

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO
REMODELAMENTO DA CROMATINA EM EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* A PARTIR DE
OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIAS
PEQUENOS E GRANDES**

TESE DE DOUTORADO

Guilherme de Medeiros Bastos

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO
REMODELAMENTO DA CROMATINA EM EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* A PARTIR DE
OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS
PEQUENOS E GRANDES**

por

Guilherme de Medeiros Bastos

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador : Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2006

B327d Bastos, Guilherme de Medeiros, 1974-

Detecção de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina em embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos e grandes / por Guilherme de Medeiros Bastos ; orientador Paulo Bayard Dias Gonçalves, Vilceu Bordignon, co-orientador. – Santa Maria, 2006
117 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2006.

1. Medicina veterinária 2. Oócito 3. Tamanho folicular 4. Potencial de desenvolvimento 5. HMG2 6. Ac.H3K14 7.γH2A.X I. Gonçalves, Paulo Payard Dias , orient. II. Bordignon, Vilceu, co-orient. III. Título

CDU: 619:636.2.08

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO
REMODELAMENTO DA CROMATINA EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* A PARTIR DE OÓCITOS ORIUNDOS DE
FOLÍCULOS ANTRAIIS PEQUENOS E GRANDES**

elaborada por

Guilherme de Medeiros Bastos

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Vilceu Bordignon (McGill)
(Co-orientador)

Marcelo Marcondes Seneda (UEL)

João Carlos Deschamps (UFPEL)

Kátia Padilha Barreto (UFSM)

Santa Maria, 26 de junho de 2006.

Esse trabalho é dedicado aos meus pais Otoni Tarrago Martins Bastos Filho e Maria Teresa de Medeiros Bastos e a minha esposa Luciana e filha Maria Eduarda.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por tudo.

Aos meus pais, Otoni Tarrago Martins Bastos Filho e Maria Teresa de Medeiros Bastos, a quem me faltam palavras para agradecer o apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, carinho e esforços que tornaram possível mais essa conquista. Eles são meu porto seguro e exemplo de vida.

À minha esposa Luciana e filha Maria Eduarda, por tudo que representam na minha vida e por me incentivar e acompanhar por onde quer que eu ande sem objeções, enfrentado comigo todos os desafios inerentes ao nosso aprimoramento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves pela dedicada orientação, ensinamentos, paciência, mas, sobretudo pela confiança e oportunidades concedidas que possibilitaram minha formação científica e crescimento pessoal, com reflexo direto na minha qualidade de vida e de minha família.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Vilceu Bordignon a quem me faltam palavras para expressar toda gratidão pela oportunidade concedida, amizade, dedicada orientação, ensinamentos, mas, sobretudo pelo exemplo de cordialidade, serenidade, grande humildade pessoal e competência profissional.

À família Bordignon, pela forte amizade e ajuda durante nossa permanência no Canadá. Nunca esqueceremos a forma carinhosa com que fomos recebidos, parecendo que éramos amigos de longa data e que há muito tempo não se encontravam, embora nunca tivéssemos nos conhecido anteriormente nessa existência. Finalmente, pelo exemplo de harmonia em família e cultivo dos valores que consideramos realmente importantes para nossa evolução.

Ao Prof. Dr. João Francisco Coelho de Oliveira pela amizade, confiança, convivência e ensinamentos transmitidos.

À amiga Izabel Moreira (*In Memorium*) pelas transformações pessoais que me possibilitaram vencer a si mesmo e grandes obstáculos inerentes à vida.

As estagiárias Fernanda e Janandra pela amizade e colaboração na execução dos experimentos.

Ao colega e amigo José Francisco Manta Bragança e sua família pela amizade, companheirismo e convívio agradável.

Ao colega Rogério Ferreira pela ajuda na análise estatística dos dados desta tese.

Ao amigo Edmir Nicola e sua família pela ajuda e amizade.

Ao colega Fabiano dos Santos pelos ensinamentos transmitidos referentes à técnica de fertilização in vitro.

Aos bolsistas de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do BioRep pelo convívio e colaboração.

À todos os meus contemporâneos do laboratório B043 da McGill University, em especial à laboratorista Limei Che e aos estagiários mexicanos Victor Absalon Medina e Gabriela Benavides pela ajuda e convívio agradável.

À UFSM e McGill University pelas oportunidades e condições de trabalho que proporcionaram minha formação científica.

À CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos concedidas durante minha permanência no Brasil e Canadá, respectivamente.

Ao CNPq, FAPERGS e NSERC/Canadá pelo suporte financeiro para a implementação dos experimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
Dinâmica do crescimento folicular na espécie bovina	18
Interação entre o diâmetro folicular e o crescimento do oócito sobre a competência meiótica e capacitação para suportar o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	20
Evidências de que o tamanho folicular interfere na competência meiótica e na capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos	22
Outros aspectos relacionados à capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos.....	24
Estrutura e função dos nucleossomos	29
Modificações epigenéticas das proteínas histonas	30
Fosforilação da histona H2A.X versus integridade do DNA	31
Dinâmica de acetilação das histonas durante o desenvolvimento embrionário precoce	35
Proteínas do grupo de alta mobilidade e suas funções biológicas	38
CAPÍTULO 1: Developmental competence and immunocytochemical expression profile of High-Mobility Group N2 and Acetylated Histone H3 (Lysine 14) in parthenogenetic bovine embryos produced from oocytes collected from small and large follicles	43
CAPÍTULO 2: Immunolocalization of phosphorylated histone H2A.X in early bovine embryos derived of oocytes collected from small and large follicles	71

DISCUSSÃO	98
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Developmental competence of parthenogenetically activated bovine oocytes derived from small or large antral follicles.....	64
TABELA 2 – Average number of nuclei in bovine embryos produced from parthenogenetically activated oocytes derived from small or large antral follicles.....	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - Fluorescence microscope image of High-Mobility-Group N2 protein (HMGN2) and Acetylated Histone H3K14 (Lysine 14) proteins in bovine embryos fixed at 50 hr after parthenogenetic activation.....66
- FIGURA 2 - Rates of High-Mobility-Group N2 (HMGN2) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles.....67
- FIGURA 3 - Rates of High-Mobility-Group N2 (HMGN2) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr after PA).....68
- FIGURA 4 - Rates of Acetylated Histone H3 positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles.....69
- FIGURA 5 - Rates of Acetylated Histone H3 positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr after PA).....70

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Fluorescence microscope image and subjective immunostaining quantification of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) in in vitro fertilized bovine embryos fixed at 42 hr after co-incubation oocytes/spermatozoa.....91
- FIGURA 2 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles.....92

FIGURA 3 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr).....	93
FIGURA 4 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the number of embryonic nuclei (< 4 N or ≥ 4 N).....	94
FIGURA 5 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles.....	95
FIGURA 6 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 32 hr or > 32 hr).....	96
FIGURA 7 - Rates of Phosphorylated Histone H2A.X staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the number of embryonic nuclei (< 4 N or ≥ 4 N).....	97

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO REMODELAMENTO DA CROMATINA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* A PARTIR DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS PEQUENOS E GRANDES

AUTOR: GUILHERME DE MEDEIROS BASTOS
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de junho de 2006.

Tem sido demonstrado que oócitos de várias espécies adquirem capacidade para completar a maturação meiótica e suportar o desenvolvimento embrionário durante os estágios finais do crescimento folicular. Com o objetivo de investigar diferenças moleculares entre embriões bovinos produzidos a partir de oócitos derivados de folículos pequenos (1-2 mm) e grandes (4-8 mm), dois experimentos foram delineados visando identificar por imunocitoquímica a presença de três fatores reguladores da cromatina envolvidos principalmente nos processos de transcrição e reparo do DNA. No primeiro experimento, foi investigado se o perfil de expressão das proteínas (do inglês) *High-Mobility Group N2* (HMGN2) e histona H3 acetilada na lisina 14 (Ac.H3K14) seria alterado pela origem dos oócitos (folículos pequenos vs. folículos grandes) e pelo tempo necessário para realizar a primeira clivagem (<24 h vs. >24 h) após ativação partenogenética (AP). Embriões clivados cedo (até 24 h) e tarde (após 24 h) foram fixados às 36, 50, 60, 70 e 80 h após AP e processados para detectar a HMGN2 ou Ac.H3K14. Os percentuais de maturação nuclear (81% vs. 59%), clivagem cedo (47% vs. 39%) e blastocisto (34% vs. 19%) foram significativamente maiores ($P<0,05$) nos oócitos oriundos de folículos grandes em comparação aos de folículos pequenos. Os percentuais de núcleos positivos para Ac.H3K14 (61% vs. 38%) e HMGN2 (74% vs. 56%) às 60 h após AP foram maiores ($P<0,05$) nos embriões produzidos a partir de oócitos de folículos pequenos comparado aos de folículos grandes. Entretanto, um maior percentual de núcleos positivos para HMGN2 (94% vs. 75%; $P<0,05$) foi detectado em embriões produzidos com oócitos de folículos grandes às 80 h após a AP. Concluiu-se que a proporção de núcleos com sinal positivo para HMGN2 e Ac.H3K14 é dependente do tamanho dos folículos e do tempo transcorrido para os oócitos realizarem a primeira clivagem. No segundo experimento, foi investigado se o perfil de fosforilação da proteína histona H2A.X (γ H2A.X), que é um indicador de rompimento da cadeia dupla do DNA, seria diferente em embriões produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos pequenos ou grandes. Os oócitos foram submetidos à AP ou fertilização *in vitro* (FIV) por 18 h e, então, cultivados. A clivagem foi avaliada 24 e 36 h após a AP e 32 e 42 h após FIV. Os embriões clivados foram fixados 36 h após AP e 42 h após FIV, e então processados para detectar a presença da γ H2A.X. A maioria dos embriões produzidos a partir de oócitos submetidos à AP e FIV apresentou quantidades detectáveis de γ H2A.X, variando entre poucos focos até um sinal completamente difuso no núcleo. A γ H2A.X foi detectada em 64% vs. 76% ($P<0,05$) dos núcleos dos embriões ativados e em 76% vs. 80% ($P<0,05$) dos núcleos dos embriões de FIV produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos pequenos e grandes, respectivamente. Embriões oriundos de FIV que apresentaram número <4 núcleos às 42 h tiveram maiores percentuais ($P<0,05$) de núcleos positivos para γ H2A.X (89% e 85%) do que os que apresentaram número ≥ 4 núcleos (72% e 62%, respectivamente para folículos pequenos e grandes). Foi demonstrado que a γ H2A.X é altamente detectada mas não é diferentemente expressa em embriões bovinos produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos pequenos e grandes e submetidos à AP ou FIV. Em geral, os experimentos demonstraram que as proteínas HMGN2, Ac.H3K14 e γ H2A.X são expressas durante o desenvolvimento embrionário precoce em bovinos.

Palavras-chave: oócito, tamanho folicular, potencial de desenvolvimento, HMGN2, Ac.H3K14, γ H2A.X

ABSTRACT

Doctoration Thesis
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETECTION OF PROTEINS INVOLVED IN CHROMATIN REMODELING OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED FROM OOCYTES DERIVED FROM SMALL AND LARGE ANTRAL FOLLICLES

AUTHOR: GUILHERME DE MEDEIROS BASTOS
ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Date and Local of the Defense: Santa Maria, June 26th, 2006.

It has been demonstrated that oocytes of several species acquire the capacity to complete meiotic maturation and support early embryonic development during the final stages of follicular growth. Aiming to investigate molecular differences between bovine embryos produced from oocytes derived from small (1 to 2-mm) and large (4 to 8-mm) follicles, two experiments were designed to evaluate by immunocytochemistry the presence on chromatin of three regulatory factors involved mainly in DNA transcription and repair. In the first experiment, we evaluated whether the expression pattern of the High-Mobility Group N2 (HMGN2) and acetylated histone H3 Lysine 14 (Ac.H3K14) were affected by the origin (from small vs. large follicles) and time of first cleavage (< 24 h vs. > 24 h) of parthenogenetically activated (PA) oocytes. Early (until 24 hr) and late (after 24 hr) cleaved embryos were fixed at 36, 50, 60, 70 and 80 h after PA and processed to detect HMGN2 or Ac.H3K14. The rate of nuclear maturation (81% vs. 59%), early cleavage (47% vs. 39%), and blastocyst (34% vs. 19%) were significantly higher ($P < 0.05$) in oocytes from large compared to small follicles. The rate of Ac.H3K14 (61% vs. 38%) and HMGN2 (74% vs. 56%) positively stained nuclei at 60 h post PA was higher ($P < 0.05$) in embryos derived from small compared to large follicles. However, more HMGN2 positively stained nuclei (94% vs. 75%; $P < 0.05$) were detected in embryos from large follicles at 80 h post PA. We concluded that the temporal proportion of embryonic nuclei with positive signal to HMGN2 and Ac.H3K14 is affected by both follicle size and time to complete first cleavage of oocytes. In the second experiment, we investigated whether the expression pattern of the phosphorylated histone H2A.X (γ H2A.X) protein, which is an indicator of DNA double-strand breaks, is different in embryos produced from oocytes derived from small or large follicles. Oocytes were PA or in vitro fertilized (IVF) for 18 h and then cultured. Cleavage was assessed at 24 and 36 h after PA and at 32 and 42 h after IVF. Cleaved embryos were fixed at 36 h after PA and 42 h after IVF, and then processed to detect the γ H2A.X. Most of the cleaved embryos produced from PA and IVF oocytes had detectable amounts of γ H2A.X, ranging from few foci to a complete diffuse staining of the nuclei. γ H2A.X was detected in 64% vs. 76% ($P < 0.05$) of nuclei in PA embryos and in 76% vs. 80% ($P > 0.05$) of nuclei in IVF embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively. IVF embryos presenting less than 4 nuclei at 42 h showed higher rates ($P < 0.05$) of γ H2A.X positive nuclei (89% and 85%) than those with ≥ 4 nuclei (72% and 62%, for large and small follicles, respectively). We found that γ H2A.X is highly detected but not differently expressed in early bovine embryos produced from PA and IVF oocytes derived from small and large follicles. In general, the present experiments demonstrate that HMGN2, Ac.H3K14 and γ H2A.X proteins are expressed during early bovine embryogenesis.

Key Words: oocyte, follicle size, developmental potential, HMGN2, Ac.H3K14, γ H2A.X

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) de espécies domésticas desempenha um papel importantíssimo tanto no que diz respeito à geração de conhecimentos pela sua aplicação em diversos tipos de pesquisa, como pela sua utilização em clínicas de reprodução humana e multiplicação de animais de elevado valor zootécnico.

O primeiro animal da espécie bovina oriundo de um oócito maturado *in vitro* nasceu há mais de 15 anos (BRACKETT et al., 1982). Desde então, os resultados de pesquisa não têm demonstrado um incremento significativo na eficácia da produção *in vitro* de blastocistos bovinos, cuja média está em torno de 30 a 40%, considerando-se o número total de oócitos submetidos inicialmente à maturação e fertilização (XU et al., 1992; HYTTEL et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 2000; RIZOS et al., 2002a).

Inúmeros experimentos tentaram identificar as causas dessa baixa eficácia, sendo que a maioria baseou-se em alguma alteração nos meios e condições de maturação e/ou fertilização dos oócitos e cultivo dos embriões, porém com limitado sucesso, embora os resultados tenham gerado benefícios no que tange a simplificação dos sistemas de PIV de embriões. Entre os achados, muitos experimentos demonstraram que a competência meiótica (maturação nuclear) e a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos estão diminuídas quando obtidos a partir de folículos menores de 2 mm em diâmetro (PAVLOK et al., 1992; BLONDIN & SIRARD, 1995). Essa limitação tem sido atribuída ao fato de que oócitos bovinos apenas completam seu crescimento (120-130 μm) quando os folículos antrais atingem um diâmetro aproximado de 3 mm (HYTTEL et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 2000; FAIR, 2003) e que durante essa fase ainda apresentam uma intensa transcrição de genes e tradução dos transcritos em proteínas, as quais o proporcionam (ao término do crescimento) “competência meiótica” (para maturação) e “capacidade” de ser fecundado e suportar as sucessivas clivagens até o momento da ativação do genoma embrionário (AGE). Foi demonstrado que a AGE em embriões bovinos ocorre em torno do quarto ciclo celular, coincidindo geralmente com o estágio de 8-16 células (TELFORD et al., 1990; BARNES & FIRST, 1991) e tem sido apontada como o período crítico de bloqueio do desenvolvimento embrionário, já que a maioria dos

embriões não ultrapassa o estágio de 4-8 células quando cultivados *in vitro* (MEIRELLES et al., 2004).

Sabe-se que as proteínas histonas e suas formas variantes, constituintes básicos da cromatina de todas as células, são alvo de várias modificações epigenéticas e outros mecanismos ainda pouco conhecidos que determinam funções celulares como transcrição, replicação e reparo do DNA (SANTOS & DEAN, 2004). Essas modificações são desencadeadas, em sua maioria, por proteínas/enzimas ainda pouco conhecidas. Embora muitas dessas modificações já tenham suas funções celulares bem determinadas, elas não têm sido investigadas na tentativa de justificar a maior ou menor capacidade de desenvolvimento embrionário de diferentes populações de oócitos.

Dentre as modificações epigenéticas conhecidas, a acetilação da histona H3 (Ac.H3) tem sido apontada como um dos mecanismos que modulam o estado permissivo da cromatina a ligação de moléculas que desempenham importantes funções celulares como transcrição gênica (LEE et al., 1993). Em embriões, sabe-se que o estado reversível de acetilação e deacetilação da porção-terminal de algumas histonas é dependente do estágio do desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2003). No entanto, ainda não foi determinado se embriões com diferentes potenciais para atingir o estágio de blastocisto *in vitro* apresentam alguma diferença em relação a essas modificações (acetilação e deacetilação) durante o desenvolvimento embrionário precoce.

Outra modificação epigenética importante é a fosforilação da histona variante H2A.X, originando uma forma alternativa dessa proteína fosforilada que passa a ser denominada γ H2A.X (ROGAKOU et al., 1998). Foi demonstrado que a fosforilação da H2A.X ocorre rapidamente em resposta a qualquer dano no DNA envolvendo rompimento de sua cadeia dupla (RCD) e a ela tem sido atribuída a função de atrair e concentrar (local do RCD) moléculas envolvidas no mecanismo de reparo do DNA (ROGAKOU et al., 1998). Embora a detecção dos níveis de γ H2A.X já tenha sido descrita em vários tipos celulares e em diversas condições experimentais, apenas um estudo (CHE et al., 2005) demonstrou sua expressão em embriões mamíferos (espécie suína). Desta forma, considerou-se a importância de se investigar também a presença da γ H2A.X em embriões bovinos, bem como a hipótese de que a expressão dessa forma fosforilada da H2A.X

poderia estar relacionada, de alguma forma, à capacidade de desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*.

A cromatina também é constituída por um segundo tipo de proteínas estruturais, não-histonas, chamadas (do inglês) *High-Mobility-Group Proteins* (HMGs). As HMGs atuam como co-fatores em processos nucleares básicos como a transcrição gênica, ligando-se a cromatina de forma reversível para alterar sua conformação e possibilitar ou facilitar a ação cooperativa com outras proteínas/enzimas que executam os referidos processos celulares de forma mais direta (JOHNS, 1982; GROSSCHEDL et al., 1994).

Dessa forma, foi investigada por imunocitoquímica a presença das proteínas Ac.H3K14, HMGN2 e γ H2A.X na cromatina de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos coletados de folículos antrais pequenos ou grandes, com relação à capacidade de desenvolvimento desses embriões. A presença das referidas proteínas também foi avaliada de acordo com o tempo necessário para os oócitos concluírem sua primeira clivagem, bem como a velocidade das clivagens subseqüentes, medida pelo número de núcleos de cada embrião em determinados períodos do desenvolvimento.

O objetivo deste estudo foi pesquisar possíveis diferenças na capacidade de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos ou grandes, com base na expressão das proteínas Ac.H3K14, HMGN2 e γ H2A.X, visando conhecer melhor os fatores e mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário precoce.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dinâmica do crescimento folicular na espécie bovina

Para se compreender melhor os fatores biológicos envolvidos na produção de embriões “*in vitro*”, torna-se fundamental o conhecimento da dinâmica de crescimento dos folículos ovarianos e suas interações com o oócito contido no seu interior. Até a década de 80, os estudos sobre a dinâmica folicular na fêmea bovina eram realizados basicamente mediante observação visual de ovários obtidos em matadouro e, também, através de algumas técnicas de histologia (RAJAKOSKI, 1960). A partir daí, PIERSON & GINTHER (1984) relataram pela primeira vez o uso da ultra-sonografia em tempo real no estudo das funções ovarianas da fêmea bovina, demonstrando que o desenvolvimento dos folículos durante o ciclo estral ocorre seguindo um padrão de ondas. Constataram também que 95% dos ciclos estrais são constituídos por duas ou três ondas de crescimento folicular, embora ciclos com uma ou quatro ondas tenham sido encontrados (SANTOS, 1993).

Cada onda de crescimento folicular caracteriza-se por uma seqüência dinâmica e contínua de eventos. Eles iniciam com o crescimento sincronizado de diversos folículos entre 4 e 8mm de diâmetro, seguido pela seleção, divergência e, finalmente, dominância de um grande folículo. Em fêmeas bovinas, esse padrão de ondas de crescimento folicular tem início ao redor da segunda semana após o nascimento da terneira, estendendo-se por todas as fases reprodutivas, inclusive durante o período pré-púbere, gestação e no pós-parto (BÓ et al., 2000). O início do desenvolvimento folicular ocorre ainda durante a vida fetal (ERICKSON, 1966) e folículos terciários (antrais) já podem ser visualizados nos ovários de fetos bovinos a partir dos 210 dias de gestação (CARAMBULA et al., 1999).

O número de ondas de crescimento folicular parece estar intimamente relacionado com a duração dos ciclos estrais. Ciclos com três ondas tendem ser mais longos em relação ao de duas ondas (SANTOS, 1993). Em ciclos com duas ondas, a emergência da primeira onda de crescimento folicular inicia no dia do cio ou da ovulação (dia 0) e o folículo dominante oriundo dessa onda pára de crescer em torno do dia 6 do ciclo, sofrendo atresia em torno do 13º dia. Nesse intervalo de tempo, aproximadamente entre os dias 8 ou 12 do

ciclo, ocorre a emergência da segunda onda. Em ciclos de três ondas, a emergência da segunda onda ocorre em torno dos dias 8 ou 9 do ciclo e a terceira a partir do dia 15 (FORTUNE, 1993; MAPLETOFT et al., 2000). Independentemente do número de ondas durante um ciclo estral, o folículo dominante presente no início da luteólise será o folículo ovulatório e a emergência de uma nova onda somente ocorrerá após a ovulação (FORTUNE, 1993; MAPLETOFT et al., 2000).

A partir da ativação dos folículos, o FSH (hormônio folículo estimulante) é responsável por completar a emergência da onda folicular, caracterizando a fase de recrutamento folicular, ao proporcionar o crescimento de folículos com diâmetro aproximado de 4 mm (FORTUNE, 1993; GINTHER et al., 1996) que continuam a crescer até atingir 7-8 mm.

Em seguida, tem início a fase de “seleção funcional” do folículo dominante, que além do FSH, envolve o sistema intra-folicular de IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) e suas proteínas de ligação (IGFBPs), as quais impedem a ligação das IGFs nos seus receptores e, conseqüentemente, a ação dessas proteínas no crescimento e diferenciação folicular. Na seqüência, dois ou três dias após a emergência da onda, o folículo dominante e os seus subordinados começam a divergir em tamanho, caracterizando a fase da divergência folicular, ou seja, o folículo evolui para “seleção morfológica”. Essa fase é caracterizada pelo aumento de tamanho do folículo e altas concentrações de estradiol no fluido folicular (FORTUNE et al., 2001). Da mesma forma, os pulsos de FSH declinam abruptamente mediante um feedback negativo dos hormônios estradiol e inibina produzidos pelo folículo dominante, impedindo temporariamente a emergência de uma nova onda (ADAMS et al., 1992b). Esses hormônios atuam diretamente na adenohipófise, impedindo a liberação de FSH mediante a diminuição da expressão do gene que codifica para a subunidade beta do FSH, com conseqüente redução da transcrição e da estabilidade do RNAm (ROCHE, 1996).

Nesse momento, o IGF (livre de suas proteínas de ligação) é responsável por manter o desenvolvimento e a viabilidade folicular, mesmo em baixas concentrações de FSH (RIVERA & FORTUNE, 2001), até que ocorra a liberação de LH em pulsos de alta freqüência para desencadear a ovulação. Provavelmente, outros fatores de crescimento

também estejam envolvidos como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (BURATINI et al., 2006).

Interação entre o diâmetro folicular e o crescimento do oócito sobre a competência meiótica e capacitação para suportar o desenvolvimento embrionário *in vitro*

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas da maturação e fecundação dos oócitos e o cultivo dos embriões. Em condições apropriadas e utilizando-se oócitos de fêmeas adultas, oriundos de folículos de 3-8 mm, obtêm-se, em média, 30 a 40 % de blastocistos (RIZOS et al., 2002a). Essa limitação da PIV tem sido atribuída, em parte, a heterogênea população de oócitos obtida desses folículos (para revisão, HYTTEL et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 2000).

Em bovinos, o crescimento do oócito pertencente a um folículo primordial tem início a partir do diâmetro de 30 μm até atingir 120-130 μm , coincidindo com o momento em que os folículos antrais atingem um diâmetro aproximado de 3mm, ou seja, antes da fase de recrutamento folicular (para revisão, HYTTEL et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 2000; FAIR, 2003). Durante o crescimento do oócito ocorre uma intensa transcrição de genes e tradução dos transcritos em proteínas, as quais proporcionam ao oócito “competência meiótica” (para maturação) e “capacidade” de ser fecundado e suportar as sucessivas clivagens até o momento da ativação do genoma embrionário (AGE; estágio de 8-16 células; TELFORD et al., 1990; BARNES & FIRST, 1991). O termo competência meiótica pode ser definido como a capacidade do oócito em completar sua maturação nuclear, ou seja, reiniciar a meiose desde o estágio de vesícula germinativa (sair do bloqueio da prófase I) até atingir o estágio de metáfase II.

À medida que o oócito aumenta seu diâmetro, várias organelas se modificam, proliferam e são redistribuídas no citoplasma. A exemplo disso, ocorre o aparecimento do espaço perivitelínico, diminuição do número de retículo endoplasmático liso e rugoso livres no ooplasma e algumas organelas como as mitocôndrias, complexo de golgi, grânulos corticais, bem como o núcleo, migram para a periferia do oócito (FAIR et al., 1997a,b). Próximo ao final da fase de crescimento do oócito, a função do nucléolo é inativada (FAIR

et al., 1996) e ocorre uma diminuição na atividade transcricional do gameta (CROZET et al., 1986).

