sendo classificados de GV0 a GV3. O estágio GV0 apresenta um padrão filamentososo difuso da cromatina, dispersa em toda área nuclear. Os estágios GV1 e GV2 apresentam como um padrão inicial e intermediário de condensação da cromatina, respectivamente, sendo que GV1 apresenta poucos focos de condensação da cromatina e prossegue para o estágio GV2 que apresenta uma formação maior de aglomerados de cromatina condensada. O nível mais alto de condensação é classificado como GV3 quando a cromatina é organizada em um único grupo, apresentando um único foco de cromatina no ovócito. Ovócitos GV0 apresentam capacidade limitada para retomar e completar a meiose I durante a maturação *in vitro*, enquanto que os ovócitos GV1, GV2 e GV3 são capazes de atingir a MII. Além disso, durante o cultivo *in vitro*, os ovócitos GV2 e GV3 possuem alto potencial de desenvolvimento embrionário em relação aos outros estágios (LODDE *et al.*, 2007). Sendo assim, pode-se afirmar que o grau de condensação da cromatina está relacionado com a competência ovocitária (DE LA FUENTE, 2006; LUCIANO *et al.*, 2012).

Figura 3 - Esquema representando o desenvolvimento folicular até o momento da ovulação (pico de LH) e as modificações na quantidade de RNAm dos ovócitos. (A) Observa-se que a taxa de transcrição é alta no período do crescimento ovocitário e diminui consideravelmente após a ovulação. (B) Ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição da transcrição próximo a ovulação ocorre também um acúmulo de RNAm importante para o desenvolvimento embrionário inicial, diretamente relacionados com a competência ovocitária. (C) Após a ovulação e consequentemente com a fecundação ocorre a tradução dos RNAm acumulados, no entanto, se essa fecundação não ocorre no momento correto tem-se uma alta taxa de degradação dos RNAm e o ovócito se torna incompetente para seguir adiante.



Fonte: LABRECQUE *et al.* (2013)

Atualmente, alguns estudos vêm relatando a importância do controle do nível de acetilação das histonas através das HDACs ao longo do processo de maturação e uma possível associação dessas proteínas com a aquisição da competência ovocitária (BESSA *et al.*, 2013; MA e SCHULTZ, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015; MA e SCHULTZ, 2016). A acetilação das histonas está associada com a transcrição permissiva em ovócitos. Durante a ovogênese, a acetilação global das histonas aumenta durante o crescimento do ovócito, mas chega a níveis quase indetectáveis durante a maturação meiótica (ENDO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006; KAGEYAMA *et al.*, 2007). Em muitos mamíferos (rato, porco, vaca, ovelha, macaco e humano), no estágio mais avançado da foliculogênese, observa-se que a cromatina forma um padrão condensado ao redor do nucléolo e juntamente com esse padrão tem-se a repressão transcricional do RNAm e RNAr. Sugere-se que essas alterações de configuração da cromatina juntamente com eventos epigenéticos, como a desacetilação das histonas através das HDACs, promove o silenciamento gênico, ocorrendo em paralelo com a aquisição da competência do ovócito (WEHREND e MEINECKE, 2001; LODDE *et al.*, 2007; LUCIANO *et al.*, 2012).

2.5 Pré-maturação *in vitro* (PMIV)

A baixa competência de desenvolvimento de ovócitos maturados *in vitro* estão relacionados a maturação citoplasmática incompleta ou tardia e a heterogeneidade dos ovócitos utilizados (SHU *et al.*, 2008). Nesse contexto, a utilização da PMIV adicionada de um inibidor de retomada da meiose pode fornecer aos ovócitos um maior tempo para que esses consigam acumular a quantidade necessária de transcritos e adquirirem sua competência. Ovócitos de folículos pequenos (0,5-2mm) quando cultivados na presença de substâncias que bloqueiam a meiose tiveram a sua cromatina remodelada, apresentando um padrão mais condensado, o que comprova que esses ovócitos tiveram um tempo a mais para adquirir uma maior competência para o desenvolvimento (LUCIANO *et al.*, 2011).

Já se sabe que a inibição das PDEs mantém níveis elevados de AMPc, retendo o ovócito em GV e pode ser utilizado no meio de PMIV. De fato, vários estudos relataram o uso de inibidor de PDE3A (SASSEVILLE *et al.*, 2009), como cilostamida e NPPC, no meio de PMIV, na tentativa de melhorar a competência ovocitária e conseqüentemente desenvolvimento embrionário (ALBUZ *et al.*, 2010; DIECI *et al.*, 2013; FRANCIOSI *et al.*, 2014; DE CESARO *et al.*, 2015; FARGHALY *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2016; CAIXETA *et al.*, 2017; DIOGENES *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Mesmo que os resultados de todos esses estudos estejam de acordo quanto ao efeito desses inibidores na retenção meiótica, seu efeito na melhora do desenvolvimento embrionário ainda é contraditório.

Franciosi *et al.* (2014) utilizaram o NPPC durante a PMIV e relataram que esse pode ser utilizado para reter a meiose e que aumenta a competência para o desenvolvimento de ovócitos bovinos. Em suínos, a utilização do NPPC na PMIV em ovócitos obtidos de folículos de 3-8mm não alterou as taxas de blastocisto porém, quando utilizado em ovócitos menos competentes, obtidos de folículos de 3-4 mm apresentaram maior taxa de produção de blastocistos em relação ao controle, sugerindo que o NPPC melhorou a competência de desenvolvimento dos ovócitos (ZHANG *et al.*, 2017).

Moduladores de AMPc também vem sendo utilizados durante a PMIV como monofosfato N6,2'-O-dibutiriladenosine 3',5'-cíclico (dbcAMP) e 3-isobutil-1-metilxantine (IBMX). Em estudo recente com ovócitos bovinos o IBMX utilizado durante 5 horas de PMIV melhorou a competência de desenvolvimento dos ovócitos de tamanho pequeno (entre 110 a 115 μ m) e a qualidade dos embriões produzidos (ABDEL-GHANI *et al.*, 2018). Sugimura *et*

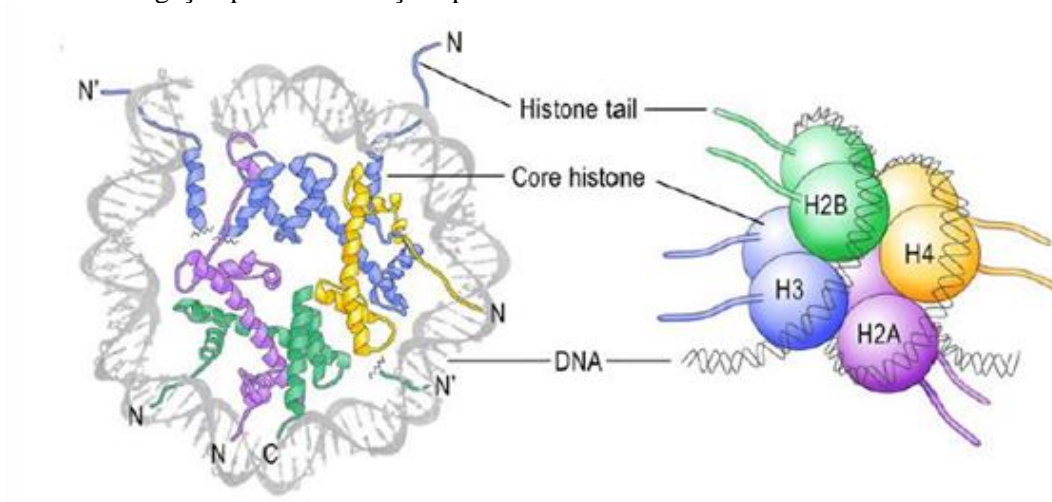
al. (2018) utilizaram dbcAMP e IBMX por duas horas de PMIV em ovócitos de folículos pequenos (2-4mm) e depois esses ovócitos foram incubados por 22 horas de MIV com meio enriquecido de FSH ou ampirregulina. Os resultados mostraram que a PMIV utilizando moduladores de AMPc podem contribuir para aquisição de competência de ovócitos obtidos de folículos pequenos através da modulação da sinalização do receptor EGF e comunicação pelas JG entre ovócito-cumulus e cumulus-cumulus.

O forskolin também tem sido utilizado nos trabalhos atuais. Forskolin ativa a enzima AC e aumenta as concentrações de AMPc. A utilização de forskolin e IBMX foi testada em ovócitos bovinos durante a PMIV por 2 horas. Esse tratamento modulou o conteúdo lipídico, sendo que, blastocistos que passaram pela PMIV apresentaram um menor conteúdo lipídico em relação ao controle. Além disso, o perfil transcricional de COC's e blastocistos que foram tratados com esses compostos foi diferente do grupo controle, sugerindo que o forskolin e IBMX melhoram potencialmente a qualidade dos embriões produzidos (RAZZA *et al.*, 2018).

2.6 Acetilação de histonas

O nucleossomo é composto de cerca de 147 pares de bases de DNA enovelados em um octâmero de histonas (FÜLLGRABE *et al.*, 2011), contendo duas cópias de cada uma das proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009), na qual são responsáveis por fazer o empacotamento de estruturas condensadas da cromatina dos cromossomos eucarióticos. Uma outra histona, a H1 se liga a fita de DNA entre dois nucleossomos e dá estabilidade para a estrutura (HE E LEHMING, 2003). As histonas afetam diretamente a estrutura da cromatina e apresentam sítios para modificações pós-traducionais e superfície para a interação com outras proteínas. Modificações nessas histonas estão relacionadas com todos os processos essenciais que requerem o acesso ao DNA como condensação, transcrição, replicação e reparo (ZENTNER e HENIKOFF, 2013). Sendo assim, além da metilação do DNA que é um tipo de modificação química do DNA, o estado de condensação da cromatina e a regulação da expressão gênica também são determinados pelas modificações nas histonas.

Figura 4 - Octâmero de histonas formando o nucleossomo e as caudas N das histonas, que são sítios de ligação para modificações pós-traducionais

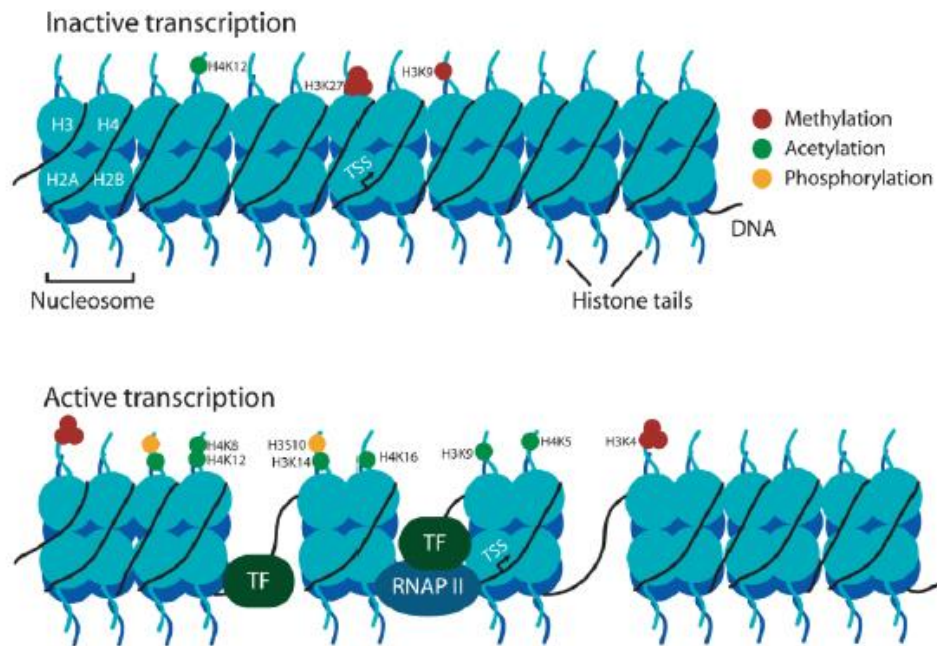


Fonte : GRÄFF e MANSUY, 2008

Dentre as modificações epigenéticas que podem afetar a transcrição estão incluídas a metilação, acetilação de histonas, fosforilação e ubiquitinação (WADE *et al.*, 1999). A região amino-terminal (cauda-N) das histonas é o sítio mais sujeito a modificações pós-traducionais por ser o local de maior acessibilidade ao nucleossomo. A acetilação, que é reversível, e a metilação, que é marca celular de longa duração, são as modificações mais estudadas dentre as alterações epigenéticas de resíduos de lisina na cauda aminoterminal das histonas H3 e H4 (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

A acetilação das histonas é responsável por enfraquecer as interações eletrostáticas entre as histonas e o esqueleto fosfato do DNA pois neutraliza a carga positiva nos resíduos de lisina e por isso está relacionado a um estado de cromatina mais aberta, que está pronta para ser transcrita. Já quando se tem um estado mais hipoacetilado a cromatina se encontra mais condensada, reprimindo assim a transcrição (VERDONE *et al.*, 2005; PARTHUN, 2007; GE *et al.*, 2015). Esse mecanismo tem papel fundamental na preparação do ovócito para maturação, sendo o fechamento da cromatina essencial para a retomada e término da meiose (WANG *et al.*, 2006). A acetilação das histonas H3 e H4 são mais extensas do que nas histonas H2A e H2B. Os locais mais críticos para a acetilação incluem pelo menos quatro lisinas (K) altamente conservadas na cauda da histona 4 (H4) que são K5, K8, K12 e K16 e, quatro lisinas (K9, K14, K18 e K27) na cauda da histona 3 (H3) (DE RUIJTER *et al.*, 2003).

Figura 5 - Modificações pós-traducionais de histonas alterando a expressão gênica.



Fonte: DAY e SWEATT, 2011.

Durante o crescimento do ovócito as histonas são acetiladas até que o mesmo complete o seu desenvolvimento. Entretanto, durante a maturação as histonas são desacetiladas, o que coincide com o silenciamento gênico que deve ocorrer até MII (GU *et al.*, 2010). Apesar de este ser o padrão geral descrito, muitos estudos têm mostrado que o padrão de acetilação de histonas durante a maturação pode apresentar variações dependendo da espécie avaliada, do sistema de maturação utilizado e de anormalidades dos ovócitos decorrentes de vários fatores internos e externos.

Racedo *et al.* (2009) mostraram que em ovócitos bovinos as histonas estavam acetiladas no estágio de VG e VGBD e que esta acetilação foi decrescendo nos estágios de MI e MII, sendo quase indetectável nesses últimos. Em contraste em ovócitos de ovinos, avaliando mudanças na acetilação da H3K9 e H4K5 e H4K12 durante a maturação, foi observado uma queda na acetilação do estágio de VG até MI e um aumento em AI, TI e MII (TANG *et al.*, 2007). O mesmo padrão foi observado em ovócitos de camundongos na qual um decréscimo na acetilação da H4K12 foi detectado durante a maturação aumentando novamente em MII (AKIYAMA *et al.*, 2004).

O estudo de Sun *et al.* (2015) em búfalos demonstrou que o nível de acetilação de H3K18, através de análises de imunohistoquímica, aumentou do estágio GV para GVBD e apresentou seus maiores níveis no estágio de GVBD. Em seguida, H3K18 foi desacetilado

completamente na fase de MI e novamente acetilada na fase MII. Esses resultados indicam que a acetilação da H3K18 pode ser necessária para a transição do estágio de GV para estágio de GVBD, e a desacetilação dessa histona também é requerida para o estabelecimento da condensação da cromatina. Quanto a expressão gênica, quando os ovócitos foram maturados em um meio suplementado com 500-nM de scriptaid (inibidor de HDAC), a expressão dos genes CBP e HAT1 nos ovócitos em todos os estágios da meiose (GVBD, MI e MII) foram significativamente mais alto do que em ovócitos maturados em meio na ausência de scriptaid. A adição do scriptaid no meio de maturação também aumentou a expressão do gene p300 em ovócitos no estágio de MI e MII mas não apresentou diferença para os ovócitos em estágio de GVBD, comprovando que esse inibidor pode aumentar o nível de acetilação da H3K18 através do aumento da expressão de genes relacionados a acetilação das histonas.

Além das diferenças de expressão das histonas de acordo com a espécie outro fator que pode afetar o status de acetilação e comprometer a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos é o sistema de maturação utilizado. Comparando o status de acetilação em ovócitos humanos maturados *in vivo* e *in vitro*, Huang et al. (2012) mostraram que a expressão reduzida de HDAC1 e que a desacetilação insuficiente das histonas estão associadas a defeitos na metáfase em ovócitos humanos maturados *in vitro*.

Franciosi et al. (2017) comparando as mudanças na acetilação da H4 (AcH4K8, AcH4K12, AcH4K16) durante a maturação *in vivo* e *in vitro* de ovócitos equinos observaram que a acetilação da H4 depende da configuração da vesícula germinativa e o estágio de condensação da cromatina. Nesse estudo foi observado que os níveis de acetilação da H4K8 e H4K12 aumentaram enquanto os da H4K16 diminuíram à medida que o estado da cromatina na VG passava de fibrilar para condensada. Enquanto, durante a meiose a K8 e a K12 eram desacetiladas de forma semelhante nos *in vivo* e nos *in vitro*, a K16 era acetilada nos maturados *in vivo* e desacetilada nos *in vitro*, sugerindo que as condições de maturação podem determinar uma alteração na regulação de enzimas específicas que poderiam ser responsáveis pela mudança no padrão de acetilação encontrada na H4K16, sem afetar H4K8, H4K12. Outro resultado importante desse estudo foi que a acetilação da H4 pode estar envolvida no controle da remodelação da cromatina que precede a retomada da meiose (DE LA FUENTE *et al.*, 2004; KAGEYAMA *et al.*, 2007). Ou seja, o rearranjo da cromatina de uma configuração fibrilar para condensada é caracterizada por uma diminuição na acetilação da K8 e K12 da H4 em equinos. Esses dados são importantes, pois esse processo de remodelação da cromatina que antecede a retomada da meiose tem sido reconhecido como um passo essencial na diferenciação final do

ovócito e parece estar associada com a aquisição da competência para o desenvolvimento (DE LA FUENTE *et al.*, 2004).

Além disso, várias alterações em ovócitos de mamíferos têm sido relacionadas a mudanças no status de acetilação das histonas. Anormalidades cromossômicas decorrentes da idade, por exemplo, têm sido relacionadas com alterações na desacetilação da H4K12 em ovócitos humanos (VAN DEN BERG *et al.*, 2011), assim como a vitrificação ao aumento da acetilação da H4K5 e H3K14 em ovócitos de camundongos (YANG *et al.*, 2010). Da mesma forma, observaram que o status de acetilação de ovócitos de camundongos diabéticos era diferente dos controles (DING *et al.*, 2012). Esses autores sugeriram que essas alterações poderiam estar envolvidas na redução das taxas de maturação ovocitária que são observadas em pacientes diabéticos. Portanto, os resultados sugerem que o padrão de acetilação pode ser afetado pela qualidade do ovócito.

2.7 Histonas acetiltransferases e Histonas desacetilases (HDACs)

Os níveis de acetilação de histonas dependem da atividade de duas enzimas sendo essas as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs) (BANNISTER, ANDREW E KOUZARIDES, TONY, 2011). As HATs catalisam a transferência de um grupo acetil, originado do cofator acetil-CoA, ao grupo amino da cadeia lateral da lisina (K), na cauda amino-terminal de histonas. Esta adição neutraliza a carga positiva da lisina causando uma redução na sua afinidade pelo DNA, relaxando a cromatina, expondo regiões do DNA e permitindo a transcrição gênica (YANG e SETO, 2007). Podem ser divididas em tipo A e B, dependendo de sua localização subcelular, origem e função.

