UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MONALISA MEDRADO BOMFIM

Efeitos do estresse oxidativo durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo *ERBB2* e *ERBB3*

Pirassununga

2017

MONALISA MEDRADO BOMFIM

**Efeitos do estresse oxidativo durante a produção *in vitro* de
embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo *ERBB2* e *ERBB3***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Programa de pós-graduação de Biociência Animal.

Área de Concentração: Ciências da Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B695e Bomfim, Monalisa Medrado
Efeitos do estresse oxidativo durante a produção
in vitro de embriões bovinos sobre o miR-199a e
genes alvo ERBB2 e ERBB3 / Monalisa Medrado Bomfim
; orientador Felipe Perecin. -- Pirassununga, 2017.
160 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO. 2. EMBRIOLOGIA
MOLECULAR. 3. miRNAs. 4. EPIGENÉTICA . 5. ESTRESSE
OXIDATIVO. I. Perecin, Felipe , orient. II. Título.

MONALISA MEDRADO BOMFIM

Efeitos do estresse oxidativo durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo *ERBB2* e *ERBB3*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Programa de pós-graduação de Biociência Animal.

Área de Concentração: Ciências da Medicina Veterinária

Data de aprovação: 07 / 04 / 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Felipe Perecin – Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

Prof. Dr.a Cláudia Lima Verde Leal
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

Prof. Dr.a Marcella Pecora Milazzotto
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Marcelo Fabio Gouveia Nogueira
Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Perecin pela orientação, confiança e paciência que permitiram a realização desse trabalho. Ao Dr. Juliano Coelho da Silveira pela co-orientação não oficial que contribuiu muito para a pesquisa. Aos colegas de laboratório Gabriela Mamede, Juliano Sangalli e Maite Del Collado pela ajuda diária nas atividades do laboratório. Às alunas de iniciação científica Letícia Rebello, Rosane Mazzarella e Bruna Pavan que sempre estavam à disposição para ajudar. À Patrícia Kubo Fontes, ao Prof. Marcelo Nogueira e ao Laboratório de Fitomedicamentos Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) pela realização dos ensaios de expressão gênica utilizando o Biomark HD.

Gostaria de agradecer também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro da bolsa de mestrado (processo 2014/21042-6) e pelo acesso ao equipamento multiusuário Nanosight NS300 (processo 2015/21829-9); ao Matadouro Frigorífico Olhos D'água pela doação dos ovários; à CRV Lagoa pela doação das paletas de sêmen necessárias ao desenvolvimento deste trabalho; e aos Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT – da FZEA/USP) e Laboratório Multiusuário Microscopia Confocal (LMMC – da FMRP/USP) pelo uso respectivamente dos microscópios de epifluorescência (FAPESP 2014/02493-7) e confocal.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões expõe o conceito a condições diferentes do ambiente intra-tubárico-uterino. A alta tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* induz estresse oxidativo mediante aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio. A condição de estresse oxidativo altera a expressão de RNAm e miRNAs, podendo comprometer vias de interação materno-embrionária. Recentemente, os exossomos têm sido descritos como um mecanismo complementar de transporte de RNAm e miRNAs, que beneficiam a comunicação bidirecional materno-embrionária. Portanto, além do estudo dos próprios embriões, a análise dos exossomos isolados do meio de cultivo da PIVE também é relevante. Comumente são utilizados dois modelos de cultivo na PIVE, a alta tensão (20%) e a baixa tensão (5%) de oxigênio. A hipótese deste estudo é que a alta tensão de oxigênio no cultivo embrionário gera uma condição de estresse oxidativo que causa alterações de expressão de RNAm e miRNAs presentes nos embriões e nos exossomos. Além disso, o estresse oxidativo exerceria efeito sobre o padrão de secreção destes exossomos. Para testar essa hipótese este estudo produziu embriões bovinos *in vitro* cultivados em diferentes tensões de oxigênio. Os embriões foram coletados no dia 7 e os meios de cultivo, para isolamento os exossomos, foram coletados nos dias 3 e 7 do cultivo. Os blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio apresentaram um aumento dos níveis de EROs através de análise de fluorescência. Este resultado validou o modelo de estresse oxidativo para embriões. Os resultados iniciais indicaram que apesar do miR-199a-5p, descrito como possível regulador dos genes alvos *ERBB2* e *ERBB3*, ter apresentado maior expressão nos embriões cultivados em alta tensão, os transcritos *ERBB2* e *ERBB3* e a proteína *ERBB2* não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Uma vez que não se estabeleceu uma relação de regulação entre o miR-199a-5p e o gene alvo *ERBB2* para os embriões bovinos, este estudo se voltou para a análise de outros 96 RNAm e 378 miRNAs, destes 40 RNAm e 8 miRNAs apresentaram alterações significativas entre os embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio. Entre as principais funções alteradas estão associadas à resposta ao estresse oxidativo, proliferação e diferenciação celular, remodelação epigenética, apoptose, metabolismo e reconhecimento materno-fetal. Por fim, com o objetivo de compreender um panorama maior dos efeitos do estresse oxidativo, este estudo se propôs a analisar o padrão de expressão e os miRNAs do conteúdo dos exossomos do meio de cultivo. O estresse

oxidativo alterou tanto a concentração dos exossomos quanto a expressão dos mRNAs, em ambos os dias do desenvolvimento embrionário (D3 e D7). Dentre os miRNAs, destaca-se o miR-210 que foi considerado por este trabalho como biomarcador não invasivo da condição de normoxia no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Em conclusão, esse estudo não elucidou como o estresse oxidativo altera a interação materno-embrionária em embriões produzidos *in vitro* em diferentes condições de tensão de oxigênio, mas gerou conhecimentos adicionais sobre o desenvolvimento embrionário bovino e os efeitos da alta tensão de oxigênio.

Palavras chave: miRNAs, EROs, metilação, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

The in vitro embryo production exposes the concept to conditions different from the intra-tubal-uterine environment. The high oxygen tension during in vitro production induces the oxidative stress by increasing the concentration of reactive oxygen species. The oxidative stress condition changes the mRNA and miRNAs expression, it can compromise pathways of maternal-embryonic interaction. Recently, the exosomes have been described as a complementary mechanism of mRNA and miRNAs transport, which improve the bi-directional maternal-embryonic communication. Therefore, the studies of the embryos and exosomes isolated from the IVP culture medium are relevant. Two cultivation models are usually used in IVP, the high tension (20%) and the low tension (5%) of oxygen. The hypothesis of this study is that the high oxygen tension in the embryonic culture generates an oxidative stress condition that causes changes in the mRNA and miRNAs expression. In addition, this oxidative stress is able to modulate the secretion pattern of the exosomes isolated from IVP embryos. To test this hypothesis, this study produced in vitro bovine embryos developed at different oxygen tensions. The embryos were sampled on day 7 and the culture media, for exosomes isolation, were collected on days 3 and 7 of the embryo development. Blastocysts cultured in high oxygen tension showed increased levels of ROS through fluorescence analysis. This result validated the oxidative stress model for embryos. In order to understand the effect of oxidative stress on the pathways of maternal-embryonic interaction, this study aimed to analyze the ERBB signaling pathway. Despite the fact that miR-199a-5p, described as a possible regulator of the ERBB2 and ERBB3 target genes, showed higher expression in embryos cultured under high tension, the *ERBB2* and *ERBB3* transcripts and the ERBB2 protein showed no significant difference between high and low oxygen tension groups. Since a regulatory relationship between miR-199a-5p and the ERBB2 target gene was not established for bovine embryos, this study turned to the analysis of other 96 mRNAs and 378 miRNAs, out of 40 mRNAs and 8 miRNAs showed significant changes among the groups. The main altered functions are the response to oxidative stress, cell proliferation and differentiation, epigenetic remodeling, apoptosis, metabolism and maternal-fetal recognition. Finally, in order to understand the bigger picture of oxidative stress effect we analyze the secretion pattern and the miRNA content of the exosomes from culture medium of IVP embryos. Oxidative stress change both, the exosome concentration

and the miRNA expression (at D3 and D7). Among the miRNAs, we highlight the miR-210 that was considered by this work as a non-invasive biomarker of the normoxia condition in the in vitro culture of bovine embryos. In conclusion, this study did not elucidate how oxidative stress changes the maternal-embryonic interaction in IVP embryos, but it generated additional knowledge about bovine embryonic development and the high oxygen tension effects.

Keywords: miRNAs, ROS, methylation, embryo development.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da reprogramação embrionária que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial. A reprogramação embrionária envolve, principalmente, dois eventos: reprogramação epigenética, através das ondas de desmetilação e metilação "de novo"; e a transição materno-embrionária, com a depleção gradual dos transcritos e proteínas maternos, concomitante com a crescente produção de transcritos do embrião (ativação do genoma embrionário). A ativação completa do genoma do embrião, em bovinos, ocorre entre os estágios de 8 e 16 células, próximo ao dia 4 do desenvolvimento embrionário.26
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do metabolismo de cisteína no complexo *cumulus* oócito, durante a suplementação do meio de maturação do oócito com cisteína e cisteamina. COC = Complexo *cumulus* oócito; GSH = Glutathiona.30
- Figura 3.** Esquema da transmissão de sinal da via ERBB.....37
- Figura 4.** Delineamento do Experimento I. Os embriões foram cultivados em diferentes tensões de O₂ (alta 20% O₂ e baixa 5% O₂), posteriormente foram desenvolvidos dois grupos adicionais cultivado em alta tensão de oxigênio na presença e ausência de suplementado com antioxidantes. As coletas dos blastocistos foram realizadas no dia 7 do desenvolvimento. As análises foram realizadas com *pools* de embriões otimizados para cada técnica, com no mínimo três repetições biológicas.40
- Figura 5.** Delineamento do experimento do Experimento II. Os embriões foram cultivados em diferentes tensões de O₂ (alta - 20% O₂; e baixa - 5% O₂), posteriormente foram desenvolvidos dois grupos adicionais cultivado em alta tensão de oxigênio na presença e ausência de suplementado com antioxidantes. As coletas dos blastocistos foram realizadas no dia 7 do desenvolvimento. As análises foram realizadas com *pools* de embriões otimizados para cada técnica, com no mínimo três repetições biológicas.....41
- Figura 6.** Delineamento do Experimento III. Os embriões produzidos em Alta O₂ e Baixo O₂ no Experimento I tiveram os meios de cultivo coletados no D3, durante o procedimento de *feeding*, e em D7. As amostras foram agrupadas em pools de 3 repetições para isolamento e análise dos exossomos e seu conteúdo de miRNAs. As análises estatísticas foram realizadas com 3 repetições para cada grupo.42
- Figura 7.** Os gráficos de pontos representam as curvas de eficiência dos *primers* para os genes candidatos *ERBB2* (azul) e *ERBB3* (verde), e genes endógenos *PPIA* (cinza) e *RPL15* (verde). A equação da reta e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R²)

são apresentados para os respectivos genes. Nos gráficos, o eixo X representa o log das diluições utilizadas e o eixo y representa os valores de Ct encontrados nas reações de Real Time RT-PCR.49

Figura 8. Resultado do sequenciamento para os transcritos *ERBB2* e *ERBB3*. As sequências foram analisadas através do software Prime BLAST e apresentaram 100% de homologia com os transcritos de interesse.50

Figura 9. Níveis intracelulares de EROs (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta e baixa tensão de oxigênio (A). As barras do gráfico representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de epifluorescência de blastocistos produzidos em alta (B) e baixa (C) tensões de oxigênio e corados com CellROX Green (40x).59

Figura 10. Expressão relativa das isoformas do miR-199a para blastocistos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).60

Figura 11. Expressão relativa dos transcritos *ERBB2* e *ERBB3* para os blastocistos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).60

Figura 12. Análises da proteína ERBB2. (A) Expressão relativa e (B) imagem representativa do padrão de bandas encontradas na análise de Western Blotting para a proteína ERBB2 (185 kDa) em blastocistos bovinos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. A expressão da proteína ERBB2 foi normalizada pela expressão da proteína beta-actina (43 kDa). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).61

Figura 13. Imunolocalização das proteínas ERBB2 (A, B e C) e ERBB3 (D, E e F) em blastocistos bovinos. As fotomicrografias de confocal representam a marcação do DNA (A e D), a localização dos receptores ERBB2 (B) e ERBB3 (E) e a combinação das duas imagens (C e F). Ambos os receptores estão predominantemente localizados no trofoblasto, o que pode ser confirmado pela ausência de marcação da massa celular interna, na qual não há células do trofoblasto, conforme indicado pelas cabeças de seta nas fotomicrografia B e E (40x). .62

Figura 14. Níveis intracelulares de EROs (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de

tratamento com antioxidantes (A). As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de epifluorescência de blastocistos produzidos em alta tensão de oxigênio na ausência de tratamento (B) e na presença de suplementação com cisteína e cisteamina (C) e corados com CellROX Green (40x). 63

Figura 15. Expressão relativa das isoformas do miR-199a. Os gráficos A e B apresentam a comparação da expressão relativa das isoformas do miR-199a entre os grupos de blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. 64

Figura 16. O resultado do Western Blotting, em unidades arbitrárias, demonstrou que a proteína ERBB2 não apresenta diferença de expressão entre os grupos de embriões cultivados em alta tensão na ausência ou presença de antioxidantes ou na baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 65

Figura 17. Os níveis de metilação global do DNA (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta ou baixa tensão de oxigênio (A). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de confocal de blastocistos produzidos em alta (B) e baixa (C) tensões de oxigênio e imunomarcados para 5-mC (40x). 66

Figura 18. Mapa das funções biológicas e expressão relativa dos 40 transcritos diferentemente expressos entre os cultivos de alta e baixa tensão de oxigênio para blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 67

Figura 19. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de 10 blastocistos analisados. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3. 68

Figura 20. Diagrama de Venn indicando a expressão de 352 miRNA em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio. 69

Figura 21. *Heatmap* indicando a expressão dos 8 miRNAs diferentemente expressos ($p \leq 0,05$) entre os blastocistos desenvolvidos em alta e baixa tensão de oxigênio, para 3 repetições biológicas. 70

Figura 22. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs mais (A) e menos (B) abundantes na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs. 71

Figura 23. Expressão relativa dos miRNAs. Os gráficos A, B, C, D E, F, G e H a expressão relativa dos mesmos miRNAs entre os grupos de blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 72

Figura 24. Média das modas e desvio padrão dos tamanhos dos exossomos (nm) observados no meio de cultivo durante os dias 3 e 7 do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em condições de alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 73

Figura 25. Média e desvio padrão das concentrações de exossomos (partículas/mL) observada no meio de cultivo durante os dias 3 e 7 do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em condições de alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 74

Figura 26. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de meio de cultivo retiradas junto com o *feeding* no dia 3 do cultivo. As análises foram realizadas para 3 repetições biológicas. Cada repetição biológica consistiu em um *pool* de meio de cultivo de 3 rotinas. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre

os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3.75

Figura 27. Diagrama de Venn indicando a presença de 281 miRNA no conteúdo dos exossomos isolados do meio do cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* no dia 3 do desenvolvimento. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio.75

Figura 28. *Heatmap* indicando 15 miRNAs diferentemente expressos ($p \leq 0,05$) no conteúdo de exossomos isolados do meio de cultivo de produção *in vitro* de embriões desenvolvidos em alta ou baixa tensão de oxigênio no dia 3 do cultivo, para 3 repetições biológicas.76

Figura 29. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs mais (A) e menos (B) expressos na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio para exossomos isolados do meio de cultivo no dia 3 em três repetições biológicas. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs.77

Figura 30. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de meio de cultivo retiradas no dia 7 do cultivo. As análises foram *pools* realizadas para três repetições biológicas. Cada repetição biológica consistiu em um *pool* de meio de cultivo de três rotinas. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3.78

Figura 31. Diagrama de Venn indicando a presença de 325 miRNA no conteúdo dos exossomos isolados do meio do cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* no dia 7 do desenvolvimento. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio.79

Figura 32. *Heatmap* indicando 18 miRNAs diferentemente presentes ($p \leq 0,05$) no conteúdo de exossomos isolados do meio de cultivo de produção *in vitro* de embriões desenvolvidos entre alta e baixa tensão de oxigênio no dia 7 do cultivo, para três repetições biológicas. ...80

Figura 33. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs elevados (A) e diminuídos (B) em exossomos isolados do meio de cultivo no dia 7 na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio para três repetições biológicas. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs.81

Figura 34. Esquema ilustrativo das reações catalisadas pelas enzimas SOD1, CAT e TXN (em destaque) como resposta ao estresse oxidativo induzido pelo excesso de EROs, durante o metabolismo celular.90

Figura 35. Esquema ilustrativo da via de sinalização FOXO, no qual foi destacada a função de resposta ao estresse oxidativo.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio padrão (DP) das taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos produzidos em alta (20%) e baixa (5%) tensão de oxigênio.....	58
Tabela 2. Médias e desvio padrão (DP) das taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos produzidos em alta tensão de oxigênio (20%) na ausência e na presença da suplementação com antioxidantes cisteína e cisteamina (C+C).....	62
Tabela suplementar S.1. Sequência dos <i>primers forward</i> específicos para o perfil de 378 miRNAs e 3 endógenos (*) presentes na placa de amplificação.....	108
Tabela suplementar S.2. Ensaios de microfluído dos 93 transcritos e 3 endógenos (*) avaliados para 8 repetições biológicas de embriões cultivados em alta ou baixa tensão de O ₂	113
Tabela suplementar S.3. Lista completa da expressão relativa dos 378 miRNAs para 3 repetições biológicas em blastocistos bovinos cultivados em alta e baixa tensões de oxigênio.....	115
Tabela suplementar S.4. Expressão relativa dos 93 RNAm avaliados para 8 repetições biológicas para embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio.....	124
Tabela suplementar S.5. Expressão relativa dos 8 miRNAs avaliados para 4 repetições biológicas de blastocistos bovinos produzidos por fertilização <i>in vitro</i> e cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina).....	127
Tabela suplementar S.6. Lista completa da expressão relativa dos miRNAs do conteúdo dos exossomos isolados do meio de cultivo nos dias 3 e 7 do cultivo de embriões produzidos por fertilização <i>in vitro</i> e expostos a diferentes condições atmosféricas, alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

5hmC	5-hidroximetilcitosinas
5mC	5-metilcitosinas
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
COC	Complexo <i>cumulus</i> oócito
CpG	Citosina-fosfato-guanina
Ct	<i>Cycle Threshold</i> , ponto em que o <i>threshold</i> cruza com a linha de amplificação da amostra
D3	Dia 3 do desenvolvimento embrionário
D7	Dia 7 do desenvolvimento embrionário
DNMT	DNA metiltransferase
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GSH	Glutathione
HRG	Herregulinas
ICM	Massa celular interna
IFN- τ	Interferon-tau
IgGs	Imunoglobulinas G
miRNA	microRNA
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MVs	Microvesículas
NDF	Fator de diferenciação NEU
NRG	Neurregulinas
OXTRs	Receptores de ocitocina no endométrio
PBS	Tampão de solução salina com fosfato
RT-PCR	Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase

PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RE	Retículo Endoplasmático
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal Bovino
SOFaa	Fluido sintético do oviduto com aminoácidos
TCM199	Meio de cultura de tecido
TB	Trofoblasto
TE	Trofectoderme
TL	Tyrode-lactato

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Revisão de Literatura.....	22
2.1. Desenvolvimento embrionário.....	22
2.2. Epigenética	24
2.3. Estresse oxidativo	27
2.4. Microvesículas e exossomos.....	31
2.5. microRNA.....	33
2.6. Via de sinalização ERBB	34
3. Hipóteses	37
3.1. Experimento I.....	38
3.2. Experimento II	38
3.3. Experimento III	38
4. Objetivos e Delineamento Experimental.....	39
4.1. Experimento I	39
4.2. Experimento II	40
4.3. Experimento III	41
5. Material e Métodos.....	43
5.1. Local dos experimentos e reagentes	43
5.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões	44
5.2.1. Tratamento com antioxidantes	45
5.2.2. Taxa de clivagem e de blastocistos	45
5.3. Experimento I	46
5.3.1. Análise do conteúdo intracelular de EROs para avaliação do estresse oxidativo	46
5.3.2. Coleta e extração de RNA total das amostras	46
5.3.3. Expressão do miR-199a.....	47
5.3.4. Análise dos RNAm de <i>ERBB2</i> e <i>ERBB3</i>	47
5.3.5. Níveis proteicos do ERBB2	50
5.3.6. Imunocitoquímica ERBB2 e ERBB3 em blastocistos bovinos	51
5.3.7. Suplementação do meio de cultivo com antioxidantes	52
5.4. Experimento II	53