Os estudos conduzidos por HYTTEL et al. (1997) demonstraram que um oócito com diâmetro de 100 μ m é competente para o reinício da meiose, no entanto, a competência para atingir o estágio de MII (completa maturação nuclear) e suportar o desenvolvimento embrionário é adquirida ao atingir o diâmetro aproximado de 110 μ m. Portanto, a maioria dos oócitos oriundos de folículos menores de 2-3 mm é considerada “incompetente” para o reinício da meiose e “praticamente incapaz” de atingir o estágio de blastocisto *in vitro* (PAVLOK et al., 1992).

A capacidade do oócito em reassumir a meiose está associada com a atividade do maturation-promotin factor (MPF) que é formado por duas sub-unidades chamadas de ciclina B e p34^{cdc2} (GAUTIER et al., 1990; TAIEB et al., 1997). Já foi demonstrado que a ativação do MPF é espécie-específica (YAMASHITA et al., 2000). No camundongo, por exemplo, a aquisição da competência meiótica é parcialmente associada à síntese da p34^{cdc2} (CHESNEL & EPPIG, 1995; KANATSU-SHINOHARA et al., 2000). Em caprinos, tanto o RNAm quanto a proteína ciclina B1 têm sido detectados em oócitos competentes e incompetentes para o reinício da meiose (HUE et al., 1997), entretanto, apenas o RNAm que codifica a proteína p34^{cdc2} foi encontrado em oócitos incompetentes (DEDIEU et al., 1998). Contrariamente a isso, ambos componentes do MPF estão presentes no oócito suíno (CHRISTMANN et al., 1994), indicando que a parada da meiose nessa espécie também é controlada por outros mecanismos. No bovino, foi demonstrado que a proteína ciclina B não está presente no oócito imaturo (LÉVESQUE & SIRARD, 1996; ROBERT et al., 2002), somente na forma de RNAm, cuja concentração diminui a medida que transcorre o crescimento folicular (ROBERT et al., 2000). Em um estudo recente, ROBERT et al. (2002) constataram que ambos componentes do complexo MPF são expressos na forma de RNAm em oócitos imaturos (VG), porém, p34^{cdc2} é a única proteína formadora do MPF encontrada nesse estágio. Isso indica que o reinício da meiose em oócitos bovinos pode ser regulado de forma diferente das demais espécies de mamíferos, provavelmente através da tradução do RNAm da ciclina B1.

Com o recrutamento folicular, um “pool” de folículos com diâmetro aproximado de 4mm continua a crescer até atingir 7-8mm, dando início à fase de divergência (em tamanho) de apenas um folículo dominante. Oócitos oriundos desses folículos (3-8 mm) são considerados competentes para o reinício da meiose, mas com “capacidade intermediária” de atingir o estágio de blastocisto. Foi demonstrado que o diâmetro de oócitos contidos em folículos entre 3 e 10mm independe do tamanho desses folículos (FAIR et al., 1995; ARLOTTO et al., 1996). In vivo, a verdadeira “capacitação” ou “pré-maturação” do oócito, ou seja, as modificações ultra-estruturais que o tornam altamente capaz de atingir o estágio de blastocisto, parece ocorrer “antes do pico ovulatório do GnRH” (para revisão, HYTTEL et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 2000); entretanto, o momento exato ainda é desconhecido e parece ser dependente da duração da dominância folicular (BLONDIN et al., 2002).

Após o pico de LH, o oócito já capacitado passa pelo processo de maturação nuclear e citoplasmática que se caracteriza pela expansão das células do cumulus, rompimento do contato entre as células da corona radiata e a membrana do oócito e a formação do espaço perivitelínico. No citoplasma do oócito, ocorre um aumento na concentração de lipídios e uma redução do aparelho de golgi. Os grânulos corticais localizam-se justapostos à membrana do oócito, ocorre o reinício da meiose e o rompimento da membrana do núcleo do oócito, liberando o conteúdo nuclear para o citoplasma.

Antes da ovulação, “durante a maturação final do folículo dominante”, o tamanho do complexo de golgi é reduzido ainda mais, a membrana nuclear torna-se ondulada, o nucléolo apresenta vacuolização e toma a forma estrutural de um anel. Além disso, ocorre uma elongação das células da corona radiata, resultando na sua retração para uma posição mais superficial na superfície da membrana do oócito e o tamanho do espaço perivitelínico é aumentado (HYTTEL et al., 1997).

Em suma, ao completar seu crescimento no interior de um folículo com diâmetro de 2-3mm, o oócito bovino adquire competência meiótica e uma limitada capacidade para suportar o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Entretanto, a fim de expressar seu pleno potencial para o desenvolvimento embrionário, o oócito necessita sofrer o processo de capacitação, o qual somente ocorre no interior do folículo dominante.

Evidências de que o tamanho folicular interfere na competência meiótica e na capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos

A competência de um oócito para sustentar o desenvolvimento embrionário é o resultado da sua adequada maturação nuclear e citoplasmática. Está bem determinado que o oócito adquire competência meiótica a partir do tamanho folicular de 1-2mm (PAVLOK et al., 1992; BLONDIN & SIRARD, 1995) e atingindo um diâmetro aproximado de 110 μ m (FAIR et al., 1995), porém apresenta uma limitada capacidade para suportar o desenvolvimento embrionário *in vitro*, devido a sua baixa capacidade de completar a maturação citoplasmática (EPPIG, 1996). Além disso, durante o seu crescimento, o oócito sintetiza e acumula RNAs, ribossomos e proteínas necessárias para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário até o momento da ativação do genoma embrionário da sua espécie. Nesse sentido, é provável que oócitos oriundos de folículos menores de 2-3mm ainda não tenham completado a síntese de RNAs e proteínas necessárias para sua sobrevivência e, por isso, estacionam o desenvolvimento embrionário durante os primeiros ciclos de divisão celular.

Diversos grupos de pesquisa demonstraram que oócitos derivados de folículos entre 4 e 8mm, que ainda não sofreram o processo de capacitação ou pré-maturação no interior do folículo dominante, resultam em maior percentual de blastocistos do que aqueles oriundos de folículos menores (TAN & LU, 1990; PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; HAGEMANN et al., 1999). Considerando-se esses diâmetros foliculares, ainda não são conhecidos os fatores moleculares envolvidos nessa transição de um estado menos para outro mais competente, antes da capacitação do oócito propriamente dita no interior do folículo dominante. Porém, sabe-se que essa transição coincide com a fase de emergência de um “pool” de folículos antrais entre 3-5mm que iniciam a crescer sob estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH) (BLONDIN et al., 1997b; MIHM et al., 2002). A partir de 4-5mm é provável que ocorra síntese e/ou degradação de RNAs e proteínas ou até mesmo modificações dessas moléculas que asseguram ao oócito maior capacidade de desenvolvimento embrionário, porém a identificação desses fatores ainda requer mais estudos.

Por outro lado, alguns estudos apresentaram resultados contraditórios, mas que devem ser interpretados cuidadosamente. BLONDIN & SIRARD (1995), por exemplo, não encontraram diferença significativa no desenvolvimento embrionário de oócitos obtidos a partir de folículos entre 3-5mm e ≥ 5 mm. Da mesma forma, HAGEMANN et al. (1999) não encontraram diferenças utilizando oócitos oriundos de folículos entre 3-5mm e 6-8mm. É compreensível que não tenham sido encontradas diferenças significativas nesses experimentos, tendo em vista que os oócitos dos tamanhos foliculares estudados apresentaram, possivelmente, diâmetros similares e pertenceriam a fases próximas da dinâmica folicular (fase de recrutamento e início da fase de divergência folicular) onde não há diferenças marcantes no potencial desses oócitos para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. HAGEMANN et al. (1999) também constataram que oócitos obtidos de folículos com diâmetro >13 mm alcançaram 65% de blastocistos contra 44% do grupo constituído por oócitos de folículos de 3-8mm, entretanto, as avaliações foram realizadas sobre um número limitado de oócitos oriundos de folículos >13 mm (n=17). Obtendo-se oócitos a partir de ovários de matadouro, as avaliações envolvendo oócitos oriundos de folículos dominantes (>8 mm) são difíceis de serem realizadas, devido a alta frequência de atresia desses gametas.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados envolvendo técnicas como a “Suppressive Subtraction Hybridization” (SSH), onde o RNAm é isolado de folículos grandes e pequenos, transformado em cDNA e, posteriormente, é feita a subtração daqueles encontrados em um tamanho folicular e não no outro. Depois de identificados, são seqüenciados e submetidos à técnica de PCR em tempo real, visando quantificar as diferenças de expressão gênica de genes específicos entre os tamanhos foliculares (ROBERT et al., 2000; ROBERT et al., 2002). Essa metodologia tem sido útil na identificação de genes associados à competência meiótica e à capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*. A partir daí, estudos mais detalhados utilizando alguns desses genes candidatos são necessários para se investigar “a fundo” o real envolvimento, ou seja, o mecanismo de ação e a importância desses genes nos processos em questão.

Faz-se importante continuar investigando quais as diferenças moleculares entre oócitos oriundos de folículos pequenos e grandes, a fim de se determinar quais moléculas são realmente vitais à aquisição da competência ou capacitação do oócito e, assim elucidar mecanismos regulatórios desses processos, a fim de extrapolá-los na rotina laboratorial, aumentando a eficiência da PIV.

Outros aspectos relacionados à capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos

Além do diâmetro folicular, vários outros fatores afetam a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos, como, por exemplo, os procedimentos/protocolos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (MIV/FIV/CIV), espermatozóides, idade e estado nutricional da vaca doadora, estímulo gonadotrófico do crescimento folicular, método de coleta dos oócitos, condições de transporte dos ovários de matadouro, etc...

Um aspecto interessante diz respeito ao grau de atresia do folículo pelo qual o oócito é obtido. Esse foi considerado um fator limitante da PIV de embriões, pois considerando-se a fisiologia da dinâmica folicular na vaca, a maioria dos folículos presentes nos ovários são atrésicos. Em função disso, a maioria dos grupos de pesquisa passou a selecionar complexo-cumulus-oócitos (CCOs) de qualidade 1 e 2 (boa qualidade) conforme a classificação sugerida por LEIBFRIED & FIRST (1979), no intuito de padronizar os grupos estudados e maximizar o percentual de embriões por oócito selecionado. Entretanto, atualmente sabe-se que o estágio inicial e até mesmo intermediário de atresia folicular não interfere negativamente na capacidade de desenvolvimento embrionário do oócito, pelo contrário, parece ser positivo, já que as modificações que ocorrem durante a fase inicial da atresia folicular, assemelham-se àquelas que acontecem durante a capacitação ou pré-maturação do oócito no interior do folículo dominante (BLONDIN & SIRARD, 1995).

Nesse sentido, foi demonstrado que folículos com mais de 73% de células apoptóticas ainda continham oócitos competentes (HAGEMANN et al., 1999). Outros dois estudos demonstraram que CCOs bovinos contendo células do cumulus com sinais intermediários de atresia produziram maiores percentuais de blastocistos que os oócitos que não

apresentavam sinais visíveis (WURTH & KRUIP, 1992; BLONDIN & SIRARD, 1995). Isso pode ser explicado pelo fato de que o CCO é a última parte integrante do folículo a ser afetada pela atresia folicular (KRUIP & DIELEMAN, 1982; WURTH & KRUIP, 1992). Mesmo em folículos com alto grau de atresia, apenas 25% dos oócitos oriundos desses folículos demonstraram sinais de degeneração, sendo que os oócitos restantes (75%) ainda mantiveram uma capacidade de desenvolvimento embrionário razoável quando submetidos à MIV/FIV (WURTH & KRUIP, 1992). Portanto, pode-se afirmar que um baixo grau de atresia folicular pode ser favorável à capacidade de desenvolvimento embrionário do oócito e que essa capacidade apenas é diminuída em folículos com alto grau de atresia.

A relação entre a fase da onda de crescimento folicular e a capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos também foi intensamente estudada. Nesse sentido, há consenso de que oócitos obtidos durante a fase de recrutamento folicular apresentam maiores percentuais de blastocisto quando comparados àqueles obtidos de folículos presentes durante a fase de dominância. Isso ocorre devido ao efeito negativo exercido pelo folículo dominante sobre seus subordinados, levando-os a atresia e diminuição gradativa do potencial dos oócitos desses folículos subordinados para o desenvolvimento embrionário (HANENBERG & WAGTENDONK, 1997; HAGEMANN et al., 1999; GOODHAND et al., 1999).

A fim de evitar o efeito deletério da dominância folicular e induzir a capacitação ou pré-maturação dos oócitos ainda *in vivo*, vários estudos foram conduzidos envolvendo estimulação gonadotrófica dos ovários, pois dessa forma pode-se obter um maior número de folículos em crescimento no momento da aspiração folicular (OPU), visando a produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos obtidos *in vivo*. Nesse sentido, BORDIGNON et al. (1997) constataram que a aplicação exógena de GnRH em novilhas, possibilitou um incremento na taxa de obtenção de oócitos coletados por aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU), bem como um incremento na capacidade de desenvolvimento embrionário desses oócitos. Também cabe citar o estudo realizado por BLONDIN et al. (2002) que resultou em 80% de blastocistos (dia 8), após tratarem as vacas com 6 injeções de FSH, seguido de aspiração folicular (OPU) 48hs após a última injeção. Os autores atribuíram o sucesso desse procedimento ao intervalo de tempo entre a última injeção de

FSH e a OPU, ao qual denominaram “coasting period” (período de espera), tempo que parece ter sido suficiente para induzir a capacitação ou pré-maturação dos oócitos, resultando em altos percentuais de blastocistos por oócito coletado. Cabe salientar que, nesse estudo, a maturação e fertilização dos oócitos aspirados, bem como o cultivo embrionário até o dia 8 (dia 0= fertilização) foram realizados *in vitro*, contrariando a polêmica hipótese de que as condições *in vitro* seriam as responsáveis pela baixa eficiência na produção de embriões.

Por outro lado, várias diferenças têm sido apontadas entre os procedimentos de maturação *in vivo* versus *in vitro*. O rompimento da vesícula germinativa do oócito, por exemplo, parece ocorrer mais rapidamente em condições de maturação *in vitro* do que *in vivo* (5-6hs *in vitro* versus 7-10hs *in vivo*, respectivamente; HYTTEL et al., 1986; DE LOOS et al., 1991; DE LOOS et al., 1994). Não obstante, foi demonstrado que algumas proteínas são ativamente sintetizadas em oócitos maturados por 16 horas *in vivo*, mas isso não ocorre naqueles maturados *in vitro* pelo mesmo período (KASTROP et al., 1991). Diferenças ultra-estruturais (HYTTEL et al., 1986; DE LOOS et al., 1992) também foram encontradas. Igualmente, a expansão das células do cumulus parece ser mais proeminente em oócitos maturados *in vivo* do que naqueles maturados *in vitro* (HYTTEL et al., 1986; DE LOOS et al., 1992).

Oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* também foram avaliados quanto à capacidade de desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, os resultados indicaram uma maior capacidade de gerar embriões dos oócitos maturados *in vivo* em relação aos maturados *in vitro* e transferidos para o oviduto (GREVE et al., 1987; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). Outros estudos também apontaram uma maior capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos maturados *in vivo* (FAIR et al., 1995; ARLOTTO et al., 1996; VAN DE LEEMPUT et al., 1999; HUMBLLOT et al., 2005). Além disso, foi comprovada a interferência da pré-maturação do oócito e suas condições de maturação na expressão gênica não apenas do oócito, mas também, do blastocisto (WATSON et al., 2000; LONERGAN et al., 2003). Vários estudos já apontaram diferenças na expressão de genes considerados importantes para o desenvolvimento embrionário, entre embriões bovinos produzidos *in vivo* versus *in vitro* (WRENZYCKI et al., 1996; NIEMANN &

WRENZYCKI, 2000; RIZOS et al., 2002b). Da mesma forma, as condições de cultivo *in vitro* são capazes de modificar a expressão gênica em embriões (DOHERTY et al., 2000; LONERGAN et al., 2003; WRENZYCKI et al., 2005).

Entretanto, deve-se considerar que nesses estudos os oócitos maturados *in vitro* foram obtidos a partir de ovários de matadouro e aspirados de folículos entre 2 a 8mm. Portanto, esses oócitos não sofreram as importantes modificações do período de dominância folicular, ou seja, a capacitação ou pré-maturação *in vivo* antes de serem maturados *in vitro*, fato esse que os diferencia enormemente daqueles maturados *in vivo*. Em função disso é que o período de espera (“coasting period”) estudado por BLONDIN et al. (2002), após aplicações de FSH, deve ser considerado com atenção, pois parece ter sido o fator determinante do alto percentual de embriões obtidos nesse experimento.

Por outro lado, com relação a utilização de oócitos oriundos de ovários de matadouro, o tempo e a temperatura da solução durante o transporte dos ovários parecem ter influência no grau de atresia dos folículos e oócitos post-mortem e, conseqüentemente, no potencial desses oócitos para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. BLONDIN et al. (1997a) demonstraram que o transporte de ovários de matadouro a 30°C por 4 horas ao invés de 2 horas, incrementou o percentual de embriões que atingiram ≥ 64 células e atribuíram esse resultado a uma provável indução de atresia dos folículos, a qual teria afetado positivamente o desenvolvimento embrionário.

Outro aspecto documentado é de que a competência meiótica dos oócitos e a capacidade de chegar a blastocisto aumentam à medida que a idade dos animais se aproxima da puberdade (PRESICCE et al., 1997). Nesse sentido, foi demonstrado que oócitos de fêmeas pré-púberes apresentam deficiências ultra-estruturais (DE PAZ et al., 2001) e funcionais como, por exemplo, a diminuição na atividade do MPF, MAPK quinase (mitogen-activate protein kinase) e receptores para o inositol-trifosfato (IP3), os quais são importantes para a maturação do oócito (DAMIANI et al., 1998; SALAMONE et al., 2001). Isso ficou evidente quando da transferência de núcleos embrionários de fêmeas adultas (MERMILLOD et al., 1998) ou de núcleos somáticos (SALAMONE et al., 2001) para oócitos enucleados de fêmeas pré-púberes, comprovando que o ooplasma do oócito oriundo de uma fêmea pré-púbere apresenta uma baixa capacidade de reprogramação

nuclear. Da mesma forma, a transferência recíproca de cromossomos em metáfase II entre oócitos de fêmeas adultas e pré-púberes, seguida de ativação partenogenética, demonstrou que o ooplasma do oócito de fêmeas pré-púberes tem uma baixa capacidade de reprogramar cromossomos de oócitos de fêmeas adultas. Entretanto, o problema não se limitou ao ooplasma de oócitos de fêmeas pré-púberes. O percentual de clivagem foi menor nos embriões gerados a partir da fusão de oócitos enucleados de fêmeas adultas e cromossomos de oócitos de fêmeas pré-púberes, em relação aos fusionados com cromossomos de oócitos de fêmeas adultas (SALAMONE et al., 2001).

É provável que oócitos ainda em crescimento, oriundos de folículos em estágio inicial de formação do antro, apresentem deficiências ultra-estruturais, bioquímicas e moleculares semelhantes a de oócitos oriundos de fêmeas pré-púberes. Aliás, esse tem sido o principal argumento ao se tentar explicar os motivos que acarretam uma menor competência meiótica e baixa produção de embriões nessas condições.

A exemplo do que se obtém com oócitos capacitados de fêmeas adultas (BLONDIN et al., 2002), para que seja possível atingir uma eficiência aproximada de 70-80 % na PIV de blastocistos sobre o total de oócitos selecionados, é necessário, entre outras coisas, conhecer melhor os fatores e mecanismos que limitam a capacidade de desenvolvimento embrionário desses oócitos. Sabe-se que a partir da fecundação, ocorre um intenso remodelamento da cromatina paternal e maternal (para revisão, MCLAY & CLARKE, 2003) com influência direta na regulação da expressão gênica e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento embrionário (para revisão, KAÑKA, 2003).

Modificações na estrutura da cromatina determinam o estado permissivo ou repressivo da transcrição de genes e não apenas a atividade dos fatores de transcrição (MAJUMDER et al., 1993). Neste sentido, estudos em leveduras, drosófila, anfíbios e mamíferos têm demonstrado a importante função de algumas proteínas e de suas modificações bioquímicas na integridade do DNA nuclear e no processo de remodelamento dos nucleossomos, os quais são formados pela associação de proteínas histonas onde o DNA é empacotado.

Estrutura e função dos nucleossomos

As células eucarióticas contêm genomas que variam entre 12×10^6 pares de bases em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) até outros ainda maiores que o genoma de humanos, o qual contém 3×10^9 pares de bases. O comprimento desses genomas acima citados, em linha reta, chega a alcançar 4 milímetros em leveduras e, aproximadamente, 2 metros no caso dos humanos (para revisão, REDON et al., 2002). Considerando-se que o núcleo representa uma pequena porção celular, o DNA deve ser “empacotado” para que possa caber no seu interior. Em eucarióticas, esse empacotamento do DNA é feito por proteínas histonas e não-histonas, formando uma estrutura altamente condensada chamada cromatina.

O nucleossomo representa o primeiro nível de compactação do DNA no núcleo da célula, sendo formado por 147 pb (pares de bases) de DNA, enrolados 1,7 vezes em torno de oito moléculas de proteínas histonas (octâmero). Esse octâmero é constituído de duas cópias de cada uma das proteínas histonas H2A, H2B, H3 e H4, formando um complexo protéico de 100 KDa (LUGER et al. 1997). Um segundo nível de compactação é assegurado pela histona de ligação H1, a qual comprime a estrutura solenóide do nucleossomo em um diâmetro aproximado de 30nm e, assim, atuando na estabilização do mesmo (WOLFFE, 1997). A ligação de um nucleossomo a outro é feito por uma curta seqüência de DNA (em torno de 20 pb). Dessa maneira, a cromatina adquire a forma de um complexo “emaranhado” de DNA e proteínas, o qual garante a ela a compactação suficiente para alocar-se no interior do núcleo.

Em células eucarióticas, a maioria dos processos celulares envolvendo o DNA, tal como transcrição, replicação e reparo, ocorrem na cromatina. O grau de compactação da cromatina afeta o acesso dos fatores regulatórios dos processos biológicos e cancerígenos ao DNA, bem como a eficiência com que as RNA e DNA polimerases movem-se ao longo da seqüência de DNA (BUSTIN et al., 1983; OWEN-HUGHES & WORKMAN, 1994; PARANJAPE et al., 1994; GRUSS & KNIPPERS, 1996).

Considerando que a complexa estrutura da cromatina é estabilizada por interações entre os nucleossomos, envolvendo a porção terminal das histonas (GARCIA-RAMIREZ et al., 1992; HANSEN & AUSIO, 1992) e, também, pela presença da histona H1 (ZLATANOVA & van HOLDE, 1996), a maioria dos processos que ocorrem na cromatina necessitam, primeiramente, ultrapassar o efeito inibitório da forma com que a cromatina é

compactada ao longo dos nucleossomos. Durante o processo de transcrição gênica, por exemplo, a estrutura da cromatina encontra-se alterada nesses locais de transcrição, mediante um relaxamento ou desunião da estrutura dos nucleossomos. Essa alteração na forma dos nucleossomos perto da região onde se encontram os genes ativos pode ser mediada pela ligação de fatores de transcrição aos seus locais alvo (FELSENFELD et al., 1996) ou mediada por um processo dependente de energia desencadeado por complexos protéicos da família SWI/SNF (PETERSON, 1996). Na verdade, está estabelecido que a compactação da cromatina está associada com inibição da transcrição, bem como dos processos de replicação e reparo do DNA (HANSEN & WOLFFE, 1992).

Modificações epigenéticas das proteínas histonas

Em biologia, epigenética significa alterações no fenótipo devido a mudanças celulares que são herdadas, mas que não alteram o genótipo. Do ponto de vista molecular, o termo “epigenética” significa alterações/mudanças herdáveis na função gênica durante a mitose e/ou meiose e que não são acompanhadas de alterações na seqüência de DNA (para revisão, MEEHAN et al., 2005). O estudo das alterações epigenéticas em oócitos e embriões está relacionado, basicamente, aos processos moleculares de metilação do DNA e modificações das histonas.

Cada grupo de histonas possui um domínio globular, o qual é necessário tanto para o contato entre histonas quanto das histonas com o DNA, assim como a região da cauda, localizada nos domínios carboxi-terminal (COOH) e amino-terminal (NH₂) da seqüência de aminoácidos que compõem as histonas. Esses domínios são alvos para modificações pós-translacionais das histonas, pois estão localizados na superfície da cromatina e, portanto, acessíveis ao maquinário enzimático. Essas modificações envolvem, basicamente, reações de fosforilação, acetilação, metilação e ubiquitinação, que influenciam o contato entre moléculas que interagem com as histonas e/ou com o DNA, regulando diversos processos celulares como transcrição e reparo do DNA (ZHANG & REINBERG, 2001; KURDISTANI & GRUNSTEIN, 2003).

Fosforilação da histona H2A.X versus integridade do DNA

Embora os cinco tipos de histonas descritos anteriormente (ditas convencionais) sejam proteínas altamente conservadas, as células contêm outras versões, ou melhor, formas alternativas (variantes) dessas proteínas com diferentes seqüências de aminoácidos. Histonas variantes são formas não alélicas das histonas convencionais (MALIK & HENIKOFF, 2003). Atualmente, formas variantes das proteínas histonas H2A, H2B, H3 e H1 têm sido identificadas (DRABENT et al., 1996; KHOCHBIN, 2001a; IGUCHI et al., 2003; para revisão, GOVIN et al. 2004) e algumas delas já foram até apontadas como mediadoras de processos celulares específicos, como transcrição, recombinação e reparo do DNA (MALIK & HENIKOFF, 2003).

A histona H2A.X, por exemplo, foi primeiramente identificada em 1980, como uma isoforma da histona H2A (WEST & BONNER, 1980), entretanto, somente foi seqüenciada no final dos anos 80 (MANNIRONI et al., 1989). Em mamíferos, a histona H2A.X representa 2 a 25% do total de um “pool” da histona H2A, dependendo, obviamente, da linhagem celular e do tecido examinado. À medida que os estudos avançaram, tornou-se cada vez mais evidente que a histona H2A.X foi conservada através da evolução em animais, plantas, fungos e, inclusive, na *Giardia*, um dos eucariotas mais primitivos e que contém um genoma de 12 Mb (para revisão, REDON et al., 2002).