As HATs tipo A são encontrados no núcleo e estão associados a complexos multiproteicos, onde desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, funcionando como coativadores transcricionais. São classificadas de acordo com sua homologia de sequência de aminoácidos e estrutura conformacional em N-acetiltransferase relacionada a Gen5 (GNAT), proteína adenoviral E1 associada a 300 kDa e proteína de ligação a elemento de resposta a cAMP (p300/CBP) e MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 e TIP 60 (MYST) (HODAWADEKAR e MARMORSTEIN, 2007). HATs tipo B são predominantemente citoplasmáticas, acetilam novas histonas recém sintetizadas e têm função de deposição de histonas (VERDONE *et al.*, 2005; PARTHUN, 2007).

A histona acetiltransferase 1 (HAT1) apesar de fazer parte do grupo das HATs do tipo B, têm participação efetiva na acetilação das histonas nucleares além de estar potencialmente envolvida no processo de montagem da cromatina. A lisina acetiltransferase 2A (KAT2A) faz parte do grupo das HATs tipo A, catalisa a acetilação de nucleossomos em núcleos ou histonas livres no citoplasma, atua como coativador transcricional na regulação dos genes e está diretamente envolvida na acetilação da histona H3 e, em menor grau, da histona H4, agindo como um adaptador transcricional (VERDONE *et al.*, 2005).

Por outro lado, as HDACs são responsáveis pela desacetilação das histonas, promovendo a remoção de grupos acetil, que, por sua vez, causa uma configuração de cromatina fechada, impedindo a expressão gênica. Mais de 17 isoformas foram identificadas em HDACs de mamíferos, e elas são classificadas em quatro classes e subdivididas em 2 famílias (clássicas e as sirtuínas) de acordo com a sua homologia: classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), classe II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10), classe III (SIRT1s 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e a classe IV (HDAC 11) (YANG e GRÉGOIRE, 2005; YANG e SETO, 2008). As HDACs clássicas, na qual compreendem as classes I, II e IV, compartilham similaridade na sua sequência e requerem Zn^{2+} para sua atividade de desacetilação (DE RUIJTER *et al.*, 2003). As Sirtuínas, que correspondem à classe III das HDACS, requerem NAD^+ como cofator.

As HDACs classe I são encontradas no núcleo celular e a atividade dessas está relacionada a modificações na arquitetura da cromatina, na expressão gênica, no transporte proteico e no ciclo celular. As HDACs da classe II exercem funções mais específicas dos tecidos e pode ser dividida em classe IIa (HDAC4, 5,7 e 9) e IIb (HDAC6 e 10). Em resposta á estímulos as HDACs da classe IIa se transportam do núcleo para o citoplasma da célula, enquanto que a HDAC6 e 10 localizam-se prioritariamente no citoplasma. As HDACs da classe II além de estarem associadas ao remodelamento da cromatina e expressão gênica, participam da transdução de sinal e processamento de RNA, ubiquitinação e ciclo celular (YANG e GRÉGOIRE, 2005). A classe IV possui só um membro, HDAC11, e se localiza tanto no núcleo quanto citoplasma e interage com proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina e expressão gênica, processamento de RNA, ciclo celular, enovelamento de proteínas e transdução de sinal (JOSHI *et al.*, 2013). As HDACs da classe III Sirt1, 6 e 7 são encontradas no núcleo, Sirt3, 4 e 5 são encontradas nas mitocôndrias e Sirt2 é citosólica. As sirtuínas estão envolvidas em processos fisiológicos como de sobrevivência celular, metabolismo e ciclo celular (DE RUIJTER *et al.*, 2003).

Vários estudos têm sido realizados no intuito de se elucidar os mecanismos de como as HATs e HDACs4 podem interferir na maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário. No estágio avançado da foliculogênese, a cromatina em muitas espécies de mamíferos (como rato, porco, vaca, ovelha, macaco e humano) sofre um rearranjo em larga escala se tornando mais condensada (MIYARA *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2007). A formação dessa configuração mais condensada, juntamente com a repressão transcricional do RNAm e RNAr ocorre em paralelo com a aquisição da competência completa do ovócito (LODDE *et al.*, 2008; LUCIANO *et al.*, 2012).

Portanto, a desacetilação das histonas é uma modificação chave necessária para garantir uma adequada condensação dos cromossomos e segregação durante a meiose no amadurecimento do ovócito. Nocaute do gene SIRT2 provocou uma hiperacetilação da H4K16 que resultou em defeitos na formação dos fusos, segregação errada dos cromossomos e prejudicou interação centrômero-microtúbulo (ZHANG *et al.*, 2014). Em ratos, HDAC2 tem sido associada com o controle transcricional em ovócito imaturo, e a exclusão do gene que codifica essa proteína o torna subfértil. A eliminação dos genes HDAC1 e HDAC2 leva a redução global na transcrição e apreensão do desenvolvimento em ovócitos de ratos (MA e SCHULTZ, 2013).

Com relação ao perfil de expressão, tem sido demonstrado que em ovócitos bovinos os níveis de transcritos da HAT1, KAT2A e das HDACs 1, 2, 3 e 7 são semelhantes entre ovócitos VG e MII (MCGRAW *et al.*, 2003; NOWAK-IMIALEK *et al.*, 2008). Em suínos a atividade global das HDACs classe I foi mantida durante toda maturação meiótica, sendo mais elevada tanto no núcleo quanto no citoplasma no estágio de GV (ENDO *et al.*, 2008). Wang *et al.*, (2010) analisaram o padrão de expressão da KAT2A e da HDAC1 em ovócitos de camundongos maturados *in vivo* e *in vitro* e observaram que a expressão da KAT2A foi semelhante em ovócitos MII maturados nos dois tipos de sistema. Entretanto, a expressão da proteína avaliada pela imunocitoquímica identificou que KAT2A foi mais expressa em ovócitos maturados *in vitro* do que no controle. Esses dados sugerem que as condições *in vitro* podem afetar a função da KAT2A. Já o nível de transcritos e de expressão da proteína HDAC1 foi menor em ovócitos maturados *in vitro* do que no grupo *in vivo*. Sugere que a MIV pode afetar a expressão de KAT2A e HDAC1 em ovócitos MII, mas os mecanismos envolvidos nesse processo não são totalmente elucidados.

Bessa *et al.*, (2013) analisando os padrões de expressão HAT1 e HDAC2 em ovócitos bovinos imaturos provenientes de folículos de 1-3 mm (incompetentes) e 6-8 mm (competentes)

observaram uma diferença na expressão da HDAC2 entre ovócitos de diferentes competências. Sendo que, neste estudo a expressão das HDACs foi menor nos ovócitos competentes em relação aos incompetentes, o que poderia ser explicado devido o aumento da tradução nesta fase final de crescimento ovocitário e retomada da meiose. Desta forma, a análise do perfil desse gene mostrou uma relação entre mudança na sua expressão e competência ovocitária o que sugere que o padrão de acetilação esteja relacionado à qualidade do ovócito. Portanto, o padrão de expressão das HDACs e HATs também pode ser diferente em ovócitos com diferentes níveis de competência.

2.8 Inibidores de histona desacetilase

É necessário que haja um equilíbrio na atividade das enzimas que controlam a acetilação e a transcrição gênica, HATs e HDACs, visto que, elas coordenam processos neurobiológicos, de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, entre outros. Sabendo que o desequilíbrio dessas enzimas já foi observado em inúmeras patologias, as HDACs se tornaram alvos terapêuticos para que se consiga controlar estados de acetilação anormais e recuperação do seu equilíbrio (MARKS e XU, 2009; URDINGUIO *et al.*, 2009).

Atualmente estão sendo descobertos novos inibidores de HDACs (HDACis), sintetizados ou isolados de produtos naturais que variam de acordo com o tipo de estrutura, especificidade, farmacologia e atividade (MARKS e XU, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Muitos desses inibidores possuem ampla ação e devido a isso a compreensão de todos seus efeitos ainda não foi esclarecida. Como exemplo de HDACis conhecidos podemos citar a Tricostatina A (TSA) e o Ácido Suberoilnilido Hidroxâmico (SAHA), que são compostos da classe dos ácidos hidroxâmicos que interagem com o sítio catalítico das HDACs, inibindo sua atividade (FINNIN *et al.*, 1999; MONNERET, 2005). Outros HDACis que estão recebendo destaque são o Ácido Valpróico (VPA) e o Butirato de Sódio (NaBu) e que afetam a expressão de inúmeros genes (PHIEL *et al.*, 2001; DAVIE, 2003). Já se demonstrou que TSA inibe todas as classes menos a classe III de HDACs e NaBu inibe a maioria das HDACs, com exceção das HDAC6 e 10 da classe IIb, da classe III e classe IV (DAVIE, 2003; BOLDEN *et al.*, 2006).

Muitos estudos estão utilizando os HDACis para melhorar a eficiência de embriões clones, diminuindo as anormalidades epigenéticas como alterações na metilação do DNA ou modificações nas histonas. Além dos inibidores citados acima estão sendo utilizado o scriptaid (VAN THUAN *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010), ácido hidroxâmico suberoylanilide (SAHA)

(ONO *et al.*, 2010), oxamflatin (SU *et al.*, 2011) em meio de cultivo *in vitro*, e que contribuíram para um aumento do desenvolvimento de embriões clones ou embriões produzidos de melhor qualidade.

Poucos trabalhos descrevem a utilização desses inibidores em meio de MIV e seus efeitos no desenvolvimento embrionário. Quando utilizado um inibidor de HDAC na MIV de ovócitos suínos o início da quebra de VG (VGBD) foi marcadamente atrasado (LIU *et al.*, 2012). Já em um estudo utilizando ovócitos de ratos foi mostrado que ovócitos ficaram retidos em MI com a presença do inibidor de HDAC (DE LA FUENTE *et al.*, 2004). Em ovócitos de búfalos o uso do scriptaid na MIV aumentou a expressão de genes relacionados à acetilação, nos quais se relacionaram a uma melhora na produção de embriões SCNT (SUN *et al.*, 2015). No entanto, quanto a utilização de um inibidor durante a PMIV e/ou MIV de ovócitos bovinos não foi encontrado nenhum trabalho até o momento.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de aumentar a eficiência das técnicas de reprodução assistida através da obtenção de ovócitos mais competentes torna relevante o conhecimento de como essa competência é adquirida e de quais mecanismos estão diretamente envolvidos nesse processo. Dentre esses mecanismos, pode-se mencionar a acetilação de histonas que tem papel importante no controle da configuração da cromatina e transcrição gênica. Diante do que foi apresentado acima, a acetilação das histonas parece estar relacionada com a aquisição da competência ovocitária, no entanto, a compreensão dessa relação ainda não está totalmente elucidada. Portanto, a quantificação do nível de transcritos e a identificação da presença e/ou atividade das enzimas relacionadas às histonas, antes e durante a maturação de ovócitos com diferentes graus de competência, forneceria informações importantes sobre a aquisição da competência. Esse maior entendimento de como o padrão de acetilação difere entre ovócitos competentes e incompetentes e, de como esse se comporta durante a maturação nos dois tipos de ovócitos poderia ajudar a identificar as alterações que podem ser feitas no sistema de MIV. Assim como a modulação do padrão de acetilação antes da retomada da meiose, com a utilização da PMIV, poderia conferir a esses ovócitos um maior acúmulo de RNAm e uma melhor competência de desenvolvimento. Essas modificações seriam importantes para que ovócitos que ainda não estão totalmente competentes possam ter a chance de se tornarem mais competentes, melhorando os resultados e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANI, M. A. et al. Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-sized oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 4, p. 365-369, 2018. ISSN 1348-4400 (Electronic)
- ACKERT, C. L. et al. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 233, n. 2, p. 258-270, 2001. ISSN 0012-1606.
- ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992. ISSN 1470-1626.
- AKIYAMA, T. et al. Regulation of histone acetylation during meiotic maturation in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 2, p. 222-7, Oct 2004. ISSN 1040-452X (Print).
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Artmed Editora, 2010. ISBN 8582714238.
- ALBUZ, F. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010. ISSN 1460-2350.
- ASHKENAZI, H. et al. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77-84, 2005. ISSN 0013-7227.
- ASSEY, R. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 3, p. 335-344, 1994. ISSN 1040-452X.
- AZARI-DOLATABAD, N. et al. Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1483-1490, 2016. ISSN 0093-691X.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381, 2011. ISSN 1748-7838.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998. ISSN 0021-8812.
- BEG, M.; GINTHER, O. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 365-377, 2006. ISSN 1470-1626.
- BESSA, I. et al. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 781-789, 2013. ISSN 0936-6768.
- BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 769, 2006. ISSN 1474-1784.

- BORGES, A. et al. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2003.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 165-171, 1997. ISSN 1470-1626.
- BREVINI, T. A. et al. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 5, p. 1218-1223, 2005. ISSN 0006-3363.
- BYSKOV, A. G. et al. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 46, n. 3, p. 296-305, 1997. ISSN 1040-452X.
- CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009. ISSN 1448-5990.
- CAIXETA, F. M. et al. Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, v. 25, n. 1, p. 32-40, Feb 2017. ISSN 1469-8730 (Electronic).
- CHA, K.-Y.; CHIAN, R.-C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 2, p. 103-120, 1998. ISSN 1460-2369.
- CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 2002. ISSN 0303-7207.
- CORTVRINDT, R.; HU, Y.; SMITZ, J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 5, p. 1292-1302, 1998. ISSN 1460-2350.
- COTICCHIO, G. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, n. 1, p. 132-144, 2004. ISSN 0077-8923.
- CROCOMO, L. F. et al. Aspectos ultraestruturais dos complexos cumulus-oócito de mamíferos domésticos. **Veterinária e Zootecnia**, p. 171-182, 2013. ISSN 0102-5716.
- DAVIE, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2485S-2493S, 2003. ISSN 0022-3166.
- DAY, J. J.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in cognition. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 813-829, 2011. ISSN 0896-6273.
- DE CESARO, M. P. et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52-59, 2015. ISSN 0378-4320.
- DE LA FUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. **Developmental Biology**, v. 292, n. 1, p. 1-12, 2006. ISSN 0012-1606.

DE LA FUENTE, R. et al. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. **Developmental Biology**, v. 275, n. 2, p. 447-58, 2004. ISSN 0012-1606 (Print)

DE RUIJTER, A. J. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 3, p. 737-749, 2003. ISSN 0264-6021.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 82-88, 1996. ISSN 1470-1626.

DIECI, C. et al. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, 1-11, 2013. ISSN 0006-3363.

DIELEMAN, S. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 2002. ISSN 0093-691X.

DING, L. et al. Changes in histone acetylation during oocyte meiotic maturation in the diabetic mouse. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 784-92, Sep 1 2012. ISSN 1879-3231 (Electronic)

DIOGENES, M. N. et al. Bovine in vitro embryo production: the effects of fibroblast growth factor 10 (FGF10). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 3, p. 383-390, Mar 2017. ISSN 1573-7330 (Electronic)

DODE, M. A. N. et al. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 73, n. 3, p. 288-297, 2006. ISSN 1040-452X.

DODE, M. A. N. et al. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 207-214, 2000. ISSN 1678-3921.

DOWNS, S. M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Developmental Biology**, v. 172, n. 1, p. 72-85, 1995. ISSN 0012-1606.

DRIANCOURT, M.-A. et al. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 3, p. 143-152, 2000. ISSN 1470-1626.

DRIANCOURT, M. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001. ISSN 0093-691X.

ENDO, T.; KANO, K.; NAITO, K. Nuclear histone deacetylases are not required for global histone deacetylation during meiotic maturation in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 6, p. 1073-80, Jun 2008. ISSN 0006-3363 (Print)

ENDO, T. et al. Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 71, n. 1, p. 123-8, May 2005. ISSN 1040-452X (Print)

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001. ISSN 1470-1626.

- ERICKSON, B. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary 1. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 800-805, 1966. ISSN 0021-8812.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003. ISSN 03784320.
- FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997. ISSN 0340-2061.
- FAIR, T. et al. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1516-1525, 2001. ISSN 0006-3363.
- FARGHALY, T. et al. The effect of temporary meiotic attenuation on the in vitro maturation outcome of bovine oocytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 51, n. 7, p. 662-671, 2015. ISSN 1071-2690.
- FARIN, C. et al. The role of transcription in EGF-and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p. 97-112, 2007. ISSN 0378-4320.
- FERNANDES LEITÃO, C. C. et al. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, 2009. ISSN 1678-0345.
- FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-48, Mar 15 2009. ISSN 0093-691X (Print)
- FIGUEIREDO, J. R. D.; RIBEIRO RODRIGUES, A. P.; ANDRADE AMORIM, C. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. 2002.
- FIGUEIREDO, R. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997. ISSN 0093-691X.
- FINNIN, M. S. et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**, v. 401, n. 6749, p. 188, 1999. ISSN 1476-4687.
- FISSORE, R. A.; HE, C. L.; VANDE WOUDE, G. F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1261-1270, 1996. ISSN 0006-3363.
- FORTUNE, J. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001. ISSN 0006-3363.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003. ISSN 03784320.
- FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, 2014. ISSN 0006-3363.

FRANCIOSI, F. et al. In vitro maturation affects chromosome segregation, spindle morphology and acetylation of lysine 16 on histone H4 in horse oocytes. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 29, n. 4, p. 721-730, Apr 2017. ISSN 1031-3613 (Print)

FREIMANN, S. et al. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 829-834, 2004. ISSN 0006-291X.

FULKA JR, J.; FIRST, N.; MOOR, R. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 41-49, 1998. ISSN 1460-2407.

FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**, v. 30, n. 31, p. 3391, 2011. ISSN 1476-5594.

GAUTIER, J. et al. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. **Cell**, v. 54, n. 3, p. 433-439, 1988. ISSN 0092-8674.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **The Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 58-75, 1978. ISSN 0021-9525.

GINTHER, O. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999. ISSN 0093-691X.

GINTHER, O. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996. ISSN 0006-3363.

GONÇALVES, P. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIRÊDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Editora Roca, 2008. ISBN 8572417443.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 33-42, 2000. ISSN 0303-7207.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 192, n. 1, p. 70-87, 2008. ISSN 0166-4328.

GRAVES, J.; CAMPBELL, J.; KREBS, E. Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 766, n. 1, p. 320-343, 1995. ISSN 0077-8923.

GU, L.; WANG, Q.; SUN, Q.-Y. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle**, v. 9, n. 10, p. 1942-1950, 2010. ISSN 1538-4101.

GUIMARÃES, A. et al. The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Zygote**, v. 24, n. 2, p. 219-229, 2016. ISSN 0967-1994.

GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000. ISSN 0006-3363.

- HALEY, S. A.; WESSEL, G. M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 5, p. 2084-2092, 2004. ISSN 1059-1524.
- HARTSHORNE, G. M. In vitro culture of ovarian follicles. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 94-104, 1997. ISSN 1470-1626.
- HE, H.; LEHMING, N. Global effects of histone modifications. **Briefings in Functional Genomics**, v. 2, n. 3, p. 234-243, 2003. ISSN 2041-2657.
- HIRADATE, Y. et al. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**, v. 22, n. 3, p. 372-377, 2014. ISSN 0967-1994.
- HUANG, J. et al. Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured in vitro is associated with aberrant meiosis. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 178-84 e3, Jan 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, n. 2, p. 645-656, 1986. ISSN 1470-1626.
- HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997. ISSN 0093-691X.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 38, p. 35-47, 1989. ISSN 0449-3087.
- HYTTEL, P. et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 21-30, 2001. ISSN 1470-1626.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 229-249, 2009. ISSN 1553-4006.
- JOSHI, P. et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, p. 672, 2013. ISSN 1744-4292.
- KAGEYAMA, S. et al. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 85-94, Jan 2007. ISSN 1470-1626 (Print)
- KAUFFOLD, J. et al. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 325-332, 2005. ISSN 0916-8818.
- KAWAMURA, K. et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7323-7328, 2004. ISSN 0027-8424.
- KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 50, p. 125-154, 2000. ISSN 0070-2153.
- KRISHER, R.; BAVISTER, B. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103-114, 1998. ISSN 0093-691X.