5.4.1.	Metilação global em blastocistos bovinos	53
5.4.2.	Níveis de transcritos gênicos em blastocistos	54
5.4.3.	Expressão do perfil de miRNAs para blastocistos bovinos	54
5.5.	Experimento III	55
5.5.1.	Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7	56
5.5.2.	Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7	56
5.6.	Análise dos Resultados	57
6.	Resultados.....	58
6.1.	Experimento I	58
6.1.1.	Taxa de clivagem e blastocisto	58
6.1.2.	Conteúdo intracelular de EROs para avaliação do estresse oxidativo	58
6.1.3.	Expressão do miR-199a.....	59
6.1.4.	Análise dos genes alvo ERBB2 e ERBB3.....	60
6.1.5.	Suplementação do meio de cultivo com antioxidantes	62
6.2.	Experimento II	65
6.2.1.	Perfil de metilação global dos blastocistos.....	65
6.2.2.	Níveis de expressão de RNAm nos blastocistos	66
6.2.3.	Perfil de microRNAs nos blastocistos.....	67
6.2.4.	Efeito da suplementação do meio de cultivo com antioxidantes na expressão dos miRNA	71
6.3.	Experimento III	72
6.3.1.	Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos nos dias 3 e 7	72
6.3.2.	Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3	74
6.3.3.	Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 7	78
7.	Discussão.....	82
7.1.	Experimento I	82
7.1.1.	Estresse oxidativo	82
7.1.2.	Provável regulação do miR-199a sobre a via ERBB	83
7.1.3.	Tratamento com antioxidantes	85
7.1.4.	Conclusão	86

7.2. Experimento II	86
7.2.1. Efeitos do estresse oxidativo no embrião: RNAm relacionados com remodelação epigenética x miRNAs	86
7.2.2. Efeito do estresse oxidativo no embrião: RNAm relacionados com estresse oxidativo x miRNAs.....	89
7.2.3. Conclusões.....	93
7.3. Experimento III	94
7.3.1. Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7.....	94
7.3.2. Vias enriquecidas pelos miRNAs presentes no conteúdo dos exossomos do meio de cultivo nos dias 3 e 7	95
7.3.3. Conclusões.....	96
8. Conclusão	97
9. Referências	99
APÊNDICE A - Tabelas suplementares.....	109
APÊNDICE B - Artigo submetido na Reproductive Sciences.....	138

1. Introdução

Um dos fatores que afetam diretamente a rentabilidade e a eficiência da produção de bovinos é a reprodução. Com o propósito de elevar a eficiência reprodutiva bovina e a velocidade do ganho genético existe uma ampla variedade de biotecnologias reprodutivas que auxiliam na maximização da exploração dos rebanhos, tais como: os protocolos hormonais de manipulação do ciclo estral e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). A PIVE é, atualmente, uma das tecnologias reprodutivas mais empregadas na pecuária nacional, e tem sido intensamente utilizada com o objetivo de aumentar o número de descendentes de animais considerados geneticamente superiores. Contudo, apesar da sua ampla exploração, ainda há necessidade de elucidar os efeitos dos sistemas *in vitro* sobre o comportamento celular e molecular durante o desenvolvimento embrionário, visando aprimorar os sistemas de produção e o subsequente desenvolvimento do embrião.

Entre os maiores obstáculos na produção de embriões *in vitro* estão a baixa competência para o desenvolvimento embrionário e danos celulares relacionados com um ambiente de cultivo contendo diversos fatores estressantes, com destaque para o estresse oxidativo. A sobrecarga oxidativa da atmosfera do meio de cultivo dos embriões leva à queda na taxa de formação de blastocistos e ao elevado número de células em apoptose (HE et al., 2012; YOON et al., 2014). Estudos realizados por Yoon et al. (2014) demonstraram experimentalmente que embriões cultivados em atmosfera com tensão de oxigênio próxima a 5% apresentaram taxas significativamente maiores de formação de blastocistos e sobrevivência celular.

Comumente são utilizados dois modelos de tensão de oxigênio atmosférico para o cultivo *in vitro* de embriões: a alta tensão (20% de O₂) e a baixa tensão (5% de O₂). Alguns estudos consideram que o modelo de baixa tensão de oxigênio favorece o desenvolvimento embrionário, uma vez que as taxas de blastócitos e prenhez são relativamente mais elevadas (DUMOULIN et al., 1999; PONTES, 2009; AMIN et al., 2014). Além disso, outros estudos demonstram que a alta tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* é um fator estressante que favorece modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, promovendo alterações significativas na expressão de reguladores gênicos pós-transcricionais. A partir destas observações, o objetivo da presente pesquisa foi determinar o efeitos da alta tensão de oxigênio sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) para validação do modelo

de estresse oxidativo em embriões bovinos. Em seguida avaliar o efeito da alta tensão de oxigênio sobre o padrão de metilação global e expressão de 378 miRNAs, 96 RNAs e proteína ERBB2 presentes nos embriões para determinar as principais vias e funções afetadas pela condição de estresse. Por fim, definir as alterações geradas pelo estresse oxidativo no padrão de secreção de miRNAs em exossomos presentes no meio de cultivo nos dias 3 e 7 do desenvolvimento embrionário. O objetivo geral deste trabalho é, portanto, investigar os efeitos do estresse oxidativo no embrião e nos exossomos do meio de cultivo da PIVE.

2. Revisão de Literatura

2.1. Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário torna-se possível devido a uma prévia aquisição de competência pelo oócito, marcada pelo crescimento do folículo ovariano e maturação do oócito. A maturação oocitária envolve diversos eventos como: modificações estruturais e funcionais no oócito e nas células do *cumulus*, tais como a formação do estoque de transcritos maternos, condensação do DNA e expulsão do primeiro corpúsculo polar no oócito e multiplicação e expansão das células do *cumulus* (EPPIG, 2001). O estoque de transcritos maternos fornece suporte para o embrião na fase inicial da embriogênese. Além da produção de RNAs e proteínas pelo próprio oócito, existe um aporte de transcritos oriundos das células do *cumulus*. Essa entrega de moléculas possibilita a diminuição da transcrição ativa pelo oócito, permitindo a condensação do seu DNA, que é fundamental para o progresso da maturação e extrusão do primeiro corpúsculo polar (LI; ZHENG; DEAN, 2010; SIRARD, 2012).

A atividade celular do embrião durante o desenvolvimento é predominantemente controlada pelos transcritos e proteínas de origem materna, até estes estoques serem gradualmente degradados e substituídos por transcritos de origem do genoma embrionário, período denominado transição materno-zigótica. Este estoque de produtos funcionais do oócito é essencial para reprogramação epigenética do embrião, na qual mecanismos de alteração da estrutura de cromatina alteram o padrão de expressão do genoma e, consequentemente, auxiliam na ativação da transcrição do genoma do embrião. A ativação

do genoma embrionário é o evento mais importante da transição materno-zigótica e, em bovinos, ocorre entre os estágios de 8 para 16 células, aproximadamente no dia 4 do desenvolvimento embrionário (BARNES; FIRST, 1991; GRAF et al., 2014).

No dia 6 do desenvolvimento o embrião bovino inicia a produção de interferon-tau (IFN- τ). Produzido pelas células mononucleares do trofotoderma embrionário, o IFN- τ é responsável por sinalizar o reconhecimento materno e bloquear os receptores de estradiol, consequentemente inibindo, também, os receptores de ocitocina no endométrio (OXTRs) e a secreção de PGF2alpha (SPENCER et al., 2007; BAZER, 2013). A produção de IFN- τ permanece até, aproximadamente, o dia 24 do desenvolvimento. O IFN- τ sinaliza, nos ruminantes, o início do período de implantação embrionária, estimulando a receptividade uterina e o crescimento placentário (MCGEADY et al., 2006).

A fase de implantação embrionária ocorre após o alongamento embrionário completo, quando o embrião compreende inteiramente os dois cornos uterinos, seguida pela aposição, fixação e adesão do trofoblasto embrionário ao epitélio luminal uterino. Contudo, o período para estabelecimento do contato adesivo entre os tecidos materno-embrionário é restrito, entre os dias 17 e 18 do desenvolvimento, e denominado de janela de implantação (BROWN et al., 2004; MCGEADY et al., 2006; SPENCER et al., 2007). A adesão é um processo complexo, envolvendo a formação de heterodímeros por receptores transmembrana, que ao interagir com os receptores maternos, desencadeiam o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular. Em bovinos, a adesão resulta apenas na justaposição das membranas materno-embrionárias, sem desenvolvimento de processos invasivos como observado em primatas e humanos (BAZER et al., 2010).

Em condições *in vivo* ideais o desenvolvimento embrionário inicial ocorre durante a migração do embrião pelo oviduto, sob tensão de oxigênio próxima de 5 a 7% (FISCHER; BAVISTER, 1993; HARVEY, 2007). Na PIVE o ambiente fisiológico do oviduto é substituído pelo ambiente *in vitro*, com atmosfera (20 ou 5% de O₂), temperatura ($\approx 38^{\circ}\text{C}$) e meio de cultivo pré-definidos, que mimetizam as características do oviduto.

O embrião permanece no ambiente *in vitro* até o dia 7 do desenvolvimento, tempo suficiente para provocar alterações nos transcritos das células embrionárias (AMIN et al., 2014). Estas modificações ocorrem por meio de alterações de expressão de diversas integrinas e metaloproteases, e refletem em um comportamento celular anormal de migração e adesão (CARSON et al., 2000; SPENCER et al., 2007). Contudo, os mecanismos

associados a estas alterações, relacionadas ao ambiente de cultivo *in vitro* ainda não foram elucidados

2.2. Epigenética

A epigenética é o estudo dos processos que caracterizam o fenótipo e não depende estritamente da sequência de DNA, ou seja, alteram o fenótipo sem alterar o genótipo. Os eventos epigenéticos estão vinculados com alterações de DNA ou de proteínas histonas. As proteínas histonas estruturam-se em agregados de oito unidades, sendo subdivididas em H2A, H2B, H3 e H4 (KORNBERG, 1974). Cada octâmero de histonas acomoda quase duas voltas de DNA (1,7 volta) (BRADDOCK; BALDWIN; BRADBURY, 1981). O agregamento do DNA e o agrupamento dos octâmeros de histonas, permite que o DNA esteja mais ou menos exposto à maquinaria de transcrição, desta forma alterando os perfis de expressão gênica. As modificações epigenéticas são dinâmicas e sensíveis às alterações ambientais (KORNBERG; LORCH, 1999). Além disso, estudos recentes sugerem que as sequências de DNA também participam da determinação da estabilidade do nucleossomo desta forma alterando a sua conformação (HENIKOFF, 2008).

Diferentes modificações epigenéticas são responsáveis por definir quais genes serão transcritos e quais serão silenciados, de modo que a transcrição e tradução de um conjunto específico de genes definam a função da célula. O núcleo do zigoto mamífero é formado pelos pró-núcleos materno e paterno, que serão sujeitos à reprogramação do padrão epigenético pré-definido nos gametas durante o desenvolvimento embrionário dos progenitores. A onda de reprogramação é responsável por reprogramar genes que não possuem marcas parentais. Os genes *imprinted*, por exemplo, não participam do processo de reprogramação (MANN; BARTOLOMEI, 2002; OKADA; YAMAGUCHI, 2017). As alterações do processo de reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda não estão completamente compreendidas.

A metilação do DNA é uma alteração epigenética importante para o estabelecimento e manutenção dos padrões de expressão gênica tecido específico e na manutenção da atividade da cromatina. A metilação do DNA é caracterizada pela adição de um radical metil na posição 5 do anel pirimídico que forma a molécula de citosina, transformando-a em uma 5-metilcitosina (BIRD, 2002). Em geral, a metilação tende a ocorrer no contexto de

dinucleotídeos CpG, em regiões com baixas taxas de mutação e promotoras de genes, denominadas Ilhas CpGs (DEATON; BIRD, 2011). A hipermetilação das ilhas CpGs leva ao aumento da compactação no DNA em torno do octâmero de proteínas histonas, dificultando o acesso da maquinaria de transcrição. Além disso, a metilação pontual do DNA recruta complexos proteicos de ligação, metil-CpG, que auxiliam no agrupamento e compactação dos nucleossomos. O processo de metilação, portanto, está associado à inativação transcricional (HENIKOFF, 2008; MIORANZA, 2014).

Em mamíferos, os padrões e os caminhos para o estabelecimento da metilação do DNA são amplos. Em geral, a manutenção da metilação, após a divisão celular, é realizada pela enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1), que recompõe a metilação das citocinas de acordo com o padrão que permanece nas cópias hemimetiladas, conservando as informações epigenéticas entre as gerações celulares (HIRASAWA et al., 2008). Entretanto, as modificações de metilação são dinâmicas, e novos padrões podem ser estabelecidos pela enzima DNA metiltransferase 3 (DNMT3A e DNMT3B). Estas modificações são fundamentais para a reprogramação do genoma após a fecundação, garantindo o adequado desenvolvimento do embrião (OKANO et al., 1999; UYSAL; AKKOYUNLU; OZTURK, 2015). Todas as isoformas das DNMTs podem ser detectadas no desenvolvimento inicial do embrião, contudo a DNMT3A é a isoforma predominantemente expressa (WATANABE et al., 2002). A reprogramação é marcada por eventos epigenéticos, envolvendo uma onda de desmetilação dos genomas de origem materna e paterna, seguida por uma onda de metilação “de novo” do genoma do embrião, que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial (MAYER et al., 2000; MANN; BARTOLOMEI, 2002). Esse processo permite a modificação dos padrões de metilação herdados dos pais (exceto para os genes *imprinted*) e determina o padrão de metilação próprio do embrião, contribuindo para a ativação do genoma embrionário (REIK; DEAN; WALTER, 2001; MIORANZA, 2014) (Figura 1).

A desmetilação dos genomas de origem materna e paterna não ocorre de maneira simétrica. O genoma materno sofre uma desmetilação passiva, na qual o padrão de metilação é gradativamente perdido de acordo com o aumento das clivagens embrionária (SANTOS et al., 2002). A desmetilação passiva ocorre devido aos baixos níveis de DNMT1 durante as mitoses, até o estágio de 4 células do embrião (REIK; DEAN; WALTER, 2001). O genoma paterno, por sua vez, passa por uma desmetilação ativa, que é mais rápida em relação à passiva. A família de enzimas TET (TET1, TET2 e TET3) promovem a desmetilação

ativa no zigoto, através da oxidação das 5-metilcitosinas (5mC) em 5-hidroximetilcitosinas (5hmC) seguida por um mecanismo de reparo e excisão de bases do DNA (GEHRING; REIK; HENIKOFF, 2009; IQBAL et al., 2011). A substituição contínua de 5mC por 5hmC e a excisão do radical metil da citosina geram um processo ativo de desmetilação do genoma paterno. Contudo, as enzimas TETs não atingem o genoma materno, cujas metilações estão protegidas pelo fator maternal Stella. Entre as enzimas TET, a TET3 é especificamente expressa no zigoto, enquanto as TET1 e TET2 são, respectivamente, ausentes e pouco expressas no zigoto. A TET3 é, portanto, a principal responsável pela desmetilação do pró-núcleo paterno (GU et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011).

Figura 1. Esquema ilustrativo da reprogramação embrionária que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial. A reprogramação embrionária envolve, principalmente, dois eventos: reprogramação epigenética, através das ondas de desmetilação e metilação "de novo"; e a transição materno-embriônica, com a depleção gradual dos transcritos e proteínas maternos, concomitante com a crescente produção de transcritos do embrião (ativação do genoma embrionário). A ativação completa do genoma do embrião, em bovinos, ocorre entre os estágios de 8 e 16 células, próximo ao dia 4 do desenvolvimento embrionário.

Durante o estado desmetilado, as células embrionárias estabelecem um estado de pluripotência. O estresse oxidativo no ambiente de cultivo *in vitro* favorece o recrutamento das enzimas DNA metiltransferase 1 (DNMT1), aumentando o potencial de manutenção dos

padrões hipermetilados e dificultando a onda de desmetilação durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, os efeitos epigenéticos da elevada presença de EROs durante o desenvolvimento embrionário são pouco explorados na espécie bovina (IORIO et al., 2007; HE et al., 2012; MIORANZA, 2014). Portanto, parte deste estudo tem como objetivo determinar os efeitos do estresse oxidativo sobre o padrão de metilação global do DNA dos blastocistos e na expressão de transcritos ligados a funções de regulação epigenética.

2.3. Estresse oxidativo

Apesar do significativo avanço das técnicas de produção de embriões *in vitro*, sabe-se que o desenvolvimento embrionário de mamíferos é afetado negativamente pela composição do meio, pH e tensão de oxigênio, que compõem o ambiente artificial (MENEZO et al., 2016). Estas condições afetam o metabolismo das células embrionárias, levando a efeitos nos processos de síntese de DNA e proteínas, transporte de aminoácidos e estresse oxidativo (AMIN et al., 2014).

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no estado de equilíbrio no sistema pró-oxidante e antioxidante das células, representados pela produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, conhecidas também como radicais livres, são produtos do metabolismo aeróbico celular, na qual uma molécula de O_2 é reduzida em duas moléculas de água, através da incorporação de 4 elétrons. Contudo, quando essa redução ocorre de forma incompleta, ou seja, agregando menos de 4 elétrons, há a formação das EROs: superperóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de hidroxila ($OH^\cdot$) (MENEZO et al., 2016). Estes metabólitos, parcialmente reduzidos, são instáveis e altamente reativos, características que condicionam um comportamento de interação com moléculas de lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, visando adquirir elétrons e reestabelecer a estabilidade das moléculas. Como consequência, as moléculas que concedem os elétrons sofrem oxidação, gerando danos celulares, como peroxidação lipídica, alterações na membrana e no DNA mitocondrial, danos no retículo endoplasmático, desnaturação proteica e alterações no fuso meiótico, que favorecem a produção de mais EROs (CROCOMO et al., 2012; AMIN et al., 2014). Apesar do excesso de EROs ser nocivo às células, estas moléculas são necessárias como sinalizadoras em reações do ciclo celular. Portanto, a redução

excessiva de EROs pode levar à parada do desenvolvimento embrionário devido ao comprometimento de funções biológicas (HARVEY, 2007; ROCHA-FRIGONI, 2016).

Os níveis de EROs produzidos durante os estágios do desenvolvimento embrionário são inconstantes. Nasr-Esfahani e Johnson Nar e colaboradores (1991) relataram um aumento na produção de EROs (excesso de H_2O_2) logo após a ativação dos oócitos de camundongo, e o relacionaram com o bloqueio do desenvolvimento no estágio de 2 células. Posteriormente, Morales et al. (1999) demonstraram que os zigotos bovinos são mais sensíveis aos efeitos deletérios de fragmentação de DNA e indução da lise celular causado pelo excesso de H_2O_2 em comparação com embriões com maior número de blastômeros (9-16 células). Os estágios iniciais de zigoto e duas células podem ser considerados, portanto, pontos críticos no desenvolvimento do embrião, sendo mais suscetíveis à perda embrionária ligada ao estresse oxidativo.

O principal mecanismo relacionado com a produção de EROs, principalmente H_2O_2 e O_2^- no embrião, é o de oxidase da xantina, no qual a purina, oriunda do processamento de glicose pela via pentose fosfato, é transformada em hipoxantina, tóxica para embrião, que é degradada em xantina e EROs (NASR-ESFAHANI; JOHNSON, 1991). Após a ativação do genoma embrionário há a ativação da transferase hipoxantina fosforibosil (HPRT), responsável pelo resgate da purina, o que auxilia na limitação da produção das EROs (DOWNS; DOW, 1991; GUERIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001). Além disso, o equilíbrio oxidativo pode ser influenciado pelas condições ambientais, como aumento da concentração de glicose ou oxigênio, que elevam a atividade metabólica e resultam em aumento das EROs (GUERIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Os antioxidantes endógenos atuam neutralizando as EROs, a fim de manter uma atividade equilibrada destes metabólitos. Estudos realizados por Amin et al. (2014) demonstraram que os genes ligados à função antioxidante não possuem expressão significativa até o estágio de 4 células do desenvolvimento embrionário, tanto no desenvolvimento em alta quanto em baixa tensão de O_2 , de maneira que a resposta do embrião ao estresse oxidativo ocorre de modo significativo apenas após a ativação do genoma embrionário. Durante o desenvolvimento anterior à ativação do genoma embrionário, parte dos antioxidantes que combatem o estresse oxidativo pertencem ao estoque materno de transcritos e proteínas produzidos durante a oogênese (CROCOMO et al., 2012; AMIN et al., 2014).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiol que compõe o estoque materno de antioxidantes não enzimáticos do embrião. O GSH remove o excesso de EROs através da redução dos peróxidos e hidroperóxidos em produtos inativos, e detoxificação de proteínas tioladas. Além de combater o estresse oxidativo, o GSH possui funções nos processos de síntese de DNA e proteína, transporte de aminoácidos e descondensação do pronúcleo paterno após a fertilização (DE MATOS et al., 1996; GASPARRINI et al., 2006; AMIN et al., 2014). Portanto, o GSH produzido durante a maturação fornece um forte indício da competência do oócito para viabilizar o posterior desenvolvimento embrionário (ROCHA-FRIGONI et al., 2014).