Assim como em outros membros da família H2A, foi demonstrado que a histona H2A.X pode ser fosforilada na serina 1, acetilada na lisina 5 e sofrer ubiquitinação na lisina 119 (WU et al., 1986). Entretanto, o que caracteriza e diferencia a H2A.X das outras isoformas da histona H2A é um resíduo de serina (Ser 139) altamente conservado e distante 4 aminoácidos da região COOH terminal, o qual é rapidamente fosforilado quando a célula é exposta a condições que danificam o DNA (ROGAKOU et al., 1998). É em função dessa característica que se atribuiu a essa forma modificada (fosforilada) da histona H2A o nome de γ H2A.X (ROGAKOU et al., 1998).

Essa relação entre fosforilação da histona H2A.X em resposta a dano no DNA foi primeiramente sugerida por ROGAKOU et al. (1998), que utilizaram análise de gel bi-dimensional para demonstrar que a histona H2A.X é fosforilada poucos minutos após as células serem expostas à radiação ionizante. Eles também demonstraram que a quantidade da histona H2A.X que é fosforilada em cada local de rompimento da cadeia dupla do DNA

(RCD), corresponde, em mamíferos, a uma região muito extensa do DNA, estimada entre 2 megabases da cromatina até milhares de nucleossomos (ROGAKOU et al., 1998; ROGAKOU et al., 1999; REDON et al., 2003).

Atualmente, a γ H2A.X tem sido caracterizada por ser o primeiro fator sinalizador de dano na estrutura da cromatina envolvendo rompimento da cadeia dupla do DNA (RCD). Essa afirmativa encontra suporte nos estudos que demonstraram o envolvimento da γ H2A.X em resposta a danos de causas metabólicas e ambientais (ROGAKOU et al., 1998; ROGAKOU et al., 1999; PAUL et al., 2000) como, por exemplo, disfunção dos telômeros (d'ADAA di FAGAGNA et al., 2003; TAKAI et al., 2003), problemas durante a replicação do DNA induzidos por luz ultravioleta (WARD & CHEN et al., 2001) e radiação ionizante (para revisão, FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004). Entretanto, em eucariotas, a γ H2A.X também participa em pelo menos três eventos celulares programados envolvendo RCD, que são o rearranjo do DNA durante o desenvolvimento do sistema imunológico, reparo do DNA e apoptose (para revisão, FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004).

O processo de união ou reparo do RCD tem a participação de dois processos importantes que são a recombinação homóloga e a junção terminal não-homóloga (NHEJ - nonhomologous end joining) (ROTHKAMM et al., 2003; XIE et al., 2004), os quais parecem ser modulados pela γ H2A.X conforme foi demonstrado em camundongos e células tronco-embrionárias γ H2A.X deficientes (PETERSEN et al., 2001; CELESTE et al., 2002; BASSING, et al., 2002; REINA-SAN-MARTIN et al., 2003). O processo de recombinação homóloga utiliza uma cópia intacta (homóloga ou a partir da cromátide irmã) do cromossomo onde ocorreu a ruptura como molde para o reparo dessa região. Durante a meiose, por exemplo, ocorrem RCDs que são reparados fisiologicamente durante o processo de recombinação dos cromossomos parentais. Já o NHEJ une, diretamente, as duas extremidades da cadeia de DNA rompida, sem haver, necessariamente, homologia entre as seqüências. Cabe lembrar que defeitos em qualquer um desses processos pode comprometer a integridade do genoma e aumentar a probabilidade da ocorrência de tumores.

A maioria dos estudos relativos a histona γ H2A.X tem sido realizada com o uso de anticorpos, onde cada ponto/sinal positivo é considerado um foco nuclear (do inglês

“nuclear foci”). Também foi demonstrado que cada local de RCD corresponde a um foco de sinal positivo (SEDELNIKOVA et al., 2002). Portanto, essas características de rápida fosforilação, relação 1:1 entre o número de focos nucleares e de RCDs, bem como a possibilidade de se explorar o momento e a distribuição dos locais de RCDs, tornaram o uso da imunofluorescência o método de eleição para detecção e quantificação de RCDs.

O mecanismo envolvido na fosforilação da histona H2A.X logo após o RCD tem sido, há anos, o alvo de vários estudos. Alguns experimentos demonstraram que ocorre a ativação de um mecanismo de sinalização baseado em proteínas kinases da família PIKK (do inglês: phosphatidylinositol-3 kinase-like family of kinases), que desencadeiam a fosforilação da histona variante H2A.X, transformando-a em γ H2A.X. Essa função tem sido atribuída, mais especificamente, a quatro membros da família PIKK, entre eles: ataxia telangiectasia mutated (ATM), ATM e Rad3-related (ATR), ATM related kinase (ATX) e a proteína kinase dependente de DNA (DNA-PK; SHILOH, 2003).

Em casos de disfunções na replicação do DNA, a histona H2A.X parece ser fosforilada pela ATR (WARD & CHEN, 2001); enquanto, ATM desempenha essa função em caso de RCD provocado por radiação ionizante (BURMA et al., 2001; FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2002). Da mesma forma, quando ocorrem RCDs em função de alterações na região dos telômeros ou no processo de recombinação homóloga, ATM parece ser o responsável pela formação da histona γ H2A.X. Entretanto, outros estudos demonstraram haver uma certa redundância na atividade dessas kinases que ativam a fosforilação da histona H2A.X, ao ser demonstrado que indivíduos mutantes que não continham um dos genes codificadores para as proteínas acima citadas ($ATM^{-/-}$, $DNA-PK^{-/-}$ ou $ATR^{-/-}$), também apresentaram fosforilação da histona H2A.X (WARD & CHEN, 2001; BURMA et al., 2001; BROWN & BALTIMORE, 2003). Isso demonstra a necessidade de mais estudos nessa área, a fim de melhor elucidar os fatores e mecanismos envolvidos nesse processo de sinalização.

Por outro lado, na opinião de alguns pesquisadores, a função da histona γ H2A.X não limita-se à “marcação” da região onde ocorreu o RCD. Eles acreditam que a histona γ H2A.X facilita o recrutamento de moléculas que participam nos processos de remodelamento e reparo do DNA (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004), embora os

resultados de CELESTE et al. (2003) não suportem essa hipótese. Outros consideram ainda que a função da histona γ H2A.X seria apenas de “manter” essas moléculas em torno da região onde ocorreu o RCD, possibilitando, assim, o reparo dessa região.

O primeiro experimento que relacionou a função da histona γ H2A.X com o processo de reparo do DNA foi realizado em *S. cerevisiae*, onde foi eliminado o único resíduo de serina na região C-terminal da histona H2A, impossibilitando, dessa forma, o processo de NHEJ (DOWNS et al., 2000). Três anos mais tarde (2003), foi demonstrado na mesma espécie que a Ser 129 da histona H2A é crucial para o reparo do RCD durante o processo de replicação do DNA (REDON et al., 2003). Até o momento, apenas CHE et al. (2005) demonstraram a presença da γ H2A.X em núcleos de embriões mamíferos (espécie suína) através da técnica de imunocitoquímica. Nesse estudo, os autores encontraram um alto percentual (24-67%) de núcleos positivos para γ H2A.X em embriões partenogênicos e oriundos de transferência nuclear, desde o estágio de uma célula até blastocisto. Demonstraram também, que oócitos ativados com uma combinação de ionomicina e estrôncio tiveram significativamente menos núcleos positivos que os ativados exclusivamente com ionomicina. Esse estudo revelou ainda que embriões de duas células fixados 48 h após ativação partenogênica tiveram maior número de focos da γ H2A.X por núcleo que os embriões contendo quatro células fixados ao mesmo tempo. Em blastocistos, encontraram uma correlação negativa entre o percentual de núcleos positivos para γ H2A.X e o número total de núcleos.

Embora existam evidências de que a histona γ H2A.X facilita o processo de reparo do DNA, o mecanismo pela qual ela atua ainda não foi completamente definido. Nesse sentido, duas hipóteses têm sido consideradas: a) a fosforilação da histona H2A.X (γ H2A.X) aumentaria a probabilidade do surgimento do complexo funcional de reparo do DNA, pelo aumento na concentração dos fatores de reparo no local onde ocorreu o dano; b) a reorganização da cromatina que seria facilitada pela histona γ H2A.X, poderia evitar a separação prematura das extremidades rompidas do DNA, prevenindo, dessa forma, um potencial processo de rearranjo cromossômico que acarretasse em tumor (para revisão, FERNANDEZ-CAPETILO et al., 2004). Em função disso, a histona γ H2A.X tem sido considerada “a histona guardiã do genoma” (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004).

Recentemente, modificações específicas de outras histonas têm sido identificadas e relacionadas a danos no DNA, entre elas a metilação da lisina 79 da histona H3 (HUYEN et al., 2004), deacetilação diferencial da lisina 16 da histona H4 (JAZAYERI et al., 2004) e metilação da lisina 20 da histona H4 (SANDERS et al., 2004).

É importante citar que o acesso dos fatores de reparo ao DNA, assim como aqueles necessários aos processos de transcrição, replicação e recombinação, dependem de modificações epigenéticas localizadas das proteínas histonas e, também, dos complexos de remodelamento dependentes de ATP (proteínas da família SWI/SNF), capazes de alterar a conformação estrutural da cromatina, possibilitando ou não o acesso dessas moléculas à cromatina para que possam exercer suas funções (para revisão, WOLFFE & GUSCHIN, 2000). Nesse contexto, se fazem necessárias mais avaliações na estrutura da cromatina e de suas modificações epigenéticas, a fim de se compreender melhor o mecanismo pelo qual as perturbações sofridas pela cromatina desencadeiam a resposta do DNA danificado.

Dinâmica de acetilação das histonas durante o desenvolvimento embrionário precoce

A cauda N-terminal das histonas H3 e H4 estão entre as seqüências mais conservadas no genoma de eucariótas (EBERHARTER & BECKER, 2002). Modificações pós-translacionais dessas seqüências de aminoácidos, principalmente acetilação, alteram a interação dos domínios da cauda, determinando a forma e a funcionalidade da cromatina (WOLFFE, 1996). O estado de acetilação das histonas está correlacionado ao estado permissivo de expressão gênica. Isso foi comprovado por LEE et al., (1993) ao demonstrarem que a acetilação da histona H4 facilita a ligação (*in vitro*) de alguns fatores de transcrição aos nucleossomos. *In vivo*, já está bem determinado que quando a cromatina está acetilada, ela altera sua conformação, tornando-se mais acessível para interagir com os fatores de transcrição, entre outras proteínas, facilitando a atividade transcricional. O aumento da sensibilidade da cromatina acetilada à DNase I comprovou esses achados (KHOCHBIN et al., 2001b).

Por outro lado, também chama a atenção o fato de que a acetilação da histona H4 é reduzida no cromossomo X inativo em fêmeas mamíferas (JEPPESEN & TURNER, 1993).

Esse achado sugere que a ausência de grupos acetila possa ser um pré-requisito para uma estrutura mais condensada e inativa.

Quanto ao mecanismo de ação, acredita-se que a acetilação de resíduos de lisina específicos na porção amino-terminal da cauda das histonas, atua neutralizando as cargas positivas da porção N-terminal, ocasionando uma diminuição da sua afinidade pelo DNA (menor compactação) e, conseqüentemente, aumentando a acessibilidade dos fatores de transcrição a seqüência alvo do DNA.

A acetilação da cauda das histonas é um processo reversível, induzido pela ação das enzimas acetiltransferases (HATs) e revertido pelas deacetilases (HDACs). As enzimas HATs são divididas em dois grupos, tipo A e tipo B, dependendo da sua origem, localização e função. As HATs tipo A encontram-se no núcleo e atuam, basicamente, na regulação da expressão gênica por atuarem como co-ativadores da transcrição. Por outro lado, as HATs tipo B atuam no citoplasma acetilando as histonas recém sintetizadas, ou seja, participam da montagem dos nucleossomos (ROTH & ALLIS, 1996; BROWNELL & ALLIS, 1996).

Não obstante, inibidores do estado acetilado foram importantes nos estudos da cromatina acetilada. A tricostatina e o ácido butírico, por exemplo, inibem as histonas-deacetilases e determinam o acúmulo dos nucleossomos acetilados (para revisão, WOLFFE & GUSCHIN, 2000). Além disso, o uso desses inibidores serviu para comprovar que a acetilação das histonas está associada à expressão gênica. Outro aspecto interessante é o fato de que as HATs não atuam somente na cromatina (histonas), mas também agem como co-ativadores de alguns fatores de transcrição tornando-os ativos (KOUZARIDES, 1999).

Em oócitos e embriões de mamíferos, o estado acetilado ou deacetilado das histonas está relacionado com a fase ou estádios de desenvolvimento. A espécie mais estudada a esse respeito tem sido o camundongo. Antes da maturação, por exemplo, a cromatina do oócito encontra-se condensada nos cromossomos através dos nucleossomos. Por outro lado, a cromatina paternal, ou seja, dos espermatozóides, encontra-se altamente compactada em torno de proteínas chamadas protaminas (AOKI & SCHULTZ, 1999). Nessa fase, a cromatina de ambos gametas não apresenta atividade de transcrição.

Logo após a penetração do espermatozóide no oócito (fecundação) ocorrem diversas mudanças nas cromatinas maternal e paternal. No gameta masculino, por exemplo, ocorre uma decondensação da cromatina e substituição das protaminas por histonas, entre o período que compreende a entrada do espermatozóide até ocorrer a replicação do DNA (NONCHEV & TSANEV, 1990). Por outro lado, no oócito, ocorre o reinício da meiose seguido também de decondensação da cromatina. O pronúcleo masculino é formado logo após o feminino e, na seqüência, ocorre a condensação dos cromossomos na singamia (união dos dois pronúcleos) antes do zigoto clivar em duas células.

Com base nos aspectos fisiológicos acima descritos, ADENOT et al. (1997) verificaram que as cromatinas do oócito em metáfase II e do espermatozóide não apresentaram níveis detectáveis de hiperacetilação da histona H4 logo após a entrada do espermatozóide no oócito. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante a primeira divisão celular, a cromatina necessita sofrer um extensivo remodelamento nuclear, enquanto o processo de transcrição ainda está silenciado. Mais tarde, durante a fase G1 do ciclo celular, constataram que o pronúcleo masculino apresentou maiores níveis de hiperacetilação da histona H4 que o feminino. Na seqüência, durante as fases S e G2, os autores notaram que os níveis de hiperacetilação em ambos pronúcleos eram semelhantes.

No camundongo, RNAm maternal para histona H3 está reduzido logo antes do estágio de duas células (momento da ativação do genoma embrionário), sendo que um aumento de expressão (RNAm) por parte do embrião ocorre proporcionalmente ao número de células a partir do estágio de oito células (GIEBELHAUS et al., 1983).

STEIN et al. (1997) também conduziram um estudo visando avaliar a distribuição de algumas isoformas acetiladas específicas em embriões de 1 a 4 células. Constataram que o sinal para a histona H3 acetilada nas lisinas 9 e 18, bem como a forma simples acetilada da histona H2A, tornaram-se transitoriamente presentes na periferia nuclear em embriões de 2 células. Verificaram também que um curto período de cultivo na presença de Trichostatin A ou Trapoxin (inibidor das HDACs) aumentou o sinal. Observou ainda que a elevada concentração das histonas hiperacetiladas e da RNA polimerase I na periferia nuclear de embriões de 2 células sugere um alto grau de transcrição.

Em suma, em embriões de camundongos, a cauda N-terminal da histona H4 encontra-se hiperacetilada antes da ativação do genoma embrionário (AGE) entretanto, durante a AGE (estádio de 2 células), a histona H4 deve ser deacetilada (WIEKOWSKI et al., 1997), o que coincide com o acúmulo da histona H1 somática (CLARKE et al., 1992) que também pode ser detectada durante o momento da AGE de embriões bovinos (BORDIGNON et al., 1999). Esses e outros mecanismos tornam a cromatina repressiva para a transcrição desordenada de genes, fazendo com que após a AGE, apenas genes importantes para cada estágio de desenvolvimento sejam transcritos.

Em função disso, esses fatores capazes de modificar a estrutura da cromatina e que são tão importantes para o desenvolvimento embrionário de várias espécies foram apontados como excelentes candidatos para investigar a maior ou menor capacidade de oócitos e embriões para atingir o estágio de blastocisto, bem como para estimar a viabilidade desses embriões quando cultivados *in vitro*.

Proteínas do grupo de alta mobilidade e suas funções biológicas

As proteínas do grupo de alta mobilidade mais conhecidas como "*high-mobility-group*" (HMG; JOHNS, 1982) compreendem uma classe heterogênea de proteínas não-histonas, mas que também fazem parte da arquitetura da cromatina (GROSSCHEDL et al., 1994) e parecem atuar minimizando a atividade repressiva das histonas, facilitando a ocorrência de vários processos celulares importantes, como a transcrição gênica. Elas foram descobertas há mais de 30 anos como componentes da cromatina que apresentam alta mobilidade eletroforética (GOODWIN et al., 1973). Depois das histonas, as proteínas HMGs são as mais abundantes na cromatina e são encontradas em todas as células de eucariotas superiores, o que sugere que elas são importantes para o funcionamento celular.

Todas as HMGs são proteínas nucleares pequenas com menos de 30 kDa e sofrem extensivas modificações pós-translacionais. A maioria dessas proteínas liga-se à cromatina de forma reversível, no entanto, a maneira com que isso ocorre é determinada pela família a qual pertence cada proteína. Existem, basicamente, três famílias de proteínas HMG, sendo elas a HMGA (HMG-I/Y), HMGB (HMG-1/2) e HMGN (HMG-14/17). Essa classificação

das HMGs se dá de acordo com as estruturas dos domínios de ligação ao DNA e, também, com a especificidade dos seus substratos de ligação (BUSTIN, 2001).

A família HMGN é composta por duas proteínas conhecidas como HMGN1 e HMGN2 (anteriormente chamadas de HMG-14 e HMG-17, respectivamente). Essas duas proteínas, diferentemente daquelas pertencentes às famílias HMGA e HMGB (as quais ligam-se em estruturas do DNA em forma de B ou distorcidas), ligam-se diretamente aos nucleossomos, entre as porções espiraladas do DNA e o octâmero de histonas (CRIPPA et al., 1992; TRIESCHMANN et al., 1995a,b; BUSTIN, 1999). Portanto, as HMGNs são as únicas proteínas não-histonas sabidamente capazes de se ligarem dentro dos nucleossomos. No entanto, embora já tenha sido descoberto que as proteínas HMGN1 e HMGN2 apresentam três domínios funcionais de ligação aos nucleossomos (HOCK et al., 1998a,b; CRIPPA et al., 1992; TRIESCHMANN et al., 1995a,b; DING et al., 1997), ainda não é conhecido o mecanismo molecular pelo qual esses domínios interagem com a cromatina, tampouco foi determinada a estrutura tri-dimensional dessas proteínas.

Foi demonstrado em células somáticas que a presença das proteínas HMGN1 e HMGN2 no núcleo, é dependente do estágio do ciclo celular (HOCK et al., 1998b). Elas encontram-se co-localizadas com o DNA nuclear em interfase e prófase, mas ausentes durante as fases de metáfase e anáfase. Entretanto, essas proteínas aparecem novamente no núcleo na fase de telófase, concomitantemente com o aparecimento do envelope nuclear. Constataram também, que HMGN1 e HMGN2 são importadas para o interior do núcleo de forma ativa.

Já em oócitos e embriões de camundongos, SPADA et al. (1998) verificaram que a proteína HMG1 (pertencente à família HMGB) está presente em oócitos no estágio de vesícula germinativa, mas sua concentração diminui nos zigotos (1 célula). Demonstraram ainda que a transcrição do gene HMG1 em embriões tem início no estágio de duas células (momento da ativação do genoma embrionário em camundongos), apresentando altos níveis nos estágios de 4 células e mórula. Não obstante, a afinidade da HMG1 pela cromatina foi similar àquela observada em células somáticas (descrita acima), ou seja, HMG1 não está co-localizada com os cromossomos na fase de metáfase (da mitose), durante o desenvolvimento embrionário.

Mais tarde, MOHAMED et al. (2001) detectaram a presença dos transcritos e das proteínas HMGN1 e HMGN2 na cromatina de oócitos e embriões de camundongos até o estágio de blastocisto. Na seqüência, eles injetaram oligonucleotídeos antisense contra o RNAm dos genes HMGN1 e HMGN2 em embriões de uma célula e constataram que houve um decréscimo das proteínas desses genes nos estádios de 2 e 4 células, re-acumulando no estágio de 8 células. Constataram também, que esses embriões injetados clivam para o estágio de duas células, mas as clivagens subseqüentes são retardadas se comparadas aos de embriões controles injetados, demorando mais para atingirem o estágio de blastocisto. Da mesma forma, quando injetaram dentro do núcleo de embriões de 2 células peptídios das proteínas HMGN1 e HMGN2 correspondentes aos domínios de ligação dessas proteínas ao nucleossomo, ocorreu um atraso para que esses embriões atingissem o estágio de 4 células. Em geral, os resultados de MOHAMED et al. (2001) demonstraram que as proteínas HMGN1 e HMGN2 são componentes constitutivos da cromatina de oócitos e embriões de camundongos e estabelecem uma relação entre a estrutura da cromatina e o tempo necessário para a progressão do desenvolvimento embrionário.

Especificamente quanto a sua função, várias evidências apontaram o envolvimento da HMGN2 na regulação do processo de transcrição do DNA. Alguns estudos demonstraram que a região da cromatina que possui genes ativos (aptos à transcrição), contém duas ou três vezes mais HMGN2 se comparada à cromatina total (DRUCKMANN et al., 1986; DORBIC & WITTIG, 1987; POSTNIKOV et al., 1991). HOCK et al. (1998b) demonstraram em células cultivadas que as proteínas HMGN1 e HMGN2 estão concentradas em locais onde também se encontram altas concentrações da RNA polimerase II e novos transcritos, porém não foram detectadas no nucléolo. Eles também verificaram que a coloração nuclear da HMGN2 e seus transcritos foram perdidos em células permeabilizadas que sofreram introdução de peptídeos correspondentes ao domínio de ligação da HMGN2 ao nucleossomo (HOCK et al., 1998b). Similarmente, a injeção de anticorpos anti-HMGN2 em fibroblastos humanos provocou uma redução no processo de transcrição (EINCK & BUSTIN, 1983).

Outros estudos envolvendo oócitos de *Xenopus* (CRIPPA et al., 1993; TREISCHMANN et al., 1995a; TREISCHMANN et al., 1995b) e embriões de drosófila

(PARANJAPE et al., 1995) também demonstraram que as proteínas HMGN1 e HMGN2 estimulam a transcrição. Atualmente, acredita-se que esse estímulo ocorra por atuarem reduzindo o grau de compactação da cromatina. Na verdade, acredita-se que as proteínas HMGN1 e HMGN2 agem desestabilizando a estrutura da cromatina por ligarem-se aos dois principais elementos de compactação da mesma, que são a histona H1 e a cauda N-terminal da histona H3 (TRIESCHMANN et al., 1995a,b; DING et al., 1997; para revisão, BUSTIN, 1999, 2001; BIRGER et al., 2003; WEST et al., 2004).

Por outro lado, evidências recentes também apontam o envolvimento das proteínas HMG no processo de reparo do DNA (para revisão, REEVES & ADAIR, 2005). Embora as proteínas das famílias HMGA e HMGB pareçam exercer um efeito inibitório nesse processo. BIRGER et al. (2003) demonstraram que HMGN1 e HMGN2 atuam estimulando o mecanismo de reparo por excisão de nucleotídios. Nesse estudo, os autores compararam fibroblastos de embriões de camundongos que continham níveis normais da proteína HMGN1 (HMGN1^{+/+}) com fibroblastos de camundongos knockout (mutantes homozigotos HMGN1^{-/-}) e constataram que as células mutantes são, pelo menos, quatro vezes mais sensíveis à irradiação ultravioleta que os heterozigotos (HMGN1^{+/-}) que apresentaram um nível de sensibilidade intermediário. Demonstraram ainda, que a hipersensibilidade das células mutantes pode ser revertida pela transfecção de plasmídios expressando a forma normal da proteína HMGN1, o que não ocorreu com a transfecção de plasmídios expressando a forma mutante. Em função desses resultados, os autores postularam que a HMGN1 liga-se diretamente na cromatina e atua reduzindo sua compactação, possibilitando o acesso dos fatores de reparo no local lesionado do DNA.

Mais estudos são necessários no sentido de elucidar os mecanismos e fatores envolvidos no recrutamento da HMGN1 para o sítio do DNA lesionado. É possível que isso ocorra por influencia da histona γ H2A.X; entretanto, essa interação ainda não foi demonstrada. Da mesma forma, resta ainda investigar se a HMGN2, cuja origem e função são semelhantes a HMGN1, também participa do mecanismo de reparo do DNA.

Developmental Competence and Expression Profile of High-Mobility Group N2 and Acetylated Histone H3 (Lysine 14) in Parthenogenetic Bovine Embryos Produced from Oocytes Collected from Small and Large Follicles

GUILHERME M. BASTOS^{1,2}, PAULO BAYARD D. GONÇALVES¹ AND VILCEU BORDIGNON^{2*}

¹Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction -BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Department of Animal Science, McGill University, Ste-Anne-De-Bellevue, QC, Canada.

Correspondence to: Vilceu Bordignon, PhD

Address: McGill University, Department of Animal Science 21111, Lakeshore road, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

Postal Code: H9X3V9

Phone number: 514-398-7793

Fax number: 514-398-7964

E-mail address: vilceu.bordignon@mcgill.ca

ABSTRACT - The objective of this study was to verify whether the expression pattern of the High-Mobility Group N2 (HMGN2) and acetylated histone H3 Lysine 14 (Ac.H3K14) were affected by the origin of the oocytes (from small vs. large follicles) and time of cleavage (< 24hr vs. > 24 hr) after parthenogenetic activation (PA). Oocytes from small (1-2 mm) or large (4-8 mm) follicles were matured in vitro for 24 hr, selected for the presence of a polar body, and then parthenogenetically activated using Ionomycin (5 μ M/5 min) followed by 6-DMAP (2.8 mM/5 hr). After PA oocytes were cultured in synthetic oviduct fluid medium. Early (until 24 hr) and late (after 24 hr) cleaved embryos were fixed at 36, 50, 60, 70 and 80 hr after PA and immunocytochemically processed to detect HMGN2 or Ac.H3K14. The immunofluorescence signal was evaluated in each nuclei from all fixed embryos. The rate of nuclear maturation (81% vs. 59%), early cleavage (47% vs. 39%), and blastocyst (34% vs. 19%) were significantly higher ($P < 0.05$) in oocytes from large compared to small follicles. Early cleaved embryos derived from small vs large follicles had higher (4.5 ± 0.2 vs. 3.8 ± 0.2 ; $P < 0.05$) and lower (6.5 ± 0.3 vs. 7.5 ± 0.8 ; $P < 0.05$) number of nuclei at 36 and 50 hr after PA, respectively. The rate of Ac.H3K14 (61% vs. 38%) and HMGN2 (74% vs. 56%) positively stained nuclei at 60 hr post PA was higher ($P < 0.05$) in embryos derived from small compared to large follicles. However, more HMGN2 positively stained nuclei (94% vs. 75%; $P < 0.05$) were detected in embryos from large follicles at 80 hr post PA. In conclusion, the temporal proportion of embryonic nuclei with positive signal after HMGN2 and Ac.H3K14 immunofluorescence staining is affected by both follicle size and time to complete first cleavage.