- KULICK, L. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 913-921, 1999. ISSN 0093-691X.
- LABRECQUE, R.; SIRARD, M. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 103-116, 2013.
- LEE, P.-C.; WILDT, D. E.; COMIZZOLI, P. Nucleolar translocation of histone deacetylase 2 is involved in regulation of transcriptional silencing in the cat germinal vesicle. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 2, p. 33, 1-9, 2015. ISSN 0006-3363.
- LIU, L. et al. Transient exposure to sodium butyrate after germinal vesicle breakdown improves meiosis but not developmental competence in pig oocytes. **Cell Biology International**, v. 36, n. 5, p. 483-90, May 1 2012. ISSN 1095-8355 (Electronic)
- LIU, Y. et al. Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. **Microscopy Research and Technique**, v. 69, n. 10, p. 799-807, 2006. ISSN 1059-910X.
- LODDE, V. et al. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 6, p. 740-9, Jun 2007. ISSN 1040-452X (Print)
- LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 75, n. 5, p. 915-924, 2008. ISSN 1040-452X.
- LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994. ISSN 1040-452X.
- LUCIANO, A. M. et al. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism (s). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-1259, 2011. ISSN 0006-3363.
- LUCIANO, A. M. et al. Large-scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation. **European Journal of Histochemistry : EJH**, v. 56, n. 3, p. e37, Aug 10 2012. ISSN 2038-8306 (Electronic)
- MA, P.; SCHULTZ, R. M. Histone deacetylase 2 (HDAC2) regulates chromosome segregation and kinetochore function via H4K16 deacetylation during oocyte maturation in mouse. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003377, 2013. ISSN 1553-7404 (Electronic)
- MA, P.; SCHULTZ, R. M. HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: Specificity versus compensation. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1119-27, Jul 2016. ISSN 1476-5403 (Electronic)
- MACHACA, K. Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 331-340, 2007. ISSN 0021-9541.
- MAO, J. et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1197-1203, 2002. ISSN 0006-3363.
- MARKS, P.; XU, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 600-608, 2009. ISSN 0730-2312.

- MASCIARELLI, S. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 196-205, 2004. ISSN 0021-9738.
- MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000. ISSN 0163-769X.
- MCGRAW, S. et al. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 383-9, Feb 2003. ISSN 0006-3363 (Print)
- MCNATTY, K. et al. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 54, p. 3-16, 1999. ISSN 0449-3087.
- MCNATTY, K. P. et al. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 379-386, 2004. ISSN 1470-1626.
- MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791-799, 2005. ISSN 1470-1626.
- MEIRELLES, F. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 13-20, 2004. ISSN 0378-4320.
- MIYARA, F. et al. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 64, n. 4, p. 458-470, 2003. ISSN 1040-452X.
- MONIRUZZAMAN, M.; MIYANO, T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 6, p. 559-566, 2010. ISSN 0916-8818.
- MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2005. ISSN 0223-5234.
- MURPHY, M.; BOLAND, M.; ROCHE, J. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 2, p. 523-533, 1990. ISSN 1470-1626.
- NORRIS, R. P. et al. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development**, v. 135, n. 19, p. 3229-3238, 2008. ISSN 0950-1991.
- NOWAK-IMIALEK, M. et al. Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 731-43, May 2008. ISSN 1098-2795 (Electronic)
- OCHSNER, S. A. et al. Disrupted function of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4376-4384, 2003. ISSN 0013-7227.
- OKTEM, O.; OKTAY, K. Stem cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, n. 1, p. 20-26, 2008. ISSN 1749-6632.
- ONO, T. et al. Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 6, p. 929-937, 2010. ISSN 0006-3363.

PARTHUN, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5319-28, Aug 13 2007. ISSN 0950-9232 (Print)

PHIEL, C. J. et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734-36741, 2001. ISSN 0021-9258.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935. ISSN 0022-1007.

PINHEIRO, O. et al. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus* with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998. ISSN 0093-691X.

RACEDO, S. et al. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 6, p. 738-748, 2009. ISSN 1448-5990.

RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinologica**, v. 34, n. 3 Suppl, p. S7-S68, 1960. ISSN 0804-4643.

RAZZA, E. M. et al. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus–oocyte complexes and blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 10, p. 1314-1328, 2018. ISSN 1448-5990.

RICHARD, F. J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1444-1451, 2001. ISSN 0006-3363.

ROBERTS, A.; GRIZZLE, J.; ECHTERNKAMP, S. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 917-929, 1994. ISSN 0093-691X.

ROBINSON, J. W. et al. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. **Developmental Biology**, v. 366, n. 2, p. 308-316, 2012. ISSN 0012-1606.

RUSSO, V. et al. Modifications in chromatin morphology and organization during sheep oogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, n. 8, p. 733-744, 2007. ISSN 1059-910X.

SANCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 12, p. 1896-912, Dec 2012. ISSN 0006-3002 (Print)

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, 2005. ISSN 0093-691X.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 2, p. 415-25, Aug 2009. ISSN 1529-7268 (Electronic)

SAVIO, J. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988. ISSN 1470-1626.

SCARAMUZZI, R. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 444-467, 2011. ISSN 1448-5990.

SCHMITT, A.; NEBREDA, A. R. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 12, p. 2457-2459, 2002. ISSN 0021-9533.

SELA-ABRAMOVICH, S. MAPK mediates LH-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 146, p. 1236-1244, 2005.

SHU, Y. M. et al. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 504-513, 2008. ISSN 1460-2350.

Silva, I. O. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido [dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2008.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006. ISSN 0093-691X.

SIRARD, M. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001. ISSN 0093-691X.

SMITZ, J. E.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 29, p. 024-037, 2011. ISSN 1526-8004.

SOMFAI, T. et al. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 743-752, 2012. ISSN 1448-5990.

SONG, J. L.; WESSEL, G. M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v. 73, n. 1, p. 1-17, 2005. ISSN 0301-4681.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, v. 127, n. 21, p. 4645-4654, 2000. ISSN 0950-1991.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001. ISSN 0006-3363.

SU, J. et al. Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and in vitro development of bovine SCNT embryos. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23805, 2011. ISSN 1932-6203.

SUGIMURA, S. et al. Effect of pre-in vitro maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 233-241, 2018. ISSN 1348-4400 (Electronic) 0916-8818 (Linking).

SUN, H. et al. Effects of scriptaid on the histone acetylation of buffalo oocytes and their ability to support the development of somatic cell nuclear transfer embryos. **Theriogenology**, v. 83, n. 7, p. 1219-25, Apr 15 2015. ISSN 1879-3231 (Electronic)

SUN, Q.; BREITBART, H.; SCHATTEN, H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 8, p. 443-450, 1999. ISSN 1448-5990.

SUN, Q. et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 155-163, 2001. ISSN 1470-1626.

SUN, X. S. et al. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 69, n. 2, p. 228-234, 2004. ISSN 1040-452X.

TANG, L.-S. et al. Dynamic changes in histone acetylation during sheep oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Development**, p. 0701310059-0701310059, 2007. ISSN 0916-8818.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 86-91, 2002. ISSN 0936-6768.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 3, p. 592-600, Jun 2010. ISSN 1097-4652 (Electronic)

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p. 1056-1072, 2009. ISSN 1474-4422.

VAN DEN BERG, I. et al. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. **Human Reproduction**, v. 26, n. 5, p. 1181-1190, 2011. ISSN 1460-2350.

VAN DEN HURK, R. et al. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 5, p. 457-474, 2000. ISSN 1460-2369.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.; BECKERS, J.-F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997. ISSN 0093-691X.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-51, Apr 1 2005. ISSN 0093-691X (Print)

VAN THUAN, N. et al. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. **Reproduction**, 2009. ISSN 1470-1626.

VARAGO, F.; MENDONÇA, L.; LAGARES, M. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; MAURO, E. D. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 3, p. 344-353, 2005. ISSN 0829-8211.

VON STETINA, J. R.; ORR-WEAVER, T. L. Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a005553, 2011. ISSN 1943-0264.

WADE, P. A. et al. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. **Nature Genetics**, v. 23, n. 1, p. 62, 1999. ISSN 1546-1718.

- WANG, N. et al. Effects of in vitro maturation on histone acetylation in metaphase II oocytes and early cleavage embryos. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-9589.
- WANG, Q. et al. Histone deacetylation is required for orderly meiosis. **Cell Cycle**, v. 5, n. 7, p. 766-774, 2006. ISSN 1538-4101.
- WEBB, R. et al. Molecular mechanisms regulating follicular. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 33-48, 1999.
- WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3-4, p. 175-184, 2001. ISSN 0378-4320.
- WESSEL, G. M. et al. The biology of cortical granules. **International Review of Cytology**, v. 209, p. 117-206, 2001. ISSN 0074-7696.
- WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042-1055, 2004. ISSN 0093-691X.
- YANG, X.-J.; GRÉGOIRE, S. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 8, p. 2873-2884, 2005. ISSN 0270-7306.
- YANG, X.-J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 206, 2008. ISSN 1471-0080.
- YANG, X. J.; SETO, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5310-8, Aug 13 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
- ZENTNER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 259-66, Mar 2013. ISSN 1545-9985 (Electronic)
- ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815-826, 2010. ISSN 1470-1626.
- ZHANG, L.; FANG, H.; XU, W. Strategies in developing promising histone deacetylase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 585-602, 2010. ISSN 0198-6325.
- ZHANG, L. et al. Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 3, p. 1435-45, Mar 2014. ISSN 1530-6860 (Electronic)
- ZHANG, M. et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4377-4385, 2011. ISSN 0013-7227.
- ZHANG, M. et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-369, 2010. ISSN 0036-8075.

ZHANG, T. et al. Effect of C-type natriuretic peptide pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 53, n. 3, p. 199-206, Mar 2017. ISSN 1543-706X (Electronic)

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 967-977, 2001. ISSN 0006-3363.

ZHAO, S. et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. **Science**, v. 327, n. 5968, p. 1000-1004, 2010. ISSN 0036-8075.

ZHONG, Y. et al. C-Type natriuretic peptide maintains domestic cat oocytes in meiotic arrest. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 10, p. 1553-1559, 2016. ISSN 1448-5990.

1 **SEGUNDA PARTE**

2 **ARTIGO 1 – Normas da Revista Reproduction Fertility and Development**

3 **(Versão submissão)**

4
5 **Histone acetylation during the *in vitro* maturation of bovine oocytes with different levels**
6 **of competence**

7 Pontelo, T.P.¹, Rodrigues, S.A.D.², Kawamoto, T.S.³, Leme, L. O.⁴, Gomes, A. C. M. M.⁵,
8 Zangeronimo, M. G.¹, Franco, M.M.⁵, Dode, M.A.N.^{5,6}

9
10 ¹ Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, MG 32700-000,
11 Brazil.

12 ² Department of Animal Science, University of Brasilia, Animal Science, Brasilia, DF
13 70910-900, Brazil.

14 ³ Department of Veterinary Medicine, Federal University Uberlândia, Uberlândia, MG
15 38400-902, Brazil.

16 ⁴ Department of Animal Science, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29075-
17 073, Brazil.

18 ⁵ Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF 70770-900, Brazil.

19 ⁶ Corresponding author. Email: margot.dode@embrapa.br

20
21 **Abstract**

22
23 We aimed to analyze histone acetylation status and expression profile of genes involved in
24 histone acetylation (*HAT1*, *KAT2A*, *HDAC1*, *HDAC2* and *HDAC3*) in bovine oocytes of
25 different competences during *in vitro* maturation (IVM). Cumulus-oocyte complexes (COCs)
26 were recovered from two groups of follicles: minor follicles (1.0-3.0 mm of diameter), which
27 were classified as less competent (IC) and large follicles (6.0-8.0 mm of diameter), as more
28 competent (CP). Oocytes were submitted to IVM for 0, 8 and 24h and stored for analysis.
29 Acetylation status of histone H4 on lysine K5, K6, K12 and K16 were assessed by

30 immunohistochemistry. For gene expression, mRNA levels were determined by RT-qPCR. All
31 oocytes, regardless of their competences, showed ($P<0.05$) a gradually decrease in acetylation
32 signals during IVM. From 0 to 8 h of maturation, an increase in the relative abundance of *HAT1*
33 mRNA was observed ($P<0.05$) only in the CP oocytes. In this group, it was also observed
34 ($P<0.05$) higher mRNA levels of *HDAC1* at 8h of maturation. In conclusion, in the present
35 study, IC oocytes have adequate acetylation levels for the resumption and progression of
36 meiosis, however these oocytes do not have the capacity to synthesize RNA during IVM as the
37 more competent oocytes.

38

39 Key words: Cumulus-oocyte complexes, Gene Expression, Histone Acetyltransferase,
40 Immunohistochemistry, Epigenetic marks.

41

42 **1 Introduction**

43

44 The success of in vitro embryo production (IVP) in cattle depends on the availability of
45 mature and competent oocytes, which must be fertilized and to have normal embryo
46 development (Blondin *et al.*, 1997). Thus, among all the IVP steps, maturation is crucial
47 because it determines the blastocyst yield. Maturation includes not only the correct dynamics
48 of chromosome segregation in nuclear maturation but also the redistribution of cytoplasmic
49 organelles and the accumulation of the maternal stores of mRNA, proteins and transcription
50 factors, which are essential for the process to be accomplished (Sirard, M. A., 2001; Lonergan,
51 P. *et al.*, 2003; Sirard, M. A. *et al.*, 2006).

52 During the maturation process, regulation of gene transcription through epigenetic
53 marks is also necessary for oocytes to progress through the meiotic stages and to grow into
54 healthy embryos (Racedo *et al.*, 2009). Among the epigenetic marks, the acetylation of histones

55 is considered a key event for the regulation of various biological functions including oocyte
56 maturation and preimplantation embryonic development (Sun *et al.*, 2015). Histone acetylation
57 is a dynamic reversible process catalyzed by two groups of enzymes, including histone
58 acetyltransferases and histone deacetylases (HDACs) (Ma e Schultz, 2016). Histone
59 acetylation makes the chromatin more accessible to transcription complexes, which is an
60 important factor for the regulation of gene expression. Thus, the interplay between HDACs and
61 HATs results in dynamic transitions in chromatin structure and, hence, in switches between
62 permissive and repressive states.

63 The HATs add acetyl groups to the histone lysine residues, neutralizing the positive
64 charges of the N-termini, causing a reduction in their affinity for DNA inducing the chromatin
65 opening. The HDACs are responsible for deacetylation of histones by promoting the removal
66 of acetyl groups. Removal of the acetyl groups, in turn, causes a chromatin closure, preventing
67 the gene expression (Ge *et al.*, 2015). It is well known that as the oocyte establishes competence,
68 its transcription capacity decreases to a very low level in preparation for meiosis (Pan *et al.*,
69 2012; Lowther e Mehlmann, 2015). Considering that histones must be deacetylated to repress
70 transcription and that changes in the chromatin configuration during the germinal vesicle (GV)
71 stage are crucial to confer competence to oocytes (Luciano, A. M. *et al.*, 2012), it is suggested
72 that histone acetylation pattern is related to oocyte quality. In that manner, it is very possible
73 that the pattern of expression of the HDACs and HATs may also be different in oocytes with
74 different levels of competence.

75 In fact, a study shows that oocytes that are considered more competent have lower levels
76 of HDAC2 mRNA than those considered less competent (Bessa, I. R. *et al.*, 2013). These
77 authors suggest that the reduction of HDAC2 transcript observed in the more competent oocytes
78 may be due to translation. Then, the levels of HDAC2 may be considered a marker for oocyte
79 quality. The relationship between the status of histone acetylation and oocyte quality has also

80 been suggested in human and mouse oocytes (Van Den Berg, I. M. *et al.*, 2011; Ding *et al.*,
81 2012; Huang *et al.*, 2012). Regarding HDACs expression, a study in mice also suggest that
82 HDAC2 is largely responsible for the deacetylation of H4K16 that occurs during oocyte
83 maturation and that such deacetylation is critical for proper chromosome segregation (Ma e
84 Schultz, 2013). In addition, another study showed that not only the levels of HDAC2 but also
85 the HDAC6 and HDAC8 transcripts were affected by chromatin status and follicular size and
86 might also be markers for oocyte quality (Lodde *et al.*, 2017).

87 Although reports in the literature (De La Fuente, 2006; Wu *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2016)
88 indicate that histone acetylation status is associated with oocyte competence, the levels of
89 HDAC and HAT before and after maturation, as well as their profile in oocytes with different
90 competences, is not yet established. Therefore, further studies, mainly in cattle, are needed to
91 clarify the association of those enzymes with the acquisition of competency and the maturation
92 of oocytes. The elucidation of these mechanisms may be useful for to interfering with the oocyte
93 acetylation status, increasing the availability of more competent oocytes and improving the
94 efficiency of embryo production by assisted reproduction techniques (Caixeta, F. M. *et al.*,
95 2017).

96 Thus, the objective of this study was to evaluate histone acetylation status and the
97 expression profile of genes involved in their acetylation and deacetylation in bovine oocytes of
98 different competences during in vitro maturation.

99

100 **2 Material and Methods**

101

102 Unless otherwise indicated, chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO,
103 USA).

104

105 **2.1 Recovery and selection of complex cumulus-oocyte**

106

107 Ovaries from crossbred females (*Bos indicus* x *Bos taurus*) were collected at the local
108 slaughterhouse and were transported to the laboratory in a saline solution (0.9% NaCl)
109 supplemented with antibiotics (100 IU/ml of penicillin G and 100 µg/ml of streptomycin), at
110 temperatures from 35°C to 37°C.

111 The follicles were dissected from the ovarian cortex at room temperature with scissors,
112 a scalpel and tweezers and were stored in washing medium (TCM-199 with Hank's salts
113 supplemented with 10% Bovine Fetal Serum [BSF (GIBCO BRL Burlington, ON, Canada)] on
114 a hotplate at 36°C throughout the dissection process. Subsequently, the follicles were measured
115 using a graduated ocular, classified morphologically and selected according to follicles of the
116 diameters of 1-3 mm and of 6-8 mm, which they were classified in less or more competent
117 (Caixeta, E. S. *et al.*, 2009). In addition to the size, the follicles were selected based on the
118 presence of extensive and fine vascularization and on showing a homogeneous translucent and
119 bright aspect. After follicular rupture, the presence of granulosa cells with a regular and healthy
120 appearance and no free-floating particles in the follicular fluid was also used as a selection
121 criterion (Blondin e Sirard, 1995; De Wit *et al.*, 2000). Only cumulus oocyte complexes (COC)
122 with a homogeneous cytoplasm, fine granulations and multiple compact layers of cumulus cells
123 and those with a homogeneous cytoplasm with small areas showing irregular pigmentation and
124 a compact cumulus with at least three complete layers were used in this experiment.

125

126 **2.2 *In vitro* maturation**

127

128 The COCs selected from each follicle category were washed in *in vitro* maturation
129 medium (IVM) consisting of TCM-199 with Earl's salts supplemented with 10% BSF, 0.075

130 mg/ml of amikacin and 0.01 UI/ml of follicle stimulating hormone (FSH) and were then
131 transferred to 50 μ L (\leq 10 oocytes) or 100 μ L (\geq 11 oocytes) droplets of IVM medium covered
132 with mineral oil. The droplets containing the COCs were incubated in a humidified atmosphere
133 for 24 h at 39°C with 5% CO₂ in the air.