A síntese de GSH ocorre por meio do ciclo γ -glutamil-cisteína que é dependente da quantidade de cisteína disponível. A cisteína é um composto de tiol de baixo peso molecular que, no citoplasma do oócito, atua como precursor para a síntese de GSH. Como o estímulo da síntese de GSH auxilia na manutenção do estado de redução-oxidação, estas moléculas são usadas rotineiramente como suplemento do meio de maturação de oócitos e de cultivo embrionário. A molécula da cisteína, entretanto, é instável em ambiente extracelular, sofrendo rápida oxidação em cistina e, conseqüentemente, atuando apenas nas primeiras horas da maturação. Todavia, quando associada a outra molécula de tiol, como a cisteamina, a cistina é reduzida novamente em cisteína, retomando a produção de GSH (DE MATOS et al., 1995). Além disso, a cisteamina também atua como agente redutor do radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e como quelante de alguns íons metálicos, auxiliando na redução dos danos do estresse oxidativo (GUERIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001; GASPARRINI et al., 2003). As células do *cumulus* bovinas também são capazes de converter a cistina em cisteína pelo mecanismo de permuta aniônica e a cisteína convertida é entregue ao oócito para a produção de GSH através das junções comunicantes (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1997) (Figura 2).

Figura 2. Esquema ilustrativo do metabolismo de cisteína no complexo *cumulus* oócito, durante a suplementação do meio de maturação do oócito com cisteína e cisteamina. COC = Complexo *cumulus* oócito; GSH = Glutathiona.

A produção de EROs é aumentada em condições de cultivo *in vitro* devido a fatores ambientais como a alta tensão de oxigênio (O_2), cátions metálicos na água ou em reagentes utilizados, exposição à luz, presença de espermatozoides e danos celulares prévios de manipulação (CROCOMO et al., 2012). Além disso, a ausência do sistema de defesa antioxidante do útero leva à potencialização dos danos causados pelas EROs, consequentemente reduzindo a viabilidade embrionária e aumentando as perdas decorrentes do estresse oxidativo (GASPARRINI et al., 2006). Na condição de alta tensão de oxigênio há um agravamento do estresse oxidativo devido a uma elevada concentração de EROs gerada pelo metabolismo celular e pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. Nesse contexto, a suplementação do meio de maturação *in vitro* com cisteamina e cisteína fornece subsídios para a síntese de uma quantidade adequada de GSH, o que auxilia na redução das lesões celulares pelos EROs e contribuem para um desenvolvimento embrionário saudável (GASPARRINI et al., 2003; ROCHA-FRIGONI, 2016). Parte do objetivo deste estudo é determinar se a alta tensão de oxigênio é capaz de gerar alteração nos níveis de EROs e se essas alterações, assim como as alterações na expressão de miRNAs e RNAm, podem ser revertidas com a suplementação com antioxidantes dos meios de cultivo da maturação e de parte do desenvolvimento embrionário.

2.4. Microvesículas e exossomos

O diálogo bidirecional materno-embriônico sincronizado determina o sucesso dos eventos reprodutivos e progressão da gestação (SPENCER et al., 2007). Entre os mecanismos que promovem essa comunicação, as microvesículas e os exossomos têm sido propostos como importantes mediadores de informações entre o embrião e o oviduto e entre o embrião e o útero, em condições fisiológicas, e entre embriões durante a produção *in vitro* (NG et al., 2013; SAADELDIN et al., 2014).

Microvesículas (MVs) e exossomos são nanopartículas compostas por uma bicamada fosfolipídica, com capacidade de transporte de moléculas bioativas entre as células próximas ou distantes através do ambiente extracelular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As principais diferenças entre as MVs e os exossomos são com relação ao tamanho, sendo as MVs (100 - 1000 nm) maiores que os exossomos (40 - 100 nm), e mecanismo de produção (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Em geral, os exossomos se formam no interior do lúmen das vesículas dando origem a corpos multivesiculares (MVBs), enquanto as MVs são produzidas a partir da própria membrana plasmática da célula (BARKALINA et al., 2015).

Os exossomos podem conter em seu interior RNAs mensageiros, proteínas, microRNAs, fatores de crescimento e citocinas, que são encaminhados às células-alvo específicas, correspondentes aos receptores célula-específicos na superfície dos exossomos (VALADI et al., 2007; MITTELBRUNN et al., 2011). As proteínas e os microRNAs associados aos exossomos estão prevalentemente relacionadas com funções durante a fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e implantação (WYDOOGHE et al., 2015). Enquanto, o conteúdo das MVs é composto por proteínas, RNAm e microRNAs, que têm sido associados a funções de manutenção e proliferação celular, apoptose, reparação tecidual, angiogênese e resposta imune (AL-DOSSARY; MARTIN-DELEON, 2015; MACHTINGER; LAURENT; BACCARELLI, 2015).

Estudos de Al-Dossary, Strehler e Martin-Deleon (2013) descreveram, pela primeira vez, a secreção de exossomos pelo oviduto de camundongos. Posteriormente, Almiñana (2015) caracterizou os exossomos liberados pelo oviduto bovino, indicando a presença da glicoproteína oviduto-específica (OVGP) e proteína A8 *heat shock* (HSPA8), fundamentais na promoção de um ambiente adequado para o suporte da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, Almiñana (2015) sugere que o embrião é capaz de atuar

como mediador do seu próprio ambiente através dos exossomos. Contudo, a abrangência dessa comunicação ainda é pouco compreendida.

A presença de vesículas no endométrio foi descrita primeiro em camundongos por Griffiths et al. (2008), que determinou a presença de proteínas SPAM1 (molécula de adesão ao espermatozoide 1) em seu conteúdo. As proteínas SPAM1 são adquiridas pelo espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea durante a capacitação *in vivo*, colaborando para a fertilização. O estudo recente de Greening et al. (2016) relacionou o conteúdo proteico das vesículas do ambiente uterino com mudanças fundamentais para a implantação: migração celular, remodelamento da matriz extracelular e aprimoramento da capacidade adesiva do trofoblasto (principalmente através da via de sinalização adesão focal quinase - FAK).

Os exossomos têm sido relacionados com alterações no epitélio endometrial humano mediadas por mecanismos de regulação pós-transcricionais, microRNAs, que atuam, através da comunicação materno-embrionária, favorecendo o potencial de implantação uterino (APLIN, 2006; NG et al., 2013). No estudo de Ng et al. (2013), por exemplo, os autores correlacionaram os miRNAs dos exossomos isolados do fluido uterino com as funções biológicas de interação entre fibronectinas e integrinas, que regulam as junções adesivas nos sítios de implantação, e ativação de múltiplas citocinas conhecidas por atuarem na implantação.

A comunicação mediada por microvesículas e exossomos entre as células no microambiente da produção *in vitro* foi relatada primeiramente por SAADELDIN et al. (2014), em embriões partenogênicos de suínos com co-cultivo e desenvolvidos em baixa tensão de oxigênio. A análise do conteúdo dos exossomos revelou a presença de transcritos relacionados com pluripotência, como *OCT4* (Transportador de carnitina orgânico 4), *SOX2* (SRY região determinante do sexo Y caixa 2), *C-MYC* (Mielocitomatose homólogo do oncogene viral v-myc) e *NANOG*, que beneficiam a capacidade de desenvolvimento do embrião (SAADELDIN et al., 2014; WYDOOGHE et al., 2015). Estes dados permitem sugerir que as células no microambiente de cultivo *in vitro* de embriões utilizam as vesículas como mecanismo para promover a qualidade do seu próprio ambiente, favorecendo seu desenvolvimento.

A secreção dos exossomos pode ser influenciada pelos hormônios estradiol e progesterona (GREENING et al., 2016) ou pelo estresse oxidativo (KING; MICHAEL; GLEADLE,

2012; SALOMON et al., 2013). Contudo, não existe relatos de como o estresse oxidativo do ambiente de cultivo de embriões produzidos *in vitro* pode mediar o padrão de secreção dos exossomos. Portanto, parte deste estudo tem o objetivo de compreender como o estresse oxidativo altera os exossomos secretados no meio de cultivo durante a produção *in vitro*.

2.5. microRNA

O desenvolvimento embrionário está relacionado com diversos mecanismos de proliferação e diferenciação celular, que por sua vez são regulados por mecanismos epigenéticos, fatores de transcrição e por pequenos RNAs não codificadores (miRNAs). Os miRNAs vêm demonstrando grande importância na regulação de processos biológicos, sendo que, aproximadamente, 50% de todos os genes codificadores de proteínas conhecidos nos mamíferos sofrem regulação através de miRNAs (MCBRIDE et al., 2012).

Os miRNAs constituem uma das famílias dos pequenos RNAs, com comprimento aproximado entre 18 a 25 nucleotídeos. Comumente são relacionados à regulação gênica pós-transcricional, atuando por meio da degradação ou pela repressão da tradução dos RNAs em mamíferos (BARTEL, 2004). Em geral, a biogênese dos miRNAs é iniciada pela transcrição de genes independentes, regiões intergênicas ou de íntrons em pri-miRNA, principalmente, via RNA polimerase II. Ainda dentro do núcleo eles são processados pela endonuclease RNAase III (Drosha) em miRNAs precursores (pré-miRNA), assumindo a forma *stem-loop*. Após o processamento são transportados para o citoplasma, via mecanismo dependente de Exportina-5, onde uma segunda endonuclease RNAase III (Dicer) cliva o pré-miRNA em miRNA maduro dupla fita (miRNA:miRNA), desta forma mais de um pré-miRNA pode dar origem a um mesmo miRNA maduro. Em geral, uma das fitas é transformada em miRNA maduro e a outra degradada, contudo, existem casos nos quais as duas fitas são transformadas em miRNA maduro (BARTEL, 2004, 2009; HA; KIM, 2014).

Os miRNAs maduros, por sua vez, são transportados pelo citoplasma por proteínas argonautas (complexo RISC), até regiões alvo específicas do mRNA, a fim de realizar as atividades de regulação (AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007). A regulação pós-transcricional ocorre após a interação, por complementariedade, do miRNA com a região 3' UTR do mRNA-alvo. Quando ocorre um pareamento perfeito das regiões ocorre a degradação do mRNA, entretanto, quando o pareamento é imperfeito ocorre a repressão da

tradução do mRNA, o que reduz os níveis proteicos dos genes-alvo (GUO et al., 2010; IWAKAWA; TOMARI, 2013). O pareamento imperfeito aumenta a possibilidade de regulação do miRNA, ou seja, um miRNA pode exercer atividade regulatória em mais de um miRNA-alvo, constituindo uma importante rede de regulação celular (RICARTE-FILHO; KIMURA, 2006)

Os miRNAs podem sofrer regulação através de processos epigenéticos ligados principalmente à metilação de ilhas CpG controladoras dos miRNAs. Durante o estresse oxidativo as EROs promovem o recrutamento da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1), favorecendo a metilação e, conseqüentemente, dificultando a onda de desmetilação durante o desenvolvimento embrionário (IORIO et al., 2007; HE et al., 2012; MIORANZA, 2014). Estudo realizado por Lee et al. (2012) demonstrou que a inibição da metilação em embriões leva a alterações de expressão de miRNAs, diminuindo a expressão de 48 miRNAs e aumentando a expressão de 17 miRNAs na fase de blastocisto. O miR-199a foi encontrado alterado entre os embriões de PIVE e *in vivo* apresentando, principalmente, alteração nos padrões de metilação dos precursores (MIORANZA, 2014). No contexto das condições de cultivo *in vitro*, He e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão do miR-199a é alterada pelo estresse oxidativo do ambiente artificial, através da metilação do DNA.

O miR-199a é transcrito das regiões intragênicas dos genes DNM3 (*Dynamin 3*) e DNM2 (*Dynamin 2*) (cromossomos 16 e 7), que transcrevem, respectivamente, miR199a-1 e miR199a-2. Estudo de Watanabe et al. (2008) sugeriu que a expressão dos miR199a-1 é dependente da expressão do gene DNM3, de modo que a inibição da transcrição do gene DNM3 leva à não transcrição do miR199a-1. Após as clivagens pelas enzimas Drosha e Dicer, ambas as fitas, que correspondem ao miRNA maduro, são mantidas, sendo denominadas de miR-199a-5p e miR-199a-3p. As duas formas maduras realizam a regulação dos genes alvo *ERBB2* e *ERBB3* (receptores do fator de crescimento epidérmico -2 e -3), contudo, o miR-199a-5p tem maior afinidade nessa regulação (HE et al., 2012).

2.6. Via de sinalização ERBB

Os receptores de tirosina quinase ERBB são glicoproteínas da família de receptores de fatores epidermais de crescimento, constituída por quatro membros: ERBB1, ERBB2, ERBB3 e ERBB4. Estes receptores mediam as atividades de proliferação e diferenciação

celular em tecidos embrionários e adultos. Diversos estudos têm relacionado a perda de qualquer um dos membros ERBB com morte embrionária durante o desenvolvimento e com anomalias em órgãos neonatais e adultos, tais como cérebro, coração, pele, pulmão e trato gastrointestinal (CHO; LEAHY, 2002; NEGRO; BRAR, 2004; ISHIKAWA et al., 2011); enquanto que a superexpressão dos receptores ERBB tem sido associada ao crescimento desordenado e formação de tumores malignos (ONO; KUWANO, 2006). Os receptores do fator de crescimento epidérmico -2 e -3 (ERBB2 e ERBB3), também denominado de HER-2 e HER-3 em humanos e murinos, têm sido descritos como fatores críticos no crescimento e sobrevivência embrionária, apresentando um importante papel na transdução do sinal em vias que regulam diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e angiogênese (WATANABE et al., 2008).

Os receptores da família ERBB possuem estrutura proteica semelhante, com três domínios principais: um domínio externo, constituído por duas regiões ricas em cisteína responsáveis pelas interações com ligantes; um domínio transmembrana; e um domínio interno chamado de citoplasmático, constituído por um domínio quinase flanqueado a uma cauda carboxi-terminal (C-terminal), que fosforilam mediante atividade de regulação e catálise dos resíduos de tirosina (ONO; KUWANO, 2006; STEFFENSEN et al., 2008).

Em geral, nos receptores ERBB, a ativação ocorre após a interação do domínio extracelular com ligantes como o fator de crescimento epidermal (EGF), neuregulinas (NRGs) e herregulinas (HRGs), pelo mecanismo de oligomerização. As NRGs são proteínas sinalizadoras de membrana da família EGF, representados por quatro isoformas: NRG-1, NRG-2, NRG-3 e NRG-4, e convencionalmente descritas como ligantes de predileção do heterodímero ERBB2/ERBB3 (BAECKSTROM; ALFORD; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, 2000; NAGY et al., 2002). As isoformas das neuregulinas, assim como os ligantes que possuem alta afinidade com os receptores ERBB, possuem um domínio EGF-*like* que se liga nos dímeros de ERBB da membrana celular e desencadeia a ativação do domínio intracelular através da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase, que passam a servir como sítios de ancoragem para proteínas citoplasmáticas distintas envolvidas na cascata de sinalização dos fatores de crescimento epidermal (ONO; KUWANO, 2006).

A especificidade e a potência dos sinais transmitidos pelos receptores ERBB dependem da composição de homo e heterodímeros da membrana celular. Os homodímeros de ERBB3 são incapazes de gerar atividade intrínseca de quinase e, apesar de

ambos os receptores, heterodímero ERBB2/ERBB3 e homodímero ERBB2, apresentarem atividade de fosforilação dos resíduos de tirosina quinase, o homodímero ERBB2 não possui ligante específico e não gera sinal eficaz para os fatores de crescimento. O domínio citoplasmático do ERBB3 possui maior quantidade de sítios de ancoragem para as subunidades reguladoras do PI3K (Fosfatidilinositol 3-quinase), o que contribui para a resistência de transmissão dos sinais pelo heterodímero ERBB2/ERBB3 (PINKAS-KRAMARSKI et al., 1996; BAECKSTROM; ALFORD; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, 2000).

A associação das proteínas em homo ou heterodímeros depende do equilíbrio entre monômeros e dímeros de ERBB2, no qual o heterodímero ERBB2/ERBB3 compete com o homodímero ERBB2, ou seja, um aumento do número de proteínas ERBB3 pode provocar o desarmamento dos homodímeros ERBB2, levando a construção preferencial de heterodímeros ERBB2/ERBB3 (YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001). De acordo com Nagy et al. (2002) as áreas da membrana com alta homoassociação da proteína ERBB2 estão positivamente relacionadas com a densidade local de ERBB2 e inversamente relacionadas com a densidade local de ERBB3. O heterodímero ERBB2/ERBB3 tem sido relacionado ao crescimento tanto de tecidos normais como de tumores malignos (STEFFENSEN et al., 2008; WATANABE et al., 2008). A ativação do heterodímero ERBB2/ERBB3 promove o mecanismo inicial básico para a ativação da atividade de diversas vias relacionadas com a atividade mitótica, como a via de sinalização PI3K/AKT (Fosfatidilinositol 3-quinase/ Quinases serina/treonina). A via PI3K/AKT ativada promove a atividade dos fatores de transcrição no núcleo, promovendo a migração, diferenciação e ciclo celular (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001) (Figura 3).

Além de seus efeitos no crescimento, os receptores ERBB2 e ERBB3 têm sido implicados nos processos de interação materno-embrião e implantação embrionária em mamíferos. Durante o desenvolvimento embrionário, em condições fisiológicas, o tecido do endométrio expressa NRGs que desempenham um importante papel na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, aumento na síntese de proteínas e expressão gênica embrionária. Brown et al. (2004) demonstraram a presença de NRG-1, na isoforma NDF (fator de diferenciação NEU), no estroma subepitelial uterino na região em contato com embrião no momento da implantação e NRG-4 em todo epitélio glandular e luminal uterino. O NDF está presente na região endometrial próxima ao blastocisto no momento da fixação durante a janela de implantação, sugerindo uma contribuição deste ligante na interface

materno-embrionária. A função do NRG-4 no endométrio também é desconhecida, contudo sua expressão coincide com a diferenciação e proliferação do epitélio endometrial durante a janela de implantação, sugerindo uma participação ativa na comunicação bidirecional embrião-útero preparando o endométrio para a implantação embrionária (KLONISCH et al., 2001; BROWN et al., 2004). Os estudos de Brown et al. (2004) sugerem que o ligante NDF possui maior potencial de ligação com o heterodímero ERBB2/ERBB3, sendo uma via de sinalização ativa durante a janela de implantação. Enquanto, o heterodímero ERBB1/ERBB2 pode se ligar ao NRG-4, levando ao aumento da atividade celular.

As taxas de gestação derivadas de embriões produzidos *in vitro* são inferiores às aquelas obtidas com transferência de embriões produzidos *in vivo* (HASLER, 1998). Além disso, estudos realizados por Pontes (2009) e Bontekoe et al. (2012) demonstraram que embriões produzidos *in vitro*, com baixa tensão de oxigênio, resultam em melhores taxas de gestação em comparação com aqueles produzidos com alta tensão de oxigênio. Portanto, é possível formular a hipótese que o sistema de produção *in vitro* leva à alteração nos níveis de ERBB2 e ERBB3 em embriões bovinos, e que esse efeito é mediado através do miR-199a em resposta ao estresse oxidativo. Assim, parte do objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do estresse oxidativo sobre a expressão do miR-199a, isoformas miR-199a-3p e miR-199-5p, durante o desenvolvimento embrionário bovino e determinar se a alteração destes miRNAs regula a expressão dos genes alvo *ERBB2* e *ERBB3* e da proteína ERBB2.

Figura 3. Esquema da transmissão de sinal da via ERBB.