Key Words: oocyte; developmental potential; HMGN2; Ac.H3K14

INTRODUCTION

Since the last few decades, *in vitro* production of embryos (IVP) from different mammalian species has been used to basic research in physiology and cell biology and, more recently, to commercial applications. However, the overall efficiency of a conventional IVP system is very low because only 30 to 40% of the oocytes reach the blastocyst stage (Xu et al., 1992; Rizos et al., 2002; for review see Hyttel et al., 1997; Hendriksen et al., 2000). Several aspects are known to affect oocyte meiotic and developmental competence such as female age, follicle status and size, oocyte morphology and IVP protocol. Also, it is well established in bovine and human species that early cleaved embryos followed by more rapid rates of development are more competent to reach blastocyst stage than those with slower developmental rates (Plante et al., 1994; Shoukir et al., 1997; Lonergan et al., 2000; Ward et al., 2001; Fenwick et al., 2002; Lequarre et al., 2003; Salumets et al., 2003). Many studies focus on optimize IVP systems including supplements in the medium with limited success (Ali and Sirard, 2002). On the other hand, most important events that drive cell function such as transcription, replication and repair happen at the chromatin level and little is known about the expression pattern of chromatin regulatory factors in bovine embryos and their relationship with developmental competence. Elucidating this issue would give an important contribution to developmental biology by identifying molecular differences between groups of competent and incompetent embryos to develop *in vitro*.

The oocyte starts growing inside the primordial stage up to a follicular size of 3-mm (Fair et al., 1995) when it reaches about 120 μm in diameter (for review see Hendriksen et al., 2000; Fair, 2003). Oocyte transcription, including nucleolar function (synthesis of rRNA), is activated in the secondary follicle and is maintained following its growth up to 3-mm tertiary follicle (Barnes and First, 1991). At this phase, the fully grown oocyte acquires meiotic competence to induce nuclear maturation *in vitro* in a process that starts with germinal vesicle breakdown (resumption of meiosis from prophase I) until reach metaphase II (MII) stage. *In vivo*, a cohort of FSH-dependent follicles about 4- to 5-mm diameter starts growth at the emergence of a follicular wave (Fortune, 1993) until some of them reach about 8-mm in diameter when follicular divergence takes place (Ginther et al., 1996). After divergence, the dominant follicle continues growing, followed by atresia of its

subordinate follicles, until reaches about 12-mm in diameter and becomes responsive to LH ovulatory stimuli. Just before the LH surge, the oocyte is believed to acquire its maximum developmental potential in response of a process called pre-maturation or capacitation triggered by follicular factors yet unknown (Hyttel et al., 1997; Hendriksen et al., 2000).

Experiments involving IVP of embryos usually use oocytes retrieved from 3- to 8-mm follicles but which did not grow enough to induce oocyte capacitation. Interestingly, most oocytes that can reach MII stage and are capable of complete the first cleavage in vitro do not develop past 4- to 8-cell stage, just before the embryonic genome activation (EGA) of transcription that usually happens during the long fourth cell cycle, coinciding with the 8- to 16-cell stage on bovine embryo (Telford et al., 1990; Barnes and First, 1991). This lack in development happens mainly in embryos produced from oocytes derived from < 3-mm follicles and that is the reason why they are classified as developmental incompetent. We hypothesized that one reason for the lack on embryo development could be the missregulation of chromatin function triggered by an insufficient or wrong temporal expression of chromatin regulatory factors during early embryogenesis.

In all eukaryotic cells, the basic unit of chromatin is the nucleosome that compact the genetic information into the nucleus. The nucleosome consists of 146 base pairs of DNA wrapped 1.7 times around an octamer of core histones that consists of two molecules of each H2A, H2B, H3 and H4 to form a 100 kDa protein complex. Further compaction is achieved at the exterior of the octamer by a fifth histone, H1, originating the higher-order-structure called heterochromatin (Luger et al., 1997; Wollfe, 1997). The N-termini of the core histones H3 and H4 are among the most highly conserved sequences in eukaryotes (Eberharther and Becker, 2002). Therefore, it is well established that acetylation of the N-terminal tails of these both histones is a reversible process that has a critical role in the folding of higher order chromatin structure, facilitating transcription factors binding to nucleosomal DNA template (Lee et al., 1993).

On the other hand, some nonhistone nuclear proteins also function as architectural elements in chromatin. The mammalian High-Mobility-Group (HMG) proteins are, after histones, the second most abundant and well characterized class of chromosomal proteins. They are called architectural transcription factors (Grosschedl e al., 1994) that recognize DNA structure, rather than sequence, and introduce structural modifications in both DNA

and chromatin substrates following binding, establishing active and inactive chromatin domains. In addition to their role in transcription, HMG proteins are recognized to participate in several nuclear processes such as chromatin and nucleosome remodeling, DNA replication and repair and genetic recombination (for review see Reeves and Adair, 2005; Bustin et al., 2001a). All HMGs are small nuclear proteins that can be divided into three families (Bustin, 2001b): HMGA family (formerly HMG-I/Y; Mw~10 kDa), HMGB (formerly HMG-1 and -2; Mw~25 kDa) and HMGN (formerly called HMGN1 and HMGN2; Mw ~ 10-20 kDa). HMGN family proteins specifically bind right inside nucleosomes, between the DNA spires and the histone octamer (Crippa et al., 1992; Trieschmann et al., 1995a, Trieschmann et al., 1995b; Bustin, 1999).

In the present study, we investigated the association between developmental competence and the immunodetection of HMGN2 and acetylated histone Ac.H3K14 chromatin regulatory factors in early and late cleaved parthenogenetic bovine embryos produced from developmental competent and incompetent oocytes, just before and during the time of EGA. Our objective was to compare the expression pattern of these chromosomal regulatory factors, measured by immunocytochemistry, in early embryos produced from oocytes derived from 1 to 2-mm and 4 to 8-mm follicles.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise indicated.

Oocyte Recovery and Selection

Bovine ovaries were collected at a commercial abattoir and transported to the laboratory (within 4 hr of slaughter) in saline solution at 30°C degrees. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) from small (1- to 2-mm diameter) and large (4- to 8-mm diameter) follicles were collected separately by aspiration using a 19-gauge needle attached to a 10-ml syringe. The COCs were selected according to their morphological characteristics (Leibfried and First, 1979), and only classes 1 and 2 (CCOs with several layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm) were used.

In Vitro Maturation

Selected COCs were washed in bicarbonate buffered tissue culture medium (TCM-199; Gibco BRL, Burlington, ON Canada) supplemented with 10% (v:v) fetal calf serum (FCS; Gibco). For maturation, groups of 40 COCs were placed into each well (separately according the follicle size category) of four-well dishes for 24 hr in 400- μ l of TCM-199 medium supplemented with 10% FCS, 50 μ g/ml LH (Ayerst, London, ON, Canada), 0.5 μ g/ml FSH (Folltropin-V; Vetrepharm, St. Laurent, PQ, Canada), 25 μ g/ml pyruvate, and 50 μ g/ml gentamicin under mineral oil and incubated in a humidified atmosphere at 39°C with 5% CO₂ in air.

Oocyte Activation and In Vitro Embryo Culture

After the maturation time, COCs were placed into a 2-ml Eppendorf tube containing 0.5 mg/ml hyaluronidase dissolved in 800 μ l of Ca⁺⁺- and Mg⁺⁺-free PBS supplemented with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) and vortexed at maximum speed for 5 min to remove cumulus cells. Denuded oocytes were washed twice (to separate them from the dispersed cumulus cells) in 35-mm Petri dishes, each containing 3 ml of TCM-199 plus 10% FCS. At this time, oocytes with visible degenerative changes or physical damage were discarded. Then, the remaining oocytes were selected for the presence of the first polar body (MII) and submitted to parthenogenetic activation as described (Susko-Parrish et al., 1994). Briefly, matured oocytes from each follicular size group were rinsed in TCM-199 Hepes-buffered medium containing 1 mg/ml BSA, exposed to 5 μ M ionomycin for 5 min in TCM-199 medium supplemented with 1mg/ml BSA, transferred to TCM-199 medium supplemented with 30 mg/ml BSA for 5 min and finally rinsed again in TCM-199 medium containing 1 mg/ml BSA. Except for rinsing, all steps of activation were done in a four-well dish that was kept inside the incubator (at 38.5°C in 5% CO₂ in air) among the oocyte manipulation intervals.

Then, oocytes were washed in 35-mm Petri dishes containing the modified synthetic oviduct fluid medium (mSOFaa) supplemented with 10% of FCS, MEM non essential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) and MEM essential amino acids (Gibco BRL). After that, groups of 10 oocytes were transferred to 100- μ l droplets of mSOFaa containing 2.8 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), covered with oil, and incubated in

an atmosphere of 5% CO₂ in air at 39°C for 4-5 hr. After that time, activated oocytes (groups of 10) were then washed several times and cultured in 100 µl droplets of mSOFaa containing 10% FCS for 50, 60, 70 and 80 hr after activation. Embryo culture was performed at 39°C in 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Rates of early and late cleavage were evaluated at 24 and 50 hr after activation, respectively. Early cleaved embryos (until 24 hr after activation) produced from each group of oocytes (considering the follicle size) were transferred to a new mSOFaa droplet and cultured under the same conditions described above.

Immunocytochemistry

At 50, 60, 70 and 80 hr after PA, early and late cleaved embryos produced from oocytes derived from small and large follicles were freed of the zona pellucida and fixed separately. Every week (1 replication per week) two out of four schedules (described above) were used for fixing embryos (for example: 50 and 60 hr after PA on first week), totalizing 8 groups of embryos (factorial 2 x 2 x 2; group according to follicle size x time to first cleavage x fixed time) to be fixed every week. Half of the embryos within each group were chosen randomly to be fixed at the first schedule (for example at 50 hr) and the other half 10h later (for example at 60 hr).

The embryos had the zona pellucida removed in a 100 µl droplet of a solution containing 0.5% of pronase (Sigma protease) dissolved in TCM-199 plus 10% FCS under stereomicroscope visualization and then washed several times in TL-Hepes-buffered medium supplemented with 3% BSA. Zona-free embryos were fixed for 20 min at room temperature in a solution of 4% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS containing 0.1% PVA, permeabilized for 1 hr in PBS with 0.5% Triton X-100 at 37°C and stored at 4°C in PBS supplemented with 3% BSA and 0.5% Triton X-100 until immunofluorescence staining starts.

Excepting the antibodies, the same protocol was used for HMGN2 and Ac.H3K14 staining. Fixed embryos were washed and incubated in blocking solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in PBS) for 1 hr at room temperature, then transferred to a rabbit anti-mouse HMGN2 (kindly gift by Dr. Hugh Clarke) or an rabbit anti-acetyl histone H3 lysine 14 (Upstate Cell Signaling Solutions, NY) primary antibody in a dilution rate of 1:250 and

1:500 in blocking solution, respectively, and incubated overnight at 4°C. As a negative control, a sample of embryos was incubated in the absence of primary antibody in each replicate. Following overnight incubation, embryos were then washed three times for 20 min each in blocking solution and incubated for 1 hr at room temperature in the presence of an isothiocyanate-conjugated or a CY3-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. PA) diluted 1:200 or 1:100 in blocking solution for HMGN2 or Ac.H3K14 staining, respectively. The embryos were then washed three times again (20 min each time) in blocking solution and mounted on a microscope slides in a drop of Moviol containing 10 µg/ml of Hoechst 33342 (Hoechst, Montreal, QC, Canada) for chromatin visualization and covered with a coverslip that was fixed to the slide with nail polish. The slides were examined 30 min after slides have been mounted or stored at 4°C in the dark to be evaluated in the next day.

Fluorescence Microscopy Evaluation and Digital Image Record:

Specimens were examined by epifluorescence using a Nikon eclipse 80i microscope (Nikon, Japan). Considering all embryos fixed at 36, 50 and 60 hr after PA, only embryos with 2 to 8 nuclei had their staining data recorded. For all embryos fixed at 70 and 80 hr, staining data were recorded from those containing at least 4 nuclei.

Firstly, each embryo was evaluated according to the total number of nucleus in the DAPI filter. Then, immunofluorescence intensity of each nucleus was classified subjectively as positive or negative. Only nuclei with strong or mid immunofluorescence intensity were considered as positive stained to Ac.H3K14 or HMGN2 as demonstrated in Figure 1. Digital images were recorded with Retiga 2000R monochromo digital camera (Qimaging, BC, Canada) and SimplePCI Imaging Software (Compix Inc. PA). Gray and color scale images were obtained using the zoom function in a 40x objective.

Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted in the SAS statistical program. The average number of embryonic nuclei was examined by ANOVA. All data described in percentage were analyzed using the PROC CATMOD (Categorical Data Analysis Procedures). Contrast statements were used to compare the results among groups or in the same group

considering different fixed time after PA. Data regarding developmental competence of embryos were obtained from 15 replications. For all analyses, differences were considered to be statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

RESULTS

Developmental Competence

The main objective of this study was to detect possible differences in chromatin regulatory factors between embryos with high and low developmental competence. Thus, the first step was done to demonstrate that embryos produced from oocytes derived from small and large follicles effectively differ in developmental competence. The total amount of oocytes and embryos used in this study and results regarding developmental competence are demonstrated in Table 1.

Table 1 shows that oocytes from large follicles had significant ($P < 0.05$) higher rates of nuclear maturation, early cleavage and development to blastocyst stage than those from small follicles. However, there were no significant differences ($P > 0.05$) on rates of late and total cleavage between oocytes from small and large follicles.

The average number of embryonic nuclei at 36, 50 and 80 hr after PA was evaluated, subdividing the embryos in groups according to follicle size of oocytes that originated the embryos (small or large follicles) and the elapsed time to complete the first cleavage. All data regarding this issue are presented in Table 2.

Early cleaved embryos (before 24 hr of PA) produced from oocytes derived from small follicles had a higher number of nuclei at 36 hr than those produced from oocytes derived from large follicles ($P < 0.05$). However, the contrary was found at 50 hr. These results indicated that oocytes from small follicles produced embryos with faster capacity to complete the second cell cycle following the first cleavage, but this parameter was reversed at 50 hr in benefit of embryos produced from oocytes derived from large follicles. At 80 hr, early cleaved embryos produced from oocytes derived from both follicle sizes and that continued development (at least more one cell cycle - 4 nuclei) did not show significant difference ($P > 0.05$) in the average number of nuclei, showing an uniformity regarding this parameter around the time of embryonic genome activation. Also, there was no difference ($P > 0.05$) between the total number of cleaved embryos (early plus late cleaved) from

oocytes derived from small and large follicles when the average number of nuclei was compared at four times evaluated.

Immunodetection of HMGN2

To investigate the immunolocalization pattern of HMGN2 and Ac.H3K14 embryos were fixed at 50, 60, 70 and 80 hr after PA. Embryos fixed at 36 hr after PA were not used for HMGN2 or Ac.H3K14 staining.

Figure 2 shows that there was no significant difference at 50 hr (56.8% vs. 46.6%; $P > 0.05$), but embryos produced from oocytes derived from small follicles had a higher rate ($P < 0.05$) of positive nuclei (74.2%) than those from large follicles (57.5%) at 60 hr. In contrast, rate of positive nuclei at 80 hr was higher ($P < 0.05$) in embryos produced from oocytes derived from large follicles (93.6%) in comparison to those from small follicles (75.0%). Taken together, these results indicate that HMGN2 binds in higher proportion ($P < 0.05$) earlier (60 hr) and starts to detach earlier (80 hr) on chromatin of embryos produced from oocytes derived from small follicles in comparison to those derived from large follicles.

Subsequently, besides follicle size, our evaluations also included data from early and late cleavage after PA, resulting in four groups of embryos (small and large follicles x early and late cleavage) whose results are demonstrated in Figure 3. Interestingly, early cleaved embryos had lower rates ($P < 0.05$) of HMGN2 positive nuclei at 50, 60 and 70 hr after PA compared to those late cleaved, excepting at 80 hr (Fig. 4). When comparing only early cleaved embryos, those produced from oocytes derived from small follicles showed higher rate ($P < 0.05$) of positive nuclei at 50 hr after PA (47.0%) compared to those derived from large follicles (21.3%), but there were no difference ($P > 0.05$) at 70 hr (83.4% vs. 84.7%) and 80 hr (86.7% vs. 93.3%). On the other hand, when comparing only late cleaved embryos, those produced from oocytes derived from large follicles showed higher rate ($P < 0.05$) of positive nuclei at 50, 70 and 80 hr after PA in comparison to those produced from oocytes derived from small follicles (89.3%, 100% and 94.2% vs. 67.9%, 93.6% and 64.9%, respectively), but there was no difference ($P > 0.05$) at 60 hr (82.6% vs. 84.0%). Interestingly, when comparing each group of embryos at four fixed times, only early cleaved embryos produced from oocytes derived from large follicles (high

developmental competence) showed a gradual increase ($P < 0.05$) on rates of positive nuclei (excepting at 70 to 80 hr; $P > 0.05$), where most nuclei were negative at 50 hr (21.3%), but in contrast they were highly positive stained at 80 hr after PA (93.3%).

Detection of Acetylated Histone H3 (Lysine 14)

Immunostaining for Ac.H3K14 protein showed exactly the same tendency as described above to HMGN2, excepting at 80 hr (Fig. 5). The rate of positive nuclei did not differ ($P > 0.05$) at 50 hr (34.3% vs. 38.2%), but at 60 hr, embryos produced from oocytes derived from small follicles had a higher rate ($P < 0.05$) of positive nuclei (61.1%) than those from large follicles (38.3%), demonstrating that Ac.H3K14 binds in higher proportion ($P < 0.05$) earlier (60 hr) on chromatin of embryos produced from oocytes derived from small follicles (less developmental competent) in comparison to those produced from oocytes derived from large follicles. At 70 hr, rates of positive nuclei in embryos produced from oocytes derived from small (72.4%) and large (75.0%) follicles were significantly higher ($P < 0.05$) in comparison to 50 hr (34.3% and 38.2%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively) and 60 hr (61.1% and 38.3%).

When the time to complete first cleavage was evaluated in addition to follicle size (Fig. 6), the same tendency to HMGN2 immunostaining was kept at 50 hr after PA, it means, early cleaved embryos showed lower rates ($P < 0.05$) of nuclei with Ac.H3K14 positive staining than those late cleaved. Interestingly, early cleaved embryos produced from oocytes derived from small follicles showed higher rates ($P < 0.05$) of nuclei with positive staining at 50 hr (27.2% vs. 4.8%) and 60 hr (64.3% vs. 30.0%) when compared to those early cleaved produced from oocytes derived from large follicles.

At 80 hr, early cleaved embryos produced from oocytes derived from small follicles showed a significant lower ($P > 0.05$) rate of positive nuclei (51.0%) when compared to the others three groups of embryos (64.4%, 71.5% and 70.7% for early cleaved from large follicles, late cleaved from small follicles and late cleaved from large follicles, respectively), and was also the only group that significantly decreased ($P < 0.05$) this rate when compared to 70 hr (72.9%). Similarly to HMGN2 results, Figure 5 shows that most nuclei from early cleaved embryos produced from oocytes derived from large follicles

(high developmental competence) were Ac.H3K14 negative stained at 50 and 60 hr and then became highly positive later at 70 and 80 hr after PA.

DISCUSSION

The present study investigated whether the difference in developmental competence of embryos produced from PA oocytes derived from small or large follicles could be related to an insufficient or abnormal temporal expression of chromatin regulatory factors. We decided by parthenogenetic activation because it overcomes the individual sperm variability. Time to first cleavage has been largely appointed as predictive of embryonic competence in bovine oocytes, with the earliest cleaving being more likely to develop to the blastocyst stage than those that cleave late (Plante, et al., 1994; Lonergan et al., 1999, 2000; Ward et al., 2001). However, evaluations of developmental competence involving both follicle size and time to first cleavage have not been described. We found that oocytes from large follicles had higher rates ($P < 0.05$) of early cleavage, total cleavage and blastocyst stage in comparison to those from small follicles (Table 1), showing their higher developmental potential besides differences in nuclear maturation. Moreover, blastocyst rates (Table 1) are in agreement to those from Blondin and Sirard (1995), where oocytes derived from follicles < 3 mm had a lower developmental competence but they could not show differences between 3-5 and > 5 mm.

Some experiments use cell number as a standard parameter to define a developmental stage, whereas average number of nuclei has been used only when evaluating blastocyst stage. Nuclei is a better parameter to be measured than cells number even in early stages of embryo development, because it can be easily differentiated one from another and counted under fluorescence microscopy. Moreover, sometimes embryos contain one or more cells with two nuclei each just because the cell did not completed the cytokinesis yet, what could be done very shortly if the embryo would has been kept in culture. So, our experimental design used both follicle size and time to first cleavage to compare the average number of embryonic nuclei among groups of embryos. Data did not show significant difference ($P < 0.05$) in the average number of nuclei, at any time evaluated, when comparing the total of cleaved embryos produced from oocytes derived from small or large follicles (Table 2). Early cleaved embryos produced from oocytes

derived from small follicles showed faster cell divisions at 36 hr, as a tentative to survive and continue developing. Contrarily, embryos produced from oocytes derived from large follicles have slower rates ($P < 0.05$) of mitosis very soon after first cleavage, but at 50 hr after PA already showed a higher ($P < 0.05$) number of nuclei than those produced from oocytes derived from small follicles, as an indicative that they are more competent to following development at later stages. The paired number of nuclei at 80 hr revealed uniformity between early cleaved embryos produced from both groups of oocytes, which were probably going through or just have transcended the burst of EGA at this time.

The most interesting point of the present study was the association that occurred among the above described data and those from immunofluorescence detection of HMGN2 and Ac.H3K14. HMGN2 and HMGN1 are abundant chromosomal protein that bind to nucleosomes and enhance transcription. However, few studies involving both HMGN proteins focused on mammalian embryos so far. Transcripts expression (mRNA) of HMGN1 and HMGN2 were previously demonstrated to be developmentally regulated in bovine embryos (Vigneault et al., 2004). The authors found that maternal HMGN1 and HMGN2 transcripts are both abundant in oocytes but decrease after fertilization and become almost undetectable at the eight-cell stage, coinciding with the time of EGA (Vigneault et al., 2004). Mohamed et al. (2001) investigated HMGN1 and HMGN2 immunodetection in mouse embryos and found that both proteins were present on oocytes and early embryonic chromatin. They also described that a transient depletion or displacement of these proteins slowed the progression of preimplantation development and was associated with a transient reduction in RNA and protein synthesis. So, we hypothesized that higher rates of HMGN2 positive nuclei should be found on competent bovine embryos, it means, in those produced from oocytes derived from large follicles and/or early cleaved.

Our results indicated that HMGN2 protein is expressed gradually on embryonic chromatin from 50 to 70 hr after PA (Fig. 3). Considering that EGA on bovine embryo happens around the fourth cell cycle, all protein content of the embryo before this time including HMGN2 is probably maternal inherited. The stability of HMGN2 protein on early embryo is not known so far, but Merz et al. (1981) described that the average half-life of proteins of the early mouse embryo is about 12 hr. It might be also considered that

catabolism of the existing proteins likely diminishes their stores and that the remaining HMGN2 protein should be subdivided between existing and newly synthesized chromatin, further reducing the quantity per nuclei. So, a possible explanation for this gradual increase on HMGN2 protein during early development is that maternal inherited mRNA encoding this protein is may be regulated by a mechanism that allows it to be translated gradually until the time of EGA. Moreover, this gradual increase on HMGN2 nuclear content (measured by immunofluorescence intensity) until 70 hr after PA corroborates with the gradual decrease in the HMGN2 mRNA described by Vigneault et al. (2004) since oocyte activation, probably as a result of its gradual increased translation by ribosomes to protein until the time of EGA.

The higher rate ($P < 0.05$) of positive nuclei at 60 hr favorable to embryos produced from oocytes derived from small follicles in comparison to those produced from large follicles (Fig. 3) is may be a tentative to survive through development, triggered by a premature translation of mRNA encoding HMGN2 protein. The increased rates of positive nuclei from 60 to 70 hr after PA in both groups of embryos (Fig. 3), confirmed that 70 hr is an important developmental time, where probably most embryos were going through EGA. This explanation is supported by studies showing that chromatin containing transcriptable genes is two or threefold enriched in HMGN1 and HMGN2 proteins (Druckmann et al., 1986; Dorbic and Wittig, 1987; Postnikov et al., 1991). Moreover, it was demonstrated by Hock et al. (1998) in somatic cells that both HMGN proteins selectively enhance RNA polymerase II dependent transcription.

Interestingly, at 80 hr, only embryos produced from oocytes derived from small follicles showed a significant decrease ($P < 0.05$) in the rate of positive nuclei (Fig. 3), what corroborates to their lower capacity to continue developing over the time of EGA, probably due an inability of the embryonic chromatin to synthesize newly mRNA. Moreover, using mice embryos, Mohamed et al (2001) found that a depletion of HMGN1 and HMGN2 during the transition from two (time of EGA in mice embryos) to four cells stage triggered a delay in embryonic development thereafter.