134

135 **2.3 Immunohistochemistry analysis**

136

137 At 0, 8 and 24 h of maturation COCs were removed from culture drop and were
138 completely denuded by gentle pipetting. After washing twice in PBS supplemented with 0.01%
139 Triton X-100 and 0.3% BSA (blocking solution) the denuded oocytes were fixed in 4%
140 paraformaldehyde in PBS for 30 minutes at room temperature. Then, oocytes were stored in
141 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C overnight. Subsequently the fixed oocytes were
142 permeabilized in 1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes at room temperature and incubated
143 with 1% BSA in PBS for 1 h. After washing three times in TBP (5 minutes for each time), they
144 were incubated with rabbit antibody against acetylated lysine at the 5, 8, 12 e 16 position of
145 histone H4 [Acetyl-Histone H4 (Lys5, Lys8, Lys12, Lys16) Polyclonal Antibody, 1:200
146 dilution; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA] overnight at 4 °C. After
147 washing in blocking solution, the oocytes were incubated with goat antirabbit immunoglobulin
148 G Alexa-Fluor 488–conjugated antibody (1:1000 dilutions; ThermoFisher Scientific, Waltham,
149 Massachusetts, USA) for 1.5 h at room temperature and then washed three times with TBP. The
150 DNA of oocyte was counterstained with 25 mg/mL of propidium iodide for 10 minutes. All
151 images were captured by a confocal microscopy leica sp8 (New Orleans, LA, United States)
152 and the nuclear fluorescence intensity was measured by Image J software (National Institutes
153 of Health, Research Services Branch, Bethesda, MD, USA) and about 20 oocytes from each
154 treatment were analyzed.

155 **2.4 Oocyte storage for qPCR**

156

157 COCs from the more competent (oocytes obtained from follicles of 6-8 mm in diameter)
158 and less competent groups (oocytes obtained from follicles of 1-3 mm in diameter) were
159 removed from culture drops at 0, 8 and 24 h of maturation. For cumulus cells removal, COCs
160 were transferred to a drop of 50 μ L of saline in PBS, where they were denuded by successive
161 pipetting until. Then, denuded oocytes were washed three times in PBS without magnesium
162 and calcium, placed in RNA-later Stabilization Solution (Ambion, Life Technologies, Carlsbad,
163 CA, USA) and stored at -80°C until RNA extraction.

164

165 **RNA extraction and complementary DNA (cDNA) synthesis**

166

167 Total RNA was isolated from four pools of fifteen oocytes for experimental group using
168 the RNeasy Plus Micro[®] Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's
169 instructions. The total RNA was used for cDNA synthesis using First Strand cDNA Synthesis
170 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) – SuperScript[®] III (200 U/ μ L) and primer Oligo-dT
171 (0.5 μ g/ μ L) according to the manufacturer's instructions in a final volume of 40 μ L. The
172 reactions were incubated at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes, 50 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes and 85 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes.

173

174 **2.5 Real Time RT PCR (qPCR)**

175

176 Real-time quantitative polymerase chain reactions (RT-qPCR) were performed using
177 the Fast SYBR Green Master Mix[®] Kit (Thermo Fisher Scientific). Each sample was analyzed
178 in triplicate with an amplification efficiency between 90 and 110%. The specificity of each PCR
179 product was determined by analyzing of the melting curve and size of amplicon in agarose gel.

180 The reactions were performed in a final volume of 25 μ L using the equivalent of 0.62 oocytes
181 per reaction. The qPCR conditions were 95°C for 5 minutes followed by 50 cycles of
182 denaturation at 95°C for 10 seconds and then annealing and extension at 60°C for 30 seconds.
183 The genes analyzed included histone acetyltransferase (*HATI*), lysine acetyltransferase 2A
184 (*KAT2A*), histone deacetylase 1 (*HDAC1*), histone deacetylase 2 (*HDAC2*), and histone
185 deacetylase 3 (*HDAC3*). The RT-qPCR analyses were performed using the 7500 Fast-Real-
186 Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The primer sequences,
187 fragment sizes and annealing temperatures are listed in Table 1. The expression level of the
188 three constitutive genes, including glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -
189 actin (*ACTB*), and peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) were submitted do geNorm software
190 (Vandesompele, J. *et al.*, 2002), which indicated that the *PPIA* gene was the most stable. The
191 relative expression of each gene was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with a correction of the
192 efficiency (Pfaffl, 2001).

193

194 **3 Statistical Analyses**

195

196 All the experiments were repeated at least three times, and the results were expressed as
197 mean \pm SEM. All data were tested for normality. To compare the gene expression and
198 immunohistochemistry of immature oocytes and oocytes at different times of maturation
199 ANOVA were used, and the means were compared by the Tukey test. Non-parametric data
200 were analyzed by Kruskal Wallis test. All statistical analyses considered a significance level of
201 $P\leq 0.05$ and were performed using the program Prophet version 5.0 (BBN Technologies System,
202 NIH, Bethesda, MD, USA, 1996).

203

204

205 **4 Results**

206

207 When differences in histone acetylation levels were evaluated in specific time points
208 during maturation it was observed that levels of acetylation decreased gradually during
209 maturation in both group ($P<0.05$), reaching levels almost undetectable at the end of maturation
210 (Fig 1 and Fig 2). However, when the level of acetylation was compared between groups in
211 each time point, no differences were found ($P>0.05$) (Fig 1 and Fig 2).

212 The results in relation to gene expression showed that the *HAT1* gene presented higher
213 level of transcripts at 8 h of IVM compared to 0 h in the group of more competent oocytes (Fig
214 3). When the different groups were compared at the same maturation time, the most competent
215 group presented ($P<0.05$) a higher expression of *HDAC1* at 8 h of maturation compared to the
216 less competent group (Fig. 4). No differences were detected ($P>0.10$) between the treatments
217 at different time of maturation for the other genes (Fig. 4).

218

219 **5 Discussion**

220

221 It is well established that at the end of oogenesis, oocytes must undergo a global process
222 of histone deacetylation to guarantee a correct metaphase transition (Akiyama *et al.*, 2004). In
223 fact, oocytes with a high competence to develop into embryos have been shown to have more
224 condensed chromatin just before resuming meiosis (Lodde, V. *et al.*, 2007; Luciano, A. M. *et*
225 *al.*, 2012), which suggests that those oocytes have been submitted to wide process of histone
226 deacetylation and have a decrease in gene transcription. Then, some studies have suggested that
227 the global status of histone acetylation could serve as an important marker for oocyte quality
228 (Van Den Berg, I. M. *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Bessa, I. R. *et al.*,
229 2013). Based on this information, we hypothesized that levels of histone acetylation as well as

230 the expression of genes encoding enzymes involved in the acetylation processes are different
231 in oocytes with different degrees of competence. Therefore, in an attempt to test our hypothesis,
232 we quantified the acetylation of histone H4 on lysines 5, 8, 12 and 16 and the transcript levels
233 of the *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HAT1* and *KAT2A* genes during IVM. The model used to
234 obtain oocytes from different levels of competence was based on the follicle size, which is very
235 well established (Lonergan, P. *et al.*, 1994; Machatkova *et al.*, 2004; Lequarre *et al.*, 2005;
236 Caixeta, E. S. *et al.*, 2009; Blondin *et al.*, 2012).

237 First, we compared the labeling of acetylated lysines on H4 histones at different times
238 of IVM, we observed that oocytes obtained from small or large follicles had the same intensity
239 of fluorescence. Our results are similar to those reported by Racedo *et al.* (2009) evaluating
240 acetylation of H4K12 in bovine oocytes of follicles smaller than 2mm and of 2-8mm at different
241 times of maturation (0, 8, 15 e 24 h). Those authors also found no difference between the groups,
242 suggesting that the oocytes obtained from smaller follicles already contain sufficient levels of
243 acetylation. Both groups we used behaved similarly during maturation, in such a way that at 8
244 h of IVM the acetylation began to fall and by 24 h the levels were almost undetectable. This
245 seems to be the acetylation pattern of in vitro matured oocytes in the bovine species, since other
246 studies also described the same behavior (Maalouf *et al.*, 2008; Racedo *et al.*, 2009).

247 After immunohistochemistry analyzes the expression of genes involved in the
248 acetylation process was evaluated. Initially, we compared the relative abundance of transcripts
249 within each group during IVM. For the oocytes obtained from small follicles no changes during
250 maturation were observed in the expression profile of all the genes examined, differently from
251 the more competent group that presented an increase in the level of *HAT1* transcripts from 0 to
252 8 h of IVM. Considering that histones acetylation, began to decrease in both groups of oocytes
253 at 8 h of maturation we may suggest that the rise in transcript levels for HAT1 observed at that
254 time only in the most competent oocytes, could be to form a stock of RNA to be used later.

255 When evaluating the amount of transcripts at each hour of IVM, it was observed that
256 more competent oocytes had a greater amount of *HDAC1* transcripts compared to less
257 competent. However, similarly to *HAT1*, the acetylation levels of the two treatments showed
258 the same intensity of fluorescence. This data suggests that even though the less competent
259 oocytes had a lower amount of *HDAC1* transcripts, they were able to undergo global
260 deacetylation until reaching the MII (Kim *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012;
261 Ge *et al.*, 2015). Therefore, we may suggest that less competent oocytes have enough transcripts
262 of histone acetylation and deacetylation genes to reach MII, however, they did not stock these
263 transcripts for use in the later stages, such as fertilization and embryonic development. It is well
264 known that during fertilization process sperm protamines should be replaced by acetylated
265 histones that come from the oocytes (Hales *et al.*, 2011). Therefore, since there was no
266 transcription of *HAT1* in the less competent oocytes it can be suggested that they do not have
267 enough acetylated histone to go through the fertilization and embryonic development.

268 No differences were detected among the groups in terms of the abundance of mRNA
269 of all the studied genes before maturation (0 h), which indicates that the stores of mRNA for
270 the genes coding acetylation/deacetylation related enzymes are not different until the GV stage.
271 These results were surprising since we were expecting that the expression levels of histone
272 acetylation related genes would be different in high-competence oocytes compared with the
273 low-competence oocytes. Our expectation was based on findings that expression levels of
274 *HDAC1* and *HDAC2* are higher in oocytes matured in vivo than in those in vitro, that
275 insufficient expression of *HDAC1* affects maturation (Huang *et al.*, 2012), and that insufficient
276 deacetylation causes an aberrant meiosis. In addition, studies have also shown that *HDAC2* is
277 differentially expressed in oocytes with various levels of competence (Bessa, I. R. *et al.*, 2013).
278 However, it is possible that not only gene expression at certain stages of maturation but also the
279 expression pattern during maturation is associated with oocyte competence. Therefore, the

280 characterization of the expression profile of target genes during maturation also contributes to
281 understanding the mechanism involved in oocyte quality.

282 In conclusion, in the present study, less competent oocytes have adequate acetylation
283 levels for the resumption and progression of meiosis, however these oocytes do not have the
284 capacity to synthesize RNA during IVM as the more competent oocytes.

285

286 **6 Conflicts of interest**

287

288 The authors declare no conflicts of interest.

289

290 **7 Acknowledgement**

291

292 We thank **Brazilian Agricultural Research Corporation** (EMBRAPA; MP1 Project
293 n. 01.03.14.011.00.00) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
294 (CAPES) for financial support, the veterinary science graduate program (PPGCV) for the
295 opportunity to pursue a doctorate, the Qualimax (Luziânia, GO) and Nippobras (Formosa, GO)
296 slaughterhouses for providing biological material to perform these experiments, and all of the
297 students and workers of Embrapa for their support during the course of these experiments.

References

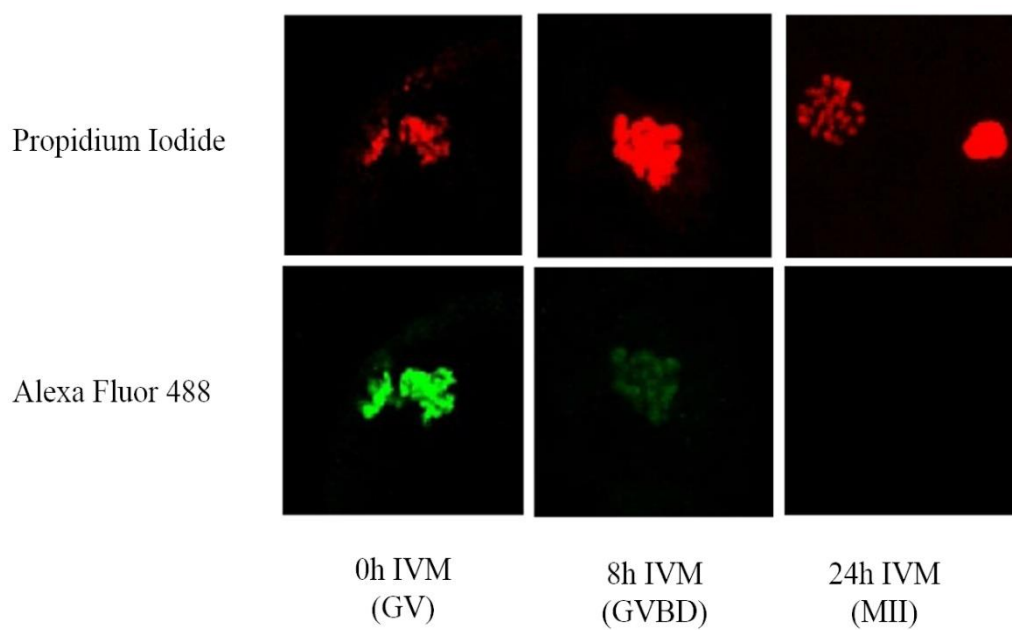
- 1
2 Akiyama, T., Kim, J.M., Nagata, M., and Aoki, F. (2004) Regulation of histone acetylation during
3 meiotic maturation in mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* **69**(2), 222-7
4
5 Bessa, I.R., Nishimura, R.C., Franco, M.M., and Dode, M.A. (2013) Transcription profile of
6 candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. *Reproduction in*
7 *domestic animals = Zuchthygiene* **48**(5), 781-9
8
9 Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L.A., and Sirard, M.A. (1997) In vitro production of bovine
10 embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* **47**(5), 1061-
11 75
12
13 Blondin, P., and Sirard, M.A. (1995) Oocyte and follicular morphology as determining
14 characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and*
15 *development* **41**(1), 54-62
16
17 Blondin, P., Vigneault, C., Nivet, A., and Sirard, M. (2012) Improving oocyte quality in cows and
18 heifers-What have we learned so far. *Anim Reprod* **9**(3), 281-289
19
20 Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B., and Dode, M.A. (2009) Effect of follicle
21 size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify
22 marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development* **21**(5), 655-
23 64
24
25 Caixeta, F.M., Sousa, R.V., Guimaraes, A.L., Leme, L.O., Spricigo, J.F., Netto, S.B., Pivato, I.,
26 and Dode, M.A. (2017) Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine
27 embryos by somatic cell nuclear transfer. *Zygote* **25**(1), 32-40
28
29 De La Fuente, R. (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian
30 oocytes. *Developmental biology* **292**(1), 1-12
31
32 de Wit, A.A., Wurth, Y.A., and Kruip, T.A. (2000) Effect of ovarian phase and follicle quality on
33 morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* **78**(5),
34 1277-83
35
36 Ding, L., Pan, R., Huang, X., Wang, J.X., Shen, Y.T., Xu, L., Zhang, Y., Liu, Y., He, X.Q., Yang,
37 X.J., Qi, Z.Q., and Wang, H.L. (2012) Changes in histone acetylation during oocyte meiotic
38 maturation in the diabetic mouse. *Theriogenology* **78**(4), 784-92
39
40 Endo, T., Kano, K., and Naito, K. (2008) Nuclear histone deacetylases are not required for global
41 histone deacetylation during meiotic maturation in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **78**(6),
42 1073-80
43
44 Ge, Z.-J., Schatten, H., Zhang, C.-L., and Sun, Q.-Y. (2015) Oocyte ageing and epigenetics.
45 *Reproduction* **149**(3), R103-R114

- 46 Hales, B.F., Grenier, L., Lalancette, C., and Robaire, B. (2011) Epigenetic programming: from
47 gametes to blastocyst. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **91**(8),
48 652-665
49
- 50 Huang, J., Li, T., Ding, C.H., Brosens, J., Zhou, C.Q., Wang, H.H., and Xu, Y.W. (2012)
51 Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured in vitro is associated with
52 aberrant meiosis. *Fertility and sterility* **97**(1), 178-84
53
- 54 Kim, J.-M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003) Changes in histone acetylation
55 during mouse oocyte meiosis. *The Journal of cell biology* **162**(1), 37-46
56
- 57 Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H.,
58 and Mermillod, P. (2005) Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo
59 development in the bovine. *Theriogenology* **63**(3), 841-59
60
- 61 Lin, J., Chen, F., Sun, M.J., Zhu, J., Li, Y.W., Pan, L.Z., Zhang, J., and Tan, J.H. (2016) The
62 relationship between apoptosis, chromatin configuration, histone modification and competence of
63 oocytes: A study using the mouse ovary-holding stress model. *Scientific reports* **6**, 28347
64
- 65 Lodde, V., Luciano, A., Franciosi, F., Labrecque, R., and Sirard, M. (2017) Accumulation of
66 chromatin remodelling enzyme and histone transcripts in bovine oocytes. In 'Oocytes.' **63**, 223-255.
67 (Springer)
68
- 69 Lodde, V., Modina, S., Galbusera, C., Franciosi, F., and Luciano, A.M. (2007) Large-scale
70 chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality
71 and developmental competence. *Molecular reproduction and development* **74**(6), 740-9
72
- 73 Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., and Gordon, I. (1994) Effect of follicle size
74 on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and
75 culture in vitro. *Molecular reproduction and development* **37**(1), 48-53
76
- 77 Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., and Boland, M.P. (2003) Oocyte and embryo
78 quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction Domestic
79 and Animals* **38**(4), 259-67
80
- 81 Lowther, K.M., and Mehlmann, L.M. (2015) Embryonic Poly(A)-Binding Protein Is Required
82 During Early Stages of Mouse Oocyte Development for Chromatin Organization, Transcriptional
83 Silencing, and Meiotic Competence. *Biology of Reproduction* **93**(2), 43
84
- 85 Luciano, A.M., Lodde, V., Franciosi, F., Tessaro, I., Corbani, D., and Modina, S. (2012) Large-
86 scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation.
87 *European journal of histochemistry : EJH* **56**(3), e37
88
- 89 Ma, P., and Schultz, R.M. (2013) Histone deacetylase 2 (HDAC2) regulates chromosome
90 segregation and kinetochore function via H4K16 deacetylation during oocyte maturation in mouse.
91 *PLoS genetics* **9**(3), e1003377

- 92 Ma, P., and Schultz, R.M. (2016) HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation
93 embryos: Specificity versus compensation. *Cell death and differentiation* **23**(7), 1119-27
94
- 95 Maalouf, W.E., Alberio, R., and Campbell, K.H. (2008) Differential acetylation of histone H4
96 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine
97 embryos. *Epigenetics* **3**(4), 199-209
98
- 99 Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., and Tomanek, M. (2004) Developmental competence
100 of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo
101 production. *Theriogenology* **61**(2-3), 329-35
102
- 103 Pan, Z., Zhang, J., Li, Q., Li, Y., Shi, F., Xie, Z., and Liu, H. (2012) Current advances in epigenetic
104 modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *Journal of genetics and
105 genomics = Yi chuan xue bao* **39**(3), 111-23
106
- 107 Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
108 *Nucleic acids research* **29**(9), 45
109
- 110 Racedo, S., Wrenzycki, C., Lepikhov, K., Salamone, D., Walter, J., and Niemann, H. (2009)
111 Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation.
112 *Reproduction, Fertility and Development* **21**(6), 738-748
113
- 114 Sirard, M.A. (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its
115 relation with developmental competence. *Theriogenology* **55**(6), 1241-54
116
- 117 Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., and Robert, C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo
118 quality. *Theriogenology* **65**(1), 126-36
119
- 120 Sun, H., Lu, F., Liu, X., Tian, M., Ruan, Z., Zhu, P., Ruan, Q., Jiang, J., and Shi, D. (2015) Effects
121 of scriptaid on the histone acetylation of buffalo oocytes and their ability to support the
122 development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology* **83**(7), 1219-25
123
- 124 van den Berg, I.M., Eleveld, C., van der Hoeven, M., Birnie, E., Steegers, E.A., Galjaard, R.J.,
125 Laven, J.S., and van Doorninck, J.H. (2011) Defective deacetylation of histone 4 K12 in human
126 oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Human
127 Reproduction* **26**(5), 1181-90
128
- 129 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman,
130 F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging
131 of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7), RESEARCH0034
132
- 133 Wu, X.F., Yuan, H.J., Li, H., Gong, S., Lin, J., Miao, Y.L., Wang, T.Y., and Tan, J.H. (2015)
134 Restraint stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: roles of
135 chromatin configuration and histone modification in germinal vesicle stage oocytes. *Biology of
136 Reproduction* **92**(1), 13
137

138 **Table 1** Primer sequences, amplicon sizes in base pairs, annealing temperatures, and
 139 reference GenBank accession numbers.