Hipóteses

3.1. Experimento I

A alta tensão de oxigênio é capaz de elevar os níveis de EROs, caracterizando uma condição de estresse oxidativo celular. Este estresse é responsável pela alteração da expressão do microRNA 199a e, conseqüentemente, dos genes alvo ERBB2 e ERBB3. Além disso, tais alterações podem ser revertidas pela suplementação de antioxidantes durante o cultivo *in vitro*.

3.2. Experimento II

O estresse oxidativo gerado pela alta tensão de oxigênio é capaz de alterar os níveis globais de metilação do DNA de blastocistos produzidos *in vitro*. Estas alterações são acompanhadas por mudanças nos padrões de expressão de miRNAs e de genes associados a resposta ao estresse oxidativo, proliferação e diferenciação celular, remodelação epigenética, apoptose, metabolismo e reconhecimento materno-fetal. A suplementação de antioxidantes no sistema de cultivo *in vitro* é capaz de prevenir as alterações dos miRNAs causadas pelo estresse oxidativo.

3.3. Experimento III

O estresse oxidativo induzido pela condição de alta tensão de oxigênio durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* é capaz de alterar o padrão de secreção de exossomo e o seu conteúdo de miRNAs durante o cultivo *in vitro*.

4. Objetivos e Delineamento Experimental

4.1. Experimento I

Objetivo geral: Validar que o modelo de cultivo em condições de alta tensão de oxigênio induz alterações nos níveis de EROs, promovendo o estresse oxidativo. Determinar o efeito do estresse oxidativo sobre a expressão das isoformas do miR-199a, transcritos dos genes alvo *ERBB2* e *ERBB3*, e proteína ERBB2 em embriões bovinos produzidos por fertilização *in vitro*. Avaliar a eficácia da suplementação com antioxidantes para reverter as alterações de EROs, miRNAs e RNAm nos blastocistos produzidos *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Determinar se a alta tensão de oxigênio (20%) é capaz de aumentar os níveis de EROs gerando um estado de estresse oxidativo nos embriões bovinos produzidos *in vitro*, em comparação com embriões produzidos em baixa tensão de oxigênio (5%);
- Comparar a expressão das isoformas do miR-199a (miR-199a-3p e miR-199a-5p), de seus genes alvo (*ERBB2* e *ERBB3*) e proteína ERBB2 em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* em alta ou baixa tensão de oxigênio;
- Determinar se as alterações no miR-199a, transcritos dos genes alvo (*ERBB2* e *ERBB3*) e proteína ERBB2 geradas pelo estresse oxidativo podem ser revertidas pela suplementação com antioxidantes (cisteína e cisteamina) durante a maturação e parte do cultivo (D1 a D3) em blastocistos bovinos.

Delineamento experimental:

Figura 4. Delineamento do Experimento I. Os embriões foram cultivados em diferentes tensões de O_2 (alta 20% O_2 e baixa 5% O_2), posteriormente foram desenvolvidos dois grupos adicionais cultivado em alta tensão de oxigênio na presença e ausência de suplementado com antioxidantes. As coletas dos blastocistos foram realizadas no dia 7 do desenvolvimento. As análises foram realizadas com *pools* de embriões otimizados para cada técnica, com no mínimo três repetições biológicas.

4.2. Experimento II

Objetivo geral: Determinar o efeito do estresse oxidativo gerado pela alta tensão de oxigênio nos níveis globais de metilação dos blastocistos bovinos. Avaliar as alterações de expressão de 96 RNAm e de 378 microRNAs causada pelo estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos por fertilização *in vitro*. Investigar se as alterações observadas na expressão dos miRNAs podem ser revertidas pela suplementação do meio de cultivo com antioxidantes.

Objetivos específicos:

- Comparar os níveis de metilação global do DNA de blastocistos produzidos *in vitro* submetidos a condições de alta (20%) ou baixa (5%) tensão de oxigênio.
- Comparar a expressão dos RNAm de 96 genes em blastocistos produzidos *in vitro* com alta ou baixa tensão de oxigênio e determinar quais as principais funções biológicas afetadas pelo estresse oxidativo.

- Determinar a expressão de 378 miRNAs e comparar as vias enriquecidas pelos miRNAs diferentemente expressos em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com alta ou baixa tensão de oxigênio.
- Comparar o cultivo de embriões em condições de alta tensão de oxigênio com a alta tensão suplementada com antioxidantes no meio de cultivo durante a MIV e parte do cultivo (D1 a D3), para determinar se a suplementação com antioxidante é capaz de reverter as alterações dos miRNAs associadas ao estresse oxidativo.

Delineamento experimental:

Figura 5. Delineamento do experimento do Experimento II. Os embriões foram cultivados em diferentes tensões de O₂ (alta - 20% O₂; e baixa - 5% O₂), posteriormente foram desenvolvidos dois grupos adicionais cultivado em alta tensão de oxigênio na presença e ausência de suplementado com antioxidantes. As coletas dos blastocistos foram realizadas no dia 7 do desenvolvimento. As análises foram realizadas com *pools* de embriões otimizados para cada técnica, com no mínimo três repetições biológicas.

4.3. Experimento III

Objetivo geral: Determinar o efeito do estresse oxidativo sobre o padrão de secreção de exossomos e o perfil de microRNAs dos mesmos, presentes no meio de cultivo durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos nos dias 3 e 7 do desenvolvimento.

Objetivos específicos:

- Comparar o tamanho e a concentração de exossomos no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* com alta (20% O₂) ou baixa (5% O₂) tensão de oxigênio, nos dias 3 e 7 do desenvolvimento.
- Comparar a expressão dos miRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio.
- Determinar as principais vias enriquecidas pelos miRNAs diferentemente expressos nos exossomos do meio de cultivo de embriões bovinos em atmosferas de cultivo de alta e baixa tensão de oxigênio.
- Comparar a expressão dos miRNAs e as vias enriquecidas pelo conteúdo de miRNAs dos exossomos com a expressão dos miRNAs nos blastocistos produzidos em condições *in vitro* de alta e baixa tensão de oxigênio.

Delineamento experimental:

Figura 6. Delineamento do Experimento III. Os embriões produzidos em Alta O₂ e Baixo O₂ no Experimento I tiveram os meios de cultivo coletados no D3, durante o procedimento de *feeding*, e em D7. As amostras foram agrupadas em *pools* de 3 repetições para isolamento e análise dos exossomos e seu conteúdo de miRNAs. As análises estatísticas foram realizadas com 3 repetições para cada grupo.

5. Material e Métodos

5.1. Local dos experimentos e reagentes

O estudo foi realizado durante os anos de 2015-2017 no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do Departamento de Medicina Veterinária, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) *campus* Fernando Costa, Pirassununga, São Paulo. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FZEA), sob o protocolo número 5763200215.

As análises de expressão gênica utilizando o HD Biomark (Fluidigm) foram feitas no Laboratório de Fitomedicamentos Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Departamento de Farmácia, do Instituto de Biociência de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) *campus* Botucatu, São Paulo.

As análises de epifluorescência foram realizadas no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT) do Departamento de Medicina Veterinária, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) *campus* Fernando Costa, Pirassununga, São Paulo.

As análises de confocal foram realizadas no Laboratório Multiusuário Microscopia Confocal (LMMC), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) *campus* de Ribeirão Preto, São Paulo.

Os reagentes e meios para o cultivo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes para a detecção de EROs e PCR em tempo real foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) e da Fluidigm (South San Francisco, CA, EUA). Os reagentes para análise de microRNAs foram adquiridos da Qiagen (Venlo, Limburg, Holanda). Os reagentes para análises de Western Blotting foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Os anticorpos foram adquiridos da LifeSpan BioSciences, Inc. (Seattle, WA, EUA), Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) e Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA).

5.2. Produção *in vitro* de embriões

Os ovários foram obtidos a partir de vacas mestiças abatidas com finalidade comercial na região de Pirassununga, São Paulo. O transporte dos ovários do frigorífico até o laboratório foi realizado em garrafas térmicas, com solução salina. Uma vez no laboratório, os ovários foram lavados e acondicionados em solução salina aquecida a 37°C. Em seguida, os folículos ovarianos entre 3 e 6 mm de diâmetro foram aspirados, com auxílio de agulhas 18G acopladas a seringas de 10 mL. O líquido folicular aspirado foi depositado em tubos cônicos de 50 mL, que foram mantidos em repouso para sedimentação dos oócitos por 20 min. O sedimento foi visualizado em estereomicroscópio para seleção dos complexos *cumulus* oócitos (COCs), que posteriormente foram destinados à fertilização *in vitro*. Foram realizadas vinte e três coletas independentes distribuídas em um período de um ano.

Os COCs selecionados foram lavados em meio TCM199 suplementado com piruvato sódico (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) e 10% soro fetal bovino depletado de vesículas extracelulares por centrifugação. Os COCs de GI e GII foram distribuídos no meio de maturação (MIV), composto de meio base TCM199 contendo: 26 mM de bicarbonato de sódio, 22 µg/mL de piruvato sódico, 50 µg/mL de gentamicina, 10% de soro fetal bovino depletado de vesículas, 0,5 µg/µL de hormônio folículo estimulante (FSH) (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) e 5 U/mL de gonadotrofina coriônica humana (HCG, Vetecor® 5000 U.I. Intervet, São Paulo, SP, Brasil). *Pools* de 20 a 25 COCs foram transferidos para gotas de 100 µL do meio MIV, cobertas com óleo mineral estéril (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA). As placas foram identificadas e mantidas em incubadora a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 22 horas, finalizando o processo de maturação oocitária.

Os oócitos supostamente maturados (dia zero) foram lavados três vezes em meio de fertilização e transferidos para gotas do mesmo meio cobertas por óleo mineral estéril. O meio de fertilização foi composto de solução TL-stock acrescida de 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato sódico, 40 µL/mL PHE (2 mM D-penicilamina, 1 mM hipotaurina e 245 µM epinefrina), 5 U/mL de heparina e 6 mg/mL BSA. O sêmen para a PIVE foi descongelado (37°C/30s) e depositado em um gradiente de Percoll 45% e 90%. O conteúdo foi centrifugado a 4500 rpm por 7 min, o sedimento suspenso foi removido para a adição de 500 µL de meio de fecundação, seguindo uma nova centrifugação de 2500 rpm

por 5 min. A concentração do espermatozoide foi ajustada para a concentração 5 mil espermatozoides por oócito, e depositado nas gotas de fertilização, nas quais os oócitos aguardavam. Os gametas foram coíncubados em gotas de fertilização por 20 horas.

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram sutilmente desnudados mantendo uma monocamada de células do *cumulus* para constituir o pseudococultivo durante o desenvolvimento. Posteriormente, os supostos zigotos foram distribuídos de modo equivalente em placas contendo gotas de meio SOFaaci suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato sódico, 5 mg/mL de BSA, e 2,5% SFB depletado de microvesículas e exossomos. As placas foram incubadas em atmosfera controlada de 5% de CO₂ em ar (20% O₂) e em 5% de CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂. As coletas do meio de cultivo para isolamento dos exossomos foram realizadas no dia 3 do desenvolvimento, durante a realização do *feeding*, e no dia 7 do cultivo. Os embriões para análise foram coletados no dia 7 do cultivo, no estágio de blastocisto do desenvolvimento.

5.2.1. Tratamento com antioxidantes

Um grupo adicional foi tratado com antioxidantes. Os oócitos selecionados foram maturados com meio de maturação, descrito anteriormente, suplementado com 0,6 mM de cisteína (#C7352) associado a 100 µM de cisteamina (#C8397) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (grupo C+C) e incubados a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por 22 horas (ROCHA-FRIGONI, 2016). O tratamento foi retirado durante a fertilização *in vitro* e reestabelecido no dia 1 do desenvolvimento até o dia 3, conforme descrito por Rocha-Frigoni et al. (2014). No dia 3 os embriões foram transferidos para uma placa nova com meio SOFaaci sem antioxidantes. Todo o desenvolvimento deste grupo foi realizado a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Os embriões foram coletados no estágio de blastocisto, no dia 7.

5.2.2. Taxa de clivagem e de blastocistos

As taxas de desenvolvimento embrionário foram avaliadas quanto a clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto. A análise da taxa de clivagem foi observada visualmente, com o auxílio de um estereomicroscópio, no momento do *feeding* e à primeira

coleta de meio de cultivo no dia 3. A taxa de blastocisto também foi avaliada com o auxílio de um estereomicroscópio, concomitantemente à coleta do dia 7 do cultivo.

5.3. Experimento I

5.3.1. Análise do conteúdo intracelular de EROs para avaliação do estresse oxidativo

A fim de determinar a formação de EROs durante o estresse oxidativo no embrião cultivado *in vitro*, grupos de 10 blastocistos de quatro rotinas experimentais diferentes foram comparados. A análise foi realizada mediante a técnicas fluorimétricas em microscopia de epifluorescência utilizando a sonda Cell ROX Green (Molecular Probes). Os embriões foram corados com 1 mmol/L do Cell ROX Green, por 30 minutos, em uma temperatura de 37°C e, logo após, fixados em 4% paraformaldeído por 20 min. Os blastocistos foram lavados e colocados em lâminas para as análises de epifluorescência. As amostras foram analisadas na objetiva 40X e comprimento de onda de 488 nm. As imagens foram analisadas a partir da quantificação da intensidade de fluorescência dos blastocistos, em escala de cinza, utilizando o programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.3.2. Coleta e extração de RNA total das amostras

Os blastocistos foram agrupados em *pools* de 10 embriões em 5 µL de PBS, suplementado com 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP), e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras de embriões foram submetidas ao tratamento com 700 µL de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda) e 140 µL de clorofórmio para separação das fases aquosa (RNAs) e orgânica (proteínas) por uma fina camada de DNA. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e purificada utilizando o miRNeasy® micro kit (50) (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda). As amostras extraídas foram quantificadas via espectrofotometria, com NanoDrop 2000® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

5.3.3. Expressão do miR-199a

As análises da expressão das isoformas do miR-199a (miR-199a-3p e miR-199a-5p) foram realizadas utilizando amostras de *pool* de 10 blastocistos para 7 repetições biológicas. A transcrição reversa do RNA em cDNA foi realizada com kit miScriptII RT (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda) utilizando o tampão HiFlex do kit e contendo 100 ng do RNA total extraído. Os cDNAs tratados com tampão HiFlex permitiram a detecção tanto dos miRNAs maduros quanto dos precursores. As reações de PCR em tempo real foram preparadas para um volume total de 6 µL contendo 3 µL de SYBR Green PCR Master Mix (#1020722), 0,6 µL *primer reverso* Universal, 0,02 µL de cDNA, 1,38 µL de água e 1 µL de *primer forward* específico (Tabela S.1, Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda). A análise prosseguiu utilizando o sistema QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições dos ciclos de PCR foram: 95°C durante 15 min e 45 ciclos de 94°C durante 15s, 55°C durante 30s e 70°C durante 30s, seguido por uma análise da curva de dissociação para confirmar a amplificação de um ou dois produtos de cDNA uma vez que podem haver miRNAs precursores e maduros em uma mesma análise. A expressão dos miRNAs foi normalizada com a média geométrica do valor de Ct dos endógenos RNU43 snoRNA e Hm/MS/Ru U1 snRNA.

A análise das vias enriquecidas pelos miRNAs foi realizada utilizando a base de dados mirBase (<http://www.mirbase.org>), para analisar a homologia da sequência entre o miRNA bovino e o miRNA humano, e o software DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>) (Vlachos *et al.*, 2015), que utiliza os miRNAs humanos para a investigação das possíveis vias enriquecidas. A validação da interação do miRNA com a 3'UTR equivalente dos genes alvo foi investigada com o software TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) (Agarwal *et al.*, 2015), utilizando a base de dados humana e bovina, e com eleição das interações com alto grau de conservação entre as espécies.

5.3.4. Análise dos RNAm de *ERBB2* e *ERBB3*

Para o RT-PCR dos RNAm dos genes alvo, *ERBB2* e *ERBB3*, a transcrição reversa foi realizada com High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Forster, City, CA, EUA) utilizando 100 ng do RNA total extraído dos blastocistos e purificado pelo

miRNeasy® mini kit (50). As análises de RNAm *ERBB2* e *ERBB3* foram realizadas com 8 repetições biológicas, cada reação de 10 µL do RT-PCR foi preparada com 5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (#4367659, Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA), 1,5 µL de solução de *primers forward* e *reverse*, na concentração de 0,5 µM, 1 µL de cDNA (10 ng de cDNA) e 2,5 µL de água. O PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA), em microtubos para PCR MicroAmp® Fast Reaction Tubes (Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA). As condições dos ciclos de PCR foram: 95°C durante 15 min e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min, seguido por uma análise da curva de dissociação para confirmar a amplificação única de produtos de cDNA. A expressão dos RNAm foi normalizada com a média geométrica do valor de Ct dos endógenos *PPIA* e *RPL15*.

5.3.4.1. *Primers* para RNAm dos genes alvo *ERBB2* e *ERBB3*

Os pares de *primers* para os RNAm dos genes alvo *ERBB2* e *ERBB3* foram desenhados com base nas sequências disponíveis no banco de dados do genoma bovino publicado no Ensembl.org® (www.ensembl.org). Priorizou-se que cada sequência de *primer* compreendesse simultaneamente as regiões de dois exons da sequência alvo e se localizasse próximo à extremidade 3' do mRNA, de modo a aumentar a fidelidade para amplificação apenas das moléculas de RNAm. Uma vez definidas as possíveis regiões de interesse, os *primers* foram desenhados com auxílio do software *Primer 3 Plus*® (www.bioinformatics.nl).

Para definir qual o melhor par de *primers* foram realizadas análises através dos softwares: Prime BLAST® (blast.ncbi.nlm.nih.gov), que permite a identificação de hibridizações com regiões inespecíficas do genoma bovino; AutoDimer® (yellow.nist.gov), que viabiliza a análise de potencial para geração de dímeros e *hairpins*; e UCSC Genome Bioinformatics® (<http://genome.ucsc.edu/>), que possibilita testes de PCR *in silico*.

Os *primers* desenhados para o *ERBB2* bovino foram *forward*: 5' CAGCCGGAATATGTGAACCA 3' e *reverse*: 5' TTTCCAGAGTGGAACCAGCA 3', e para *ERBB3* *forward*: 5' GCCACAGCCTGCTTACTCCT 3' e *reverse*: 5' CCGGAGGAGGTACCTTTG 3'. Os pares de *primers* produziram *amplicons* curtos de 100 e 110 bases nitrogenadas, respectivamente, para *ERBB2* e *ERBB3*. Os *primers* endógenos escolhidos foram os genes *PPIA* e *RPL15* (MACABELLI et al., 2014).

5.3.4.2. Curva de eficiência dos *primers*

Os *primers* foram testados no RT-PCR para uma diluição seriada de amostra, de modo a gerar uma curva, que permitiu o cálculo da eficiência do *primer*, através da fórmula: $E = \left(10^{\frac{-1}{-y}} - 1\right) \times 100$. A curva de diluição teve 5 pontos com concentrações seriadas de amostra (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng de RNA). As eficiências entre 90 e 110% foram associadas a *primers* adequados.

Para a reação de RT-PCR padronizada, os *primers* apresentaram eficiências satisfatórias de 94,79% (ERBB2), 99,54% (ERBB3), 105,25% (PPIA) e 101,11% (RPL15; Figura 7).

Figura 7. Os gráficos de pontos representam as curvas de eficiência dos *primers* para os genes candidatos ERBB2 (azul) e ERBB3 (verde), e genes endógenos PPIA (cinza) e RPL15 (verde). A equação da reta e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R²) são apresentados para os respectivos genes. Nos gráficos, o eixo X representa o log das diluições utilizadas e o eixo y representa os valores de Ct encontrados nas reações de Real Time RT-PCR.

5.3.4.3. Sequenciamento dos *amplicons*

Os *amplicons* gerados após a reação de RT-PCR foram encaminhados para sequenciamento dos pares de base após purificação do produto de RT-PCR com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda). As sequências resultantes do sequenciamento foram analisadas através do software Prime BLAST®

(blast.ncbi.nlm.nih.gov), que identificou se os segmentos sequenciados correspondiam à regiões específicas do genoma bovino nos quais os *primers* foram desenhados (Figura 8).

Figura 8. Resultado do sequenciamento para os transcritos ERBB2 e ERBB3. As seqüências foram analisadas através do software Prime BLAST e apresentaram 100% de homologia com os transcritos de interesse.

Os resultados do sequenciamento demonstram que os *primers* amplificam os segmentos corretos dos transcritos de interesse.