When we analyzed the staining profile of embryos produced from oocytes derived from small or large follicles but subdivided according to the time to complete first cleavage, it was found that those early cleaved produced from oocytes derived from large

follicles showed the lower rates ($P < 0.05$) of positive nuclei at 50 hr, keeping the same tendency at 60 hr (Fig. 4). Considering that this class of embryos have the best developmental competence, may be it can be considered that all others three groups of embryos showed in Figure 3 had abnormal HMGN2 staining until 60 hr after PA. Although late cleaved embryos produced from oocytes derived from large follicles have shown a significant decrease ($P < 0.05$) in the rates of positive nuclei from 70 to 80 hr, the rate of this group of embryos did not differ from that of early cleaved at 80 hr, indicating an later uniformity regarding the normal pattern of HMGN2 staining may be acts allowing this group of embryos to continue developing similarly to early cleaved embryos produced from the same oocyte source (large follicles). This result suggests that the higher developmental competence of embryos produced from oocytes derived form large follicles can not be attributed only to those cleaved embryos, but also to the high capacity of late cleaved embryos in continue developing, contrarily to those late cleaved produced from oocytes derived from small follicles that showed a significant decrease ($P < 0.05$) on rate of positive nuclei from 70 to 80 hr.

No longer, epigenetic events like histone acetylation/deacetylation is developmentally regulated in several species like *Xenopus* (Almouzni et al., 1994), mouse (Wiekowski et al., 1997) and bovine (Santos et al., 2003), and have been considered as crucial time-dependent events required to normal embryo development. In bovine embryo, chromatin undergoes extensive nuclear modifications during the first cell divisions, while transcription is initially silenced. It is expected to occurs a gradual decrease on histone acetylation in the beginning of embryonic development and an abrupt increase during the time of EGA, followed by a new decrease (deacetylation) thereafter (Santos et al., 2003). Interestingly, we found similar results between HMGN2 and Ac.H3K14 staining at 50 and 60 hr, where embryos produced from oocytes derived from both follicles sizes showed a significant difference ($P < 0.05$) on rates of positive nuclei only at 60 hr. The significant increase ($P < 0.05$) in the rates of Ac.H3K14 positive nuclei that occurred in both groups of embryos from 60 to 70 hr was probably triggered by the burst of EGA that usually occurs at this time-point. Similarly, Wiekowski et al. (1997) found that histone H4 is predominantly diacetylated in both 1-cell and 2-cell mouse embryos (time of EGA in this specie), followed

by deacetylation towards an unacetylated and monoacetylated H4 population from the late 2-cell to 4-cell stage.

When we analyzed the Ac.H3K14 staining according to the time to complete first cleavage besides follicle size, all four groups of embryos (Figure 4) showed exactly the same pattern of HMGN2 staining at 50 hr, it means, only those early cleaved produced from oocytes derived from large follicles showed significantly low rates ($P < 0.05$) of Ac.H3K14 positive nuclei. These standard partial results between HMGN2 and Ac.H3K14 staining at 50 hr indicate reliable differences among the groups of embryos evaluated in this study in terms of protein immunoexpression.

At 60 hr, the higher rates ($P < 0.05$) of Ac.H3K14 positive staining in both early and late cleaved embryos from small follicles in comparison to those from large follicles indicate a premature increase on nuclear acetylation levels of these classes of embryos. As a consequence, this missregulation of chromatin function may be triggers a premature EGA on these embryos that probably impairs their further development. As previously described to HMGN2 staining, rates of Ac.H3K14 positive nuclei were uniformly high at 70 hr in all four groups of embryos (Fig. 6), coinciding with the expected time to EGA, where chromatin might be unfolded to allows access to regulatory factors. That is an important point, since it was described by Trieschmann et al., (1998) that chromatin unfolding is facilitated by specific interactions between the C-terminal of the HMGs and the N-terminal tail of histone H3.

In conclusion, our results firstly confirm that parthenogenetic bovine embryos produced from oocytes derived from 4-8 mm follicles are more developmental competent than those produced from 1-2 mm follicles. Secondly, early cleaved embryos produced from oocytes derived from small or large follicles show a time-related difference in the number of nuclei at 36 and 50 hr after PA, but it is equalized at 80 hr; while there is no difference when considering the total cleaved embryos produced from oocytes derived from both classes of follicles sizes studied. Finally, the results of the present study confirm our hypothesis that immunoexpression pattern of HMGN2 and Ac.H3K14 proteins during early stages of embryo development depends of follicle size used as source of oocytes, time to complete first cleavage and time in culture, showing a considerable variation on immunoexpression profile according to developmental competence of the embryos.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Colbex abattoir (Canada) for providing bovine ovaries and the technical support of Limei Che. We are also grateful to CAPES and CNPq for providing a fellowship to the first author while in Brazil and Canada. This study was supported by grants from NSERC/Canada and CNPq from Brazil.

REFERENCES

- Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66:901-905.
- Almouzni G, Khochbin S, Dimitrov S, Wolffe AP. 1994. Histone acetylation influences both gene expression and development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 165:654-669.
- Barnes FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29:117-123.
- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 41:54-62.
- Busitn M. 2001. Chromatin unfolding and activation by HMGN chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 26:431-437.
- Bustin M. 2001. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 26:152-153.
- Crippa MP, Alfonso PJ, Bustin M. 1992. Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J Mol Biol* 228:442-449.
- Dorbic T, Witting B. 1987. Chromatin from transcribed genes contains HMG17 only downstream from the starting point of transcription. *EMBO J* 6:2393-2399.
- Druckmann S, Mendelson E, Landsman D, Bustin M. 1986. Immunofractionation of DNA sequences associated with HMG-17 in chromatin. *Exp Cell Res* 166:486-496.
- Eberharter A, Becker PB. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep* 3:224-229.

- Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42:437-442.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78:203-216.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. 2002. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 17:407-412.
- Fortune JE. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Anim Reprod Sci* 33:111-125.
- Grosschedl R, Giese K, Pagel J. 1994. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 10:94-100.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55:1187-1194.
- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg MM, Bevers MM, Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53:11-20.
- Hock R, Wilde F, Scheer U, Bustin M. 1998. Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on transcriptional activity. *EMBO J* 17:6992-7001.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73-84.
- Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48:76-86.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A and Donnay I. 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod* 69:1707-1713.
- Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, de la Fuente J and Boland MP. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth

- factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocyst produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57:146-152.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage and the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 117:159-167.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.
- Merz EA, Brinster RL, Bruner S, Chen HY. 1981. Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *J Reprod Fertil* 61:415-418.
- Mohamed OA, Bustin M, Clarke HJ. 2001. High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. *Develop Biol* 229:237-249.
- Plante L, Plante C, Shepherd DL, King WA. 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39:375-383.
- Postnikov YV, Shick VV, Belyavsky AV, Khrapko KR, Brodolin KL, Nikolskaya TA, Mirzabekov AD. 1991. Distribution of high mobility group proteins ½, E and 14/17 and linker histones H1 and H5 on transcribed and non-transcribed regions of chicken erythrocyte chromatin. *Nucleic Acids Res* 19:717-725.
- Reeves R, Adair JE. 2005. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair* 4:926-938.
- Rizos D, Ward F, Duff P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-248.
- Salumets A, Hydén-Granskog C, Makinen S, Suikkari A, Tiitinen A and Tuuri T. 2003. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 18:821-825.

- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 13:1116-1121.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. 1997. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 12:1531-1536.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schtzkus V, First NL. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 166:729-739.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90-100.
- Trieschmann L, Alfonso PJ, Crippa MP, Wolffe AP, Bustin M. 1995a. Incorporation of chromosomal proteins HMG-14/HMG-17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes. *EMBO J* 14:1478-1489.
- Trieschmann L, Martin B, Bustin M. 1998. The chromatin unfolding domain of chromosomal protein HMG-14 targets the N-terminal tail of histone H3 in nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci* 95:5468-5473.
- Trieschmann L, Postnikov YV, Rickers A, Bustin M. 1995b. Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: Definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol Cell Biol* 15:6663-6669.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 70:1701-1709.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. 2001. Paternal influence on the time of the first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryos development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev* 60:47-55.

- Wiekowski M, Miranda M, Nothias JY, DePamphilis ML. 1997. Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J Cell Sci* 110:1147-1158.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ, King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matures and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertil* 94:33-43.

Table 1. Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Bovine Oocytes Derived from Small or Large Antral Follicles

Follicle Size	Number of		Activated Oocytes (n)	Cleavage (Hours after parthenogenetic activation)						Blastocyst (Day 7)		
	Oocytes n	MII		<24 hr		>24 hr		Total (50 hr)		n/total	(% ± S.E.)	
		n		(% ± S.E.)	n	(% ± S.E.)	n	(% ± S.E.)	n			(% ± S.E.)
1 to 2 mm	1756	1031	58.7 ± 2.2 ^A	1009	392	38.9 ± 2.7 ^A	377	37.4 ± 2.2 ^A	769	76.2 ± 2.1 ^A	35/181	18.9 ± 2.6 ^A
4 to 8 mm	360	292	81.1 ± 2.0 ^B	288	135	46.9 ± 4.6 ^B	104	36.1 ± 3.6 ^A	239	83.0 ± 3.0 ^B	45/145	34.3 ± 5.2 ^B
Total	2116	1323	62.5 ± 2.5	1297	527	40.6 ± 2.7	481	37.1 ± 2.1	1008	77.7 ± 1.9	80/326	24.5 ± 3.8

Within a column, values without a superscript common letter (A, B) are different ($P < 0.05$).

Percentage data represent means of 15 replications, excepting for blastocyst rates (means of 5 replicates).

Percentage data are followed by Standard Error (S.E.)

Table 2. Average Number of Nuclei in Bovine Embryos Produced from Parthenogenetically Activated Oocytes Derived from Small or Large Antral Follicles

Follicle Size (Group)	Cleavage (Hours after PA)	Time after parthenogenetic activation (PA)					
		36 hr		50 hr		80 hr	
		Embryos n	Nuclei (Mean \pm S.E.)	Embryos n	Nuclei (Mean \pm S.E.)	Embryos n	Nuclei (Mean \pm S.E.)
1 to 2 mm	Early (< 24 hr)	78	4.5 \pm 0.2 ^{Aa}	81	6.5 \pm 0.3 ^{Ab}	87	8.4 \pm 0.6 ^{Ac}
4 to 8 mm	Early (< 24 hr)	42	3.8 \pm 0.2 ^{Ba}	17	7.5 \pm 0.8 ^{Bb}	42	8.0 \pm 0.8 ^{Ab}
1 to 2 mm	Total	115	3.9 \pm 0.1 ^{Ba}	157	5.7 \pm 0.2 ^{Ab}	190	7.3 \pm 0.3 ^{Ac}
4 to 8 mm	Total	61	3.4 \pm 0.2 ^{Ca}	28	6.7 \pm 0.6 ^{ABb}	60	7.3 \pm 0.6 ^{Ab}
Both	Total	176	3.7 \pm 0.1	185	5.8 \pm 0.2	250	7.3 \pm 0.3

Within a column, values without a common capital letter (A, B, C, D) means statistical difference ($P < 0.05$) among groups according to follicle size and time to first cleavage.

Within the same line, values without a common small letter (a, b, c, d) means statistical difference ($P < 0.05$) within the same group among the different fixed time after parthenogenetic activation.

Data indicating average number of embryonic nuclei are followed by Standard Error (S.E.).

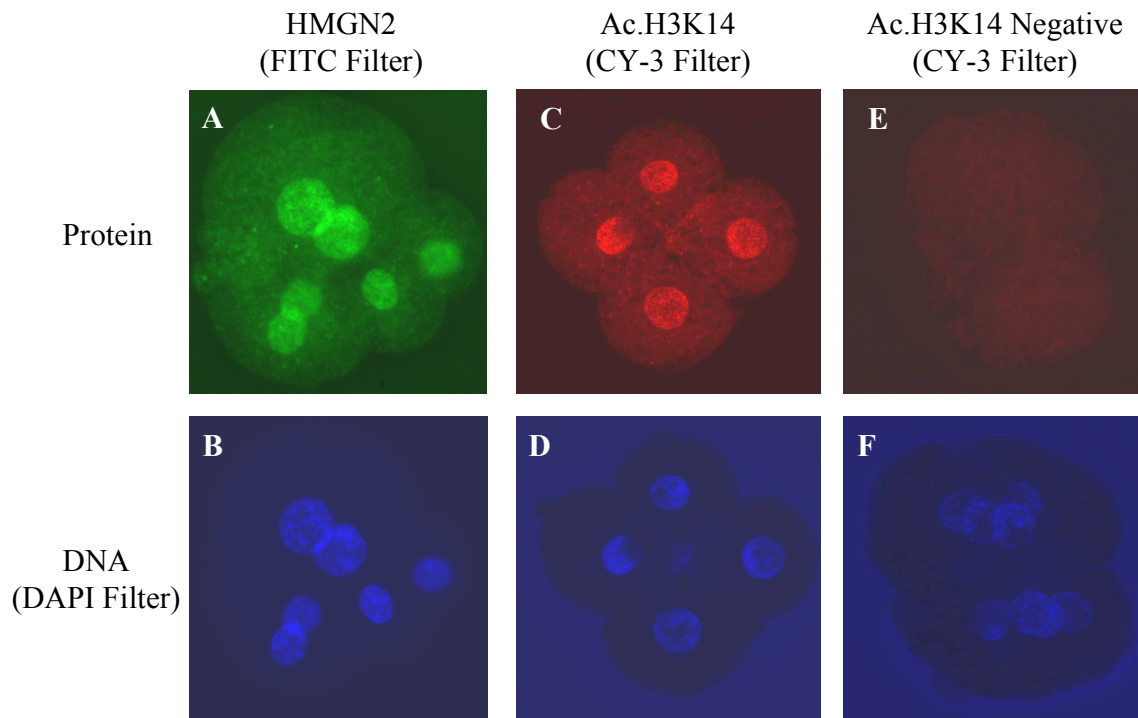


Fig. 1. Fluorescence microscope image of High-Mobility-Group N2 protein (HMGN2) and Acetylated Histone H3K14 (Lysine 14) abundance in bovine embryos fixed at 50 hr after parthenogenetic activation. Embryos were visualized in a FITC filter (green color) to detect HMGN2 signal and in a CY-3 filter (red color) to detect Ac.H3K14 signal. DAPI filter was used to detect DNA (blue color). (A,B) Embryo containing six nuclei with positive HMGN2 signal; (C,D) Embryo containing four nuclei with positive Ac.H3K14 signal; (E,F) Control embryo containing eight nuclei with negative Ac.H3K14 signal.

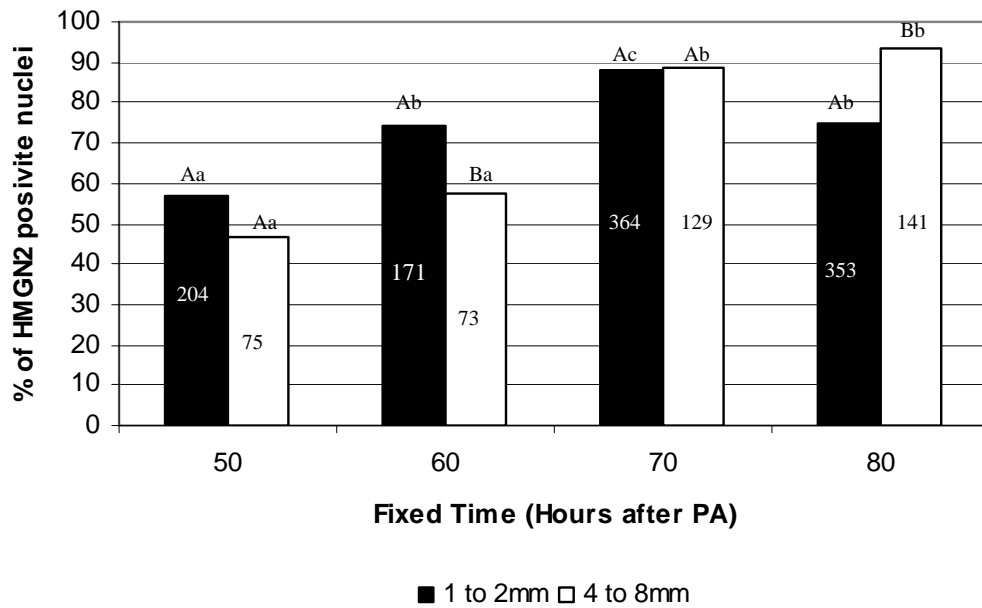


Fig. 2. Rates of High-Mobility-Group N2 (HMGN2) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles. Embryos were collected, fixed and immunostained at 50, 60, 70 and 80 hr after oocyte activation. A total amount of 175 and 70 embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B) in the same fixed time were different ($P < 0.05$). Columns without a common small letter (a, b, c) in the same color bar along the four fixed times were different ($P < 0.05$).

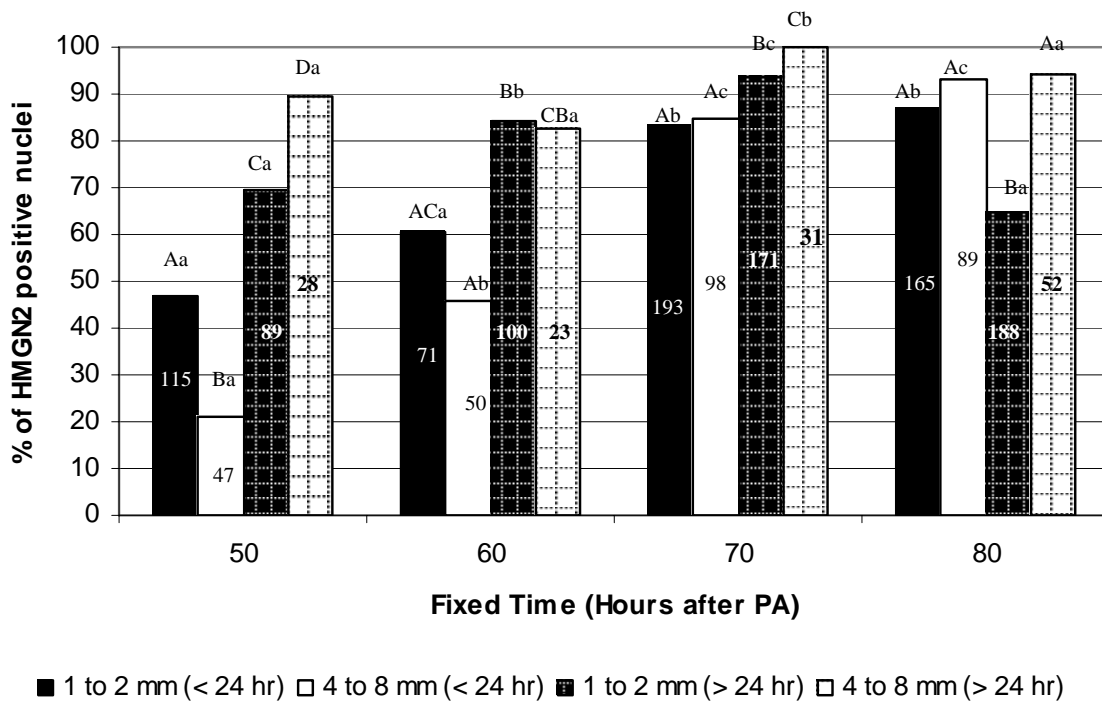


Fig. 3. Rates of High-Mobility-Group N2 (HMGN2) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr after PA). Embryos were collected, fixed and immunostained at 50, 60, 70 and 80 hr after oocyte activation. A total amount of 80 and 43 early cleaved plus 95 and 27 late cleaved embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same fixed time were different ($P < 0.05$). Columns without a common small letter (a, b, c, d) in the same color bar along the four fixed times were different ($P < 0.05$).

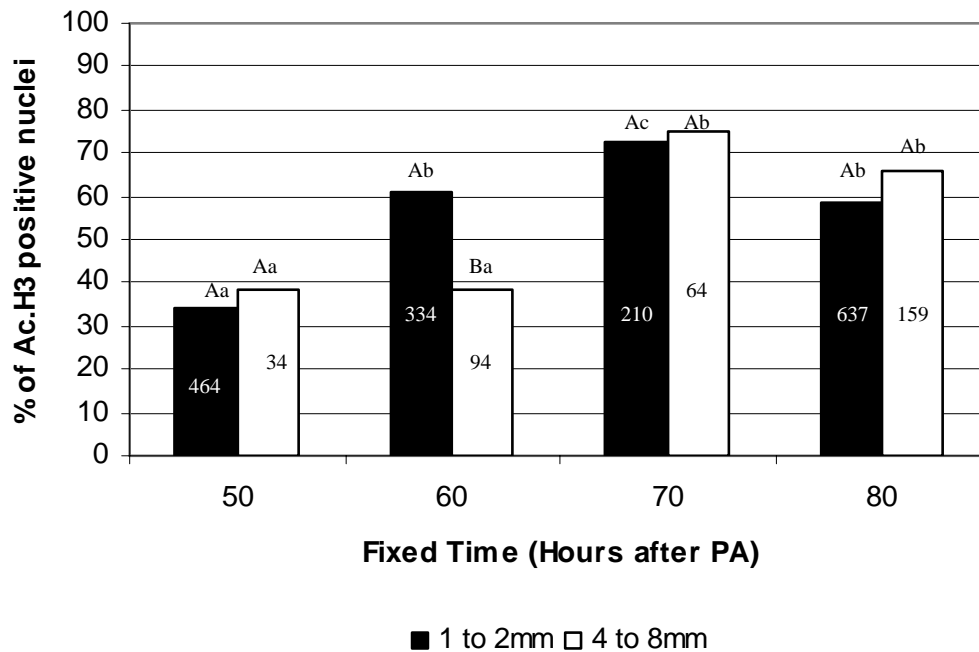


Fig. 4. Rates of Acetylated Histone H3 (Lysine 14; Ac.H3) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles. Embryos were collected, fixed and immunostained at 50, 60, 70 and 80 hr after oocyte activation. A total amount of 335 and 89 embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B) in the same fixed time were different ($P < 0.05$). Columns without a common small letter (a, b, c) in the same color bar along the four fixed times were different ($P < 0.05$).

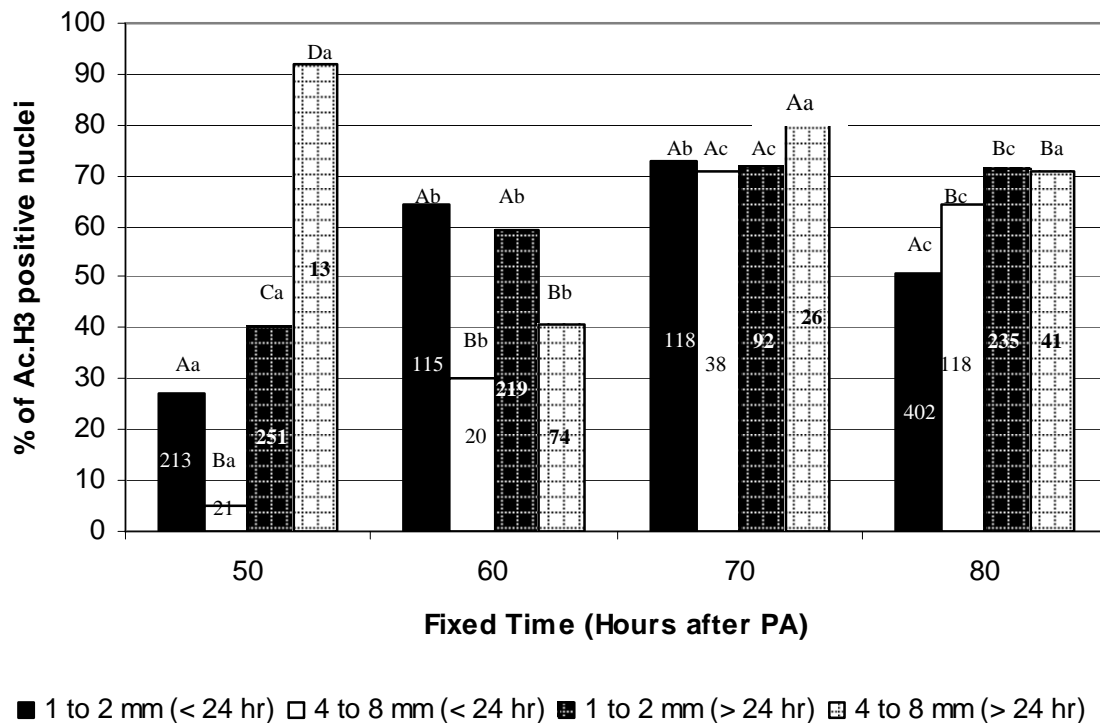


Fig. 5. Rates of Acetylated Histone H3 (Lysine 14; Ac.H3) positive nuclei in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr after PA). Embryos were collected, fixed and immunostained at 50, 60, 70 and 80 hr after oocyte activation. A total amount of 146 and 41 early cleaved plus 189 and 48 late cleaved embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same fixed time were different ($P < 0.05$). Columns without a common small letter (a, b, c, d) in the same color bar along the four fixed times were different ($P < 0.05$).

Immunolocalization of Phosphorylated Histone H2A.X in Early Bovine Embryos Derived of Oocytes Collected from Small and Large Follicles

GUILHERME M. BASTOS^{1,2}, **PAULO BAYARD D. GONÇALVES**¹ AND **VILCEU BORDIGNON**^{2*}

¹Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Department of Animal Science, McGill University, Ste-Anne-De-Bellevue, QC, Canada.

Correspondence to: Vilceu Bordignon, PhD

Address: McGill University, Department of Animal Science 21111, Lakeshore road, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

Postal Code: H9X3V9

Phone number: 514-398-7793

Fax number: 514-398-7964

E-mail address: vilceu.bordignon@mcgill.ca

ABSTRACT - This study investigated whether the expression pattern of the phosphorylated histone H2A.X (γ H2A.X) protein, which is an indicator of DNA double-strand breaks, is different in early bovine embryos produced from oocytes derived from small (1- to 2-mm) or large (4- to 8-mm) follicles. Oocytes were matured in vitro for 24 hr and then either parthenogenetically activated (PA) using Ionomycin (5 μ M/5 min) followed by incubation in 6-DMAP (2.8 mM/5 hr) or in vitro fertilized (IVF) for 18 hr. Both groups were then cultured in SOFaa medium. Cleavage was assessed at 24 and 36 hr after PA and at 32 and 42 hr after IVF. Cleaved embryos were fixed at 36 hr after PA and 42 hr after IVF, and then immunocytochemistry processed to detect γ H2A.X. Most of the cleaved embryos produced from PA and IVF oocytes had detectable amounts of γ H2A.X, ranging from few foci to a complete diffuse staining of the nuclei. γ H2A.X was detected in 64% vs. 76% ($P < 0.05$) of nuclei in PA embryos and in 76% vs. 80% ($P > 0.05$) of nuclei in IVF embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively. IVF embryos presenting less than 4 nuclei at 42 hr showed higher rates ($P < 0.05$) of γ H2A.X positive nuclei (89% and 85%) than those with ≥ 4 nuclei (72% and 62%, for large and small follicles, respectively). In conclusion, γ H2A.X is highly detected but not differently expressed in early bovine embryos produced from PA and IVF oocytes derived from small and large follicles.