Genes	Sequence	Size	Temperature (°C)	GenBank
<i>HAT1</i>	F: AAT TGA GAG ACT TTG TGC TTG TGA R: TTC AAT GAC ACG TCG ATA ATC TTC	392	60	NM_001034347.1
<i>HDAC1</i>	F: ATC GGT TAG GTT GCT TCA ATC TG R: GTT GTA TGG AAG CTC ATT AGG GA	188	60	NM_001037444.2
<i>HDAC2</i>	F: TTA TTT GAA AAT TTA CGC ATG TT R: TTG CTC CTT TCT TAT GAT CAG TC	229	56	NM_001075146.1
<i>HDAC3</i>	F: GAA GAG GCC ATT AGT GAA GAG R: TCA GTC CTG TCG TAG GTT AG	227	60	NM_001206243.1
<i>KAT2A</i>	F: TGG GAT TTG CTT CCG CAT GTT TCC R: TTG ACC TGC TCA TTG GAG GTG ACA	81	60	XM_003587447.4
<i>PPIA</i>	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	119	60	NM_178320.2

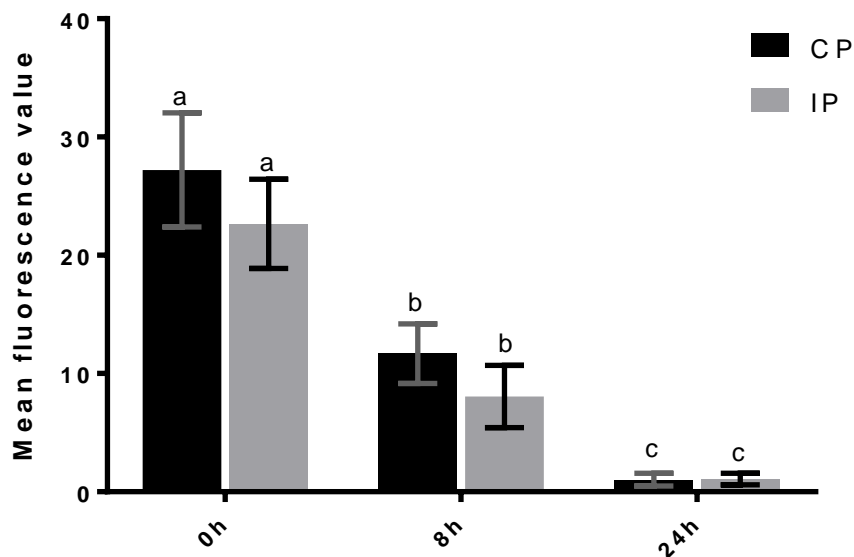


140

141 **Figure 1** Acetylation pattern of lysine 5, 6, 12 and 16 of histone H4 on bovine oocytes142 obtained from large follicles (CP) matured *in vitro*, for 0 h (germinal vesicle - VG), 8 h

143 (germinal vesicle breakage - VGBD) and 24 h of maturation (metaphase II - MII).

144

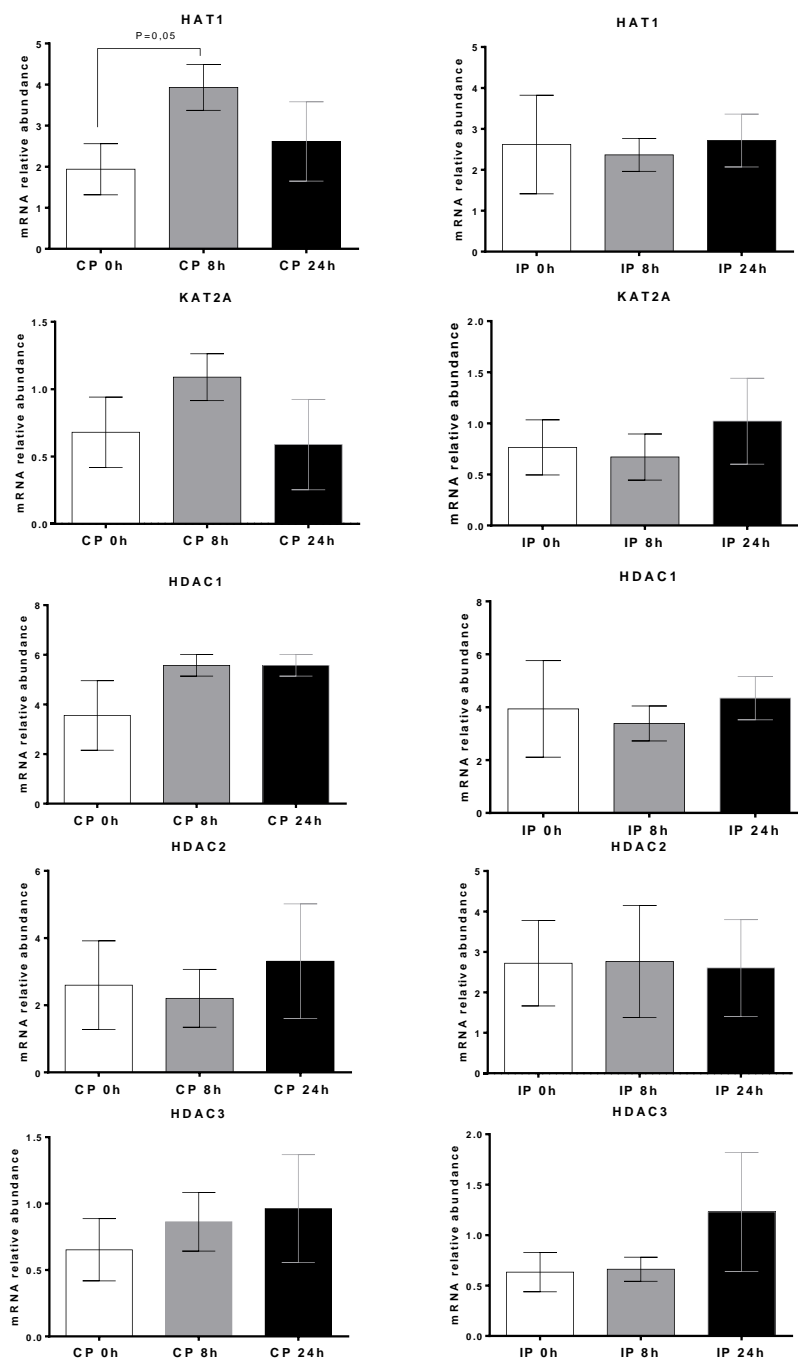


145

146 **Figure 2** Average \pm SEM of the immunofluorescence signal of lysine 5, 6, 12 and 16 of
147 histone H4 on bovine oocytes obtained from small follicles (IP) and large follicles (CP)
148 matured in vitro for 0h, 8h and 24 h of maturation. ^{a, b, c} Different letters indicate a
149 significant difference ($P < 0.05$).

150

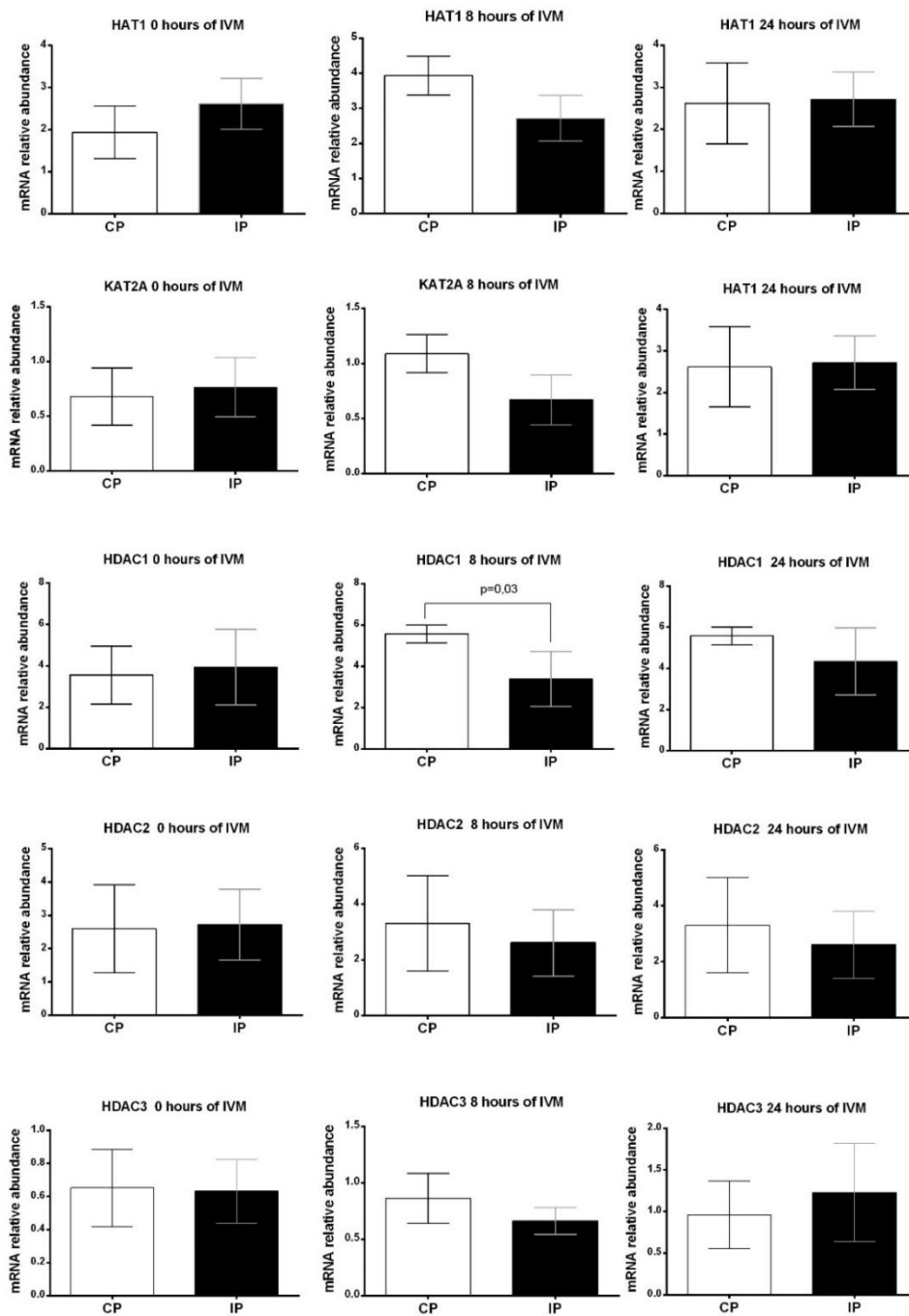
151



152

153 **Figure 3** Transcripts levels of HAT1, KAT2A, HDAC1, HDAC2, and HDAC3 quantified
 154 by RT-PCR in bovine oocytes from more competent (CP) and less competent (IP) groups

155 at 0, 8 and 24 h of maturation. Each group was analyzed using four pools of oocytes. The
156 data (mean \pm SD) were normalized using the formula $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001), and PPIA was
157 the endogenous control.



158

159 **Figure 4** Transcript levels for the genes HAT1, KAT2A, HDAC1, HDAC2, and HDAC3
 160 quantified by RT-PCR in bovine oocytes at each moment of maturation (0, 8 and 24 h),

161 comparing the two treatments as follow: more competent (CP), and less competent (IP).
162 Each group was analyzed using four pools of oocytes. The data (mean \pm SD) were
163 normalized using the formula $\Delta\Delta\text{CT}$ (Pfaffl, 2001), and PPIA was the endogenous control.

1 **TERCEIRA PARTE**

2 **ARTIGO 2 – Normas da Revista Molecular Reproduction and Development**

3 **(Versão submissão)**

4
5 **Histone deacetylase inhibitor during pre-maturation and/or *in vitro* maturation does**
6 **not improve the developmental competence of bovine oocytes**

7
8 Pontelo, T. P¹., Franco, M. M^{5,6}., Kawamoto, T. S²., Caixeta, F. M³., Leme, L.O⁴.,
9 Kussano, N. R.³, Zangeronimo, M.G¹., Dode, M. A. N⁶.

10
11 ¹ Federal University of Lavras, Veterinary Science, Lavras, MG 32700-000, Brazil.

12 ² Federal University Uberlândia, Animal Science, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil.

13 ³ University of Brasilia, Animal Science, Brasilia, DF 70910-900, Brazil.

14 ⁴ Federal University of Espírito Santo, Animal Science, Vitória, ES 29075-073, Brazil.

15 ⁵ Institute of Genetics and Biochemistry of Federal University of Uberlandia, Uberlândia,
16 MG 38405-320, Brazil.

17 ⁶ Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF 70770-900, Brazil.

18
19 **Abstract**

20
21 Histone acetylation regulates gene expression and chromatin configurations and appears to
22 be related to oocyte competence. We aimed to evaluate the effect of scriptaid during pre-

23 maturation (PIVM) and/or maturation (IVM) on the developmental competence of bovine
24 oocytes. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were submitted to PIVM for 6 h in the
25 presence or absence of scriptaid. COCs were distributed into 5 groups: T1-IVM for 22 h,
26 T2-PIVM for 6 h and IVM for 22 h, T3-PIVM with scriptaid for 6 h and IVM for 22 h, T4-
27 PIVM for 6 h and IVM with scriptaid for 22 h, and T5-PIVM with scriptaid for 6 h and
28 IVM with scriptaid for 22 h. Nuclear maturation, gene expression, cumulus cells (CCs)
29 expansion, and embryo development and quality were evaluated. At the end of maturation,
30 all groups presented more than 85% of oocytes in MII ($P>0.05$). Only *HAT1* gene was
31 differentially expressed ($P<0.01$) in oocytes with different treatments. Regarding embryo
32 development at D7, T4 (23%) and T5 (18%) had lower blastocyst rate ($P<0.05$) than the
33 other treatments (T1 = 35%, T2 = 37% and T3 = 32%). No effect ($P>0.05$) was observed
34 when scriptaid in PIVM was used in less competent oocytes, obtained from follicles 1-3
35 mm. In conclusion, presence of scriptaid in PIVM and/or IVM did not improve oocyte
36 developmental competence or embryo quality.

37

38 Key words: Cattle, meiosis retensor, NPPC, scriptaid, oocyte competence.

39

40 **1 Introduction**

41

42 In vitro maturation (IVM) is one of the most critical steps in the in vitro production
43 of embryos (IVP) since oocytes are obtained from follicles of different sizes and constitute

44 a very heterogeneous population (Lodde, Valentina *et al.*, 2007; Varago *et al.*, 2008b;
45 Smitz *et al.*, 2011; Luciano, A. *et al.*, 2012). Considering that after the removal of the
46 oocytes from the follicular environment they spontaneously resume meiosis regardless
47 their level of competence, many of the oocyte submitted to IVM are not fully competent
48 yet and cannot support embryonic development (Luciano *et al.*, 2011; Luciano, A. *et al.*,
49 2012). One of the ways to overcome this problem is to use a pre-maturation (PIVM) period,
50 which can provide oocytes an extra time to undergo changes such as additional transcripts
51 stock formation, and cytoplasm reorganization (Albuz *et al.*, 2010; Farghaly *et al.*, 2015;
52 Azari-Dolatabad *et al.*, 2016).

53 A variety of agents that maintain high levels of cAMP and retain the oocyte at GV
54 such as stimulators of adenylate cyclase or inhibitors of type 3 A phosphodiesterases
55 (PDE3A) have been used for PIVM (Sasseville, Maxime *et al.*, 2009; Albuz *et al.*, 2010;
56 Dieci *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; De Cesaro *et al.*, 2015; Farghaly *et al.*, 2015;
57 Guimaraes *et al.*, 2016; Caixeta, F. M. *et al.*, 2017; Diogenes *et al.*, 2017; Zhang, T. *et al.*,
58 2017). Even though the findings of all those studies are consistent regarding the effect of
59 these agents on meiotic retention, their effect on the improvement of embryo development
60 is contradictory. The main reason for these controversial results is that in most studies, the
61 PIVM system consisted of only culture medium supplemented with a protein source, and a
62 modulator of cAMP/cGMP. Moreover the effect of PMIV use appears to vary according to
63 the size of the follicles in which the oocytes were obtained. Zhang *et al.* (2017) using NPPC
64 during PMIV in pig oocytes obtained from 3-8 mm follicles did not show any difference

65 but when they were used only in oocytes from follicles of 3-4 mm, they observed better
66 blastocyst rates.

67 Among all the events needed to prepare the oocyte for fertilization, the post-
68 translational histone modifications have important roles during oogenesis. Specifically,
69 histone acetylation/deacetylation is essential to accumulate and store all the necessary
70 mRNA, and to sustain remodeling of both maternal and paternal chromatin in the early
71 embryo (Gu *et al.*, 2010; Hales *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2015). These histone modifications
72 are established by two families of enzymes: histones acetyltransferases (HATs) and histone
73 deacetylases (HDACs) (Kuo e Allis, 1998; Mcgraw, Serge *et al.*, 2003; Ma e Schultz,
74 2016). A more acetylated pattern of histones induces a more open chromatin state, making
75 it more accessible for transcriptional machinery, thereby allowing several transcription
76 factors to have access to the gene promoters (Verdone *et al.*, 2005; Iacobuzio-Donahue,
77 2009). However, a more deacetylated pattern characterizes a more condensed chromatin,
78 with transcriptional repression occurring in most genes (Ge *et al.*, 2015).

79 In immature oocytes, at GV stage, histones are highly acetylated, but they lose their
80 acetylation status as meiosis progresses. In fact, studies have shown that bovine oocytes
81 showed higher levels of acetylation in the GV and in germinal vesicle break down (GVBD)
82 stages compared to metaphase I (MI) and metaphase II (MII) stages, indicating that
83 acetylation signals after GVBD practically disappear (Racedo *et al.*, 2009). Therefore, if
84 GV oocytes could be retained at prophase I and at the same time with histones in a
85 hyperacetylated status after being removed from their follicles, they would keep

86 transcription for a longer period increasing mRNA stock, and ultimately oocyte
87 competence. Hyperacetylated status of histones can be induced by inhibitors of histone
88 deacetylases (HDACis) such as trichostatin A, valproic acid, scriptaid, and sodium butyrate
89 (Mehnert e Kelly, 2007; Seto e Yoshida, 2014; Hyndman e Knepper, 2017). These
90 inhibitors have been used mainly in embryo culture media to improve the development of
91 clone embryo produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT) (Hou *et al.*, 2014; Jin *et*
92 *al.*, 2017; Laguna-Barraza *et al.*, 2018). Few studies reported the use of HDACi during
93 maturation; however, when scriptaid was used during IVM of buffalo oocytes, the results
94 showed an increased expression of genes related to acetylation, and improvement in the
95 production of SCNT embryos (Sun *et al.*, 2015).