5.3.5. Níveis proteicos do ERBB2

A proteína ERBB2 foi analisada de forma quantitativa, pelo método de Western Blotting para 6 repetições biológicas. *Pools* de 25 embriões, submetidos à extração com tampão de lise RIPA (colocados na amostra na proporção de 1:3 e constituído por 50 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton x-100, 0,5% de desoxicolato de sódio e 0,1% de dodecil sulfato de sódio - SDS) e incubados *overnight* a -80°C. As amostras foram submetidas ao tratamento (1:3) com solução 1:10 de 4X Laemmli *Sample* Tampão (#1610747) e β-Mercapto (M7154) e aquecidos a 98°C por 5 min, para desnaturação das formas complexas das proteínas.

As proteínas foram aplicadas no Mini-PROTEAN® TGX Gels (#456-1033) ainda aquecidas e, posteriormente, submetidas a uma diferença de potencial elétrico em tampão de corrida 10x Tris/Tricine/SDS Running Buffer (#1610744). Logo em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), através de um sistema Trans-Blot®Turbo™ Transfer Pack (#170-4156) e transferência semi-seca com equipamento Trans-Blot®Turbo™Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

As membranas foram bloqueadas em solução de tampão TBST (10 mM Tris-HCL (pH 7,5) 150 mM NaCl e 0,05% Tween-20) com 5% de BSA, por 1h. Posteriormente, foram marcadas com anticorpo primário ERBB2 (1:1.000, LS-A9398, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, EUA), a 4°C *overnight*. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens sequenciais com tampão TBST e incubadas com anticorpos secundários, anti-coelho (1:1.000, #A0545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1h em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi lavado com TBST, e as bandas específicas foram reveladas por quimioluminescência utilizando kit Amersahm™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, HP7, GB), de acordo com as normas do fabricante. As membranas foram reveladas com auxílio do transmissor Molecular Imager® GelDoc™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O controle positivo para o anticorpo primário ERBB2 foi um pool de amostras de carcinomas de mama caninos. O anticorpo endógeno escolhido foi a beta-actina (1:50.000, #A3854, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

5.3.6. Imunocitoquímica ERBB2 e ERBB3 em blastocistos bovinos

No dia 7 do desenvolvimento, durante a coleta das amostras, *pools* de 3-7 blastocistos foram fixados em 4% de paraformaldeído por 20 min, e estocados em PBS livre de Mg e Ca a 4°C. A análise de imunocitoquímica foi realizada com *pools* de 3 blastocistos de 3 rotinas diferentes, por grupo, para localização das proteínas ERBB2 e ERBB3 nos blastocistos bovinos.

Os embriões foram permeabilizados com solução de PBS acrescido de 0,5% de saponina por 10 min, seguidos por lavagem em PBS e bloqueio com solução de PBS, 1% de BSA, 0,3 M de glicina e 0,1% de Tween 20 por 30 min. Os blastocistos foram incubados, de acordo com cada grupo, com os anticorpos primários ERBB2 (1:100, LS-A9398) e ERBB3 (1:100, LS-C4251) diluídos em PBS com 1% de BSA e 0,1% de Tween 20, *overnight* a 4°C. Na

sequência, os embriões foram lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários (1:250) anti-coelho (#A11036) e anti-camundongo IgGs (#A11029) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) diluídos em PBS com 1% de BSA e 0,1% de Tween 20, respectivamente, para ERBB2 e ERBB3, por 1h em temperatura ambiente. Para cada grupo foi separado um blastocisto controle, que não foi submetido à incubação com o anticorpo primário.

Posteriormente, todos os grupos foram incubados com corante Hoechst (#33342) por 15 min, para identificação de núcleo. Os blastocistos foram lavados e colocados em lâminas para as análises de epifluorescência. As amostras foram analisadas na objetiva 40X e avaliadas em comprimento de onda de 568 nm para o ERBB2 e 488 nm para ERBB3.

5.3.7. Suplementação do meio de cultivo com antioxidantes

No intuito de determinar a eficácia da suplementação do meio de cultivo com antioxidantes em reverter os efeitos do estresse oxidativo para os níveis de EROs, um grupo foi estimulado para a produção do antioxidante glutatona através da suplementação do meio de maturação com cisteína e cisteamina no grupo alto O_2 (C+C), mantendo para cada rotina um grupo controle sem tratamento exposto às mesmas condições de alta tensão de oxigênio grupo alto O_2 (Ctr). A suplementação foi realizada conforme descrito no item 5.2.1. O tratamento foi validado pela técnica de fluorimetria para detecção de EROs utilizando a sonda Cell ROX Green (Molecular Probes) e analisado em microscopia de epifluorescência na objetiva 40X e avaliadas com comprimento de onda de 488 nm, conforme descrito no item i. A análise foi realizada com 32 e 22 blastocistos, respectivamente cultivados em alta tensão na ausência e presença do tratamento C+C, oriundos de três rotinas experimentais diferentes.

O potencial da suplementação com cisteína e cisteamina em reverter as alterações do estresse oxidativo observados nos miR-199a-3p e miR-199a-3p expressos nos blastocistos cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio, foi avaliado com *pools* de 10 blastocistos para 4 repetições biológicas. A extração do RNA total das amostras ocorreu conforme descrito anteriormente no item 5.3.2. deste experimento. Os processos de transcrição reversa e PCR em tempo real para as isoformas do miR-199a foram realizadas conforme descrito no item 5.3.3. deste experimento. A expressão dos miRNAs foi normalizada com a média geométrica do valor de Ct dos endógenos RNU43 snoRNA e Hm/MS/Ru U1.

A capacidade do tratamento C+C em reverter as alterações do estresse oxidativo sobre a expressão proteica do receptor ERBB2 foi analisada por *Western Blotting* com *pools* de 25 blastocistos, conforme descrito no item 5.3.5. deste experimento. A análise foi realizada com seis rotinas experimentais diferentes.

5.4. Experimento II

5.4.1. Metilação global em blastocistos bovinos

Os níveis globais de metilação do DNA foram determinados por imunomarcação de 5-mC em embriões produzidos em alta e baixa tensão de oxigênio. Os blastocistos, previamente fixados em 4% de paraformaldeído por 20 min, foram agrupados em *pools* de 12 embriões, de 6 rotinas diferentes, por grupo, e os níveis de marcação para 5-mC foram obtidos por microscopia confocal.

Os embriões foram permeabilizados com solução de PBS acrescido de 0,5% de saponina por 10 min, seguidos por lavagem em PBS, desnaturação do DNA com 4 N de ácido clorídrico por 12 min, neutralização com 100 mM de solução Tris HCl por 20 min e bloqueio com solução de PBS, 1% de BSA e 0,3 M de glicina por 1 hora. Os blastocistos foram incubados com o anticorpo primário para 5-metilcitidina (1:500, #SC56615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), de acordo com cada grupo, *overnight* a 4°C. Na sequência, os embriões foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-camundongo IgGs (1:500, #A11029, Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA), por 1 h em temperatura ambiente. Para cada grupo foi separado um blastocisto controle, que não foi submetido à incubação com o anticorpo primário. Os blastocistos foram lavados e colocados em lâminas. As análises foram realizadas por microscopia confocal, em equipamento SP5 da Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, WZ, Alemanha), através da objetiva 40X em imersão à óleo. As amostras foram excitadas com o laser HeNe 543, em emissão de 590 a 630 nm, sendo 5 cortes por embrião. As imagens foram analisadas a partir de 5 blastômeros por corte utilizando o programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.4.2. Níveis de transcritos gênicos em blastocistos

As análises de expressão de 96 RNAm foi realizada por qPCR utilizando o sistema de microfluídica Biomark HD (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA) para 8 repetições biológicas de embriões cultivados em alta ou baixa tensão de oxigênio (Tabela S.2). O RNA total de oito *pools* de 10 blastocistos foi extraído e purificado pelo miRNeasy® mini kit (50) conforme descrito no item 5.3.2. do experimento I. A transcrição reversa foi realizada com High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Foster, City, CA, EUA) utilizando 100 ng do RNA total. Aproximadamente 1,25 µL de cDNA (5ng/µL) da reação de transcrição foi submetida ao processo de pré-amplificação sequência específica, com 1,25 µL de mix Taqman® Assay e 2,5 µL de TaqMan PreAmp Master Mix (#4391128, Applied Biosystems), sob condições de ciclagem de 95°C por 10 min, 95°C por 15 s e 14 ciclos de 60°C por 4 min, para ativação, desnaturação e anelamento, respectivamente.

As análises dos 96 transcritos foram realizadas em reação de 10 µL para o sistema Biomark HD foi preparada com 2,25 µL de cDNA (produto da pré-amplificação), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems, City, CA, EUA) e 0,25µL de 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA); e 5 µL de solução para o ensaio com 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, City, CA, EUA) e 2,5 µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA). Os dados foram coletados com o chip 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA). O protocolo de ciclagem utilizado no sistema Biomark HD foi o TaqMan GE 96x96 Standard, que consiste em um estágio *Thermal Mix* (50°C por 2 min, 70°C por 20 min e 25°C por 10 min) seguido por um estágio de aquecimento *Hot Start* (50°C por 2 min e 95°C por 10 min) e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 60s, para desnaturação, anelamento do *primer* e extensão. Amostras com valor de Ct maior que 35 foram descartadas. Os valores de Ct bruto dos 96 transcritos foram normalizados pela média geométrica do valor de Ct dos endógenos PPIA, GAPDH e ACTB.

5.4.3. Expressão do perfil de miRNAs para blastocistos bovinos

A expressão de 378 miRNAs foi investigada por PCR em tempo real a partir de *pools* de 10 blastocistos de 3 repetições biológicas cultivadas em alta ou baixa tensão de oxigênio.

As reações de extração, transcrição reversa e PCR foram realizadas, respectivamente, de acordo com o descrito nos itens 5.3.2. e 5.3.3. do experimento I (Tabela S.1). Em seguida, foi realizada a análise da curva de dissociação para confirmar a amplificação miRNAs precursores e maduros. Amostras que apresentavam valor de Ct a cima de 35 também foram descartadas. A expressão dos miRNAs foi normalizada com a média geométrica do valor de Ct dos endógenos RNU43 snoRNA, Hm/MS/Ru U1 snRNA e bta-miR-99b. A análise de bioinformática para identificação das vias enriquecidas para os miRNAs encontrado diferentemente expressos foi realizada de acordo com a descrição do item 5.3.3. do experimento I.

Adicionalmente, foram determinados os níveis de expressão relativa de oito miRNAs (bta-miR-34c, bta-miR-19a, bta-miR-210, bta-miR-140, bta-miR-1260b, bta-miR-378b, bta-miR-22-5p e bta-miR-155) em *pools* de 10 blastocistos de 4 repetições biológicas cultivadas em alta tensão de oxigênio na ausência ou presença de antioxidantes (conforme descrito abaixo no item 5.2.1). As reações de extração, transcrição reversa e PCR foram realizadas, respectivamente, de acordo com o descrito nos itens 5.3.2. e 5.3.3. do experimento I. A análise dos resultados ocorreu conforme descrito anteriormente. A expressão dos miRNAs foi normalizada com a média geométrica do valor de Ct dos endógenos RNU43 snoRNA, Hm/MS/Ru U1 snRNA e bta-miR-99b.

5.5. Experimento III

As coletas do meio de cultivo para isolamento dos exossomos foram realizadas no dia 3 do cultivo *in vitro* de embriões bovinos em alta e baixa tensão de oxigênio, durante a realização do *feeding*; e no dia 7 do cultivo, após a coleta dos blastocistos. Imediatamente após a coleta os meios foram processados através de um protocolo de centrifugação de 300G por 10 min, 2.000G por 10 min e 16.500G por 30 min, para separação e descarte de células e restos celulares remanescentes. Após o processamento os meios foram armazenados à -80°C.

Os meios de cultivo foram agrupados em *pools* de 3 rotinas. Os exossomos foram isolados após tratamento com reagente ExoQuick-TC (1:1, #EXOQ20A1, System Biosciences, CA, EUA), *overnight* a 4°C, e centrifugação a 1.500G por 30 min. O pellet de exossomos foi

ressuspendido em 50 μ L de PSB, dos quais 10 μ L foi direcionado para a análise do padrão de secreção e 40 μ L submetido ao processo de extração de RNA total.

5.5.1. Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7

O padrão de secreção dos exossomos foi analisado através do NanoSight NS300 (NanoSight, Slisbury, SP, GB) utilizando 10 μ L do pellet de exossomos isolado do meio de cultivo diluído em PBS na proporção 1:50. Foram analisados 3 *pools* de exossomos avaliados para cada grupo, alta e baixa tensão de oxigênio, para os dias 3 e 7 do desenvolvimento. O *screen gain*¹ da análise do NanoSight NS300 foi padronizada para 4,0 no dia 3 e 10,0 no dia 7. Não houve variação do *screen gain* dentro dos grupos. Para cada amostra o NanoSight NS300 gerou 5 vídeos de 30s, com os quais foram analisados os padrões de tamanho e concentração dos exossomos nos meios de cultivo de alta e baixa tensão de oxigênio, nos dias 3 e 7 do desenvolvimento.

5.5.2. Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7

As análises da expressão relativa de 378 miRNAs do conteúdo dos exossomos foram realizadas a partir de 40 μ L dos 50 μ L do pellet de exossomos isolado do meio de cultivo para 3 *pools* de meio de cultivo submetidos a alta ou baixa tensão de oxigênio. As amostras de isolados de exossomos foram submetidas ao tratamento com 700 μ L de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda) e 140 μ L de clorofórmio para separação das fases aquosa (RNAs) e orgânica (proteínas) por uma fina camada de DNA. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e purificada utilizando o miRNeasy® mini kit (50) (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda). As amostras extraídas foram quantificadas via espectrofotometria, com NanoDrop 2000® (Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA).

¹ O *screen gain* é uma configuração de imagem que determina a gama de intensidades de pixels capturadas pela câmera, regulando a saturação da fluorescência na imagem.

A transcrição reversa do RNA em cDNA foi realizada com kit miScriptII RT (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda) utilizando o tampão HiFlex do kit e contendo 100 ng do RNA total extraído. Os cDNAs tratados com tampão HiFlex permitiram a detecção tanto dos miRNAs maduros quanto dos precursores. As análises dos 378 miRNAs foram realizadas utilizando amostras de 3 *pools* de exossomos isolados do meio de cultivo por grupo (alta e baixa tensão de oxigênio), nos dias 3 e 7 do desenvolvimento, em reações de 6 µL preparadas com 3 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda), 0,6 µL *primer* reverso Universal (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda), 0,02 µL de cDNA, 1,38 µL de água e 1 µL de *primer forward* específico (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda). As placas de 384 poços foram montadas manualmente e analisadas por RT-PCR utilizando o sistema QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições dos ciclos de PCR foram: 95°C durante 15 min e 45 ciclos de 94°C durante 15s, 55°C durante 30s e 70°C durante 30s, seguido por uma análise da curva de dissociação para confirmar a amplificação de miRNAs precursores e maduros. As amostras que apresentaram valor de Ct a cima de 35 foram descartadas. Os valores de Ct bruto foram normalizados pela média geométrica do valor de Ct dos endógenos Hm/MS/Ru U1 snRNA e bta-miR-99b tanto para as amostras do D3 como para as do dia 7.

A análise das vias enriquecidas pelos miRNAs foi realizada utilizando a base de dados mirBase (<http://www.mirbase.org>), para analisar a homologia da sequência entre o miRNA bovino e humano, e o software DIANA TOOLS (Vlachos et al., 2015), que utiliza os miRNAs humanos para a investigação das possíveis vias enriquecidas.

5.6. Análise dos Resultados

Os resultados dos experimentos de desenvolvimento embrionário, níveis de EROs, expressão de miRNA e mRNA e metilação global foram comparadas utilizando Teste T Student. Os níveis de proteína foram comparados utilizando teste de Tukey para múltiplas comparações. Quando necessários os dados foram transformados matematicamente para log, como para as análises de EROs, expressão proteica e metilação global do DNA. As análises foram realizadas com auxílio do SAS e o nível de significância considerado foi de 5% em todos os experimentos.

6. Resultados

6.1. Experimento I

6.1.1. Taxa de clivagem e blastocisto

As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em 23 rotinas independentes. Não houve diferença significativa entre os cultivos de alta e baixa tensão de oxigênio (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvio padrão (DP) das taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos produzidos em alta (20%) e baixa (5%) tensão de oxigênio.

	No	Nc	Taxa de Clivagem (média ± DP)	Nb	Taxa de Blastocistos (média ± DP)	Taxa Total
Alto O₂	1.908	1.591	83,23% ± 4,23	485	27,24% ± 10,99	25,42%
Baixo O₂	1.872	1.557	82,92% ± 6,31	422	23,96% ± 9,36	
TOTAL	3.780	3.148	-	907	-	-

No= número de oócitos

Nc= número de embriões clivados

Nb= Número de blastocistos

6.1.2. Conteúdo intracelular de EROs para avaliação do estresse oxidativo

Os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram determinados em 35 e 38 blastocistos cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio, respectivamente (Figura 9). Os resultados foram analisados em unidades arbitrárias de fluorescência. O grupo desenvolvido sob alta tensão de O₂ apresentou níveis maiores de EROs (12,448 ± 0,794) em relação ao grupo de baixa tensão de O₂ (10,006 ± 0,678, considerando $p \leq 0,05$).

Figura 9. Níveis intracelulares de EROs (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta e baixa tensão de oxigênio (A). As barras do gráfico representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de epifluorescência de blastocistos produzidos em alta (B) e baixa (C) tensões de oxigênio e corados com CellROX Green (40x).

6.1.3. Expressão do miR-199a

Os resultados de expressão das isoformas do miR-199a demonstraram que o miR-199a-3p não apresenta variação de expressão entre as amostras cultivadas em alta ($0,0000478 \pm 0,0000222$) ou em baixa ($0,0000476 \pm 0,0000179$, considerando $p \leq 0,05$) tensão de oxigênio. O miR-199a-5p, por sua vez, foi mais expresso na alta tensão ($0,0000482 \pm 0,0000193$) de oxigênio em comparação com a baixa tensão ($0,0000305 \pm 0,00000305$, considerando $p \leq 0,05$) (Figura 10).

Figura 10. Expressão relativa das isoformas do miR-199a para blastocistos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6.1.4. Análise dos genes alvo ERBB2 e ERBB3

Os resultados da expressão dos RNAm *ERBB2* e *ERBB3* não apresentaram diferença significativa entre os grupos de alta ($0,034 \pm 0,01$ e $0,029 \pm 0,011$ para *ERBB2* e *ERBB3*, respectivamente) e baixa ($0,029 \pm 0,009$ e $0,023 \pm 0,006$ para *ERBB2* e *ERBB3*, respectivamente, considerando $p \leq 0,05$) tensões de oxigênio (Figura 11).

Figura 11. Expressão relativa dos transcritos ERBB2 e ERBB3 para os blastocistos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A expressão proteica do ERBB2, foi numericamente superior nos blastocistos cultivados em alta tensão ($0,548 \pm 0,455$) em comparação com a baixa tensão de oxigênio

($0,308 \pm 0,317$, considerando $p \leq 0,05$), entretanto este valor não foi significativamente diferente (Figura 12A). Este estudo observou a presença de um padrão de 2 ou 3 bandas para o *Western Blotting* da proteína ERBB2 de modo semelhante ao reportado por Fock e colaboradores (2015) (Figura 12B).

Figura 12. Análises da proteína ERBB2. (A) Expressão relativa e (B) imagem representativa do padrão de bandas encontradas na análise de *Western Blotting* para a proteína ERBB2 (185 kDa) em blastocistos bovinos cultivados em alta ou em baixa tensão de oxigênio. A expressão da proteína ERBB2 foi normalizada pela expressão da proteína beta-actina (43 kDa). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A análise complementar de imunocitoquímica demonstrou, como esperado, que ambas as proteínas ERBB2 e ERBB3 são receptores de membrana localizados apenas no trofoblasto dos blastócitos bovinos, uma vez que não foi observada presença de fluorescência na região da massa celular interna conforme destacado na Figura 13.

Figura 13. Imunolocalização das proteínas ERBB2 (A, B e C) e ERBB3 (D, E e F) em blastocistos bovinos. As fotomicrografias de confocal representam a marcação do DNA (A e D), a localização dos receptores ERBB2 (B) e ERBB3 (E) e a combinação das duas imagens (C e F). Ambos os receptores estão predominantemente localizados no trofoblasto, o que pode ser confirmado pela ausência de marcação da massa celular interna, na qual não há células do trofoblasto, conforme indicado pelas cabeças de seta nas fotomicrografia B e E (40x).