Key Words: developmental competence; follicle size; chromatin; immunofluorescence

INTRODUCTION

The term developmental competence can be defined as the ability of an oocyte to undergo nuclear and cytoplasmatic maturation, fertilization and reach the blastocyst stage. Developmental competence is acquired progressively during folliculogenesis (Pavlok et al., 1992; Yang et al., 1998). Usually, oocytes from 3 to 8mm size follicles are used for in vitro embryo production but the average of matured oocytes that become a blastocyst is only 30 to 40%. While oocytes from preantral follicles are unable to resume meiosis after arresting in prophase I, those from very small antral follicles progress to metaphase II and become an embryo at much lower rates than do those from large antral follicles (Eppig, 1996). It was also shown that embryos completing the first cell-cleavage early and following fast cell divisions have greater developmental potential when compared to those co-cultured late cleaved embryos with slower cell divisions (Plante et al., 1994; Shoukir et al., 1997; Lonergan et al., 1999, 2000; Ward et al., 2001; Fenwick et al., 2002; Lequarre et al., 2003; Favetta et al., 2004). Moreover, most oocytes that can reach MII stage and can complete the first cleavage in vitro do not develop further than 4- to 8-cell stage, just before the embryonic genome activation (EGA) of transcription that happens at 8- to 16-cell stage on bovine embryo (Telford et al., 1990; Barnes and First, 1991). Interestingly, this timepoint developmental block arises at much higher rates in embryos produced from oocytes derived from small antral follicles (≤ 2 mm). The molecular changes that underlie this increase in competence according to follicle size and time to first cleavage are poorly known.

Transcription drops markedly once the ovarian follicle has grown to 3mm (Fair et al., 1995; Crozet et al., 1986) and the oocyte remains transcriptionally nearly quiescent thereafter (De Souza et al., 1998). So, it has been postulated that oocytes from antral follicles smaller than 3 mm have not yet attained the full RNA complement required for developing beyond the third-fourth cell cycle, becoming unable to activate transcription of important developmental genes. On the other hand, some researchers believe that this developmental block can be also a consequence of the inability of the early embryo to repair DNA injuries triggered by environment in vitro (Betts and King, 2001; Meirelles et al., 2004). Some studies examined the feasibility of applying PCR-based subtraction techniques to isolate mRNA associated with oocyte maturation and developmental competence based on follicular size (Robert et al., 2000; Donnison and Pfeffer, 2004; Fair

et al., 2004). However, it also becomes relevant to investigate the chromatin integrity, that is, whether the higher developmental competence of embryos produced from oocytes derived from large follicles is due a difference in the chromatin damage susceptibility and/or repair ability when compared to those produced from oocytes derived from small follicles.

In all eukaryotic cells the basic unit of chromatin is the nucleosome that compact the genetic information into the nucleus. The nucleosome consists of 146 base pairs of DNA wrapped 1.7 times around an octamer of core histones that is composed by two molecules of each H2A, H2B, H3 and H4 to form a 100 kDa protein complex. Further compaction is achieved at the exterior of the octamer by a fifth histone, H1, originating the higher-order-structure called heterochromatin (Luger et al., 1997; Wollfe, 1997).

In addition, functional isoforms called histone variants are scattered throughout the mammalian genome and have specialized biological functions others than the packaging of DNA into nucleosomes. For example, mammalian cells contain at least four histone H2A variants, H2A.1, H2A.2, H2A.Z, and H2A.X (Zweidler, 1984). Sequenced in the late 80's (Mannironi et al., 1989), H2A.X represents about 10-15% of total H2A in most mammalian cells and has been appointed as the DNA damage-specific "histone code" based on the observation that DNA damage, represented by DNA double-strand break (DSB), is often associated with phosphorylation of histone variant H2A.X, generating a form of the protein referred to as γ H2A.X by members of the phosphatidylinositol 3-kinase-like kinase (PI3KK) family (Fernandez-Capetillo et al., 2004). H2A.X phosphorylation (surrounding each DSB) happens within minutes following the DNA double strand breaks (DSBs) in a highly conserved serine residue (Serine 139) located 4 amino acids from the CCOH terminus of this histone, and is believed to involve about 2 megabases of chromatin or thousands of nucleosomes forming localized "foci" at the sites of DSBs, originating the so called nuclear foci (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999).

Embryonic chromatin suffers several physiological modifications (remodeling) in the beginning of embryo development (Santos and Dean, 2004). Some of these modifications may result in abnormal alterations of chromatin and DNA damage compromising further embryo development whether the lesions are not repaired. In this direction, several studies have supported the hypothesis that γ H2A.X is essential for the

recruitment and concentration of repair/signaling factors to the region of DNA damage (Rogakou et al., 1998; Paul et al., 2000; Bassing et al., 2002; Ward et al., 2003). The phospho-specific anti γ H2A.X antibody has been appointed as the “gold tool” to detect the presence of DSBs (Sedelnikova et al., 2002). Thus, we thought that differences in γ H2A.X immunoexpression could be associated (in some way) to developmental competence of embryos. Bordignon’s research group was the first to investigate the expression pattern of γ H2A.X in mammalian embryos (Che et al., 2005). In this study, nuclei of porcine embryos produced by parthenogenetic activation and nuclear transfer were affected by both methods and also by the protocol used for oocyte activation (Che et al., 2005).

In the present study, we investigated the association between developmental competence and the immunodetection of phosphorylated H2A.X (γ H2A.X) in early and late cleaved bovine embryos produced from developmental competent (derived from large follicles) and less competent (derived from small follicles) oocytes, submitted to parthenogenetic activation or in vitro fertilization and fixed before the time of maternal to embryonic transition of transcriptional control. The objective was to verify the frequency and severity of γ H2A.X positive nuclei in embryos according to: a) follicle size used as oocytes source; b) time to complete the first cleavage and c) number of nuclei. We hypothesized that embryos produced from oocytes derived from large follicles, early cleaved and with higher number of nuclei would have lower rates of γ H2A.X positive nuclei, justifying their higher developmental competence when compared to those produced from oocytes derived from small follicles, late cleaved and delayed on development.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise indicated.

Oocyte Recovery and Selection

Bovine ovaries were collected at a commercial abattoir and transported to the laboratory (within 4 hr of slaughter) in standard saline solution at 30°C degrees. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) from small (1- to 2-mm diameter) and large (4- to 8-mm diameter) follicles were collected separately by aspiration using a 19-gauge needle attached

to a 10-ml syringe. Only CCOs with several layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm (classes 1 and 2) were used (Leibfried and First, 1979).

In Vitro Maturation

Selected COCs were washed in bicarbonate buffered tissue culture medium (TCM-199; Gibco BRL, Burlington, ON Canada) supplemented with 10% (v:v) fetal calf serum (FCS; Gibco). For maturation, groups of 40 COCs were placed into each well (separately according the follicle size category) of four-well dishes (Nunc) for 24 hr in 400- μ l of TCM-199 medium supplemented with 10% FCS, 50 μ g/ml LH (Ayerst, London, ON, Canada), 0.5 μ g/ml FSH (Folltropin-V; Vetrepharm, St. Laurent, PQ, Canada), 25 μ g/ml pyruvate, and 50 μ g/ml gentamicin under mineral oil and incubated in a humidified atmosphere at 39°C with 5% CO₂ in air.

Parthenogenetic Activation of Oocytes

After the maturation time, COCs were placed into a 2-ml Eppendorf tube containing 0.5 mg/ml hyaluronidase dissolved in 800 μ l of Ca⁺⁺- and Mg⁺⁺-free PBS (PBS) supplemented with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) and vortexed at maximum speed for 5 min to remove cumulus cells. Denuded oocytes were washed twice (to separate them from the dispersed cumulus cells) in 35-mm Petri dishes (Nunc), each containing 3 ml of TCM-199 plus 10% FCS. At this time, oocytes with visible degenerative changes or physical damage were discarded. Then, the remaining oocytes were selected for the presence of the first polar body (metaphase II; MII) and submitted to parthenogenetic activation as described by Susko-Parrish et al. (1994). Briefly, matured oocytes from each follicular size group were rinsed in TCM-199 Hepes-buffered medium containing 1 mg/ml BSA, exposed to 5 μ M ionomycin for 5 min in TCM-199 medium supplemented with 1mg/ml BSA, transferred to TCM-199 medium supplemented with 30 mg/ml BSA for 5 min and finally rinsed again in TCM-199 medium containing 1 mg/ml BSA. Except for rinsing, all steps of activation were done in a of four-well dishes (Nunc) that were kept inside the incubator (at 38.5°C in 5% CO₂ in air) among the oocyte manipulation intervals.

Then, oocytes were washed in 35-mm Petri dishes (Nunc) containing the culture medium modified synthetic oviduct fluid medium (mSOFAa) supplemented with 10% of

FCS, MEM non essential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) and MEM essential amino acids (Gibco BRL) and then groups of 10 oocytes were transferred to 100- μ l droplets of mSOFaa containing 2.8 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), covered with oil, and incubated in an atmosphere of 5% CO₂ in air at 39°C for 4-5 hr. After this time, activated oocytes (groups of 10) were washed several times in culture medium and in vitro cultured as described in the appropriated item. Two replications were done involving a total of 113 and 58 embryos produced from PA oocytes derived from small or large follicles, respectively.

In Vitro Fertilization

For IVF, frozen semen from a previously tested bull (given by CIAQ, St. Hyacinthe, QC, Canada) were thawed in a 37°C water bath for 30 sec and rinsed in a discontinuous percoll gradient prepared by adding 1 ml of 40% (v/v) percoll over 1 ml of 90% (v/v) percoll in a 15 ml centrifuge tube. The semen samples were added on the top of the percoll gradient and centrifuged for 30 min (700 X g) at 30°C. Then, supernatant was discarded and the volume of the pellet at the bottom of the 90% fraction containing the viable spermatozoa was measured using a pipettor set up to 10 μ l. A sample of 5 μ l was used to evaluate the motility rate. Also, spermatozoa were counted in a hemocytometer. According to the volume of the pellet, motility and concentration, the pellet was diluted in an appropriate volume of the fertilization medium composed of modified Tyrode Lactate medium (TALP) supplemented with 0.6% BSA (fatty-acid free), 0.2 mM pyruvic acid, 10 μ g/ml heparin and 50 μ g/ml of gentamicin to give a final concentration of 1×10^6 live spermatozoa/ml. A 5 μ l aliquot of this suspension was added to each fertilization droplet. Thirty minutes later, CCOs matured for 24 hr were rinsed twice in fertilization medium and added to 60-mm plates containing 5 droplets (10 oocytes per droplet) of 100 μ l each of fertilization medium (and previous added 5 μ l of spermatozoa suspension), under mineral oil and co-incubated for 18 hr in 5% CO₂ in humidified air at 39°C. After co-incubation period, presumptive zygotes were submitted to cumulus cells removal (as described above) and cultured as described bellow. A total of four replications were done involving a total of 161 and 49 embryos produced from IVF oocytes derived from small or large follicles, respectively.

In Vitro Embryo Culture

Initially, presumptive zygotes produced from oocytes derived from small or large follicles were cultured in 60-mm plates containing 5 droplets of 100 μ l each of mSOFaa (20 zygotes per droplet) under mineral oil. Embryo culture was performed at 39°C in 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Rates of early and late cleavage were evaluated at 24 and 36 hr after PA or 32 and 42 hr after co-incubation (IVF) respectively, for PA and IVF embryos. After evaluation of first cleavage, early cleaved embryos produced from each group of oocytes (considering follicle size) was transferred to a new mSOFaa droplet, cultured until the time of late cleavage evaluation (at 36 hr or 42 hr for PA and IVF embryos, respectively) and then fixed as described below.

Immunocytochemistry

Embryos were fixed separately (according to follicle size and time of cleavage) for 20 min at room temperature in a solution of 4% paraformaldehyde in PBS. Then, they were rinsed in PBS containing 0.1% PVA and stored at 4°C in PBS supplemented with 3% BSA and 0.5% Triton X-100 until immunofluorescence staining starts.

For γ H2A.X staining, fixed embryos were permeabilized for 1 hr in PBS with 0.5% Triton X-100 at 37°C, rinsed and incubated in blocking solution (1% BSA and 0.05% Tween-20 in PBS) for 1 hr at room temperature. Then, they were transferred to a mouse monoclonal anti-phospho-H2A.X (Serine 139) (Upstate Cell Signaling Solutions, NY) primary antibody in a dilution rate of 1:500 in blocking solution and incubated for 1 hr at 37°C. As a negative control, a sample of embryos was incubated in the absence of primary antibody in each replicate. After this time, embryos were rinsed three times for 20 min each in blocking solution and incubated for 1 hr at 37°C in the presence of a Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. PA) in a dilution rate of 1:100 in blocking solution. Then, they were rinsed again three times for 20 min each in blocking solution at room temperature and mounted on a microscope slides in a drop of Moviol containing 10 μ g/ml of Hoechst 33342 (Hoechst, Montreal, QC, Canada) for chromatin visualization and covered with a coverslip that was fixed to the slide with nail polish. The slides were examined 30 min after slides have been mounted or stored at 4°C in the dark to be evaluated in the next day.

Microscopy Evaluation and Digital Image Record

Specimens were examined by epifluorescence using a Nikon eclipse 80i microscope (Nikon, Japan). Firstly, each embryo was evaluated according to the total number of nucleus in the DAPI filter. Then, immunofluorescence of each nucleus was classified as positive or negative to γ H2A.X staining using a Cy3 filter, where the positive ones were classified as less than 10 foci (< 10 Foci), more than 10 foci (> 10 Foci) or diffuse staining (Fig. 1). Digital images were recorded with Retiga 2000R monochrome digital camera (Qimaging, BC, Canada) and SimplePCI Imaging Software (Compix Inc. PA). Gray and color scale images were obtained using the zoom function in a 40x objective.

Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted in the SAS statistical program. Data regarding the average number of nuclei in IVF embryos were examined by ANOVA. All data described in percentage were analyzed using the PROC CATMOD procedure (Categorical Data Analysis Procedures). When embryos were subdivided by the time to complete first cleavage or number of nuclei besides follicle size, comparisons among the four groups of embryos in each staining signal were done with contrast statements. For all analyses, differences were considered to be statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

RESULTS

Occurrence of γ H2A.X in Embryos Produced from PA Oocytes

Most of embryos produced from PA oocytes had detectable amounts of γ H2A.X, ranging from few foci to a complete diffuse staining of the nuclei. It was found that embryos produced from PA oocytes derived from large follicles had higher rates ($P < 0.05$) of γ H2A.X positive nuclei (75.9%) than those produced from small follicles (64.5%). However, this difference only happened at the classification of < 10 foci (17.9% vs. 5.4%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively) that is the more light level of positive staining classification used in this study. Results regarding this issue are demonstrated in Figure 2.

Subsequently, evaluations included data from early and late cleavage after PA, resulting in four groups of embryos (small and large follicles x early and late cleavage) whose results are demonstrated in Figure 3. Rate of γ H2A.X negative nuclei was higher ($P < 0.05$) in early cleaved embryos produced from oocytes derived from small follicles (36.5%) than in those early cleaved produced from oocytes derived from large follicles (24.1%). However, late cleaved embryos produced from oocytes derived from small (32.0%) or large (23.9%) follicles did not differ ($P > 0.05$) in rates of negative nuclei. Diffused staining did not differ significantly ($P > 0.05$) between early cleaved (29.2% vs. 28.9%) and late cleaved (57.3% vs. 43.5%) embryos produced from oocytes derived from small or large follicles, respectively. However, late cleaved embryos produced from oocytes derived from small follicles were severely affected by DNA damage (represented by diffuse staining) in a higher rate (57.3%; $P < 0.05$) in comparison to those early cleaved (29.2% and 28.9%, from small and large follicles, respectively).

In the experiment 1, our last analyze investigated the patterns of γ H2A.X staining according to follicle size used as oocytes donors but subdividing embryos according to the number of nuclei at the fixed time (36 hr after PA) as demonstrated in Figure 4. There was no significant difference ($P > 0.05$) between rates of γ H2A.X negative nuclei when comparing embryos with < 4 nuclei produced from oocytes derived from small (24.2%) or large (20.0%) follicles. However, a higher rate ($P < 0.05$) of negative nuclei was found in embryos with ≥ 4 nuclei produced from oocytes derived from small follicles (37.5%) than in those produced from oocytes derived from large follicles (25.7%).

Occurrence of γ H2A.X in Embryos Produced from IVF Oocytes

Similarly to embryos produced from PA oocytes, most of embryos produced from IVF oocytes had detectable amounts of γ H2A.X, ranging from few foci to a complete diffuse staining of the nuclei. In the first evaluation, IVF embryos produced from oocytes derived from small or large follicles did not show significant difference ($P > 0.05$) in any parameter used to evaluate γ H2A.X staining (see Fig. 5). Rates of positive nuclei were high in embryos produced from oocytes derived from both small (76.3%) and large follicles (79.8%).

Thus, IVF embryos produced from oocytes derived from small or large follicles were subdivided according to time to complete first cleavage (Fig. 6). Results showed no significant difference ($P > 0.05$) in the rates of γ H2A.X negative nuclei between early (36.6% vs. 24.1%) and late (15.5% vs. 14.0%) cleaved embryos produced from oocytes derived from small or large follicles, respectively. Early cleaved embryos only showed difference ($P < 0.05$) in rates of nuclei with diffused staining (34.1% vs. 53.2%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively). On the other hand, late cleaved embryos showed differences ($P < 0.05$) in rates of both > 10 foci (31.0% vs. 50.0%) and diffused staining (50.4% vs. 32.0%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively).

IVF embryos were additionally analyzed according to the number of nuclei at 42 hr after co-incubation (fixed time) besides follicle size used as source of oocytes, as demonstrated in Figure 7. At this point, rates of nuclei showing γ H2A.X negative staining did not differ ($P > 0.05$) between embryos with < 4 nuclei (15.2% vs. 11.5%) and ≥ 4 nuclei (38.0% vs. 27.9%) produced from oocytes derived from small or large follicles, respectively. However, embryos with ≥ 4 nuclei showed significant higher ($P < 0.05$) rates of negative nuclei (38.0% and 27.9%) than those with < 4 nuclei (15.2% and 11.5%). Early cleaved embryos showed differences ($P < 0.05$) in rates of both > 10 foci (31.1% vs. 47.5%) and diffused staining (49.2% vs. 27.9%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively). Similarly, late cleaved embryos also showed differences ($P < 0.05$) in rates of both > 10 foci (22.8% vs. 8.8%) and diffused staining (35.45% vs. 60.3%, for embryos produced from oocytes derived from small and large follicles, respectively).

DISCUSSION

Results of the present study demonstrated that early bovine embryos produced from both PA (Fig. 2) and IVF (Fig. 5) oocytes showed high rates of γ H2A.X positive staining. So, it seems that the difference in developmental competence of embryos produced from oocytes derived from small and large follicles can not be attributed effectively to the presence or quantity of phosphorylated H2A.X (γ H2A.X) on chromatin. However, γ H2A.X seems to affect the mitotic rate of embryos. That become evident when embryos produced

from IVF oocytes (independently of follicle size) that had faster mitotic rates represented by those with ≥ 4 nuclei (Fig. 7) showed higher rates ($P < 0.05$) of negative nuclei (38.0% and 27.9%) in comparison to embryos with < 4 nuclei or delayed in development (15.2% and 11.5%). Che et al. (2005) also found high rates of positive nuclei (24 - 67%) in nuclear transfer and parthenogenetic porcine embryos. In addition, the authors also found that the 2-cell stage embryos fixed at 48 hr after PA had greater H2A.X foci per nuclei than 4-cell stage embryos fixed at the same time, corroborating with our present results in bovine embryos.

We also found that embryos produced from PA oocytes derived from large follicles had higher rate ($P < 0.05$) of nuclei with < 10 foci in comparison to embryos produced from oocytes derived from small follicles (17.9% vs. 5.4%, respectively), but there were no differences ($P > 0.05$) in the others parameters of γ H2A.X staining evaluated (Fig. 2). This result contributed to the higher rate ($P < 0.05$) of nuclei with total positive staining found in embryos produced from oocytes derived from large (75.9%) in comparison to small (64.5%) follicles. However, it is important to note that < 10 foci is the lightest level of γ H2A.X positive staining described in this study. Moreover, DNA damage in nuclei containing < 10 foci is may be easily repaired by chromatin repair machinery and probably does not represent a threat for continued embryo development.

In general, it is intriguing the fact that embryos had so high levels of phosphorylated H2A.X in the present study. Chromatin of mammalian embryos is target of several modifications during early development including, for example, epigenetic events like histone demethylation/methylation, acetylation/deacetylation, phosphorylation and ubiquitination (Santos and Dean, 2004) as well as loss and reappearance of somatic histone H1 (Bordignon et al., 1999, 2001) and others variants (Gao et al., 2004). So, it is possible that any abnormal occurrence in these events may results in DNA damage that triggers H2A.X phosphorylation in order to attract and concentrate repair factors in the vicinity of DNA lesion, as a tentative to repair it and allows the embryo to continue development. Even that, most cleaved embryos is impaired during development at the third to fourth cell cycle, that is, just before or during the time of EGA. Therefore, may be embryos produced from oocytes derived from large follicles (more developmental competent) contain a more efficient chromatin repair machinery that allow them to continue development through

EGA phase and reach higher rates of blastocyst in vitro than those produced from oocytes derived from small follicles.

On the other hand, the high rates of γ H2A.X positive nuclei described in the present experiment originated a doubt whether the PA and IVF protocols or some of its chemicals could be responsible for these so high staining levels. In the first experiment involving γ H2A.X immunoexpression in mammalian embryos, Che et al. (2005) found that porcine embryos produced from both parthenogenetic activation and nuclear transfer procedures showed considerable levels of γ H2A.X positive staining which were additionally affected by the protocol used for oocyte activation. Moreover, studies in several species have shown the negative influence of in vitro maturation and culture systems on embryo development and gene expression (Iwasaki et al., 1990; Niemann and Wrenzycki, 2000; Adrienne et al., 2001; Rizos et al., 2002; Eichenlaub-Ritter & Peschke, 2002; Izquierdo et al., 2002). In this direction, a recent study performed with rhesus monkey oocytes and embryos examined the expression of 48 mRNAs related to sensing different kinds of DNA damage, repairing that DNA damage, and controlling the cell cycle (Zheng et al., 2005). Results revealed that in vitro culture may lead to dysregulation of many such genes and a potentially impaired ability to repair DNA damage, thus affecting cellular viability and long-term embryo viability via effects on genome integrity. So, it seems also interesting to investigate whether embryos produced in vivo will show high levels of γ H2A.X immunoexpression as those produced in vitro. This information will contribute for excepting or attributing high level of DNA damage and H2A.X phosphorylation to in vitro culture conditions.

γ H2A.X recognizing antibody has become a gold standard to detect the presence of DSBs because of the rapid induction and amplification of phospho-H2A.X and the 1:1 correspondence between the number of H2A.X foci and the number of DSBs (Sedelnikova et al., 2002). Phosphorylation of H2A.X has been described in response to DNA double strand breaks (DSBs) originated from diverse origins including external damage (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999; Paul et al., 2000), replication fork collision (Ward et al., 2001; Furuta et al., 2003), apoptosis (Rogakou et al., 2000), dysfunctional telomeres (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003) and replication stress (Ward and Chen, 2001). Physiological DSBs are also created and repaired during meiosis, which is a cellular differentiation program giving rise to recombination events between parental chromosomes

(Fernandez-Capetillo et al., 2003). Additionally, non homologous end joining (NHEJ) and homologous that are two evolutionary conserved pathways involved in the repair of DSBs are also mediated by γ H2A.X (Khanna & Jackson, 2001).

Recently, McManus et al. (2005) demonstrated that, in the absence of exogenous or artificial sources of DNA damage, hundreds γ H2A.X sites were found throughout the genome of normally growing mammalian cell lines and primary cultures. They also found that the steady-state phosphorylation of histone H2A.X was under cell cycle regulation, where the cell cycle-dependent changes in the abundance of H2A.X occurred with the minimum abundance of sites being associated with G1 phase. Then, as cells progressed through S phase, there was a normal, but gradual increase in γ H2A.X. The authors attributed this increase to the DSBs that occurred during DNA replication as a result of stalled and collapsed replication forks and the activities of topoisomerases as previously described (Limoli et al., 2002; Furuta et al., 2003; Furuta, 2003; Huang et al., 2003, 2004). However, the γ H2A.X signal intensities did not plateau in S phase but rather continued to increase until maximal levels are attained in G2/M. Thus, McManus et al. (2005) showed that γ H2A.X exists independently of DSBs, introducing the possibility that other functions for histone H2A.X phosphorylation exist and may impact upon genomic stability independent of DNA damage.

To our knowledge, the present study is the first to demonstrate what happens in terms of γ H2A.X immunoexpression during early development of bovine embryos in vitro. It is relevant to note that rates of embryonic nuclei with negative γ H2A.X expression in all evaluations described in the present study are very closed to those usually obtained in terms of blastocyst. Although these results represent rates of γ H2A.X negative nuclei and not negative embryos, it is reasonable to speculate that only embryos with no γ H2A.X positive nuclei or with low levels of staining (for example < 10 foci per nuclei) should be able to develop beyond the EGA phase and reach blastocyst stage.

In conclusion, we demonstrated that γ H2A.X is highly expressed during early development of bovine embryos produced from PA and IVF oocytes. Additionally, our results suggest that the high level of γ H2A.X expression before the expected time of EGA is may be one reason to explain why most embryos are not able to develop beyond the maternal to zygotic transition of genome control, once a high proportion of chromatin was

showed to be already damaged before this event and probably do not executing its biological functions properly. Although results have showed that embryos with faster mitotic rates have lower rates ($P < 0.05$) of γ H2A.X positive nuclei, at least in IVF embryos, our others results did not indicate an association between the parameters used to measure developmental competence (follicle size and time to first cleavage) and γ H2A.X immunodetection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Colbex abattoir (Canada) for providing bovine ovaries and the Centre d'Insémination Artificielle du Québec – CIAQ for the donation of frozen semen for the IVF protocol. We are also grateful to CAPES and CNPq for providing a fellowship to the first author while in Brazil and Canada, and either by the technical support of Limei Che. This study was supported by a grant from NSERC/Canada and CNPq/Brazil.