96 Therefore, the aim of this study was to evaluate the use of scriptaid during pre-
97 maturation and/or maturation stage in an attempt to improve oocyte competence, and *in*
98 *vitro* development of bovine embryos.

99

100 **2 Material and Methods**

101

102 Unless otherwise indicated, chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO,
103 USA).

104

105

106

107 **2.1 Recovery and selection of oocytes**

108

109 Ovaries from crossbred cows (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*) were
110 collected from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in a 0.9% saline
111 solution (NaCl 0.9%), supplemented with streptomycin sulphate (100 µg/ml) and penicillin
112 G (100 IU/ml) at 35–36 °C, with maximum transport time of 4 h. Cumulus–oocyte
113 complexes (COCs) were aspirated from 3 to 8 mm diameter follicles with a syringe with
114 18-gauge needle and pooled in a 15-ml conical tube (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen,
115 Switzerland). After sedimentation, 10 ml of the supernatant follicle fluid was centrifuged
116 for 5 min at 700 ×g and used for search and selection of COCs. Only COCs with 4 or more
117 layers of cumulus cell (CC) and homogeneous cytoplasm were used for the experiment.

118

119 **2.2 Pre-maturation (PIVM)**

120

121 Selected COCs were washed and transferred in number of 25 to 30 to a 150 µl drop
122 of either PIVM or maturation medium covered with mineral oil, and then cultured for 6 h
123 at 38.5 °C in 5% CO₂. PIVM medium consisted of TCM-199 with Earle's salts (Gibco®,
124 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplement with 0.075 mg/ml of amikacin, 0.2% free
125 fatty acid albumin (BSA-FAF), 0.68 mM of L-glutamine, 1 mM of sodium pyruvate, 0.1
126 µM of cysteamine, 10⁻⁴ IU/ml recombinant follicle stimulating hormone [rFSH (Gonal-F®,
127 Merck Serono, Rockland, MA, USA), and a meiotic inhibitor supplemented or not

128 supplemented with scriptaid. The meiotic inhibitor used was the natriuretic peptide
129 precursor C (NPPC) in a concentration of 100 μ M (Caixeta et al., 2016). Scriptaid was
130 added to the PIVM medium in final concentration of 500 nM (Sun *et al.*, 2015).

131

132 **2.3 Maturation *in vitro* (IVM)**

133

134 After PIVM, 25 to 30 oocytes were placed in 150 μ l drops of maturation medium.
135 The IVM medium consisted of TCM-199 Earl's salts (Gibco $\text{\textcircled{R}}$) supplemented with 10%
136 fetal bovine serum (FBS, Gibco $\text{\textcircled{R}}$), 0.01 IU/ml of follicle stimulating hormone (FSH), 0.1
137 of mg/ml L-glutamine, 0.075 mg/ml of amikacin, 0.1 μ M/ml of cysteamine, and 0.2 mM
138 of sodium pyruvate. The IVM was performed for 22 h at 38.5 $^{\circ}$ C and 5% CO² in air.

139 To assess meiotic stage, oocytes were removed from the culture medium at the
140 beginning and end of PIVM (6 h) to verify meiotic arrest, and at the beginning and end of
141 IVM (0 h and 22 h respectively) to assess the reversibility of the arrest and progression of
142 meiotic maturation. At each time point, they were washed in phosphate buffered saline
143 (PBS), and denuded by repeated pipetting until CCs were completely removed. The
144 samples were then fixed for 48 h in ethanol and acetic acid (3:1) and stained with 45%
145 lacmoid in glacial acetic acid. The evaluation of meiotic stage was performed under a
146 phase-contrast microscope (Nikon Eclipse E200, 1.000x), and oocytes were classified
147 according to meiotic stages into: GV, GVBD, metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase

148 I (TI), and metaphase II (MII). Any oocyte that has diffuse or undefined chromatin or has
149 some chromosomal aberration was considered as degenerated or abnormal.

150

151 **2.4 Assessment of cumulus expansion**

152

153 To determine CC expansion, each COC was measured after selection, and after
154 PIVM and IVM using the Motic Images Plus 2.0 program (Motic China Group Co, Ltd.,
155 Xiamen, China). The CC expansion during PIVM and IVM was determined by the
156 difference between the mean area of all COCs from each treatment before and after PIVM,
157 and before and after IVM.

158

159 **2.5 *In vitro* embryo production (PIVE)**

160

161 After IVM, COCs were transferred to 150 μ l drops of fertilization medium,
162 consisting of Tyrode's through Albumin Lactate Pyruvate (TALP), supplemented with 0.5
163 mM/ml of penicillamine, 0.25 of mM hypotaurine, 25 mM of epinephrine, and 10 mg/ml
164 of heparin. Frozen semen from the same bull that was previously tested for IVP of embryos,
165 was used for all treatments and replicates. After thawing, the sperm were selected by
166 Percoll gradient method (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA) with 90% (400 μ l) and
167 45% (400 μ l) poured in 1.5 ml microcentrifuge tubes, and centrifuged for 5 min at 9000
168 rpm or 700 $\times g$. The resultant pellet was re-suspended and added into the fertilization

169 medium in a final concentration of 1×10^6 motile spermatozoa/ml. The oocytes were co-
170 incubated with the sperm, for 18 to 20 h, at 38.5 °C and 5% CO₂ in air. The day of
171 insemination was considered as day 0 (D0). Eighteen hours after insemination, the
172 presumptive zygotes of all treatments were washed and transferred to 150 mL drops of
173 synthetic oviduct fluid media containing amino acids, citrate, and inositol (SOFaaci [Holm
174 et al., 1998]), supplemented with bovine serum albumin, and incubated at 38.5 °C with 5%
175 CO₂ for 8 days. Embryos were evaluated on Day 2 (D2) for cleavage, and on Days 6–8
176 (D6-8) to determine the blastocyst rates.

177

178 **2.6 RT-qPCR**

179

180 Total RNA was isolated from 4 pools of 20 oocytes for each treatment using
181 RNeasy Plus Micro[®] Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's
182 instructions. Total RNA was used for cDNA synthesis using the First Strand cDNA
183 Synthesis kit (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) and the Oligo-dT (0.5 µg/µl) primers,
184 according to the manufacturer's instructions in a final volume of 40 µl. Reactions were
185 incubated at 65 °C for 5 min, 50 °C for 5 min, and 85 °C for 5 min.

186 qPCR analyses were performed using the 7500 Fast-Real-Time PCR System
187 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and the Fast SYBR Green Master Mix[®] Kit
188 (Thermo Fischer). Each sample was analyzed in triplicate with amplification efficiency
189 between 90 and 110%. The specificity of each PCR product was determined by analyzing

190 the melting curve, and the amplicon size in agarose gel. The reactions were performed in a
191 final volume of 25 μ l using an equivalent of 0.62 oocytes per reaction. The qPCR
192 conditions were 95 °C for 5 min followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s,
193 and then annealing and extension at 60 °C for 30 s. Histone acetyltransferase (*HAT1*), lysine
194 acetyltransferase 2A (*KAT2A*), histone deacetylase 1 (*HDAC1*), histone deacetylase 2
195 (*HDAC2*), histone deacetylase 3 (*HDAC3*), and the histone deacetylase 8 (*HDAC8*) genes
196 were analyzed. The primer sequences, fragment sizes, and annealing temperatures are listed
197 in Table 1. The expression level of the 3 constitutive genes, including Glyceraldehyde 3-
198 phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -actin (*ACTB*), and peptidylprolyl isomerase A
199 (*PPIA*) were analyzed using geNorm software (Vandesompele, Jo *et al.*, 2002), which
200 indicated that PPIA gene was the most stable. This gene was used as a reference for data
201 normalization. The relative expression of each gene was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method
202 with correction of the efficiency (Pfaffl, 2001).

203

204 **2.7 Differential staining of embryos**

205

206 Total cell number, trophectoderm (TE) cells, and inner cell mass (ICM) were
207 stained using protocol described by Velazquez et al. (2012) with slight modifications. Only
208 expanded blastocysts (BX) at D7 of culture were used for differential cell staining using
209 Hoeschst 33342 and propidium iodide (PI). Briefly, the BXs were washed 3 times in PBS
210 supplemented with polyvinyl pyrrolidone (PVP-0.1%). Subsequently, the BXs were

211 incubated in 500 µl of PI solution (PBS with 0.3% Triton X-100 and 100 µg/ml of PI
212 solution) for 30 s. Blastocysts were washed 3 times in PBS/PVP, and then incubated in 500
213 µl of 4% paraformaldehyde fixation solution with 5 mg/ml Hoeschst 33342 for 15 min.
214 Finally, the embryos were washed with PBS/PVP, mounted on glass slide in a drop of
215 glycerol, gently flattened with a coverslip, and visualized for cell counting. Cell counting
216 was performed directly under a fluorescence microscope (Carl ZEISS Axioplan-2, LLC,
217 United States) with UV excitation of 460 for Hoechst and 560 nm for propidium iodide.
218 Thus, nuclei labeled with bisbenzimidide appeared blue, and they were considered as ICM
219 while the nuclei labeled with both bisbenzimidide and propidium iodide appeared red and
220 were classified as TE. Embryos with about 20-40% of ICM in relation to the number of
221 total cells were considered of good quality.

222

223 **2.8 Experimental Design**

224

225 *2.8.1 Experiment 1: Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on nuclear maturation*
226 *kinetics*

227

228 This experiment aimed to determine if scriptaid could affect the progression of
229 meiosis. Before performing the nuclear maturation kinetics, we evaluated how long
230 scriptaid could be used during maturation without affecting oocyte developmental
231 competence. Three different treatments (T) were administered as follows: T1) control;

232 COCs were submitted to 22 h of IVM, T2) COCs were submitted to IVM with scriptaid
233 for the first 6 h and the remaining 16 h without scriptaid, T3) COCs were submitted to IVM
234 with scriptaid for 22 h. Based on the results, we chose to expose COCs to scriptaid for 22
235 h of IVM for subsequent experiments.

236 Then, we evaluated if COCs would remain in the GV stage after PIVM, and if they
237 were able to resume and complete meiosis after being blocked for 6 h during PIVM. Five
238 treatments were used: T1- IVM (control): COCs were matured for 22 h; T2- PIVM/IVM:
239 COCs were submitted to 6 h of PIVM and 22 h of IVM; T3- PIVM + scriptaid/IVM: COCs
240 were submitted to PIVM for 6 h in the presence of scriptaid and matured for 22 h; T4-
241 PIVM/IVM + scriptaid: COCs were submitted to PIVM for 6 h and matured for 22 h in
242 the presence of scriptaid; T5-PIVM + scriptaid/IVM + scriptaid: COCs were submitted to
243 PIVM for 6 h in the presence of scriptaid and matured for 22 h, also in the presence of
244 scriptaid.

245 To assess nuclear kinetic, COCs were collected and fixed at 0 h, after 6 h of PMIV
246 with and without the addition of scriptaid, at 8 h and 22 h of IVM. After fixation, they were
247 stained with lacmoid and evaluated for meiotic stage under a phase-contrast microscope.
248 The control group was evaluated at 0 h, 8 h, 14 h and 22 h; we added an additional
249 evaluation time (14 h) which corresponded to the 6 h of PIVM plus 8 h of IVM.

250

251

252 *2.8.2 Experiment 2: Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on transcripts levels for*
253 *enzymes related to the histone acetylation/deacetylation in bovine oocytes*

254

255 The aim of this experiment was to analyze if the presence of scriptaid during PIVM
256 and/or IVM could affect the expression profile of the genes involved in histone
257 acetylation/deacetylation processes in bovine oocytes. Treatments were the same as those
258 used in the previous experiment, being the oocytes of all treatment groups collected at 0 h
259 and 6 h of PIVM, and 0 h and 22 h of IVM. For CCs removal, the COCs classified as grades
260 1 and 2 were transferred to a drop of 50 µl of saline in phosphate buffer (PBS), where the
261 CCs were stripped out by successive pipetting until complete removal. After denudation,
262 the oocytes were washed 3 times in PBS. The oocytes were transferred (2 µl) to a 0.2 ml
263 tube, and twice the volume of RNAlater (4 µl) (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA,
264 USA) was added to the tube. These oocytes were stored in -80 °C freezer until the day of
265 qT-PCR analysis.

266

267 *2.8.3 Experiment 3: Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on developmental*
268 *competence of bovine oocytes*

269

270 The objective of this experiment was to evaluate if the use of PIVM with or without
271 the presence of HDACi would improve oocyte competence and embryo development. For
272 this experiment oocytes obtained from 3-8 mm follicles were distributed into 5 treatments,

273 which were same as those described in experiment 2. For all treatments, CCs expansion
274 was evaluated after selection, and after pre-maturation and maturation phases. After
275 maturation, the COCs were submitted to IVF and then cultured until D 7 of development.
276 Embryos were evaluated on D2 for cleavage and on D6 and D7 for blastocyst rates. To
277 evaluate the embryo quality, the expanded blastocyst (Bx) at D7 were stained by
278 differential staining technique, that provides information about the total cell number,
279 trophoectoderma cells (TE), inner cell mas (ICM), as well as the ratio of cell mass to total
280 cells (ICM/total cells).

281

282 *2.8.4 Experiment 4: Effect of the HDAC inhibitor, scriptaid, on less competent oocytes*

283

284 Considering that, it has been reported that PIVM may be more beneficial for the oocytes
285 with lower developmental competence (Dieci et al., 2016), we also evaluated whether scriptaid
286 added to PIVM medium could improve oocyte competence. We chose to use less
287 competent oocytes obtained from 1-3 mm follicles (Caixeta et al., 2009), which were
288 evaluated for embryo production and embryo quality. Follicles of 1-3 mm diameters were
289 dissected from the ovarian cortex, classified, selected morphologically and measured.
290 Oocytes obtained from dissected follicles were divided into 3 treatment groups: 22 h IVM,
291 PIVM + 22 h IVM, and PIVM with scriptaid + 22 h IVM. Oocytes of 3-8 mm from
292 aspirated follicles were used as controls and submitted to the same treatments. Cleavage
293 rate on D2, blastocyst rate on D6 and D7, and embryonic developmental speed were

294 evaluated. At D7, expanded blastocysts Bx embryos were stained with differential staining
295 method.

296

297 **3 Statistical Analyses**

298

299 Data on nuclear maturation, embryonic development, and proportion of ICM/total
300 cells were analyzed using chi-square test ($P < 0.05$). The comparison between treatment
301 groups regarding cumulus cell expansion, gene expression, number of TE cell, number of
302 ICM cells, and total cell number was performed by analysis of variance (ANOVA)
303 followed by Tukey's test at significance level of $P < 0.05$. Non-parametric data of gene
304 expression and the number of TE and ICM cells were analyzed using the Kruskal Wallis
305 test. All analyses were performed by GraphPad Prism version 7 for Windows (GraphPad
306 Software, La Jolla California USA).

307

308 **4 Results**

309

310 *Experiment 1: Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on nuclear maturation kinetics*

311

312 Initially we evaluated how long scriptaid could be used during maturation without
313 affecting oocyte developmental competence. Cleavage rate (D2) was similar ($P > 0.05$)
314 between the control (82.1%; $n = 179$) and the groups in which scriptaid was administered

315 for 6 h (77.7%; n = 175) or 224y h (77.0%; n=196) of maturation. However, blastocyst rate
316 on D7 was lower ($P < 0.05$) in groups with scriptaid treatment for the first 6 h (17.7%) of
317 IVM than in the control group (27.95%) and IVM treatment group with scriptaid for 22 h
318 (30.6%). Then, the use of scriptaid for 22 h was chosen for the remaining experiments.

319 To determine if scriptaid could affect meiosis progression, nuclear maturation
320 kinetics was evaluated. The percentage of oocytes at GV stage was similar ($P > 0.05$)
321 among the control and treatment groups in which COCs were submitted to PIVM, either in
322 the presence or absence of scriptaid (Table 2). As for meiosis progression, after 8 h of IVM
323 the control group presented majority of the oocytes at GVBD and GV stages, while
324 treatment groups submitted to PIVM had majority of the oocytes in MI, AI, and TI phases.
325 However, at the end of maturation, no differences between treatment groups was observed
326 ($P > 0.05$), having all groups presenting around 90% of the oocytes at MII stage (Table 3).

327

328 *Experiment 2 Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on transcripts levels for enzymes*
329 *related to histone acetylation/deacetylation in bovine oocytes*

330

331 The expression profile of 6 genes involved in histone acetylation/deacetylation
332 (*HAT1*, *KAT2A*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*) was analyzed in oocytes during
333 PIVM and/or IVM with or without scriptaid. Of the 6 genes analyzed, only *HAT1* was
334 differentially expressed among the treatment groups. While the expression of *HAT1*
335 decreased after maturation relative to the expression before maturation (0 h) in the control

336 group ($P < 0.05$), and in the group submitted to PIVM and IVM without scriptaid, the
337 expression of *HAT1* in all other treatments with or without scriptaid at some point did not
338 change during maturation ($P > 0.05$) (Figure 1).

339

340 *Experiment 3: Effect of scriptaid during PIVM and/or IVM on developmental competence*
341 *of bovine oocytes*

342

343 First, it was evaluated if scriptaid affected cumulus cells expansion after PIVM and
344 IVM. The data showed that there was no expansion of cumulus cells after PIVM. After 22
345 h of IVM, the treatment group that received scriptaid during PIVM and IVM presented a
346 lower expansion of cumulus cells than PIVM and IVM treatment group without scriptaid
347 (Figure 2). Regarding embryo development, no differences ($P > 0.05$) among treatment
348 groups were observed for cleavage rate (Table 4). At D7, the treatments that received
349 scriptaid during IVM regardless of the use of scriptaid in PIVM, showed a lower rate of
350 blastocysts ($P < 0.05$) than the control.

351 Only the treatment group in which scriptaid was given during PIVM and IVM had
352 lower number of total cells than the control ($P < 0.05$) (Table 5). To evaluate the allocation
353 of ICM and TE cells, the expanded blastocysts evaluated were divided into 3 groups: 0%-
354 20%, 20%-40%, and 40%-60% ICM / total cells. The group that received scriptaid during
355 PIVM and IVM showed a higher ($P < 0.05$) percentage of embryos between 0%-20% (17%,

356 5/30), and a lower ($P < 0.05$) percentage of embryos between 20%-40% (67%, 20/30) than
357 the control (2,6%, 1/39; 87.1%, 34/39, respectively) (Data not shown).

358

359 *Experiment 4: Effect of HDAC inhibitor, scriptaid, on less competent oocytes*

360

361 Less competent oocytes obtained from 1-3 mm follicles submitted to PIMV with or
362 without scriptaid showed a lower ($P < 0.05$) cleavage and blastocyst rate than oocytes
363 obtained from larger follicles (Table 6). Regarding the amount of ICM, TE and total cells,
364 all treatments were similar ($P > 0.05$) (Table 7).

365 As in the previous experiment, the cell allocation was analyzed. On the control
366 group, the majority of the embryos belonged to 20%-40% ICM/Total category while no
367 embryo was classified as 0%-20% category. The other treatment groups were similar to the
368 control group, except the low competent oocytes not exposed to scriptaid, which showed a
369 lower ($P < 0.05$) percentage of embryos classified as 20%-40% ICM/Total cell than the
370 control (Data not shown).

371

372 **5 Discussion**

373

374 Considering that low developmental competence of *in vitro* matured oocytes is
375 related to incomplete cytoplasmic maturation due to their early removal from the follicles
376 (Shu *et al.*, 2008; Smitz *et al.*, 2011), it can be assumed that the use of PIVM may provide

377 the oocytes with extra time to increase their competence (Luciano *et al.*, 2011; Dieci *et al.*,
378 2013; Franciosi *et al.*, 2014). One of the factors responsible for full competence is the
379 accumulation of transcripts. It is well known that this accumulation is controlled by
380 epigenetic modifications that regulate gene expression and the conformational state of
381 chromatin. Among these epigenetic modifications, histone acetylation is one of the mark
382 controlling the opening and closing of chromatin, and consequently regulating transcription
383 (Gu *et al.*, 2010; Bannister, Andrew J. e Kouzarides, Tony, 2011; Castillo *et al.*, 2017).
384 Thus, we hypothesized that the addition of HDACi during PIVM and/or IVM could prevent
385 histones deacetylation allowing additional transcription, and the accumulation of mRNA.