6.1.5. Suplementação do meio de cultivo com antioxidantes

As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em 10 rotinas independentes. Não houve diferença significativa entre os cultivos controle, produzido apenas em alta tensão de oxigênio ou na alta tensão com suplementação com cisteína e cisteamina (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvio padrão (DP) das taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos produzidos em alta tensão de oxigênio (20%) na ausência e na presença da suplementação com antioxidantes cisteína e cisteamina (C+C).

	No	Nc	Taxa de Clivagem (média $\pm$ DP)	Nb	Taxa de Blastocistos (média $\pm$ DP)	Taxa Total
Alto O₂	927	786	84,39% $\pm$ 3,66	206	23,97% $\pm$ 11,41	22,23%
Alto O₂ C+C	914	766	83,01% $\pm$ 6,23	235	25,76% $\pm$ 7,99	25,71%
TOTAL	1.841	1.552	-	441	-	-

No= número de oócitos

Nc= número de embriões clivados

Nb= Número de blastocistos

C+C = cisteína + cisteamina

Os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram determinados em 22 e 32 blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de cisteína e cisteamina, respectivamente (Figura 14). Os resultados foram analisados em unidades arbitrárias de fluorescência. O grupo cultivado em alta tensão sem o tratamento (6,452 $\pm$ 0,833) apresentou níveis maiores de EROs em relação ao grupo alta tensão suplementado com C+C (3,492 $\pm$ 0,336, considerando $p \leq 0,05$).

Figura 14. Níveis intracelulares de EROs (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de tratamento com antioxidantes (A). As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de epifluorescência de

blastocistos produzidos em alta tensão de oxigênio na ausência de tratamento (B) e na presença de suplementação com cisteína e cisteamina (C) e corados com CellROX Green (40x).

No intuito de avaliar se o tratamento com antioxidantes é capaz de prevenir as alterações induzidas pelo estresse oxidativo, este estudo avaliou a expressão das isoformas do miR-199a, seus possíveis transcritos alvo *ERBB2* e *ERBB3* e proteína *ERBB2*. Entre as isoformas do miR-199a, o miR-199a-3p não apresentou diferença significativa entre os grupos de blastocisto cultivados em alta tensão na ausência ($0,0000125 \pm 0,0000065$) e presença de antioxidantes ($0,0000175 \pm 0,0000108$, considerando $p \leq 0,05$), de forma semelhante como observado nas comparações dos cultivos em alta e baixa tensão de oxigênio. O miR-199a-5p também não apresentou diferença significativa entre os embriões cultivados na ausência ($0,0000254 \pm 0,00000489$) e presença de suplementação com antioxidantes ($0,0000105 \pm 0,000013$, considerando $p \leq 0,05$) (Figura 15).

Figura 15. Expressão relativa das isoformas do miR-199a. Os gráficos A e B apresentam a comparação da expressão relativa das isoformas do miR-199a entre os grupos de blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média.

Os resultados de expressão dos RNAm *ERBB2* ($0,03 \pm 0,002$ e $0,03 \pm 0,004$ grupo de alto O₂ e alto O₂ C+C, respectivamente) e *ERBB3* ($0,025 \pm 0,004$ e $0,28 \pm 0,005$ grupo de alto O₂ e alto O₂ C+C, respectivamente, considerando $p \leq 0,05$) não demonstraram diferença significativa entre os grupos cultivados em alta tensão sem suplementação e suplementados com C+C, de forma semelhante ao observado nos grupos cultivados em alta e baixa tensão

de oxigênio. Os resultados da proteína ERBB2 também não difere entre os grupos de embriões cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença da suplementação C+C ($0,336 \pm 0,283$, considerando $p \leq 0,05$) (Figura 16).

Figura 16. O resultado do Western Blotting, em unidades arbitrárias, demonstrou que a proteína ERBB2 não apresenta diferença de expressão entre os grupos de embriões cultivados em alta tensão na ausência ou presença de antioxidantes ou na baixa tensão de oxigênio. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6.2. Experimento II

6.2.1. Perfil de metilação global dos blastocistos

A imunocitoquímica para avaliação do padrão da metilação global foi realizada para 12 e 9 blastocistos cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio, respectivamente. Os resultados da metilação global demonstram que o cultivo embrionário em alta tensão de oxigênio resulta em aumento nos níveis de imunomarcagem para 5-mC em relação à baixa tensão de oxigênio (Figura 17).

Figura 17. Os níveis de metilação global do DNA (em unidades arbitrárias de fluorescência) em blastocistos bovinos produzidos em alta ou baixa tensão de oxigênio (A). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias de confocal de blastocistos produzidos em alta (B) e baixa (C) tensões de oxigênio e imunomarcados para 5-mC (40x).

6.2.2. Níveis de expressão de RNAm nos blastocistos

Os resultados da análise do perfil de 96 RNAm para 8 repetições biológicas demonstraram que 40 transcritos foram diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) entre os grupos de blastocistos cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio (Tabela S.4). Entre os 40 RNAm, 39 foram mais expressos em alta tensão de oxigênio em relação a baixa. O transcrito *PGK1* foi o único encontrado como menor expressão em alta tensão de oxigênio em relação à baixa (Figura 18). As funções biológicas associadas aos transcritos diferentemente

expressos são de resposta ao estresse oxidativo (*SOD1*, *CAT*, *TXN*, *TNFRSF21*, *PRDX1*, *PRDX3*, *NRF2* e *KEAP1*), resposta ao estresse oxidativo e proliferação (*HSP90AA1*, *GLRX2*, *PTGS2* e *PPARG*), remodelação epigenética (*DNMT3A*, *HDAC2*, *H2AFZ*, *H3F3B*, *MORF4L2*, *REST* e *PAF1*), proliferação e diferenciação celular (*STAT3*, *EGFR*, *MAPK1*, *CDCA8*, *NANOG*, *OTX2*, *TFAM*, *PRKCD*, *PA2G4*, *HSF1* e *CCND2*), reconhecimento materno-fetal (*IFNT2*), apoptose (*BAX*, *BID*, *CASP9* e *TNFRSF21*) e metabolismo (*PGK1*, *SREBF1*, *ACSL3*, *HAND1* e *ATP5L*).

Figura 18. Mapa das funções biológicas e expressão relativa dos 40 transcritos diferentemente expressos entre os cultivos de alta e baixa tensão de oxigênio para blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6.2.3. Perfil de microRNAs nos blastocistos

Os resultados da análise do perfil de 378 miRNAs para três repetições biológicas demonstraram a expressão de 352 miRNAs (Tabela S.3). Os dados foram considerados

consistentes, uma vez que os *pools* apresentaram alta repetibilidade quando comparados (Figura 19). Entre os 352 miRNAs expressos, 22 foram identificados como exclusivos de alta tensão, 14 exclusivos de baixa tensão e 316 comuns aos dois sistemas de cultivo (Figura 20).

Figura 19. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de 10 blastocistos analisados. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3.

Perfil de miRNAs nos blastocistos bovinos

Figura 20. Diagrama de Venn indicando a expressão de 352 miRNA em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio.

Dentre os 316 miRNAs identificados como comuns aos dois sistemas de cultivo, oito foram considerados diferentemente expressos, sendo cinco aumentados e três diminuídos na alta tensão em relação a baixa tensão de oxigênio (Figura 21). A partir dos miRNAs diferencialmente expressos foram analisadas as principais vias enriquecidas para alta e baixa tensões de oxigênio, sendo consideradas as primeiras 20 vias ranqueadas pelo valor de p transformado por $-\log_{10}$ (Figura 22). O grupo de miRNAs mais abundantes em alta tensão de oxigênio apresentou um maior número de vias relacionadas a câncer em relação a baixa tensão de O₂. Vias relacionadas com câncer geralmente estão associadas a funções de divisão celular para proliferação, e diferenciação celular. Em contrapartida, entre as vias relacionadas com os miRNAs menos abundantes em alta tensão destaca-se a via de sinalização ERBB, relacionada com a interação materno-embrionária, foco do presente estudo.

Figura 21. Heatmap indicando a expressão dos 8 miRNAs diferentemente expressos ($p \leq 0,05$) entre os blastocistos desenvolvidos em alta e baixa tensão de oxigênio, para 3 repetições biológicas.

Figura 22. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs mais (A) e menos (B) abundantes na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs.

6.2.4. Efeito da suplementação do meio de cultivo com antioxidantes na expressão dos miRNA

Para confirmar os efeitos do estresse oxidativo na modulação dos níveis de miRNAs, embriões bovinos foram produzidos *in vitro* em alta tensão de oxigênio na presença e na ausência de suplementação do sistema antioxidante cisteína e cisteamina (grupo alto O₂ C+C). Nestes embriões foram amplificados os oito miRNAs (bta-miR-34c, bta-miR-19a, bta-miR-210, bta-miR-140, bta-miR-1260b, bta-miR-378b, bta-miR-22-5p e bta-miR-155) que diferiram entre embriões produzidos na alta e baixa tensão de oxigênio. Para os grupos de embriões cultivados em alta e baixa tensão, 5 miRNAs (bta-miR-378b, bta-miR-34c, bta-miR-19a, bta-miR-155, bta-miR-1260b) estavam mais abundantes na alta tensão enquanto 3 miRNAs (bta-miR-22-5p, bta-miR-210 e bta-miR-140) estavam menos abundantes na alta tensão em comparação a baixa tensão de oxigênio. Os 8 miRNAs não apresentaram

diferença significativa entre os grupos de embriões cultivados em alta tensão na ausência e na presença da suplementação C+C (Tabela S.5) (Figura 23).

Figura 23. Expressão relativa dos miRNAs. Os gráficos A, B, C, D E, F, G e H a expressão relativa dos mesmos miRNAs entre os grupos de blastocistos cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina). As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6.3. Experimento III

6.3.1. Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos nos dias 3 e 7

Os exossomos isolados do meio de cultivo da produção *in vitro* de embriões bovinos sofreram alterações no padrão de secreção dependentes da condição de tensão de oxigênio durante o desenvolvimento. Os tamanhos dos exossomos não diferiram no meio de cultivo no dia 3 ($117,8 \pm 28,66$ e $124,6 \pm 32,1$ para alta e baixa tensão, respectivamente), e nem no dia 7 ($112,24 \pm 18,52$ e $107,15 \pm 19,01$ para alta e baixa tensão, respectivamente) de oxigênio (Figura 24).

Figura 24. Média das modas e desvio padrão dos tamanhos dos exossomos (nm) observados no meio de cultivo durante os dias 3 e 7 do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em condições de alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A concentração dos exossomos foi significativamente diferente entre os grupos de alta e baixa tensão de oxigênio em ambos os dias do desenvolvimento, D3 e D7. O meio de cultivo em D3 apresentou menor concentração de partículas/ml em alta tensão (178.000.000,00 $\pm$ 28.317.082,17) em relação a baixa tensão de O₂ (283.9333.333,33 $\pm$ 72.160.997,24). Contudo, em D7 a concentração de partículas foi maior na alta tensão (393.133.333,33 $\pm$ 140.869.172,67) em comparação com a baixa tensão de O₂ (252.466.666,67 $\pm$ 117.841.822,95) (Figura 25).

Figura 25. Média e desvio padrão das concentrações de exossomos (partículas/mL) observada no meio de cultivo durante os dias 3 e 7 do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em condições de alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas. As barras representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6.3.2. Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3

Os resultados da análise do perfil de 378 miRNAs para três repetições biológicas detectou a presença de 281 miRNAs em exossomos isolados do meio de cultivo em D3 (Tabela S.6). Os dados foram considerados consistentes, uma vez que os *pools* apresentaram alta repetibilidade quando comparados (Figura 26). Entre os 281 miRNAs identificados, 10 foram considerados exclusivos de alta tensão, 19 exclusivos de baixa tensão e 252 comuns aos dois sistemas de cultivo (Figura 27).

Figura 26. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de meio de cultivo retiradas junto com o *feeding* no dia 3 do cultivo. As análises foram realizadas para 3 repetições biológicas. Cada repetição biológica consistiu em um *pool* de meio de cultivo de 3 rotinas. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3.

Perfil de miRNAs do conteúdo dos exossomos do meio do cultivo de embriões em D3

Figura 27. Diagrama de Venn indicando a presença de 281 miRNA no conteúdo dos exossomos isolados do meio do cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* no dia 3 do desenvolvimento. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio.

Entre os 281 miRNAs identificados no conteúdo dos exossomos como comuns aos dois sistemas de cultivo, 15 foram considerados diferentemente expressos, sendo quatro elevados e 11 diminuídos na alta tensão em relação a baixa tensão de oxigênio (Figura 28). A partir dos miRNAs diferencialmente expressos foram analisadas as principais vias enriquecidas para alta e baixa tensões de oxigênio, sendo consideradas as primeiras 20 vias ranqueadas pelo valor de p transformado por $-\log_{10}$ (Figura 29). Ambos os grupos, Alto e Baixo O_2 , apresentaram uma grande quantidade de vias relacionadas com câncer.

Figura 28. Heatmap indicando 15 miRNAs diferentemente expressos ($p \leq 0,05$) no conteúdo de exossomos isolados do meio de cultivo de produção *in vitro* de embriões desenvolvidos em alta ou baixa tensão de oxigênio no dia 3 do cultivo, para 3 repetições biológicas.

Figura 29. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs mais (A) e menos (B) expressos na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio para exossomos isolados do meio de cultivo no dia 3 em três repetições biológicas. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs.

6.3.3. Perfil de microRNAs dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 7

Os resultados da análise do perfil de 378 miRNAs para três repetições biológicas demonstraram a expressão de 325 miRNAs no conteúdo de exossomos isolados do meio de cultivo em D3 (Tabela S.6). Os dados foram considerados consistentes, uma vez que os *pools* apresentaram alta repetibilidade quando comparados (Figura 30). Entre os 325 miRNAs identificados, 25 foram considerados exclusivos de alta tensão, 14 exclusivos de baixa tensão e 286 comuns aos dois sistemas de cultivo (Figura 31).

Figura 30. Diagrama de Venn indicando o número de miRNAs expressos em cada um dos *pools* de meio de cultivo retiradas no dia 7 do cultivo. As análises foram realizadas para três repetições biológicas. Cada repetição biológica consistiu em um *pool* de meio de cultivo de três rotinas. Representação gráfica da dispersão do valor de Delta Ct entre os *pools* analisados e o valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), indicando alta repetibilidade dos resultados de amplificação de miRNAs entre amostras (repetições) do mesmo grupo. A-P1 = alta tensão – *pool* 1; A-P2 = alta tensão – *pool* 2; A-P3 = alta tensão – *pool* 3; B-P1 = baixa tensão – *pool* 1; B-P2 = baixa tensão – *pool* 2; B-P3 = baixa tensão – *pool* 3.

Perfil de miRNAs do conteúdo dos exossomos do meio do cultivo de embriões em D7

Figura 31. Diagrama de Venn indicando a presença de 325 miRNA no conteúdo dos exossomos isolados do meio do cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* no dia 7 do desenvolvimento. As caixas de texto apresentam as listas dos miRNAs considerados exclusivos para alta e baixa tensões de oxigênio.

Entre os 325 miRNAs identificados no conteúdo dos exossomos como comuns aos dois sistemas de cultivo, 18 foram considerados diferentemente expressos, sendo 16 elevados e dois diminuídos na alta tensão em relação a baixa tensão de oxigênio (Figura 32). A partir dos miRNAs diferencialmente detectados foram analisadas as principais vias enriquecidas para alta e baixa tensões de oxigênio, sendo consideradas as primeiras 20 vias ranqueadas pelo valor do número de genes regulados por via (Figura 33). Ambos os grupos, Alto e Baixo O₂, apresentaram uma grande quantidade de vias relacionadas com câncer. Além disso, entre as vias enriquecidas pelos miRNAs menos expressos na alta tensão de oxigênio destaca-se a via de sinalização FOXO, relacionada com resposta ao estresse oxidativo.

Figura 32. Heatmap indicando 18 miRNAs diferentemente presentes ($p \leq 0,05$) no conteúdo de exossomos isolados do meio de cultivo de produção *in vitro* de embriões desenvolvidos entre alta e baixa tensão de oxigênio no dia 7 do cultivo, para três repetições biológicas.

Figura 33. Principais vias enriquecidas pelos miRNAs elevados (A) e diminuídos (B) em exossomos isolados do meio de cultivo no dia 7 na alta tensão de oxigênio em relação a baixa tensão de oxigênio para três repetições biológicas. Os valores do eixo Y da esquerda representam o número de genes enriquecidos pelos miRNAs para as respectivas vias, enquanto o eixo Y da direita representa o valor de enriquecimento do score para cada via. O valor de enriquecimento de score é o $-\log_{10}$ do valor de p, que é um valor extraído do algoritmo do software DIANA TOOLS com base na proporção de simulações de alvos para os miRNAs.

7. Discussão

7.1. Experimento I

7.1.1. Estresse oxidativo

Nos resultados deste trabalho as diferentes tensões de oxigênio não alteraram as taxas de clivagem e de blastocisto durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os resultados de Harvey et al. (2004), Pontes (2009) e Gaspar et al. (2015) são semelhantes, as taxas de clivagem e blastocisto não são diferentes entre a alta e a baixa tensão. Entretanto, outros estudos mostram que apesar da taxa de clivagem não variar entre a alta e baixa tensão, as taxas de blastocisto, em geral, são menores na alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio (DUMOULIN et al., 1999; AMIN et al., 2014; YOON et al., 2014). Neste estudo foi empregado um sistema de cultivo embrionário com a adição de soro fetal bovino depletado de vesículas extracelulares e com o emprego do pseudo-co-cultivo com células do *cumulus*. O efeito benéfico do cocultivo durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* já é conhecido, atuando na redução dos danos oxidativos sobre o embrião ou no intercâmbio de fatores de crescimento que auxiliam no desenvolvimento do embrião (WYDOOGHE et al., 2015). Recentemente, a utilização de SFB depletado de vesículas extracelulares do SFB também tem sido vinculado a um efeito benéfico durante desenvolvimento embrionário (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Assim, nas condições de cultivo empregadas neste trabalho não houve diferença nas taxas de desenvolvimento embrionário, e as condições particulares empregadas no cultivo impedem uma comparação plena com resultados já descritos.

Os resultados de acúmulo de EROs demonstraram que o desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* realizado em alta tensão de oxigênio gera maiores níveis de espécies reativas de oxigênio comparado com o cultivo em baixa tensão de oxigênio. O estresse oxidativo é um distúrbio no estado de equilíbrio pró-oxidante e antioxidante nas células, consequentemente diversos estudos associaram diretamente o nível de estresse com a presença de EROs, relacionando o excesso de EROs com baixa qualidade embrionária e atraso no desenvolvimento (CROCOMO et al., 2012; AMIN et al., 2014). Este estudo identificou acúmulo de EROs no sistema de cultivo de alta tensão em relação a baixa tensão

de oxigênio, permitindo determinar que o excesso de oxigênio durante o desenvolvimento embrionário é capaz de gerar estresse oxidativo celular.

7.1.2. Provável regulação do miR-199a sobre a via ERBB

Estudos de Dumoulin et al. (1999), Pontes (2009) e Bontekoe et al. (2012) demonstraram uma diferença significativa entre as taxas de animais gestantes de embriões cultivados em alta ou baixa tensão de oxigênio, na qual a alta tensão apresenta uma taxa menor em relação a baixa tensão. Tais resultados sugerem que a baixa tensão de oxigênio favorece o desenvolvimento e a implantação embrionária. A fim de compreender os prováveis mecanismos de interação materno-embrionária que o estresse oxidativo pode alterar, de modo a comprometer as taxas de gestação, este estudo propôs-se a estudar a via ERBB e sua regulação pós-transcricional. A via de sinalização do ERBB apresenta função importante na interação materno-embrionária a partir da interação dos receptores da família das ERBBs, presentes na membrana do trofoblasto e os ligantes das células do estroma do endométrio, como as NRGs (REESE et al., 1998; BROWN et al., 2004).

Estudo de He e colaboradores (2012) demonstrou a regulação dos receptores ERBB2 e ERBB3 pelo miR-199-5p em células de tumor de mama, entretanto, apesar da expressão do miR-199a-5p ser maior nos blastocistos cultivados em alta tensão comparado aos de baixa tensão, a proteína ERBB2 não variou de expressão entre os grupos. A alta presença do miR-199a-5p não diminuiu a expressão do receptor ERBB2, sugerindo que o transcrito *ERBB2* bovino provavelmente não é um gene alvo do miR-199a-5p. Em contrapartida, Tan et al. (2016) caracterizaram que a inibição do miR-199a-5p diminui a taxa de gestação a termo e a razão ICM/TE (razão entre a quantidade de células que compõem a massa celular interna (ICM) e trofoblasto (TE)) em embriões de camundongo. A expressão do miR-199a-5p pode ser associada com a manutenção do potencial desenvolvimento e viabilidade embrionário. Este estudo detectou o aumento da expressão do miR-199a5p em embriões cultivados na alta tensão de oxigênio. Contudo, mais estudos são necessários para compreender a função e os mecanismos de atuação do miR-199a-5p em embriões submetidos a condições de estresse oxidativo.