REFERENCES

- Barnes FL and First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29:117-123.
- Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW. 2002. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2A.X. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:8173-8178.
- Betts DH, King WA. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 55:171-191.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 1999. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. *Biol Reprod* 61:22-30.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 2001. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. *Dev Biol* 233:192-203.
- Che L, Lalonde A, Bordignon V. The occurrence of phosphorylated histone H2A.X in porcine embryos produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic

- activation. 38th Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction (SSR) 2005. Abstract. 671.
- Crozet N, Kanka J, Motlik J, Fulka J. 1986. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete Res* 14:65-73.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saratzki G, Carter NP, Jakson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194-198.
- De Souza PA, Watson AJ, Schultz GA, Bilodeau-Goeseels S. 1998. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Mol Reprod Dev* 51:112-121.
- Eichenlaub-Ritter U, Peschke M. 2002. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum Reprod Update* 8:21-41.
- Eppig JJ. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:485-489.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42:437-442.
- Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P. 2004. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 67:136-144.
- Favetta LA, Robert C, John EJ, Betts DH, King WA. 2004. p66^{shc}, but not p53, is involved in early arrest of in vitro-produced bovine embryos. *Molec Hum Reprod* 10:383-392.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert M. 2002. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 17:407-412.
- Fernandez-Capetillo O, Bodo L, Scherthan H, Nussenzweig A. 2003. H2AX regulates meiotic telomere clustering. *J Cell Biol* 163:15-20.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3:959-967.
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y. 2003.

- Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278:20303-20312.
- Furuta, T. 2003. Phosphorylation of histone H2A.X and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278:20303-20312.
- Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol* 266:62-75.
- Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 2003. DNA damage induced by DNA topoisomerase I and topoisomerase II inhibitors detected by histone H2A.X phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle* 2:614-619.
- Huang, X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz, Z. 2004. Assessment of histone H2A.X phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry* 58A:99-110.
- Iwasaki S, Yoshihara N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil* 90:279-284.
- Izquierdo D, Villamediana P, López-Bejar M, Paramio MT. 2002. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57:1431-1441.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254.
- Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48:76-86.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A and Donnay I. 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod* 69:1707-1713.

- Limoli CL, Giezinski E, Bonner WM, Cleaver JE. 2002. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, γ H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:233-238.
- Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, de la Fuente J and Boland MP. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocyst produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57:146-152.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage and the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 117:159-167.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.
- Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL. 1989. H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* 17:9113-9126.
- McManus KJ, Hendzel MJ. 2005. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2A.X in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025.
- Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, Garcia SM. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *An Reprod Sci* 82-83:13-20.
- Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21-34.
- Paull, TT, Rogakou EP, Yamazaki, V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000. A critical role for histone H2A.X in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10:886-895.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31:63-67.

- Plante L, Plante C, Shepherd DL, King WA. 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39:375-383.
- Rizos D, Ward F, Duff P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-248.
- Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. 2000. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 57:167-175.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2A.X histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390-9395.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-strand breaks induce histone H2A.X phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
- Santos F, Dean W. 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 127:643-651.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. 2002. Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-492.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. 1997. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 12:1531-1536.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schtzkus V, First NL. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 166:729-739.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13:1549-1556.

- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90-100.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. 2001. Paternal influence on the time of the first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryos development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev* 60:47-55.
- Ward IM, Chen J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759-47762.
- Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J. 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2A.X. 2003. *J Biol Chem* 278:19579-19582.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PE, Presicce GA. 1998. Control of oocyte maturation in cows – biological factors. *Theriogenology* 49:471-482.
- Zheng P, Schramm D, Latham KE. 2005. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod* 72:1359-1369.
- Zweidler A. 1984. Histone genes: Structure, organization and regulation. In “Histone Genes and Histone Gene Expression” (Stein GS, Stein JL, Marzluff WF) 339-371, Wiley, New York.

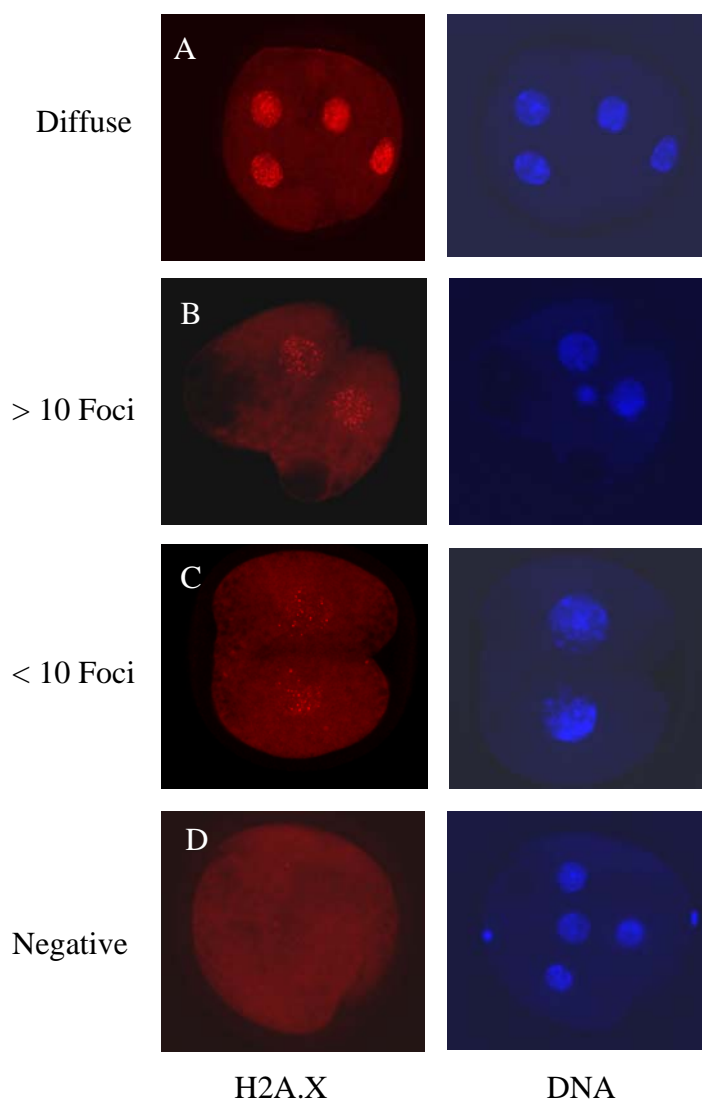


Fig. 1. Fluorescence microscope image and subjective immunostaining quantification of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) in in vitro fertilized bovine embryos fixed at 42 hr after co-incubation oocytes/spermatozoa. Embryos were visualized in both Cy3 (red color) and DAPI (blue color) filters to detect γ H2A.X protein signal (left) and DNA (right), respectively. (A) Embryo containing four nuclei with diffuse staining; (B) Embryo containing two nuclei with > 10 foci; (C) Embryo containing two nuclei with < 10 foci. (D) Embryo containing four nuclei with negative staining.

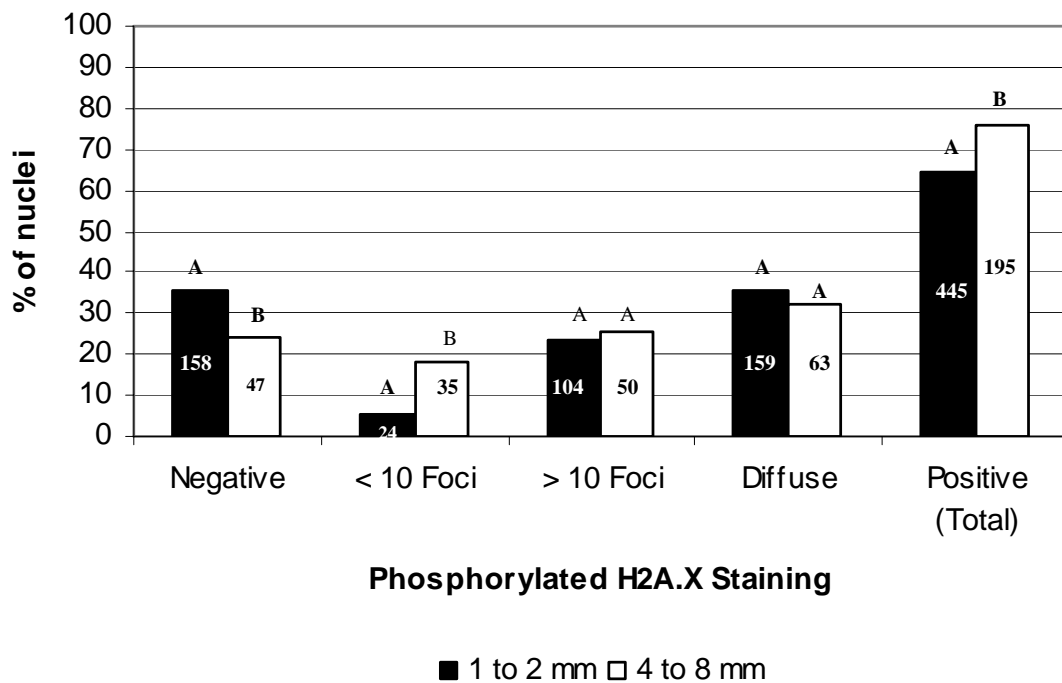


Fig. 2. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles. A total amount of 113 and 58 embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

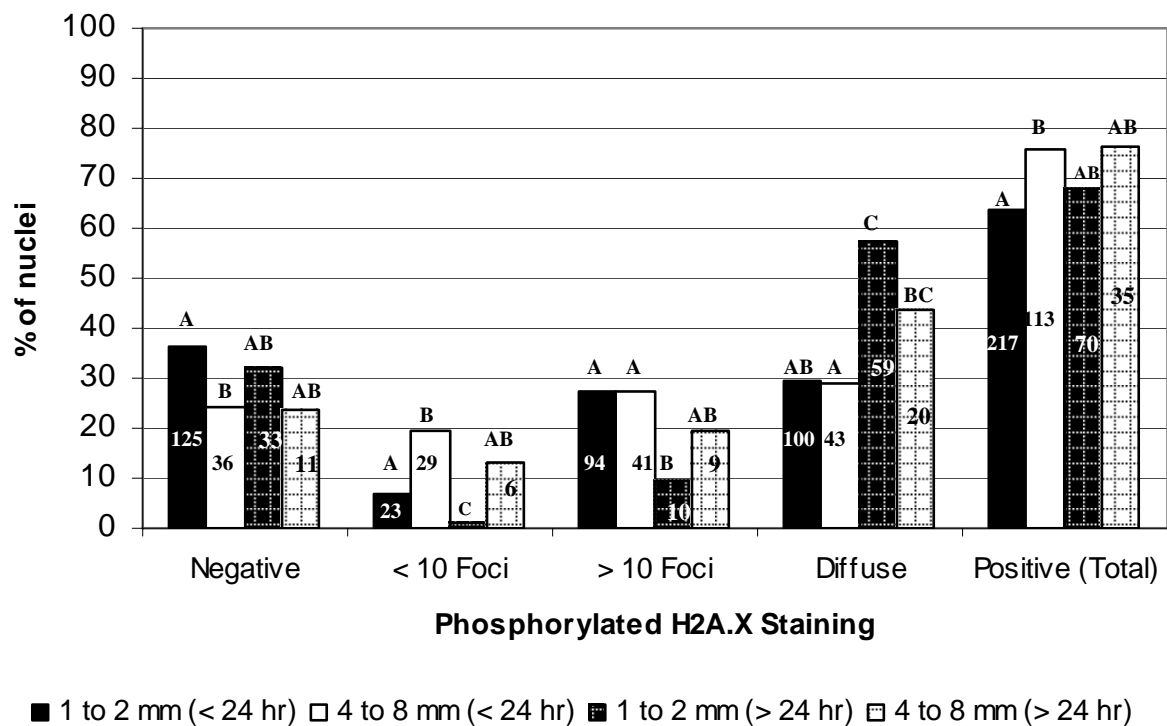


Fig. 3. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 24 hr or > 24 hr). A total amount of 76 and 39 early cleaved plus 37 and 19 late cleaved embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

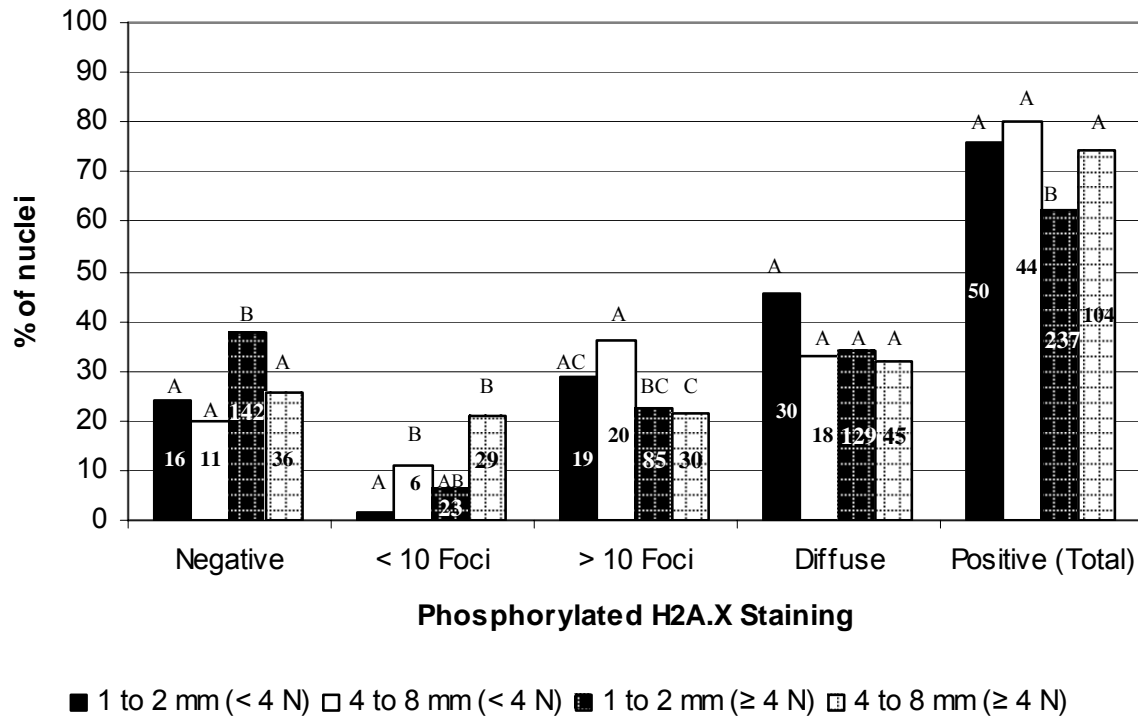


Fig. 4. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from parthenogenetically activated (PA) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the number of embryonic nuclei (< 4 N or ≥ 4 N). A total amount of 32 and 26 embryos with < 4 nuclei plus 81 and 32 embryos with ≥ 4 nuclei produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

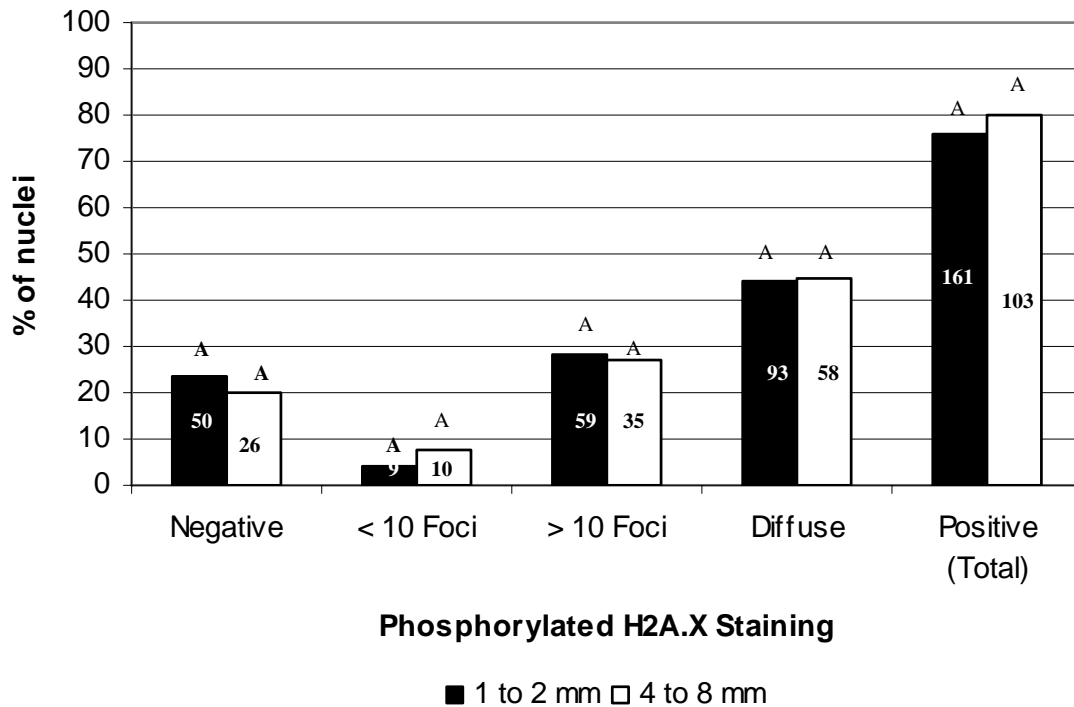


Fig. 5. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles. A total amount of 84 and 45 embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

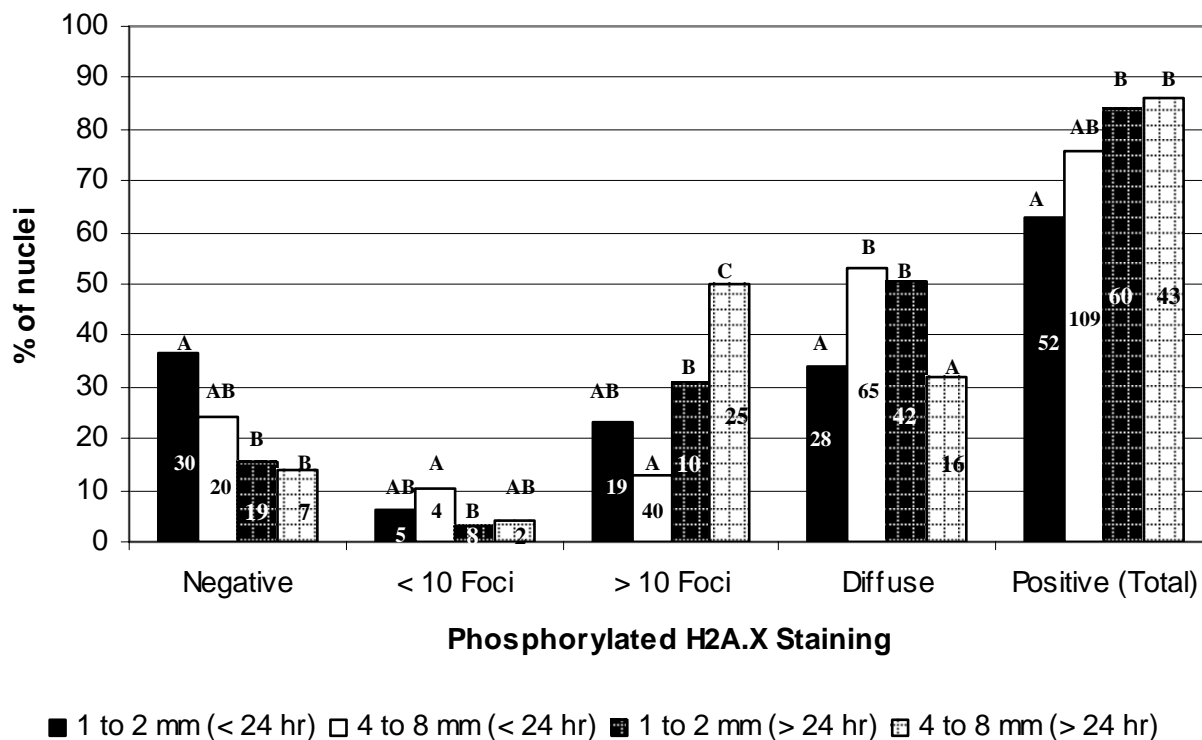


Fig. 6. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the time to complete first cleavage (< 32 hr or > 32 hr). A total amount of 23 and 21 early cleaved plus 61 and 24 late cleaved embryos produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

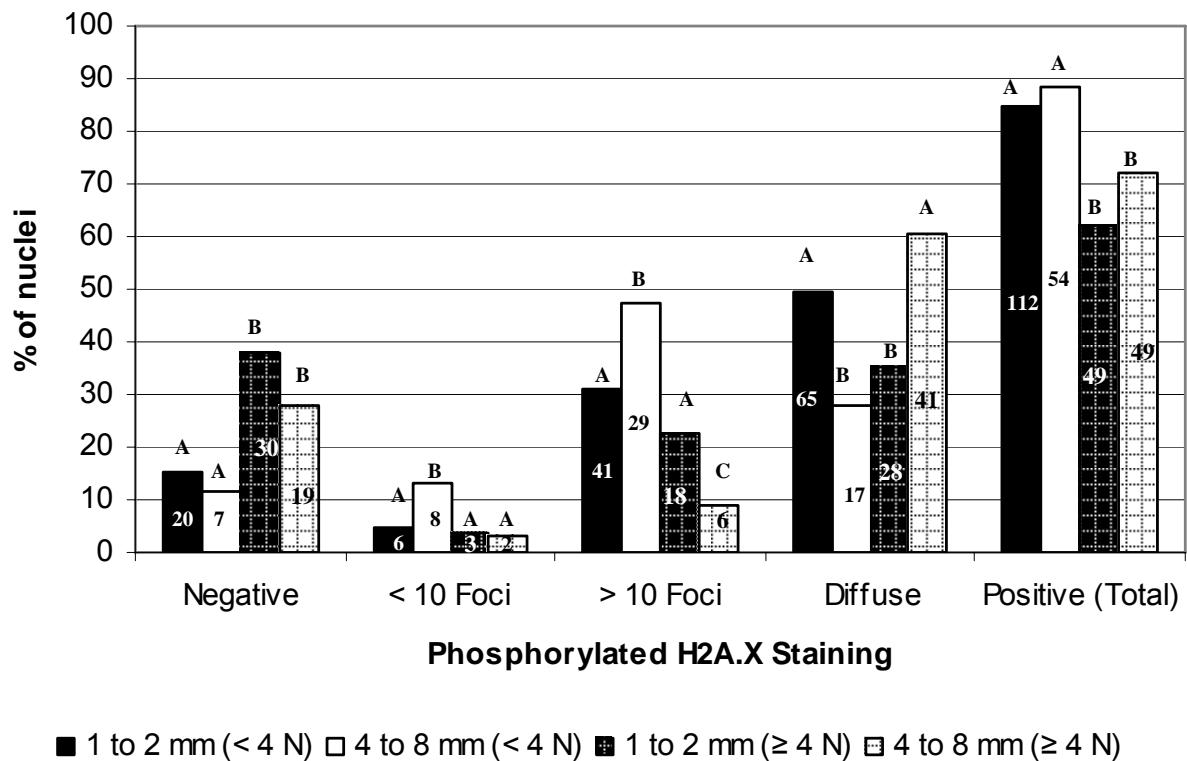


Fig. 7. Rates of Phosphorylated Histone H2A.X (γ H2A.X) staining in embryos produced from in vitro fertilized (IVF) bovine oocytes derived from small (1 to 2 mm) or large (4 to 8 mm) antral follicles and subdivided according to the number of embryonic nuclei (< 4 N or \geq 4 N). A total amount of 65 and 30 embryos with < 4 nuclei plus 19 and 15 embryos with \geq 4 nuclei produced from oocytes derived from small and large antral follicles, respectively, were used. Individual nuclear immunostaining was evaluated by epifluorescence. Nuclei with positive signal were classified as < 10 foci, > 10 foci or diffuse staining. Numbers inside columns represent the total amount of nuclei. Columns without a common capital letter (A, B, C, D) in the same staining parameter were different ($P < 0.05$).

DISCUSSÃO

Os experimentos realizados visaram investigar se a diferença na capacidade de desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos coletados de folículos pequenos ou grandes estaria relacionada a uma insuficiente ou anormal expressão das proteínas Ac.H3K14, HMGN2 e γ H2A.X, as quais atuam regulando várias funções da cromatina.

Inicialmente, os resultados de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética (AP) e fertilização *in vitro* (FIV; dados não demonstrados) demonstraram que realmente oócitos oriundos de folículos pequenos (entre 1-2 mm) são significativamente ($P < 0,05$) menos capazes de atingir o estágio de blastocisto *in vitro* em relação aos coletados de folículos grandes (entre 4-8 mm). Também foi verificado que embriões produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos grandes apresentaram maior percentual ($P < 0,05$) de clivagem até 24 h e 32 h pós AP e FIV (clivagem cedo), respectivamente, em comparação aos coletados de folículos pequenos. Vários estudos apontaram uma correlação negativa entre o tempo para completar a primeira clivagem (desde a AP ou co-incubação com espermatozóides) e capacidade de atingir o estágio de blastocisto *in vitro* (PLANTE et al., 1994; SHOUKIR et al., 1997; LONERGAN et al., 2000; WARD et al., 2001; FENWICK et al., 2002; LEQUARRE et al., 2003; SALUMETS et al., 2003). Portanto, os resultados obtidos referentes ao tempo de clivagem corroboram com os resultados de maturação nuclear e blastocisto acima descritos, ao demonstrarem a maior viabilidade de se utilizar oócitos oriundos de folículos grandes para produção *in vitro* de embriões bovinos.

Contrariamente, uma maior ($P < 0,05$) velocidade de divisão celular foi detectada (mediante contagem de núcleos) desde a primeira clivagem até 36 h de cultivo pós AP nos embriões clivados cedo e produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos pequenos em comparação aos clivados cedo e produzidos com oócitos de folículos grandes. Mais tarde, às 50 h pós AP, houve uma significativa ($P < 0,05$) inversão no número de núcleos em prol dos embriões produzidos a partir de oócitos de folículos grandes, sendo que às 80 h, não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$). Em suma, esses resultados indicam que embriões produzidos a partir de oócitos de folículos pequenos e clivados cedo, apresentam

uma aceleração na taxa de divisão celular logo após a primeira clivagem, sugerindo uma tentativa de maior sobrevivência até o período de ativação do seu genoma (AGE), ao passo que os embriões produzidos com oócitos de folículos grandes continuam o desenvolvimento de forma mais lenta até 50 h pós AP, e talvez por esse motivo, sejam capazes de atingir maior percentual de blastocistos.