386 Among the HDACi available we chose to use scriptaid because it has been used
387 with success in the production of clone embryo (Van Thuan *et al.*, 2009b; Wang *et al.*,
388 2011; Liang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Tram *et al.*, 2017), and specially due to its low
389 toxicity (Su *et al.*, 2000). Because there is no information regarding the use of scriptaid
390 during maturation of bovine oocytes, we did a pre-experiment aiming to define how long
391 scriptaid in culture should be kept. Our results showed that blastocyst rate at D6 and D7
392 was lower when scriptaid was added during 6 h of IVM than when it was added during 22
393 h of IVM. Therefore, we chose to use 22 h for all the experiments.

394 Because it is well known that meiotic progression is affected not only by HDACis
395 (Wang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014) but also by meiotic
396 arrest agents (Farghaly *et al.*, 2015; Caixeta, F. *et al.*, 2017) we evaluated the nuclear
397 kinetics of the oocytes exposed to NPPC and scriptaid. The results showed that regardless

398 of the addition of scriptaid, meiosis was retained during 6 h of PIVM. However, after the
399 oocytes were removed from PIVM and placed in IVM, an acceleration of meiotic
400 progression was observed in all groups compared to the control. We are not sure why
401 meiosis progression was accelerated after meiotic block, but it is probable an effect of the
402 blockage itself since it has also been reported in previous studies (Adona e Leal, 2004;
403 Adona e Leal, 2006; Barretto *et al.*, 2011). Moreover, no effect of the arrest or the presence
404 of HDACi, on nuclear maturation rate was observed. Similar results were reported using
405 trichostatin on other species such as mice and porcine during IVM (Endo, Tsutomu *et al.*,
406 2005; Akiyama *et al.*, 2006).

407 Furthermore, we tried to find out if the presence of scriptaid during PIVM and/or
408 IVM could affect gene expression pattern of acetylation related genes. From all the genes
409 analyzed (*HAT1*, *KAT2A*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, and *HDAC8*), only *HAT1* showed a
410 difference in the expression pattern. Transcript levels of *HAT1* decreased during maturation
411 in the control group ($P = 0.001$), suggesting that histone acetylation is decreasing through
412 maturation and that global deacetylation is occurring until reaching MII. (Kim *et al.*, 2003;
413 Akiyama *et al.*, 2004; Endo, Tsutomu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Racedo *et al.*, 2009).
414 It is interesting to note that treatments with scriptaid at any time (PIVM or IVM) showed
415 no difference in the expression of any evaluated gene, suggesting that the acetylation may
416 remain unchanged until the stage of MII owing to the use of scriptaid. In agreement with
417 this, similar results were reported by Sun *et al.* (2015), who used the same concentration of
418 scriptaid in IVM of buffalo oocytes and found that it induced an increase in the expression

419 of acetylation related genes in MII, including *HAT1*. Although we were expecting to see a
420 change on the expression of genes besides *HAT1*, some studies have shown that treatments
421 with HDACis may influence a small percentage of genes (Wang *et al.*, 2009; Hezroni *et*
422 *al.*, 2011).

423 To evaluate the effect of PIVM with or without scriptaid on the oocyte
424 developmental competence, embryo production and quality were assessed. According to
425 our results, the use of PIVM with or without scriptaid did not affect embryo production on
426 D7. However, when scriptaid was used in IVM associated with PIVM, a detrimental effect
427 on embryo production was observed. These results suggest that there are some interactions
428 between PIVM and scriptaid during IVM. PIVM seems to have some effects on the oocyte
429 that is only expressed during IVM with scriptaid present. We are not sure why this
430 interaction occurred, but it was clearly shown by our data. Since the scriptaid was used
431 only during IVM without the oocytes having been submitted to PIVM, it was not
432 detrimental to embryo development. Besides embryo production, we also evaluated
433 embryo quality using total cell number, and the proportion of ICM/total cells by differential
434 staining (Kocyigit e Cevik, 2015; Ochota *et al.*, 2016; Laguna-Barraza *et al.*, 2018).
435 Treatment with scriptaid during PIVM and IVM, besides having a lower embryo
436 production also showed embryo with lower quality than the control group. The lower
437 quality of embryos can be observed by the lowest cell number and by the lowest percentage
438 of embryos with proportion of 20%-40% of ICM/total cells (Ikeda *et al.*, 2009). The results
439 suggest that in addition to the previously cited interaction between PIVM and subsequent

440 addition of scriptaid in IVM, prolonged use of scriptaid may have affected the oocyte and,
441 subsequently embryo quality. If scriptaid is maintaining the levels of *HAT1*, it is possible
442 that the prolonged use of the scriptaid allowed histones to remain acetylated until the end
443 of maturation, inducing disorganization of the genome, and impairing subsequent
444 embryonic development. It is well known that at the end of maturation, chromatin
445 condensation associated with gene silencing (Bouniol-Baly *et al.*, 1999; De La Fuente *et*
446 *al.*, 2004) occurs. Therefore, an acetylation in MII would be detrimental to the oocyte and
447 subsequent embryo development (Kim *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2006; Hales *et al.*,
448 2011).

449 As CCs play an important role in maturation, and undergo extensive changes during
450 this period, we evaluated their expansion before and after 6 h of PIVM and 22 h of IVM.
451 There was no expansion of the CCs observed after PIVM in any of the treatments, which
452 supports the idea that meiosis was arrested during the 6 h. Lack of CCs expansion during
453 PIVM period has also been reported in previous studies (Gharibi *et al.*, 2013; Diogenes *et*
454 *al.*, 2017) but the effect of PIVM in CCs expansion after IVM is contradictory (Gharibi *et*
455 *al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2017). In our study, after maturation, only the group that received
456 scriptaid during PMIV and MIV presented less expansion than PIVM and IVM groups
457 without scriptaid. This same treatment also presented a later meiotic progression in relation
458 to the other groups. This suggests that the use of scriptaid in both moments could be
459 detrimental to maturation. As already mentioned, the prolonged exposure of the oocytes to
460 scriptaid (PIVM and IVM) may have maintained high level of histone acetylation until the

461 end of maturation. This is not desirable because in MII, the chromatin is poorly acetylated,
462 and needs to be fully closed.

463 Some studies have shown an improvement in the developmental competence of the
464 oocytes from small follicles (Luciano *et al.*, 2011; Abdel-Ghani *et al.*, 2018; Sugimura *et*
465 *al.*, 2018) when PIVM was used. Then we decided to evaluate the use of scriptaid during
466 PIVM of the oocytes obtained from follicles of 1-3 mm, which is considered less competent
467 than the follicles > 3.0 mm (Lonergan, P. *et al.*, 1994; Lequarre *et al.*, 2005; Caixeta, E. S.
468 *et al.*, 2009). As expected, the less competent group presented lower embryo production in
469 relation to the control, which confirms the lower competence of this oocyte. Moreover,
470 PIVM and the addition of scriptaid during PIVM did not improve embryos production. Our
471 results suggest that a possible state of hyperacetylation provoked by HDACis prior to the
472 resumption of meiosis is not necessary for acquiring oocyte competence.

473 According to our results, the use of scriptaid may have maintained the patterns of
474 histone acetylation due to its effect on *HATI* transcripts levels. The use of scriptaid during
475 PIVM and IVM proved to be detrimental to embryonic development, and did not improve
476 embryo development even in the less competent oocytes. Therefore, scriptaid does not
477 improve the competence of bovine oocytes matured *in vitro*.

478

479

480

481

482 **6 Acknowledgement**

483

484 We thank **Brazilian Agricultural Research Corporation** (EMBRAPA; MP1
 485 Project n. 01.03.14.011.00.00) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
 486 Superior (CAPES) for financial support, the veterinary science graduate program
 487 (PPGCV) for the opportunity to pursue a doctorate, the Qualimax (Luziania GO) and
 488 Nippobras (Formosa, GO) slaughterhouses for providing biological material to perform
 489 these experiments, and all of the students and workers of Embrapa for their support during
 490 the course of these experiments.

491

492

References

- 493 Abdel-Ghani, M. A., Sakaguchi, K., Kanno, C., Yanagawa, Y., Katagiri, S., & Nagano, M. (2018).
 494 Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-
 495 sized oocytes. *Journal Reproduction and Develompent*, *64*(4), 365-369.
- 496 Adona, P., & Leal, C. (2006). Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on
 497 meiosis progression in bovine oocytes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
 498 *Zootecnia*, *58*(3), 354-359.
- 499 Adona, P. R., & Leal, C. L. V. (2004). Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase
 500 inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote*,
 501 *12*(3), 197-204.
- 502 Akiyama, T., Kim, J. M., Nagata, M., & Aoki, F. (2004). Regulation of histone acetylation during
 503 meiotic maturation in mouse oocytes. *Molecular reproduction and development*, *69*(2),
 504 222-227. doi:10.1002/mrd.20121
- 505 Akiyama, T., Nagata, M., & Aoki, F. (2006). Inadequate histone deacetylation during oocyte
 506 meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proceedings of the National*
 507 *Academy of Sciences*, *103*(19), 7339-7344.
- 508 Albuz, F., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D., Thompson, J., & Gilchrist, R. (2010). Simulated
 509 physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that
 510 substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*,
 511 *25*(12), 2999-3011.
- 512 Azari-Dolatabad, N., Rahmani, H., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, S., & Nasr-Esfahani,
 513 M. (2016). Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and

- 514 development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue
515 staining. *Theriogenology*, 85(8), 1483-1490.
- 516 Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell*
517 *Research*, 21, 381.
- 518 Barretto, L. S. S., Castro, V. S. D. C., Garcia, J. M., & Mingoti, G. Z. (2011). Meiotic inhibition of
519 bovine oocytes in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on
520 meiosis progression and developmental capacity. *Zygote*, 19(2), 107-116.
- 521 Bouniol-Baly, C., Hamraoui, L., Guibert, J., Beaujean, N., Szollosi, M. S., & Debey, P. (1999).
522 Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown
523 mouse germinal vesicle oocytes. *Biology of Reproduction*, 60(3), 580-587.
- 524 Caixeta, E. S., Ripamonte, P., Franco, M. M., Junior, J. B., & Dode, M. A. (2009). Effect of follicle
525 size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to
526 identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and*
527 *development*, 21(5), 655-664.
- 528 Caixeta, F., Sousa, R., Guimarães, A., Leme, L., Sprícigo, J., Netto, S. S., . . . Dode, M. (2017).
529 Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos by somatic
530 cell nuclear transfer. *Zygote*, 25(1), 32-40.
- 531 Caixeta, F. M., Sousa, R. V., Guimaraes, A. L., Leme, L. O., Spricigo, J. F., Netto, S. B., . . . Dode,
532 M. A. (2017). Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos
533 by somatic cell nuclear transfer. *Zygote*, 25(1), 32-40.
- 534 Castillo, J., Lopez-Rodas, G., & Franco, L. (2017). Histone Post-Translational Modifications and
535 Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions. *Adv Exp*
536 *Med Biol*, 966, 65-92.
- 537 De Cesaro, M. P., Macedo, M. P., Santos, J. T., Rosa, P. R., Ludke, C. A., Rissi, V. B., . . .
538 Gonçalves, P. B. (2015). Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in
539 bovine. *Animal Reproduction Science*, 159, 52-59.
- 540 De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J.
541 (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes
542 is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric
543 heterochromatin function. *Developmental biology*, 275(2), 447-458.
- 544 Dieci, C., Lodde, V., Franciosi, F., Lagutina, I., Tessaro, I., Modena, S. C., . . . Luciano, A. M.
545 (2013). The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin
546 remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic
547 activation and nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 89(3), 68, 61-11.
- 548 Diogenes, M. N., Guimaraes, A. L., Leme, L. O., & Dode, M. A. (2017). Bovine in vitro embryo
549 production: the effects of fibroblast growth factor 10 (FGF10). *Journal of assisted*
550 *reproduction and genetics*, 34(3), 383-390. doi:10.1007/s10815-016-0852-8
- 551 Endo, T., Naito, K., Aoki, F., Kume, S., & Tojo, H. (2005). Changes in histone modifications during
552 in vitro maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development:*
553 *Incorporating Gamete Research*, 71(1), 123-128.
- 554 Farghaly, T., Khalifa, E., Mostafa, S., Hussein, M., Bedaiwy, M., & Ahmady, A. (2015). The effect
555 of temporary meiotic attenuation on the in vitro maturation outcome of bovine oocytes. *In*
556 *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 51(7), 662-671.
- 557 Franciosi, F., Coticchio, G., Lodde, V., Tessaro, I., Modena, S. C., Fadini, R., . . . Luciano, A. M.
558 (2014). Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap

- 559 junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biology of*
 560 *Reproduction*, 91(3).
- 561 Gao, H., Bai, H., Ao, X., Sa, R., Wang, H., Wang, Z., . . . Yu, H. (2014). The effect of valproic acid
 562 on bovine oocyte maturation and early embryonic development in vitro. *Cytotechnology*,
 563 66(3), 525-532.
- 564 Ge, Z.-J., Schatten, H., Zhang, C.-L., & Sun, Q.-Y. (2015). Oocyte ageing and epigenetics.
 565 *Reproduction*, 149(3), 103-114.
- 566 Gharibi, S., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, S., Forouzanfar, M., & Nasr-Esfahani, M.
 567 (2013). Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on nuclear maturation and in vitro
 568 development of ovine oocytes. *Theriogenology*, 80(4), 302-312.
- 569 Gu, L., Wang, Q., & Sun, Q.-Y. (2010). Histone modifications during mammalian oocyte
 570 maturation: dynamics, regulation and functions. *Cell cycle*, 9(10), 1942-1950.
- 571 Guimaraes, A. L., Pereira, S. A., Kussano, N. R., & Dode, M. A. (2016). The effect of pre-
 572 maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and
 573 selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Zygote*, 24(2), 219-
 574 229.
- 575 Hales, B. F., Grenier, L., Lalancette, C., & Robaire, B. (2011). Epigenetic programming: from
 576 gametes to blastocyst. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*,
 577 91(8), 652-665.
- 578 Hezroni, H., Saliaja, B. S., & Meshorer, E. (2011). Pluripotency-related, VPA-induced genome-
 579 wide H3K9 acetylation patterns in embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*,
 580 jbc.M111.266254.
- 581 Hou, L., Ma, F., Yang, J., Riaz, H., Wang, Y., Wu, W., . . . Zhang, L. (2014). Effects of histone
 582 deacetylase inhibitor oxamflatin on in vitro porcine somatic cell nuclear transfer embryos.
 583 *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 16(4), 253-265.
- 584 Hyndman, K. A., & Knepper, M. A. (2017). Dynamic regulation of lysine acetylation: the balance
 585 between acetyltransferase and deacetylase activities. *American Journal of Physiology-
 586 Renal Physiology*, 313(4), 842-846.
- 587 Iacobuzio-Donahue, C. A. (2009). Epigenetic changes in cancer. *Annual Review of Pathological
 588 Mechanical Disease*, 4, 229-249.
- 589 Ikeda, S., Tatemizo, A., Iwamoto, D., Taniguchi, S., Hoshino, Y., Amano, T., . . . Saeki, K. (2009).
 590 Enhancement of histone acetylation by trichostatin A during in vitro fertilization of bovine
 591 oocytes affects cell number of the inner cell mass of the resulting blastocysts. *Zygote*, 17(3),
 592 209-215.
- 593 Jin, J. X., Lee, S., Taweechaipaisankul, A., Kim, G. A., & Lee, B. C. (2017). The HDAC Inhibitor
 594 LAQ824 Enhances Epigenetic Reprogramming and In Vitro Development of Porcine
 595 SCNT Embryos. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of
 596 experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 41(3), 1255-1266.
- 597 Jin, Y. X., Zhao, M. H., Zheng, Z., Kwon, J. S., Lee, S. K., Cui, X. S., & Kim, N. H. (2014). Histone
 598 deacetylase inhibitor trichostatin A affects porcine oocyte maturation in vitro.
 599 *Reproduction, fertility, and development*, 26(6), 806-816. doi:10.1071/RD13013
- 600 Kim, J.-M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., & Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation
 601 during mouse oocyte meiosis. *The Journal of cell biology*, 162(1), 37-46.
- 602 Kocyigit, A., & Cevik, M. (2015). Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth
 603 factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology*, 71(1),
 604 64-69.

- 605 Kuo, M. H., & Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene
606 regulation. *Bioessays*, 20(8), 615-626.
- 607 Laguna-Barraza, R., Sánchez-Calabuig, M., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & Pérez-Cerezales, S.
608 (2018). Effects of the HDAC inhibitor scriptaid on the in vitro development of bovine
609 embryos and on imprinting gene expression levels. *Theriogenology*, 110, 79-85.
- 610 Lequarre, A. S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., . . .
611 Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo
612 development in the bovine. *Theriogenology*, 63(3), 841-859.
- 613 Liang, S., Zhao, M.-H., Choi, J.-w., Kim, N.-H., & Cui, X.-S. (2015). Scriptaid treatment decreases
614 DNA methyltransferase 1 expression by induction of microRNA-152 expression in porcine
615 somatic cell nuclear transfer embryos. *PloS one*, 10(8), e0134567.
- 616 Liu, L., Song, G., Gao, F., Guan, J., Tang, B., & Li, Z. (2012). Transient exposure to sodium
617 butyrate after germinal vesicle breakdown improves meiosis but not developmental
618 competence in pig oocytes. *Cell biology international*, 36(5), 483-490.
619 doi:10.1042/CBI20110220
- 620 Lodde, V., Modina, S., Galbusera, C., Franciosi, F., & Luciano, A. M. (2007). Large-scale
621 chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap junction
622 functionality and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development:
623 Incorporating Gamete Research*, 74(6), 740-749.
- 624 Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size
625 on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation,
626 fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*, 37(1), 48-53.
- 627 Luciano, A., Lodde, V., Franciosi, F., Tessaro, I., Corbani, D., & Modina, S. (2012). Large-scale
628 chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and
629 differentiation. *European journal of histochemistry: EJH*, 56(3).
- 630 Luciano, A. M., Franciosi, F., Modina, S. C., & Lodde, V. (2011). Gap junction-mediated
631 communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and
632 differentiation through cAMP-dependent mechanism (s). *Biology of Reproduction*, 85(6),
633 1252-1259.
- 634 Ma, P., & Schultz, R. M. (2016). HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation
635 embryos: Specificity versus compensation. *Cell death and differentiation*, 23(7), 1119-
636 1127. doi:10.1038/cdd.2016.31
- 637 McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L., & Sirard, M.-A. (2003). Quantification of Histone
638 Acetyltransferase and Histone Deacetylase Transcripts During Early Bovine Embryo
639 Development1. *Biology of Reproduction*, 68(2), 383-389.
- 640 Mehnert, J. M., & Kelly, W. K. (2007). Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of
641 action. *The Cancer Journal*, 13(1), 23-29.
- 642 Nunes, M., Silva, A. L., Oliveira, L., Machaim, M., & Nunes, M. A. (2017). Prematuration and
643 maturation of bovine oocytes with fibroblast growth factor 10 (FGF10): Effect on meiotic
644 progression, cumulus cell expansion, gene expression and embryo development.
645 *Theriogenology*.
- 646 Ochota, M., Wojtasik, B., & Nizański, W. (2016). Total cell number and its allocation to
647 trophoctoderm and inner cell mass in in vitro obtained cats' blastocysts. *Reproduction in
648 Domestic Animals*, 51(3), 339-345.
- 649 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
650 *Nucleic acids research*, 29(9), 45.