Com o objetivo avaliar se os anticorpos para as proteínas ERBB2 e ERBB3 correspondiam realmente à estes receptores foi realizada a imunolocalização das proteínas.

As imagens geradas pela análise permitiram a identificação de uma região que não foi marcada pelos anticorpos, identificada como camada de Rauber (Figura 13). A camada de Rauber foi descrita por Betteridge e Flechon (1988) como a ausência de células do trofoblasto na região polar do embrião na qual se encontra a massa celular interna. A ausência de marcação dos receptores ERBB2 e ERBB3 na camada de Rauber demonstrou a presença exclusiva dessas proteínas nas células do trofotoderma do embrião bovino, o que vai de acordo com a descrição de Brown et al. (2004) sobre os receptores ERBB2 e ERBB3 em embriões bovinos e atesta a eficácia de identificação destas proteínas pelos anticorpos utilizados.

A sinalização da via ERBB depende primariamente da ativação dos receptores ERBB, que ocorre através de sinalização hormonal ou interação com neurotransmissores (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; ONO; KUWANO, 2006). Este estudo não encontrou diferença de expressão dos transcritos ERBB2 e ERBB3 entre os embriões desenvolvidos em alta e baixa tensões de oxigênio. A especificidade e a potência dos sinais transmitidos pelos receptores ERBB depende da composição de homo e heterodímeros da membrana celular, uma vez que o heterodímero ERBB2/ERBB3 apresenta função de sinalização após a fosforilação enquanto homodímero ERBB2 não possui ligante específico e não gera sinal eficaz para os fatores de crescimento (BAECKSTROM; ALFORD; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, 2000; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). Além disso, a associação das proteínas em homo ou heterodímeros depende do equilíbrio entre monômeros e dímeros de ERBB2, de acordo com Nagy et al. (2002) as áreas da membrana com alta homodimerização da proteína ERBB2 estão positivamente relacionadas com a densidade local de ERBB2 e inversamente relacionadas com a densidade local de ERBB3. Este estudo não detectou diferença significativa nos níveis da proteína ERBB2 entre os embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio. Entretanto, para indicar a potência do sinal gerado pela via ERBB o estudo de outros receptores da via é indispensável.

A função final da via ERBB, no entanto, é composta pela ação conjunta com outras vias, como a PI3K/AKT e MAPK (mitógeno ativado quinase-*like*) (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; ONO; KUWANO, 2006). Este estudo encontrou no experimento II um aumento da expressão do transcrito *MAPK1* na alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio. Em síntese, este estudo demonstrou que os elevados nos níveis de EROs e do miR199a-5p não induziram alterações significativas nos níveis do ERBB2 (RNAm e proteína).

Portanto, são necessários mais estudos para compreender como o estresse oxidativo interfere na sinalização da via ERBB.

7.1.3. Tratamento com antioxidantes

A suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões com agentes antioxidantes, como a cisteína e a cisteamina, é amplamente utilizada nos sistemas de cultivo com o objetivo de reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Este estudo demonstrou que o uso de antioxidantes diminuiu de forma eficaz os níveis de EROs, de modo semelhante ao demonstrado por De Matos, Furnus e Moses (1997), Gasparrini et al. (2006) e Rocha-Frigoni (2016). De modo similar a Rocha-Frigoni (2016) este estudo não observou diferença entre as taxas de clivagem e blastocisto entre os grupos de alta tensão de oxigênio e alta tensão com C+C. Em geral, o tratamento com cisteína e cisteamina leva ao aumento do antioxidante GSH em oócitos maturados. Os acúmulo de GSH é responsável pela redução dos níveis de EROs. Dessa forma, é possível afirmar que o tratamento C+C proposto foi eficaz no combate do estresse oxidativo induzido por EROs.

A análise das isoformas do miR-199a demonstrou que conforme observado para a alta e a baixa tensão de oxigênio o miR-199a-3p não apresentou diferença significativa entre os grupos cultivados em alta tensão na ausência e presença de antioxidantes. A comparação da expressão transcritos *ERBB2* e *ERBB3* também não apresentou resultados significativamente diferentes entre os grupos de alta tensão de oxigênio e alta tensão com C+C, de modo similar ao observado neste estudo para alta e baixa tensão de oxigênio. A expressão da proteína ERBB2 não foi estatisticamente diferente entre os grupos, da mesma forma como observado entre os grupos de alta e baixa tensão. É importante ressaltar que não existem relatos anteriores de mensuração da expressão das isoformas do miR-199a ou transcritos e proteínas da via ERBB para embriões tratados com cisteína e cisteamina. Os resultados apresentados anteriormente demonstram que a suplementação com cisteína e cisteamina, embora tenha reduzido os níveis de EROs nos blastocistos bovinos, não mimetizaram a expressão do miR-199a-5p observada no grupo Baixo O₂. Desta forma, é possível sugerir que a suplementação do meio de cultivo com cisteína e cisteamina não controla completamente os efeitos do estresse oxidativo sobre as células dos embriões bovinos. Portanto, são necessários mais estudos sobre o efeito de outros antioxidantes

sobre a expressão dos miRNAs em embriões produzidos *in vitro* em diferentes condições de cultivo.

7.1.4. Conclusão

A alta tensão de oxigênio durante o cultivo de embriões bovinos foi capaz de gerar um modelo de estresse oxidativo eficiente a partir do aumento dos níveis de EROs. Apesar do estresse oxidativo ser capaz de alterar a expressão do miR-199a-5p, não foram observadas alterações significativas nos níveis de *ERBB2* e *ERBB3*, bem como nos níveis da proteína ERBB2. A partir dos resultados apresentados não há indicação que os níveis de miR-199a-5p atuem como regulador pós-transcricional do ERBB2 para embriões bovinos. Como a sinalização da via ERBB depende tanto da conformação de homo e heterodímeros da membrana e da sinalização de outras vias, os resultados demonstrados não permitem inferir sobre a interação materno-embrionária mediada por ERBB ou os efeitos do estresse oxidativo nesta interação. Outros estudos são necessários para compreender como o estresse oxidativo interfere no potencial de implantação do embrião, comprometendo as taxas de gestação de embriões cultivados em alta tensão de oxigênio.

7.2. Experimento II

7.2.1. Efeitos do estresse oxidativo no embrião: RNAm relacionados com remodelação epigenética x miRNAs

Com objetivo de avaliar os níveis globais de metilação do DNA, os blastócitos foram avaliados por imunocitoquímica para 5-mC. Os resultados relaram uma hipermetilação do DNA dos blastocistos desenvolvidos *in vitro* em alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio, confirmando a hipótese de que o estresse oxidativo aumenta os níveis globais de metilação do DNA. Li et al. (2014) relataram um aumento do padrão de metilação global semelhante, entretanto a comparação foi entre embriões produzidos *in vitro* (cultivados em alto O₂) e produzidos *in vivo*. Além disso, Yamanaka e colaboradores (2011) demonstraram a ausência de diferença no padrão de metilação entre embriões produzidos *in vitro* sob baixa tensão de oxigênio (5%) e embriões *in vivo*. A hipótese deste estudo é de

que os embriões de baixa tensão de oxigênio seriam mais semelhantes aos embriões *in vivo*, uma vez que no oviduto e no útero a tensão de oxigênio é baixa (aproximadamente de 5 a 7%). Os resultados deste estudos, juntos com os de Li et al. (2014) e os de Yamanaka et al. (2011) confirmam essa hipótese. Portanto, em relação aos níveis de metilação do DNA após a reprogramação epigenética, os embriões bovinos produzidos *in vitro* em baixo O₂ podem ser considerados semelhantes aos embriões produzidos *in vivo*.

Uma vez que os níveis de metilação do DNA dos blastocistos estavam alterados, espera-se encontrar também alterações na expressão dos transcritos. O presente estudo avaliou a expressão de 96 RNAm, a partir deles 40 transcritos foram considerados diferentemente expressos entre alta e baixa tensões de oxigênio. Este resultado confirmou a hipótese de que o estresse oxidativo altera efetivamente a expressão de transcritos relacionados com resposta ao estresse oxidativo, proliferação e diferenciação celular, remodelação epigenética, apoptose, metabolismo e reconhecimento materno-fetal. 7 dos RNAm (*DNMT3A*, *HDAC2*, *H2AFZ*, *H3F3B*, *MOFF4L2*, *REST* e *PAF1*) possuem função envolvida com remodelação epigenética e estão mais expressos na alta tensão em comparação com a baixa tensão (Figura 18). A alteração desses mecanismos indica que a alta tensão de oxigênio é capaz de interferir na reprogramação epigenética através da modulação da expressão de transcritos ligados a processos de metilação e aceitação do DNA e proteínas histonas durante o desenvolvimento embrionário.

Os transcritos *DNMT3A* e *PAF1* foram elevados na alta tensão de oxigênio em comparação a baixa tensão. A *DNMT3A* realiza a resposta primária da atividade de metilação *de novo*, preferencialmente nas ilhas de metilação (CpGs), processo essencial durante a reprogramação epigenética para estabelecimento do padrão de metilação do embrião, permitindo a ativação do genoma embrionário (OKANO; XIE; LI, 1998; UYSAL; AKKOYUNLU; OZTURK, 2015). A ausência da *DNMT3A* tem sido associada a letalidade ou desenvolvimento embrionário defeituoso (OKANO et al., 1999). O *PAF1* (componente homólogo *PAF1* do complexo RNA polimerase II) está envolvido no processo de metilação das proteínas histonas. Distúrbios na expressão do *PAF1* têm sido relacionado com defeitos no desenvolvimento cardíaco e neuronal em peixes-zebra (KROGAN et al., 2003; NGUYEN et al., 2010). Entretanto, em camundongos a menor expressão da *PAF1* é essencial para a diferenciação celular no processo de blastulação (DING et al., 2009). García et al. (2016) demonstraram um aumento da expressão de *PAF1* em células de leveduras expostas a

condições de estresse oxidativo da mesma forma que este estudo. Em suma, o aumento da expressão da *DNMT3A* e *PAF1* podem corroborar com o resultado do padrão de aumento da metilação encontrado nos embriões cultivados em alta tensão de oxigênio.

As análises de bioinformática deste trabalho e os estudos de Fabbri et al. (2007) indicaram uma regulação predita dos membros da família miR-29 sobre os transcritos *DNMT3A* e *DNMT3B*. Este estudo não encontrou alterações significantes da expressão da família miR-29 entre os grupos de embriões cultivados em alta ou baixa tensão de oxigênio. Contudo, uma vez que os transcritos de *DNMT3A* foram elevados no grupo de alta tensão em comparação ao grupo baixa, a ausência de diferença de expressão no miR-34b e na família miR-29 entre estes grupos pode indicar que os níveis da proteína DNMT3A estarão alterados de modo semelhante à expressão do transcrito. Estudos dos níveis da proteína de DNMT3A são necessários para confirmar essa hipótese.

Conforme demonstrado neste estudo a atmosfera de alta tensão de oxigênio favorece o acúmulo de EROs. O aumento dos níveis de EROs tem sido associado por diversos autores, como He et al. (2012) e Li et al. (2014), ao aumento da expressão da DNA metiltransferase 1 (*DNMT1*), respectivamente em células tumorais e embriões bovinos. Entretanto este estudo não identificou diferenças significativas na expressão da *DNMT1* para os embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio. Essa ausência de alteração pode ser justificada por meio regulação pós-transcrição pelo bta-miR-155. O miR-155 foi descrito por Zhang et al. (2015) como regulador efetivo entre do *DNMT1* em células renais humanas. Como neste estudo o miR-155 foi mais expresso no grupo de alta tensão em relação ao grupo de baixa tensão e o transcrito *DNMT1* não apresentou diferença de expressão entre os grupos, é possível sugerir que o aumento da expressão do miR-155 na alta tensão de oxigênio foi capaz de modular a expressão da *DNMT1* em blastocistos bovinos, e por isso não foi observado a diferença significativa de expressão do RNAm *DNMT1*.

A expressão dos miRNAs também pode ser modulada por alterações epigenéticas. Conforme demonstrado por He et al. (2012), o aumento dos níveis de metilação das ilhas CpGs foi capaz de diminuir a expressão de miRNAs. Este estudo relatou a menor expressão do miR-210 em embriões cultivados em alta tensão de oxigênio de modo similar ao descrito por Xiong et al. (2012). O miR-210 promove a função anti-apoptose em células cancerígenas, além de ser considerado como uma assinatura da condição de hipóxia (KULSHRESHTHA et al., 2007). A metilação do DNA é capaz de diminuir os níveis do miR-210 sob condições de

normóxia e hipóxia (XIONG et al., 2012). Este estudo apresentou o aumento nos níveis dos transcritos relacionados com promoção da metilação do DNA, como o *DNMT3A* e *PAF1*, em embriões cultivados em alta tensão de oxigênio. A alta expressão destes transcritos explica o aumento dos níveis de metilação dos blastocistos cultivados em condição de estresse oxidativo. Estas alterações epigenéticas, por sua vez, podem justificar a diminuição da expressão do miR-210 nos embriões cultivados em alta tensão de oxigênio.

7.2.2. Efeito do estresse oxidativo no embrião: RNAm relacionados com estresse oxidativo x miRNAs

Com o objetivo de compreender a resposta celular do embrião ao estresse oxidativo gerado pela alta tensão de oxigênio este estudo isolou, a partir dos 40 RNAm diferentemente expressos entre os modelos de cultivo de alta e baixa tensão de O₂, 12 transcritos relacionados com resposta ao estresse oxidativo. Os 12 transcritos (*SOD1*, *CAT*, *TXN*, *TNFRSF21*, *PRDX1*, *PRDX3*, *NRF2*, *KEAP1*, *HSP90AA1*, *GLRX2*, *PTGS2* e *PPARG*) estavam mais expressos na alta tensão de oxigênio em relação a baixa, indicando um possível mecanismo de compensação do estresse oxidativo (Figura 18). Os transcritos *SOD1* (superoxide dismutase), *CAT* (catalase) e *TXN* (thioredoxin) destacaram-se por estarem de acordo com os resultados de Amin et al (AMIN et al., 2014), que relatou um aumento destas enzimas antioxidantes no cultivo embrionário em 20% de oxigênio e os associou com mecanismos que combatem ao acúmulo de EROs (Figura 34). O SOD 1 é uma enzima que catalisa a reação de dismutase para remoção das EROs. A CAT está associada com a catalise da reação de decomposição de H₂O₂ em água (HARVEY et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A TXN é uma proteína de ubiquitinação da reação de redutase do dissulfeto, que a partir do processo de redução combate o estresse oxidativo induzido pelas EROs. O bloqueio da expressão de TXN tem sido associado a falhas no desenvolvimento da massa celular interna e morte embrionária logo após a transferência, reforçando a importância dessa enzima no processo do desenvolvimento embrionário (MATSUI et al., 1996; BING et al., 2003). Dessa forma, é possível considerar que o aumento da expressão dos transcritos *SOD1*, *TXN* e *CAT* tem o objetivo de melhorar a qualidade e a competência dos embriões submetidos a condições estresse oxidativo.

Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2015, p.361)

Figura 34. Esquema ilustrativo das reações catalisadas pelas enzimas SOD1, CAT e TXN (em destaque) como resposta ao estresse oxidativo induzido pelo excesso de EROs, durante o metabolismo celular.

Os resultados do enriquecimento das vias pelos miRNAs mais expressos na alta tensão de oxigênio indicaram a regulação da via de sinalização FOXO (subclasse O da família *forkhead* de fatores de transcrição) ligada à resposta ao estresse oxidativo. A via de sinalização FOXO atua em conjunto com vias como a via da insulina e a via PI3K/AKT desencadeando a ativação da transcrição das enzimas antioxidantes CAT e SOD1 e, consequentemente, resistência ao estresse oxidativo (Figura 35) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; VLACHOS et al., 2015). Conforme demonstrado por estudos prévios, a alta tensão de oxigênio condiciona um agravamento do estresse oxidativo devido a uma elevada concentração de EROs gerada pelo metabolismo celular e pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (DE MATOS et al., 1996; GASPARRINI et al., 2006). O enriquecimento da via de sinalização FOXO pelos miRNAs mais expressos na alta tensão de oxigênio sugere que o estresse oxidativo induz alterações na regulação da via FOXO, aparentemente compensadas através do aumento da transcrição de CAT e SOD1, também observada no grupo de alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio.

Adaptado de Vlachos et al (2015)

Figura 35. Esquema ilustrativo da via de sinalização FOXO, no qual foi destacada a função de resposta ao estresse oxidativo.

O conjunto dos resultados auxilia na validação do modelo de estresse oxidativo para o cultivo embrionário, demonstrando que a exposição dos embriões à alta tensão de oxigênio durante o desenvolvimento é capaz de gerar uma resposta de estresse oxidativo celular mediado por EROs. Desta forma, é possível inferir que em resposta às alterações induzidas pelo estresse oxidativo no embrião ocorre um aumento da expressão de agentes antioxidantes, como SOD1, CAT e TXN, que tem o objetivo reduzir os níveis de EROs e restabelecer o equilíbrio entre os agentes pró-oxidante e antioxidante nas células. Dessa forma, as alterações ligadas ao sistema de resposta ao estresse oxidativo favorecem a qualidade e a progressão do desenvolvimento de embriões expostos à alta tensão de oxigênio.

Os resultados do enriquecimento de vias pelos miRNAs mais expressos na alta tensão de oxigênio demonstraram a presença de vias de câncer, como câncer pancreático e câncer de próstata, além da via da leucemia mieloide crônica. O transcrito *STAT3* (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3), mais expresso na alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio, foi associado as vias de câncer de pâncreas e leucemia mieloide crônica promovendo as funções de angiogênese e anti-apoptótica, respectivamente. Os resultados estão de acordo com Li e colaboradores (2004, 2010), que relataram o aumento dos níveis

de *STAT3* mediante condições de estresse oxidativo induzido por EROs em células tumorais humanas. O *STAT3* é frequentemente ligado a funções de proliferação ou promoção da sobrevivência celular responsivo a citocinas (DARNELL JR; KERR; STARK, 1994; LI, Li et al., 2010). Este estudo não encontrou microRNAs significativamente alterados pelo estresse oxidativo para o gene alvo *STAT3*. O transcrito *HSP90AA1* (Proteína 1 *Heat Shock* 90kd), mais elevado na alta tensão em relação a baixa tensão de oxigênio, foi correlacionado com a via de câncer de próstata intermediando a função de proliferação, provavelmente, através da atividade de organização de subunidades do complexo celular para progressão do ciclo mitótico (WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008). Além disso, a *HSP90* é descrita como uma proteína chaperona altamente conservada responsável pela regulação da homeostase e resposta ao estresse oxidativo, e caracterizada pela alta expressão celular (FRANCO et al., 2013). Os resultados deste estudo concordam com o aumento de *HSP90* induzido pelo estresse oxidativo observado por Liu et al. (2016), que também associou a inibição de *HSP90* com indução da morte de células submetidas a condições de estresse. Este estudo não encontrou microRNAs significativamente alterados pelo estresse oxidativo para o gene alvo *HSP90AA1*. Neste contexto, é possível sugerir que o aumento nos níveis dos transcritos *STAT3* e *HSP90AA1* tem o objetivo de favorecer a viabilidade dos embriões submetidos a condições de estresse oxidativo.

Para avaliar a eficácia do tratamento com antioxidantes em reverter as alterações induzidas pelo estresse oxidativo, os 8 miRNAs (*bta-miR-378b*, *bta-miR-34c*, *bta-miR-19a*, *bta-miR-155*, *bta-miR-1260b*, *bta-miR-22-5p*, *bta-miR-210* e *bta-miR-140*) que apresentaram diferença significativa de expressão entre os grupos de embriões cultivados em alta e baixa tensões de oxigênio foram avaliados para dois grupos submetidos a condições de alta tensão de oxigênio na ausência e presença de antioxidantes. O tratamento com cisteína e cisteamina é comumente utilizado para aumentar os níveis de glutathione intracelular, o que aumenta a atividade de neutralização das EROs (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1997; ROCHA-FRIGONI, 2016). Uma vez que os níveis de EROs foram reduzidos após o uso dos antioxidantes, de modo semelhante ao observado anteriormente no grupo de Baixo O_2 , esperava-se observar uma expressão de miRNAs também semelhante à baixa tensão de O_2 . No entanto, a expressão dos miRNAs não apresentou diferença significativamente entre os grupos de alta tensão de oxigênio e alta tensão com C+C. Portanto, apesar da suplementação do meio de cultivo com cisteína e cisteamina ser eficiente na diminuição das

EROs, conforme demonstrado nesse estudo, ela não mimetizou a expressão de miRNAs observada na baixa tensão de oxigênio.