Por outro lado, as diferenças encontradas em embriões produzidos a partir de oócitos coletados de folículos pequenos e grandes com relação à detecção da Ac.H3K14 e HMGN2, parecem confirmar os achados referentes à velocidade de divisão celular. A maior proporção ($P < 0,05$) de núcleos positivos para Ac.H3K14 e HMGN2 às 60 h nos embriões produzidos com oócitos de folículos pequenos em relação aos grandes também sugere que isso ocorre nos primeiros (de folículos pequenos) como uma tentativa de manter sua viabilidade por mais tempo.

Essas diferenças ficaram ainda mais evidentes, inclusive às 50 h, quando as proporções de núcleos positivos foram avaliadas em ambos grupos de embriões (folículos pequenos e grandes) de acordo com o momento da primeira clivagem (< 24 h ou > 24 após AP). Os percentuais de núcleos positivos para Ac.H3K14 e HMGN2 mantiveram-se invariavelmente menores ($P < 0,05$) às 50 h, porém somente para Ac.H3K14 às 60 h, nos embriões produzidos com oócitos de folículos grandes e clivados cedo em comparação aos produzidos com oócitos de folículos pequenos clivados cedo ou tarde. Considerando-se que os embriões gerados com oócitos de folículos grandes e clivados cedo pertencem a categoria de maior capacidade de desenvolvimento embrionário, pode-se deduzir que os embriões pertencentes aos demais grupos apresentaram um padrão anormal de expressão dessas proteínas, o que justifica de certa forma sua menor capacidade de desenvolvimento. FAVETTA et al. (2004) também encontraram diferença entre embriões bovinos clivados cedo ou tarde, mas com relação à expressão da proteína p66^{shc}.

Deve-se notar também que houve uma padronização na proporção de núcleos positivos para Ac.H3K14 às 70 h nos quatro grupos de embriões estudados devido, provavelmente, a AGE dos embriões nesse período, já que este evento parece ocorrer de forma mais associada ao tempo transcorrido desde a ativação dos oócitos do que propriamente ao número de células dos embriões (BORDIGNON, V., comunicação pessoal). Também parece importante observar que ocorreu uma diminuição significativa

($P < 0,05$) na proporção de núcleos positivos para HMGN2 às 80 h em comparação às 70 h nos embriões produzidos com oócitos de folículos pequenos e clivados tarde e também em comparação aos outros três grupos de embriões especificamente às 80 h. Acredita-se que às 80 h a maioria dos embriões já ultrapassou a fase de AGE. Portanto, esse achado indica que os embriões clivados tarde são os maiores responsáveis pelo baixo percentual de blastocistos obtido com oócitos de folículos pequenos, ao passo que os embriões produzidos com oócitos de folículos grandes e clivados tarde mantiveram uma elevada proporção de núcleos positivos para HMGN2 às 80 h, o que talvez seja um indicativo de que são responsáveis pelo maior percentual final de blastocistos geralmente obtido utilizando-se oócitos de folículos grandes. Essas suposições são feitas com base em vários estudos que demonstraram que a cromatina ativa (contendo genes que estão sendo transcritos) contém duas ou três vezes mais HMGN1 e HMGN2 que a inativa (DRUCKMANN et al., 1986; DORBIC & WITTIG, 1987; POSTNIKOV et al., 1991). Em geral, diferentemente dos outros grupos de embriões avaliados, apenas embriões produzidos com oócitos de folículos grandes e clivados cedo apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) e gradativo na proporção de núcleos positivos para Ac.H3K14 e HMGN2 entre 50, 60 e 70 h e que se manteve elevada às 80 h após a AP.

Por outro lado, a presença da γ H2A.X foi demonstrada de forma inédita na cromatina de embriões bovinos. Inicialmente, os resultados revelaram altos percentuais de fosforilação da H2A.X em embriões produzidos mediante AP, independentemente do tamanho folicular e do tempo transcorrido desde a ativação até a primeira clivagem dos oócitos. O primeiro experimento referente à presença da γ H2A.X na cromatina de embriões também demonstrou elevados percentuais de núcleos positivos (Che et al. 2005). Além disso, os autores desse estudo utilizaram embriões suínos produzidos por transferência nuclear ou ativação partenogenética e encontraram menores níveis de detecção da γ H2A.X quando os oócitos foram ativados com ionomicina e estrôncio em relação aos ativados exclusivamente com ionomicina. Em função disso, o presente estudo também procurou avaliar a presença da γ H2A.X em embriões produzidos a partir de oócitos submetidos a FIV. Igualmente aos ativados, os embriões oriundos de FIV apresentaram altos percentuais de núcleos positivos, indicando que outros fatores além dos protocolos de AP e FIV tem influencia sobre o mecanismo de fosforilação da H2A.X. Nesse sentido, vários estudos têm

demonstrado o efeito negativo dos sistemas *in vitro* utilizados para maturação de oócitos e cultivo dos embriões não somente com relação à taxa de desenvolvimento e qualidade dos embriões, mas também sobre a expressão gênica (IWASAKI et al., 1990; NIEMANN & WRENZYCKI, 1999; RIZOS et al., 2002; IZQUIERDO et al., 2002). Portanto, é provável que as condições *in vitro* estejam desencadeando esses altos níveis de fosforilação da H2A.X. Um estudo recente utilizando oócitos e embriões de primatas (macaco Rhesus) revelou que as condições de cultivo *in vitro* desencadearam uma desregulação na expressão de vários genes, o que provavelmente impede ou dificulta a eficiência do mecanismo de reparo do DNA frente às lesões e impossibilita a continuidade do desenvolvimento embrionário (ZHENG et al., 2005). Portanto, torna-se necessário comparar a presença da γ H2A.X em embriões produzidos *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo*.

Nesse sentido, McMANUS et al. (2005) recentemente encontraram centenas de focos referentes a γ H2A.X no genoma de vários tipos celulares (em crescimento) em cultivo e demonstraram variações na presença desses focos de acordo com as diferentes fases do ciclo celular. Sendo assim, embora a presença da γ H2A.X na cromatina esteja associada a ocorrências de quebras na cadeia dupla do DNA (para revisão, FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004), sua presença massiva na cromatina durante o desenvolvimento embrionário precoce sugere que ela exerça outras funções além daquela citada anteriormente.

Embora os embriões partenogênicos produzidos com oócitos de folículos grandes tenham apresentado maior percentual de núcleos positivos para γ H2A.X que os de folículos pequenos, essa diferença não parece relevante, pois ela se deu devido a significativa diferença encontrada entre esses dois grupos de embriões com relação a classificação de < 10 focos, que por sua vez representa o sinal positivo de menor dano da cromatina se comparado as outras classificações utilizadas (> 10 focos e difuso). Portanto, os resultados da γ H2A.X aparentemente não estão relacionados com capacidade de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos de acordo com o tamanho dos folículos utilizados para obtenção de oócitos.

Por outro lado, o fato de que embriões oriundos de FIV com ≥ 4 núcleos obtiveram menor presença da γ H2A.X na cromatina que os contendo < 4 núcleos (independente do tamanho folicular pelo qual os oócitos foram obtidos) sugere que uma maior velocidade de

divisão celular (mitose) está relacionada a maior integridade da cromatina. Da mesma forma, os resultados de CHE et al. (2005) demonstraram que embriões suínos de duas células fixados 48 h pós AP tiveram maior número de núcleos com focos referentes a γ H2A.X que embriões no estágio de quatro células fixados no mesmo período.

Em suma, o conjunto de resultados obtidos demonstra o perfil de expressão das proteínas Ac.H3K14, HMG2 e γ H2A.X em núcleos de embriões bovinos com diferente capacidade de desenvolvimento *in vitro*.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra: 1) que embriões produzidos a partir de oócitos oriundos de folículos entre 1-2 mm apresentam menor competência meiótica e capacidade de atingir o estágio de blastocisto *in vitro* que aqueles produzidos com oócitos oriundos de folículos entre 4-8 mm; 2) a expressão das proteínas HMGN2, Ac.H3K14 e γ H2A.X durante o desenvolvimento embrionário precoce em bovinos; 3) que embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos oriundos de folículos entre 1-2 mm e 4-8 mm apresentam diferenças no número de núcleos, bem como no percentual de núcleos positivos para HMGN2 e Ac.H3K14 de acordo com a duração do cultivo, avaliado entre 50 e 80 h pós-ativação partenogenética, e o tempo necessário para realização da primeira clivagem; 4) que a expressão da proteína γ H2A.X parece não estar relacionada à capacidade de desenvolvimento de embriões produzidos mediante ativação ou fertilização de oócitos oriundos de folículos entre 1-2 mm e 4-8 mm, tampouco com relação ao tempo necessário para realizar a primeira clivagem; 5) que menor percentual de expressão da γ H2A.X parece estar relacionado à maior velocidade de divisão celular (mitose) de embriões oriundos de oócitos fertilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L, GINTHER, O.J. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.95, p.627-640. 1992.
- ADENOT, P.G. et al. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. **Development**, v.124, p.4615-4625, 1997.
- AOKI, E., SCHULTZ, R.M. DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. **Zygote**, v.7, p.165-172, 1999.
- ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.
- BARNES, F.L., FIRST, N.L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.29, p.117-123, 1991.
- BASSING, C.H. et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, p.8173-8178, 2002.
- BIRGER, Y. et al. Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. **EMBO J.**, v.22, p.1665-1675, 2003.
- BLONDIN, P. et al. *In vitro* competence of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, p.1061-1075, 1997a.
- BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.66, p.38-43, 2002.
- BLONDIN, P., GUILBAULT, L.A., SIRARD, M.A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v.48, p.803-813, 1997b.
- BLONDIN, P., SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v.41, p.54-62, 1995.

BÓ, G.A., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J. Dinámica folicular ovárica en el bovino. In: **Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**, São Paulo: Ed. USP, 2000. p.12-34.

BORDIGNON, V. et al. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, v.48, p.291-298, 1997.

BORDIGNON, V., CLARKE, H.J., SMITH, L.C. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. **Biol. Reprod.**, v.61, p.22-30, 1999.

BRACKETT, B.G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol Reprod.**, v.27, p.147-158, 1982.

BROWN, E.J., BALTIMORE, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. **Genes Dev.**, v.17, p.615-628, 2003.

BROWNELL, J.E., ALLIS, C.D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.6, p.176-184, 1996.

BURATINI JR., J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and 4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v.130, p.343-350, 2006.

BURMA, S. et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.42462-42467, 2001.

BUSTIN, M. et al. **Immunological studies on the influence of chromatin structure on the binding of a chemical carcinogen to the genome**. In Application of Biological Markers to Carcinogen Testing (Millman, H.A.S., ed.), p.1349-1371, Plenum Press, New York, 1983.

BUSTIN, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal protein. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, p.5237-5246, 1999.

BUSTIN, M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v.26, p.152-153, 2001.

CARÁMBULA, S.F. et al. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.563-571, 1999.

- CELESTE, A. et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. **Science**, v.296, p.922-927, 2002.
- CELESTE, A. et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. **Nat. Cell Biol.**, v.5, p.675-679, 2003.
- CHE, L., LALONDE, A., BORDIGNON, V. The occurrence of phosphorylated histone H2A.X in porcine embryos produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. **38th Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction (SSR) 2005**. Abstract, p.671.
- CHESNEL, F., EPPIG, J.J. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Mol. Reprod. Dev.**, v.40, p.503-508, 1995.
- CHRISTMANN, L., JUNG, T., MOOR, R.M. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.38, p.85-90, 1994.
- CLARKE, H.J., OBLIN, C., BUSTIN, M. Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. **Development**, v.115, p.791-799, 1992.
- CRIPPA, M.P. et al. Deposition of chromosomal protein HMG-17 during replication affects the nucleosomal ladder and transcriptional potential of nascent chromatin. **EMBO J.**, v.12, p.3855-3864, 1993.
- CRIPPA, M.P., ALFONSO, P.J., BUSTIN, M. Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. **J. Mol. Biol.**, v.228, p.442-449, 1992.
- CROZET, N. et al. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Res.**, v.14, p.65-73, 1986.
- DAMIANI, P., FISSORE, R.A., DUBY, R.T. Biochemical and physiological maturation of cow and calf oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.310, 1998 (abstract).
- DE LOOS, F.A.M. et al. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. **Theriogenology**, v.35, p.527-535, 1991.
- DE LOOS, F.A.M. et al. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molec. Reprod. Dev.**, v.31, p.208-214, 1992.

- DE LOOS, F.A.M., ZEINSTRA, E., BEVERS, M.M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.39, p.162-165, 1994.
- DEDIEU, T. et al. p34^{cdc2} expression and meiotic competence in growing goat oocytes. **Molec. Reprod. Dev.**, v.50, p.251-262, 1998.
- DING, H.F., BUSTIN, M., HANSEN, U. Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14. **Mol. Cell Biol.**, v.17, p.5843-5855, 1997.
- DOHERTY, A.S. et al. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1526-1535, 2000.
- DORBIC, T., WITTING, B. Chromatin from transcribed genes contains HMG17 only downstream from the starting point of transcription. **EMBO J.**, v.6, p.2393-2399, 1987.
- DOWNS, J.A., LOWNDES, N.F., JACKSON, S.P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. **Nature**, v.408, p.1001-1004, 2000.
- DRABENT, B. et al. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. **Histochem. Cell Biol.**, v.106, p.247-251, 1996.
- DRUCKMANN, S. et al. Immunofractionation of DNA sequences associated with HMG-17 in chromatin. **Exp. Cell Res.**, v.166, p.486-496, 1986.
- EBERHARTER, A., BECKER, P.B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. **EMBO Rep.**, v.3, p.224-229, 2002.
- EINCK, L., BUSTIN, M. Inhibition of transcription in somatic cells by microinjection of antibodies to chromosomal proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.80, p.6735-6739, 1983.
- EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p.485-489, 1996.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v.11, n.1, p. 97-105, 1966.
- FAIR, T. et al. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anat. Embryol.**, v.195, p.327-336, 1997a.
- FAIR, T. et al. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Mol. Reprod. Dev.**, v.43, p.503-512, 1996.

- FAIR, T. et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.208-215, 1997b.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.203-216, 2003.
- FAIR, T., HYTTEL, P., GREEVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev.** V.42, p.437-442, 1995.
- FELSENFELD, G. et al. Chromatin structure and gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.9384-9388, 1996.
- FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. **Nat. Cell Biol.**, v.4, p.993-997, 2002.
- FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. H2AX: the histone guardian of the genome. **DNA Repair**, v.3, p.959-967, 2004.
- FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, n.3, p. 648-654, 2001.
- FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **An. Reprod. Sci.**, v.33, p.111-125, 1993.
- GARCIA-RAMIREZ, M., DONG, F., AUSIO, J. Role of the histone tails in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.19587-19595, 1992.
- GAUTIER, J. et al. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v.60, p.487-494, 1990.
- GIEBELHAUS, D.H., HEIKKILA, J.J., SCHULTZ, G.A. Changes in the quantity of histone and actin messenger RNA during the development of preimplantation mouse embryos. **Dev. Biol.**, v.98, p.148-154, 1983.
- GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GOODHAND, K.L. et al. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v.51, p.951-961, 1999.

- GOODWIN, G.H., SANDERS, C., JOHNS, E.W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. **Eur. J. Biochem.**, v.38, p.14-19, 1973.
- GOVIN, J. et al. The role of histones in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. **Eur. J. Biochem.**, v.271, p.3459-3469, 2004.
- GREVE, T. et al. In vivo development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured in vivo versus *in vitro*. **J. Vitro Fert. Embryo Transfer**, v.4, p.281-285, 1987.
- GROSSCHEDL, R., GIESE, K., PAGEL, J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. **Trends Genet.**, v.10, p.94-100, 1994.
- GRUSS, C., KNIPPERS, R. Structure of replicating chromatin. **Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.**, v.52, p.337-365, 1996.
- HAGEMANN, L.J. et al. Development during sIVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Mol. Reprod. Dev.**, v.53, p.451-458, 1999.
- HANENBERG, E.H.A.T., van WAGTENDONK-DE, L.A.M. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collections for *in vitro* embryo production results. **Theriogenology**, v.47, p.158, 1997. abstract.
- HANSEN, J.C., AUSIO, J. Chromatin dynamics and the modulation of genetic activity. **Trends Biochem.**, v.17, p.187-191, 1992.
- HANSEN, J.C., WOLFFE, A.P. Influence of chromatin folding on transcription initiation and elongation by RNA polymerase III. **Biochemistry**, v.31, p.7977-7988, 1992.
- HENDRIKSEN, P.J.M. et al. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.
- HOCK, R. et al. Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on transcriptional activity. **EMBO J.**, v.17, p.6992-7001, 1998b.
- HOCK, R., SCHEER, U., BUSTIN, M. Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport. **J. Cell Biol.**, v.143, p.1427-1436, 1998a.

- HUE, I. et al. Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.47, p.222-228, 1997.
- HUMBLOT, P. et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.
- HUYEN, Y. et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, v.432, p.406-411, 2004.
- HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- HYTTEL, P., CALLESEN, H., GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.645-656, 1986.
- IGUCHI, N. et al. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Ilils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. **Int. J. Androl.**, v.26, p.354-365, 2003.
- JAZAYERI, A., McAINSH, A.D., JACKSON, S.P. Saccharomyces cerevisiae Sin 3p facilitate DNA double-strand break repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.101, p.1644-1649, 2004.
- JEPPESEN, P., TURNER, B.M. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. **Cell**, v.74, p.281-289, 1993.
- JOHNS, E.W. **Chromosomal proteins**. Academic Press, New York, 1982.
- KANATSU-SHINOHARA, M., SCHULTZ, R.M., KOPF, G.S. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34cdc2, cyclin B1, cdc25C, and weel in meiotically incompetent and competent oocytes. **Biol. Reprod.**, v.63, p.1610-1616, 2000.
- KAÑKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. **Theriogenology**, v.59, p.3-19, 2003.
- KASTROP, P.M.M. et al. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. **Mol. Reprod. Dev.**, v.29, p.271-275, 1991.
- KHOCHBIN, S. et al. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.11, p.162-166, 2001b.

- KHOCHBIN, S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. **Gene**, v.271, p.1-12, 2001a.
- KOUZARIDES, T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.9, p.40-48, 1999.
- KRUIP, T.A.M., DIELEMAN, S.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.22, p.465-473, 1982.
- KURDISTANI, S.K., GRUNSTEIN, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.4, p.276-284, 2003.
- LEE, D.Y. et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. **Cell**, v.72, p.73-84, 1993.
- LEIBFRIED, L., FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, v.48, p.76-86, 1979.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. et al. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v.36, p.376-383, 1987.
- LÉVESQUE, J.T., SIRARD, M.A. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1427-1436, 1996.
- LONERGAN, P. et al. Effect of follicles size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.37, p.48-53, 1994;
- LONERGAN, P. et al. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected *in vitro* or *in vivo* before and 20h after the preovulatory luteinizing hormone surge. **Mol. Reprod. Dev.**, v.66, p.297-305, 2003.
- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v.389, p.251-260, 1997.
- MAJUMDER, S., MIRANDA, M., DePAMPHILIS, M.L. Analysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates that the primary role of enhancers is to relieve repression promoters. **EMBO J.**, v.12, p.1131-1140, 1993.
- MALIK, H.S., HENIKOFF, S. Phylogenomics of the nucleosome. **Nat. Struct. Biol.**, v.10, p.882-891, 2003.

MANNIRONI, C., BONNER, W.M., HATCH, C.L. H2A.X a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3'processing signals. **Nucleic Acids Res.**, v.17, p.9113-9126, 1989.

MAPLETOFT, R.J., BÓ, G.A., ADAMS, G.P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, n.1, p.24-51, 2000.

McLAY, D.W., CLARKE, H.J. Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v.125, p.625-633, 2003.

MEEHAN, R.R. et al. Epigenetic silencing in embryogenesis. **Exp. Cell Res.**, v.309, p.241-249, 2005.

MERMILLOD, P. et al. Assessment of cytoplasmic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. **Theriogenology**, v.47, p.187, 1998 (abstract).

MIHM, M. et al. Follicle wave growth in cattle. **Reprod. Domest. Anim.**, v.37, p.191-200, 2002.

MOHAMED, O.A., BUSTIN, M., CLARKE, H.J. High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. **Develop. Biol.**, v.229, p.237-249, 2001.

NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, p.21-34, 2000.

NONCHEV, S., TSANEV, R. Protamine histone replacement and DNA-replication in the male mouse pronucleus. **Mol. Reprod. Dev.**, v.25, p.72-76, 1990.

OWEN-HUGHES, T., WORKMAN, J.L. Experimental analysis of chromatin function and transcriptional control. **Crit. Rev. Gene Express.**, v.11, p.1-39, 1994.

PARANJAPE, S.M., KAMAKAKA, R.T., KADONAGA, J.T. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. **Annu. Rev. Biochem.**, v.63, p.265-297, 1994.

PARANJAPE, S.M., KRUMM, A., KADONAGA, J.T. HMG17 is a chromatin-specific transcriptional coactivator that increases the efficiency of transcription initiation. **Genes Dev.**, v.9, p.1978-1991, 1995.

- PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.31, p.63-67, 1992.
- PETERSEN, S. et al. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. **Nature**, v.414, p.660-665, 2001.
- PETERSON, C.L. Multiple SWItches to turn on chromatin? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.6, p.171-175, 1996.
- PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495-504, 1984.
- POSTNIKOV, Y.V. et al. Distribution of high mobility group proteins $\frac{1}{2}$, E and 14/17 and linker histones H1 and H5 on transcribed and non-transcribed regions of chicken erythrocyte chromatin. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p.717-725, 1991.
- PRESICCE, G.A. et al. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biol. Reprod.**, v.56, p.386-392, 1997.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v.34 (suppl. 52), p.7-68, 1960.
- REDON, C. et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. **Current Opinion in Genetics & Develop.**, v.12, p.162-169, 2002.
- REDON, C. et al. Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. **EMBO Rep.**, v.4, p.1-7, 2003.
- REEVES, R., ADAIR, J.E. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. **DNA Repair**, v.4, p.926-938, 2005.
- REINA-SAN-MARTIN, B. et al. H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. **J. Exp. Med.**, v.197, p.1767-1778, 2003.
- RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulation hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biol. Reprod.**, v.65, n.1, p.112-118, 2001.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol. Reprod.**, v.66, p.589-595, 2002a.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev.**, v.61, p.234-248, 2002b.

ROBERT, C. et al. Quantification of cyclin B1 and p34cdc2 in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. **Biol. Reprod.**, v.67, p.1456-1464, 2002.

ROBERT, C. et al. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.167-175, 2000.

ROCHE, J.F. Control and Regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. **Rev. Reprod.**, v.1, p.1927, 1996.

ROGAKOU, E.P. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.5858-5868, 1998.

ROGAKOU, E.P. et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. **J. Cell Biol.**, v.146, p.905-916, 1999.

ROTH, S.Y., ALLIS, C.D. Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? **Cell**, v.87 p.5-8, 1996.

ROTHKAMM, K. et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. **Mol. Cell Biol.**, v.23, p.5706-5715, 2003.

SALAMONE, D.F. et al. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biol. Reprod.**, v.64, p.1761-1768, 2001.

SANDERS, S.L. et al. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. **Cell**, v.119, p.603-614, 2004.

SANTOS, I. W. **Diagnóstico ginecológico bovino pela ultra-sonografia**. 1993. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1993.

SEDELNIKOVA, O.A. et al. Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. **Radiat. Res.**, v.158, p.486-492, 2002.

- SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p.155-168, 2003.
- SPADA, F. et al. High mobility group 1 (HMG1) protein in mouse preimplantation embryos. **Mechanism. Dev.**, v.76, p.57-66, 1998.
- STEIN, P. et al. Stage-dependent redistributions of acetylated histones in nuclei of the early preimplantation mouse embryo. **Mol. Reprod. Dev.**, v.47, p.421-429, 1997.
- TAIEB, R., THIBIER, C., JESSUS, C. On cyclins, oocytes and eggs. **Mol. Reprod. Dev.**, v.48, p.397-411, 1997.
- TAKAI, H., SMOGORZEWSKA, A., de LANGE, T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. **Curr. Biol.**, v.13, p.1549-1556, 2003.
- TAN, S.J., LU, K.H. Effects of different estrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v.33, p.335, 1990. abstract.
- TELFORD, N.A., WATSON, A.J., SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. **Mol. Reprod. Dev.**, v.26, p.90-100, 1990.
- TRIESCHMANN, L. et al. Incorporation of chromosomal proteins HMG-14/HMG-17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes. **EMBO J.**, v.14, p.1478-1489, 1995a.
- TRIESCHMANN, L. et al. Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: Definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. **Mol. Cell Biol.**, v.15, p.6663-6669, 1995b.
- VAN DE LEEMPUT, E.E. et al. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.
- WARD, I.M., CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.47759-47762, 2001.
- WATSON, A.J. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.62, p.355-364, 2000.
- WEST, K.L. et al. **Chromatin structure and dynamics: State-of-the-Art**. Elsevier B.V., New York, N.Y., p.135-154, 2004.

- WEST, M.H., BONNER, W.M. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. **Biochemistry**, v.19, p.3238-3245, 1980.
- WIEKOWSKI, M. et al. Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. **J. Cell. Sci.**, v.110, p.1147-1158, 1997.
- WOLFFE, A.P. Chromatin and gene regulation at the onset of embryonic development. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.36, p.581-606, 1996.
- WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D. Chromatin structural features and targets that regulate transcription. **J. Struct. Biol.**, v.129, p.102-122, 2000.
- WOLFFE, AP. Histone H1. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.29, p.1463-1466, 1997.
- WRENZYCK, C. et al. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, p.23-35, 2005.
- WRENZYCKI, C. et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum. Reprod.**, v.16, p.893-901, 2001.
- WRENZYCKI, C. et al. Expression of the gap junction gene connexin 43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **J. Reprod. Fertil.**, v.108, p.17-24, 1996.
- WU, R.S. et al. Histones and their modifications. **CRC Crit. Rev. Biochem.**, v.20, p.201-263, 1986.
- WURTH, Y.A., KRUIP, T.A.M. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. **Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.**, The Hague, The Netherlands, I:387-389, 1992.
- XIE, A. et al. Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. **Mol. Cell**, v.16, p.1017-1025, 2004.
- YAMASHITA, M. et al. Molecular mechanisms of the initiation of the oocyte maturation: general and species-specific aspects. **Prog Cell Cycle Res.**, v.4, p.115-129, 2000.
- ZHANG, Y., REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modification of the core histone tails. **Genes Dev.**, v.15, p.2343-2360, 2001.

ZLATANOVA, J., van HOLDE, K. The linker histones and chromatin structure: New twists. **Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.**, v.52, p.221-259, 1996.