- 651 Racedo, S., Wrenzycki, C., Lepikhov, K., Salamone, D., Walter, J., & Niemann, H. (2009).
652 Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro
653 maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(6), 738-748.
- 654 Sasseville, M., Albuz, F. K., Côté, N., Guillemette, C., Gilchrist, R. B., & Richard, F. J. (2009).
655 Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biology of*
656 *Reproduction*, 81(2), 415-425.
- 657 Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes.
658 *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a018713.
- 659 Shu, Y.-m., Zeng, H.-t., Ren, Z., Zhuang, G.-l., Liang, X.-y., Shen, H.-w., . . . Wang, N.-n. (2008).
660 Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development
661 of immature human oocytes. *Human Reproduction*, 23(3), 504-513.
- 662 Smitz, J. E., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2011). The promise of in vitro maturation in
663 assisted reproduction and fertility preservation. *Seminars in reproductive medicine*, 29,
664 024-037.
- 665 Su, G. H., Sohn, T. A., Ryu, B., & Kern, S. E. (2000). A novel histone deacetylase inhibitor
666 identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer*
667 *research*, 60(12), 3137-3142.
- 668 Sugimura, S., Yamanouchi, T., Palmerini, M. G., Hashiyada, Y., Imai, K., & Gilchrist, R. B. (2018).
669 Effect of pre-in vitro maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte
670 developmental competence in cattle. *J Reprod Dev*, 64(3), 233-241.
- 671 Sun, H., Lu, F., Liu, X., Tian, M., Ruan, Z., Zhu, P., . . . Shi, D. (2015). Effects of scriptaid on the
672 histone acetylation of buffalo oocytes and their ability to support the development of
673 somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 83(7), 1219-1225.
- 674 Tram, N., Linh, N. K., Minh, N., Bui, H.-T., & Van Thuan, N. (2017). *The Histone Deacetylase*
675 *Inhibitor Scriptaid Improves the Expression Pattern of TIF1 β in Cloned Outbred Mouse*
676 *Embryos*. Paper presented at the International Conference on the Development of
677 Biomedical Engineering in Vietnam.
- 678 Van Thuan, N., Bui, H.-T., Kim, J.-H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., . . . Wakayama,
679 T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production
680 and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 138(2), 309-317.
- 681 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman,
682 F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric
683 averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034. 0031.
- 684 Varago, F., Mendonça, L., & Lagares, M. d. A. (2008). Produção in vitro de embriões bovinos:
685 estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de*
686 *Reprodução Animal*, 32(2), 100-109.
- 687 Velazquez, M., Hadelér, K.-G., Herrmann, D., Kues, W., Rémy, B., Beckers, J.-F., & Niemann, H.
688 (2012). In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-
689 formed bovine blastocysts. *Theriogenology*, 78(3), 517-527.
- 690 Verdone, L., Caserta, M., & Mauro, E. D. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene
691 expression. *Biochemistry and Cell Biology*, 83(3), 344-353.
- 692 Wang, L.-J., Zhang, H., Wang, Y.-S., Xu, W.-B., Xiong, X.-R., Li, Y.-Y., . . . Zhang, Y. (2011).
693 Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell
694 nuclear transfer bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem*
695 *Cells")*, 13(5), 431-439.

- 696 Wang, Q., Yin, S., Ai, J.-S., Liang, C.-G., Hou, Y., Chen, D.-Y., . . . Sun, Q.-Y. (2006). Histone
697 deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell cycle*, 5(7), 766-774.
- 698 Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Genome-
699 wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes.
700 *Cell*, 138(5), 1019-1031.
- 701 Zhang, T., Zhang, C., Fan, X., Li, R., & Zhang, J. (2017). Effect of C-type natriuretic peptide
702 pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. *In vitro cellular & developmental*
703 *biology. Animal*, 53(3), 199-206.

Tables and figures

Table 1 Primer sequences, amplicon sizes in base pairs, annealing temperatures, and reference GenBank accession numbers.

Genes	Sequence	Size (pb)	Temperature (°C)	GenBank
<i>HAT1</i>	F: AAT TGA GAG ACT TTG TGC TTG TGA R: TTC AAT GAC ACG TCG ATA ATC TTC	392	60	NM_001034347.1
<i>HDAC1</i>	F: ATC GGT TAG GTT GCT TCA ATC TG R: GTT GTA TGG AAG CTC ATT AGG GA	188	60	NM_001037444.2
<i>HDAC2</i>	F: TTC CTG GAA CAG GAG ACT TA R: ATC ACC AGA TAG GGA GTC TG	194	60	NM_001075146.1
<i>HDAC3</i>	F: GAA GAG GCC ATT AGT GAA GAG R: TCA GTC CTG TCG TAG GTT AG	227	60	NM_001206243.1
<i>HDAC8</i>	F: CCA AAG CAG TGG TCT TAC AGC R: TCC TCC CAA GAT GAG CGT TG	140	60	NM_001076231.2
<i>KAT2A</i>	F: TGG GAT TTG CTT CCG CAT GTT TCC R: TTG ACC TGC TCA TTG GAG GTG ACA	81	60	XM_003587447.4
<i>PPIA</i>	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	119	60	NM_178320.2

Table 2. Evaluation of meiotic retention of bovine oocytes for 6 hours using pre-maturation (PIVM) for 6 h with 100 nM Type C natriuretic peptide added with 500nM scriptaid (Scrip)

Treatment	N	Stages of Maturation	
		GV	GVBD
Control 0h	69	66 (95.7%)	3(4.3%)
6h PIVM	54	47(87.0%)	7(12.9%)
6h PIVM c/ Scrip	48	41(85.4%)	7(14.6%)

713 ^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant difference by Chi-Square test
714 (P<0.05)
715 GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle break
716

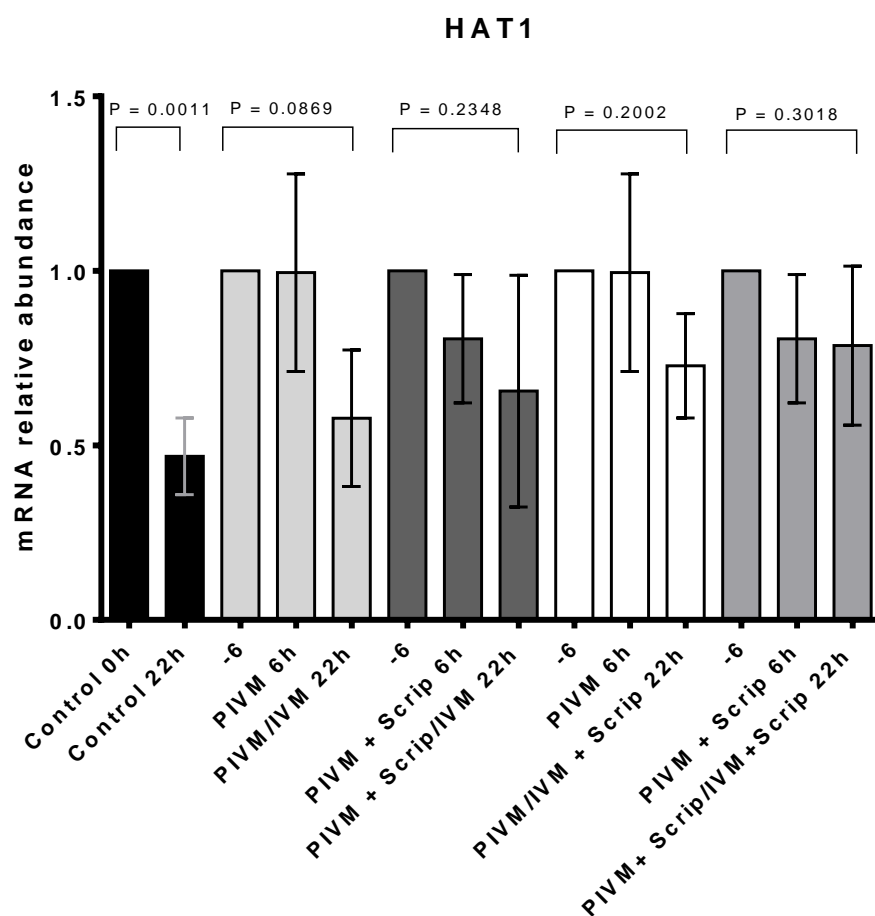
Table 3. Meiotic stage at 8 , 14 and 22 h of maturation of oocytes from the control group (no prematuration and no scriptaid) and of oocytes that had been submitted to a prematuration (IVM) for 6 h with 100nM of Type C natriuretic peptide added or not of 500nM scriptaid (Scrip) and then were matured (IVM) in medium supplemented with or without 500nM scriptaid

Treatment	N	Stages of Maturation			
		GV	GVBD	MI, AI, TI	MII
Control 8h IVM	73	21(28.8%) ^a	41(56.2%) ^a	11(15.1%) ^d	0(0) ^b
Control 14h IVM	42	0(0) ^b	0(0) ^e	42(100%) ^a	0(0)
6h PIVM + 8h IVM	44	0(0) ^b	7(15.9%) ^{bc}	37(84.09%) ^b	0(0)
6h PIVM c/ Scrip + 8h IVM	49	0(0) ^b	5(10.2%) ^{cd}	44(89.7%) ^b	0(0)
6h PIVM + 8h IVM c/ Scrip	45	1(2.2%) ^{bc}	4(8.9%) ^{cd}	40(88.9%) ^b	0(0)
6h PIVM c/ Scrip + 8h IVM c/ Scrip	67	5(7.5%) ^b	20(29.9%) ^b	42(62.7%) ^c	0(0)
Control 22h IVM	57	0(0) ^c	0(0) ^e	2(3.5%) ^e	55(96.49%)
6h PIVM + 22h IVM	48	0(0) ^b	0(0) ^e	2(4.2%) ^e	46(95.8%)
6h PIVM c/ Scrip + 22h IVM	52	0(0) ^c	0(0) ^e	4(7.7%) ^{de}	48(92.3%)
6h PIVM + 22h IVM c/ Scrip	54	0(0) ^c	0(0) ^e	2(3.7%) ^e	52(96.3%)
6h PIVM c/ Scrip + 22h IVM c/ Scrip	53	0(0) ^c	0(0) ^e	4(7.5%) ^{de}	47(88.7%)

717 ^{a,b,c,d,e} Different letters in the same column differ statistically from each other by the Chi-square test
718 (P<0.05).

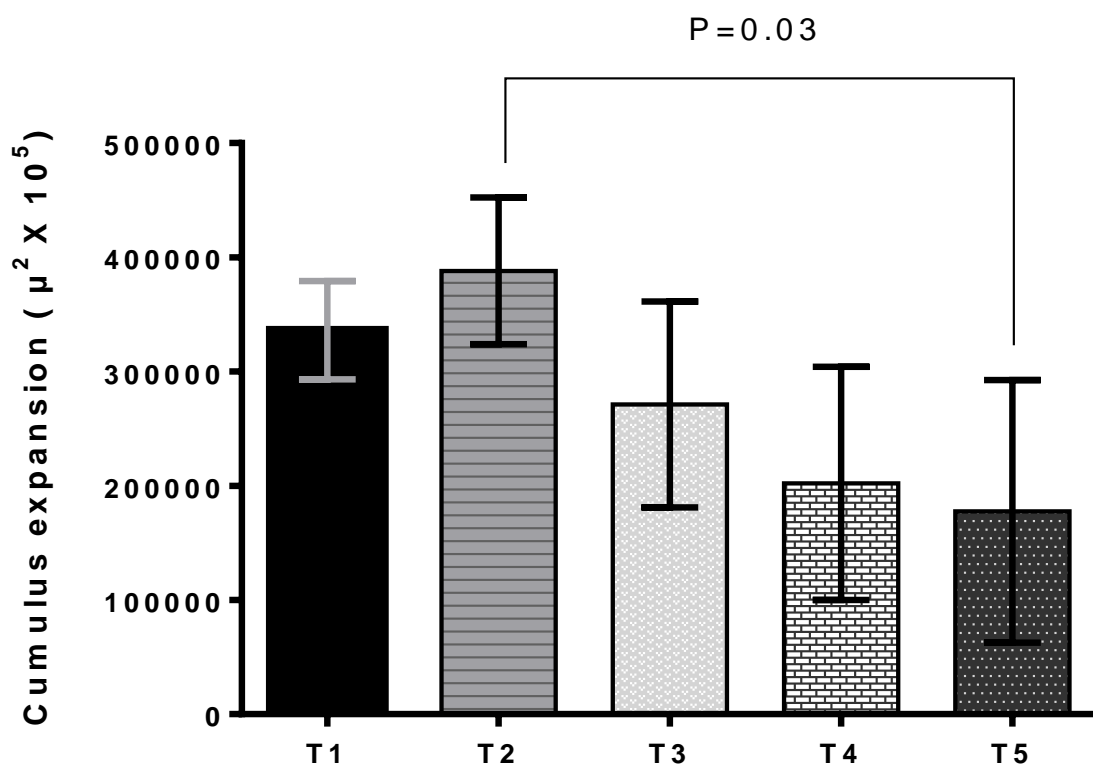
719 GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle break; MI, metaphase I; MII, metaphase II; TI,
720 telophase I, MII; metaphase II

721



722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734

Figure 1 Transcripts levels of *HAT1* quantified by RT-PCR of bovine oocytes indifferent treatment groups. When the treatments were submitted to pre-maturation, we used the -6 legend to represent the control group 0 h. PIVM 6 h corresponds to oocytes that were submitted to pre-maturation for 6 h, PIVM + Scrip 6 h corresponds to oocytes submitted to pre-maturation with scriptaid for 6 h, PIVM / IVM 22 h corresponds to the oocytes that were pre-maturated and later matured in MIV medium for 22 h, PIVM + Scrip / 22 h IVM corresponded to oocytes submitted to pre-maturation with scriptaid and then matured for 22 h, PIVM + Scrip/IVM + Scrip corresponds to oocytes that underwent pre-maturation and maturation with addition of scriptaid.



735
 736 Figure 2 Expansion area of cumulus-oocyte complexes submitted to maturation (IVM) for
 737 22 h (T1), pre-maturation (PIVM) for 6 h plus IVM for 22 h (T2), PIVM with scriptaid for
 738 6 h plus IVM 22 h (T3), PIVM for 6 h plus MIV with scriptaid for 22 h (T4), PIVM for 6 h
 739 with scriptaid plus MIV 22 h with scriptaid (T5). Data are expressed as mean \pm standard
 740 deviation and were analyzed by ANOVA and then compared by the Tukey test at the 0.05
 741 level of significance. The data were obtained from the value of the initial mean area (0 hour)
 742 of the cumulus-oocyte-complexes (CCOs) subtracted from the value of the final mean area
 743 of the CCOs after IVM (22 h).

744

745

Table 4 Effect of addition of scriptaid on PIVM and/or IVM on the rate of cleavage (D6) and rate of blastocysts in D6 and D7 on development of bovine embryos produced *in vitro*

Treatments	N	Cleaved	Blastocyst D6	Blastocyst D7
T1	236	202(85.6%)	24(10.2%) ^a	82(34.7%) ^{ab}
T2	190	145(76.3%)	12(6.3%) ^a	71(37.4%) ^a
T3	203	154(75.9%)	3(1.5%) ^b	65(32.0%) ^b
T4	207	152(73.4%)	2(1.0%) ^b	47(22.7%) ^c
T5	177	136(76.8%)	3(1.7%) ^b	32(18.1%) ^c

746 ^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant difference by Chi-Square test (P<0.05)

747 T1: Cumulus-oocyte complexes (COCs) submitted to maturation (IVM) for 22 h

748 T2: COCs submitted to pre-maturation (PIVM) for 6 h plus IVM for 22 h

749 T3: COCs submitted to PIVM with scriptaid for 6 h plus IVM 22 h

750 T4: COCs submitted to PIVM plus IVM with scriptaid for 22 h

751 T5: COCs submitted to PIVM with scriptaid plus IVM with scriptaid for 22 h

752

Table 5 Effect of the addition of 500nM of Scriptaid during pre-maturation (PIVM) and/or maturation (IVM) on the amount of cells of the internal cell mass (ICM) and trophoectoderma (TE)

Treatment	N	Total Cells	TE	%TE	ICM	%ICM
T1	39	192.59 ^a	133.10	69.04	59.49	30.96
T2	39	178.79 ^{ab}	121.67	67.93	57.13	32.07
T3	32	189.53 ^a	133.31	74.54	56.22	29.53
T4	30	178.10 ^{ab}	124.60	73.91	53.50	30.30
T5	30	161.53 ^b	113.67	69.99	47.87	30.01

753 ^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant difference by ANOVA (P<0.05).

754 When the data did not follow normality were analyzed by Kruskal Wallis.

755 T1: Cumulus-oocyte complexes (COCs) submitted to maturation (IVM) for 22 h

756 T2: COCs submitted to pre-maturation (PIVM) for 6 h plus IVM for 22 h

757 T3: COCs submitted to PIVM with scriptaid for 6 h plus IVM 22 h

758 T4: COCs submitted to PIVM plus IVM with Scriptaid for 22 h

759 T5: COCs submitted to PIVM with scriptaid plus IVM with scriptaid for 22 h

760

761 Table 6 Effect of addition of scriptaid on PIVM of less competent oocytes (obtained from
 762 1-3 mm follicles) on the rate of cleavage (D2) and rate of blastocysts in D6 and D7 on
 763 development of bovine embryos produced *in vitro*

Treatments	N	Cleavage	Blastocyst D6	Blastocyst D7
T1	100	83(83%) ^a	13(13%) ^a	34(34%) ^a
T2	71	50(69%) ^{ab}	2(3%) ^b	13(18%) ^b
T3	104	83(80%) ^a	4(4%) ^b	34(33%) ^a
T4	114	83(73%) ^a	3(3%) ^b	35(31%) ^a
T5	63	32(45%) ^{bc}	1(2%) ^b	8(13%) ^b
T6	67	39(56%) ^b	1(1%) ^b	9(13%) ^b

764 ^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant difference by Chi-Square test (P <0.05)

765 T1: Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from follicles of 3-8mm submitted to maturation
 766 (IVM) for 22 h

767 T2: COCs obtained from follicles of 1-3mm submitted to IVM for 22 h

768 T3: COCs obtained from of 3-8mm submitted to PIVM plus IVM 22 h

769 T4: COCs submitted from of 3-8mm submitted to PIVM with scriptaid plus IVM 22 h

770 T5: COCs submitted from of 1-3mm submitted to PIVM plus IVM 22 h

771 T6: COCs submitted from of 1-3mm submitted to PIVM with scriptaid plus IVM 22 h

772

Table 7 Effect of the addition of scriptaid during PIVM of less competent oocytes (obtained from 1-3 mm follicles) on the amount of cells of the internal cell mass (ICM) and trophoectoderma (TE)

Treatment	N	Total cells	TE	%TE	ICM	%ICM
T1	19	131	88	70	35	30
T2	17	136	93	77	34	23
T3	21	122	82	62	35	38
T4	19	140	96	71	35	28
T5	7	115	79	70	46	30
T6	14	122	81	74	39	25

^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant difference by Chi-Square test (P<0.05)

773

T1: Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from follicles of 3-8mm submitted to maturation (IVM) for 22 h

774

T2: COCs obtained from follicles of 1-3mm submitted to IVM for 22 h

775

T3: COCs obtained from of 3-8mm submitted to PIVM plus IVM 22 h

776

T4: COCs submitted from of 3-8mm submitted to PIVM with scriptaid plus IVM 22 h

777

T5: COCs submitted from of 1-3mm submitted to PIVM plus IVM 22 h

778

T6: COCs submitted from of 1-3mm submitted to PIVM with scriptaid plus IVM 22 h

779