Em suma, o presente estudo propôs a investigação inédita da expressão dos miRNAs em embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos à condições de estresse oxidativo e suplementados com antioxidantes. Os resultados observados permitem inferir que o uso de cisteína e cisteamina no meio de cultivo não previne todas as alterações causadas pelo estresse oxidativo gerado pela alta tensão de O₂. Estudos sobre outros antioxidantes, com diferentes princípios de ação, são necessários para compreender como o estresse oxidativo modula a expressão de miRNAs durante a produção *in vitro* de embriões e para a seleção de uma suplementação com antioxidantes mais eficiente contra os efeitos do estresse oxidativo.

7.2.3. Conclusões

A alta tensão de oxigênio durante o cultivo de embriões bovinos foi capaz de gerar um modelo de estresse oxidativo eficiente para avaliação molecular em blastocistos produzidos *in vitro*. O estresse oxidativo gerou o aumento da metilação global nos blastocistos e alterou a expressão de 40 transcritos e 8 miRNAs. Entre as principais vias e funções alteradas destacam-se as vias de modulação epigenética, resposta ao estresse oxidativo e proliferação celular. Entre os transcritos ligados a alterações epigenéticas, o aumento da expressão dos transcritos *DNMT3A* e *PAF1* nos blastocistos cultivados na alta tensão de oxigênio pode justificar o padrão de hipermetilação observado nestes embriões. Estas modificações epigenéticas observadas podem justificar a menor expressão do miR-210 na alta tensão de oxigênio. A maior expressão do miR-210 na baixa tensão de oxigênio (5%) confirma o seu potencial como assinatura da condição de hipóxia. Por sua vez, o aumento da expressão dos transcritos ligados a resposta ao estresse oxidativo e proliferação celular nos embriões cultivados em alta tensão de oxigênio têm o objetivo de favorecer o potencial de sobrevivência e desenvolvimento dos embriões. Além disso, a investigação da eficácia do tratamento com cisteína e cisteamina em reverter as alterações de miRNAs causadas pelo estresse oxidativo não gerou resultados consistentes. Neste estudo a suplementação com cisteína e cisteamina não reverteu as alterações de expressão de RNAm observadas em embriões cultivados em condição de estresse oxidativo.

7.3. Experimento III

7.3.1. Padrão de secreção dos exossomos presentes no meio de cultivo de embriões bovinos nos dias 3 e 7

A descoberta da comunicação mediada por exossomos proporcionou um novo panorama para o estudo da comunicação bidirecional intercelular no ambiente de cultivo *in vitro*. O presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de secreção dos exossomos no ambiente *in vitro* de cultivo de embriões de forma semelhante ao realizado por Saadeldin et al. (2014) para embriões suínos. Os resultados do tamanho dos exossomos não demonstraram diferença entre os grupos de alta (117,8 nm) e baixa tensão (124,6 nm) de O₂ em D3 e apresentaram tamanho compatível com o diâmetro dos poros da zona pelúcida observados nas fases de zigoto (223 nm) e 8 células (203 nm) (VANROOSE et al., 2000).

Os exossomos isolados do meio de cultivo até D7 também não apresentam diferença significativa nos tamanhos dos exossomos entre a alta (112,24 nm) e a baixa (107,1 nm) tensão de oxigênio. Apesar da diminuição do tamanho das partículas entre os dias 3 e 7 do cultivo ser oposta ao observada por Saadeldin et al. (2014) em embriões suínos, ela está de acordo com os resultados de diminuição dos poros da zona pelúcida no estágio de mórula em relação aos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário demonstrados por Vanroose et al. (2000). Além disso, de forma semelhante ao observado em D3, no D7 os exossomos também apresentam tamanho compatível com os poros da zona pelúcida no estágio de mórula (155 nm). Quando avaliados juntos, estes resultados permitem sugerir que exossomos presentes próximos aos embriões bovinos possuem o potencial de transpor a zona pelúcida durante os estágios de zigoto, oito células e mórulas em condições de cultivo *in vitro* de alta e baixa tensão de oxigênio.

A concentração de exossomos no meio de cultivo até o dia 3 do desenvolvimento foi menor na alta tensão em comparação com a baixa tensão de O₂. Estudos de King, Michael e Gleadle (2012) e Salomon (2013) evidenciaram que a baixa tensão de oxigênio promove um aumento da concentração de exossomos liberados por células tumorais com alta capacidade metastática, que estimulam a progressão do desenvolvimento tumoral. A diminuição da concentração de exossomos observada na alta tensão de oxigênio pode, portanto, ser associado a um déficit na comunicação provocado pelo estresse oxidativo.

Após sete dias de cultivo, entretanto, o meio de cultivo da alta tensão apresentou maior concentração de exossomos em relação à baixa tensão de O₂. Os resultados de Vanroose e colaboradores (2000) reportaram o aumento na quantidade de poros durante o estágio de mórula. O aumento da concentração de exossomos e o aumento da quantidade de poros da zona pelúcida permitem sugerir que a comunicação entre as células é maior no terço final do desenvolvimento embrionário inicial. Quando comparados, os resultados de D3 e D7 sugerem que a exposição ao estresse oxidativo é capaz de alterar a concentração de partículas do meio de cultivo da produção *in vitro* de embriões. Apesar de inicialmente as condições de estresse oxidativo aparentarem dificultar a comunicação, no terço final do desenvolvimento inicial é possível observar um comportamento oposto, que sugere uma resposta celular à condição de estresse oxidativo prolongado, que pode impactar na qualidade dos embriões.

7.3.2. Vias enriquecidas pelos miRNAs presentes no conteúdo dos exossomos do meio de cultivo nos dias 3 e 7

Neste estudo avaliamos alterações encontradas na expressão dos microRNAs de exossomos isolados do meio de cultivo da produção *in vitro* de embriões bovinos na presença e ausência de condições de estresse oxidativo. Inicialmente foram identificados 15 e 18 microRNAs diferentemente expressos entre a alta e baixa tensão de O₂ para os dias 3 e 7 do cultivo, respectivamente. Os resultados do enriquecimento das vias pelos miRNAs demonstraram que para todos os grupos, em D3 e D7, as vias com maior número de genes enriquecidos são vias de câncer. Em geral as vias de câncer são associadas a função de progressão do ciclo mitótico para promoção da proliferação celular, corroborando com a função anti-apoptose (VLACHOS et al., 2015). A associação entre os exossomos e a atividade de manutenção da sobrevivência celular foi previamente descrita por Ng et al. (2013) e Salomon et al. (2013), respectivamente nos cultivos de células uterinas e placentária. No entanto, o relato do enriquecimento de vias, com função de proliferação, baseado em microRNAs de exossomos obtidos do meio de cultivo *in vitro* de embriões é inédito.

A via de sinalização FOXO, ligada ao mecanismo de resposta ao estresse oxidativo, foi enriquecida pelos miRNAs elevados em vesículas do cultivo em alta tensão em comparação com a baixa tensão de oxigênio, em D3 e D7. Alterações induzidas pelo estresse oxidativo

sobre o conteúdo de microRNAs e proteínas foram relatadas, respectivamente, por King, Michael e Gleadle (2012) em células de tumor e Salomon et al. (2013) em células de placenta. Os resultados deste estudo, portanto, corroboram com a hipótese que o estresse oxidativo é capaz de gerar alterações no conteúdo de miRNAs dos exossomos.

O miR-210 apresentou maiores níveis em exossomos do meio de cultivo submetido a baixa tensão de oxigênio (5%), o mesmo resultado foi observado para os microRNAs nos blastocistos (conforme exposto nos resultados – experimento II: 6.2.3.). Os níveis elevados do miR-210 no ambiente de baixa tensão de oxigênio (1%) em comparação com a alta tensão (20%) também foi observada por King, Michael e Gleadle (2012) em células tumorais. Kulshreshtha et al. (2007) descreveram o miR-210 como uma assinatura da condição de hipóxia. No contexto do ambiente de cultivo da produção *in vitro* de embriões, o miR-210 pode ser indicado como uma assinatura molecular para estado de normoxia embrionária, uma vez que o oviduto e o útero materno apresentam tensões de oxigênio fisiológicas próximas de 5 a 7% (FISCHER; BAVISTER, 1993; HARVEY, 2007). É importante ressaltar que não existem relatos anteriores de mensuração dos níveis de microRNAs em exossomos isolados do cultivo *in vitro* de embriões bovinos na presença e ausência de estresse oxidativo.

7.3.3. Conclusões

A diminuição da concentração dos exossomos observado no meio de cultivo em D3 da alta tensão, e o posterior aumento da concentração de partículas em D7 também para a alta tensão de oxigênio, permitem inferir que após exposição crônica o estresse oxidativo é capaz de alterar a comunicação intercelular no ambiente de cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Além disso, o estudo permitiu a identificação do miR-210 indicado como biomarcador molecular não invasivo para estado de normoxia (5% de O₂) do desenvolvimento embrionário bovino. Estes dados reunidos permitem concluir que o estresse oxidativo é capaz de gerar alterações no cultivo *in vitro* de embriões, que refletem no conteúdo de miRNAs de exossomos presentes no meio de cultivo. De modo geral, o estudo contribuiu para a compreensão da atividade celular de embriões produzidos *in vitro* em condições de estresse oxidativo.

8. Conclusão

O sistema de cultivo de alta tensão de oxigênio para embriões bovinos produzidos *in vitro* confirmou a hipótese inicial de que a alta tensão de oxigênio é capaz de gerar um modelo de estresse oxidativo que permite o estudo de biomoléculas do embrião e dos exossomos secretados no meio de cultivo nos dias 3 e 7 do desenvolvimento embrionário. O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos do estresse oxidativo no embrião e nos exossomos do meio de cultivo da PIVE. Com o objetivo específico de compreender como a alta tensão de oxigênio afeta os embriões consequentemente reduzindo as taxas de prenhes, este estudo se propôs analisar a via de sinalização ERBB, descrita como uma via de interação materno-embrionária. Apesar do miR-199a-5p, descrito como possível regulador dos gene alvo *ERBB2* e *ERBB3*, ter apresentado maior expressão nos embriões cultivados em alta tensão, os transcritos *ERBB2* e *ERBB3* e a proteína *ERBB2* não apresentaram diferença significativa entre os grupos de alta e baixa tensão de oxigênio. A partir destes resultados não há indicação que o miR-199a-5p atuem como regulador pós-transcricional do *ERBB2* para embriões bovinos. Portanto, outros estudos são necessários para compreender como o estresse oxidativo interfere no potencial de implantação do embrião, comprometendo as taxas de gestação de embriões cultivados em alta tensão de oxigênio.

Ao refutar a hipótese de que o miR-199a-5p exerce regulação sobre o gene alvo *ERBB2* em bovinos, este estudo explorou a expressão de outros 96 transcritos e 378 miRNAs, buscando estabelecer outras relações que explicassem as desordens nos sistemas de reprogramação epigenética e resposta ao estresse oxidativo nos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram encontrados 40 RNAm e 8 miRNAs que apresentaram alterações significativas entre os embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio. Além disso, os embriões cultivados em alta tensão de oxigênio também apresentaram altos níveis de metilação do DNA. Esta hipermetilação do DNA foi relacionada com o aumento de expressão de transcritos que promovem a metilação do DNA, como *DNMT3* e *PAF1*. Com relação aos transcritos ligados à resposta ao estresse oxidativo, os RNAm *SOD1* e *CAT* também foram encontrados mais expressos nos embriões cultivados na alta tensão de oxigênio. A análise de bioinformática do enriquecimento de vias pelos miRNAs diferentemente expressos revelou a presença da via de sinalização FOXO, que está associada à resposta ao estresse oxidativo

mediante a transcrição de enzimas antioxidantes como SOD e CAT. Portanto, tanto a análise dos transcritos como das vias enriquecidas pelos miRNAs levam a uma resposta mediada pelo SOD e pela CAT, destacando a importância destas enzimas no processo de ativação de mecanismos de proteção dos embriões expostos à condição de estresse oxidativo.

Por fim, para compreender o efeito do estresse oxidativo sobre a comunicação celular no microambiente de cultivo *in vitro* este estudo se propôs a analisar os exossomos isolados do meio de cultivo após 3 dias e 7 dias do desenvolvimento. Os resultados observados confirmaram a hipótese de que o estresse oxidativo altera a concentração de exossomos no meio de cultivo e também modifica a expressão dos miRNAs do seu conteúdo. O miR-210, por exemplo, foi observado mais expressos nos exossomos isolados do meio de cultivo de baixa tensão em D7. Apesar do miR-210 ser considerado uma molécula assinatura da condição de hipóxia, como o ambiente fisiológico uterino apresenta baixa tensão de oxigênio (5 a 7%) este trabalho considerou o miR-210 como biomarcador não invasivo da condição de normoxia no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Em conclusão, esse estudo contribuiu com conhecimentos sobre a expressão de miRNAs presentes no embrião e nos exossomos do meio de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões em dois modelos de cultivo, alta tensão de oxigênio, que caracteriza a condição de estresse oxidativo celular, e baixa tensão de oxigênio, que estaria próxima às condições fisiológicas. Outros estudos, no entanto, são necessários para compreender com totalidade a influência da regulação dos miRNAs sobre vias importantes para a interação materno-embrionária, como a via de sinalização ERBB.

9. Referências

- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, v. 4, p. e05005, 2015.
- AL-DOSSARY, A. A.; MARTIN-DELEON, P. A. Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 21, p. 1278-1285, 2015.
- AL-DOSSARY, A. A.; STREHLER, E. E.; MARTIN-DELEON, P. A. Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e80181, 2013.
- ALMIÑANA, C. Snooping on a private conversation between the oviduct and gametes/embryos. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 366-374, 2015.
- AMERES, S. L.; MARTINEZ, J.; SCHROEDER, R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 101-112, 2007.
- AMIN, A. et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction & Development**, v. 81, p. 497-513, 2014.
- APLIN, J. D. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 13, n. 6, p. 833-839, 2006.
- BAECKSTROM, D.; ALFORD D.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Morphogenetic and proliferative responses to heregulin of mammary epithelial cells in vitro are dependent on HER2 and HER3 and differ from the responses to HER2 homodimerisation or hepatocyte growth factor. **International Journal of Oncology**, v. 16, n. 6, p. 1081-90, 2000.
- BARKALINA, N. et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of molecular compounds into gametes and embryos: learning from nature. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 5, p. 627-639, 2015.
- BARNES, F. L.; FIRST, N. L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, n. 2, p. 117-123, 1991.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.
- BAZER, F. W. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 23, p. 1-10, 2013.

BAZER, F. W. et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 135-153, 2010.

BETTERIDGE, K. J.; FLECHON, J. E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 155-187, 1988.

BING, Y. Z. et al. Effects of thioredoxin on the preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 3, p. 863-873, 2003.

BINISZKIEWICZ, D. et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2124-2135, 2002.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6-21, 2002.

BONTEKOE, S. et al. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. **The Cochrane Library**, 2012.

BRADDOCK, G. W.; BALDWIN, J. P.; BRADBURY, E. M. Neutron-scattering studies of the structure of chromatin core particles in solution. **Biopolymers**, v. 20, n. 2, p. 327-343, 1981.

BROWN, N. et al. Embryo-uterine interactions via the neuregulin Family of growth factors during implantation in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2003-2011, 2004.

CARSON, D. D. et al. Embryo Implantation. **Developmental Biology**, v. 223, p. 217-237, 2000.

CHO, H. S.; LEAHY, D. J. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. **Science**, v. 297, n. 1095-9203 (Electronic), p. 1330-1333, 2002.

CROCOMO, L. et al. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470-479, 2012.

DARNELL JR, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science-AAAS-weekly paper edition-including guide to scientific information**, v. 264, n. 5164, p. 1415-1420, 1994.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1420-1425, 1997.

DE MATOS, D. G. et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 432-436, 1995.

DE MATOS, D. G. et al. Stimulation of Glutathione Synthesis of In Vitro Matured Bovine Oocytes and-ItsEffect on Embryo Development and Freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 451-457, 1996.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & Development**, v. 25, n. 10, p. 1010-1022, 2011.

DING, L. et al. A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. **Cell stem cell**, v. 4, n. 5, p. 403-415, 2009.

DOWNS, S. M.; DOW, M. P. Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 6, p. 1025-1039, 1991.

DUMOULIN, J. C. M. et al. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 465-469, 1999.

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

FABBRI, M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 40, p. 15805-15810, 2007.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 673-679, 1993.

FOCK, V. et al. Trophoblast subtype-specific EGFR/ERBB4 expression correlates with cell cycle progression and hyperplasia in complete hydatidiform moles. **Human Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 789-799, 2015.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 2, p. 189-195, 2012.

FRANCO, M. C. et al. Nitration of Hsp90 induces cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. E1102-E1111, 2013.

GARCÍA, P. et al. Genome-wide Screening of Regulators of Catalase Expression ROLE OF A TRANSCRIPTION COMPLEX AND HISTONE AND tRNA MODIFICATION COMPLEXES ON ADAPTATION TO STRESS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 2, p. 790-799, 2016.

GASPAR, R. C. et al. Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro–produced embryos in a bovine model. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1408-1415, 2015.

GASPARRINI, B. et al. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 943-952, 2003.

GASPARRINI, B. et al. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, p. 275-287, 2006.

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**, v. 25, n. 2, p. 82-90, 2009.

GRAF, A. et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4139-4144, 2014.

GREENING, D. W. et al. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. **Biology of Reproduction**, p. 115, 2016.

GRIFFITHS, G. S. et al. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 11, p. 1627-1636, 2008.

GU, T. P. et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 606-610, 2011.

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

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835-840, 2010.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509-524, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Capitulo 7: Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. p. 354-410.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1, p. 113-128, 2007.

HARVEY, A. J. et al. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1108-1119, 2004.

HARVEY, M. B. et al. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 3, p. 532-540, 1995.

HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production. **Journal Animal Science**, v. 76, n. 3, p. 52-74, 1998.

HE, J. et al. Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR-199a/125b and DNA methylation. **EMBO Reports**, v. 13, n. 12, p. 1116-1122, 2012.

HENIKOFF, S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. **Nature Publishing Group**, v. 9, p. 15-26, 2008.

HIRASAWA, R. et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. **Genes & Development**, v. 22, n. 12, p. 1607-1616, 2008.

IORIO, M. et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8699-8707, 2007.

IQBAL, K. et al. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3642-3647, 2011.

ISHIKAWA, T. et al. Design and synthesis of novel human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/epidermal growth factor receptor (EGFR) dual inhibitors bearing a pyrrolo[3,2-d]pyrimidine scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 8030-8050, 2011.

IWAKAWA, H.-O.; TOMARI, Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. **Molecular Cell**, v. 52, n. 4, p. 591-601, 2013.

KING, H. W.; MICHAEL, M. Z.; GLEADLE, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

KLONISCH, T. et al. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1835-1844, 2001.

KORNBERG, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. **Science**, v. 184, n. 4139, p. 868-871, 1974.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 285-294, 1999.

KROGAN, N. J. et al. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 721-729, 2003.

KULSHRESHTHA, R. et al. A microRNA signature of hypoxia. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1859-1867, 2007.

LEE, Y. M. et al. MicroRNA regulation via DNA methylation during the morula to blastocyst transition in mice. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 184-193, 2012.

LI, L. et al. Modulation of gene expression and tumor cell growth by redox modification of STAT3. **Cancer Research**, v. 70, n. 20, p. 8222-8232, 2010.

LI, L.; SHAW, P. E. A STAT3 dimer formed by inter-chain disulphide bridging during oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 3, p. 1005-1011, 2004.

LI, L.; ZHENG, P.; DEAN, J. Maternal control of early mouse development. **Development**, v. 137, n. 6, p. 859-870, 2010.

LI, W. et al. High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 948-956, 2014.

LIU, Q. et al. Inhibition of HSP90 promotes neural stem cell survival from oxidative stress through attenuating NF- κ B/p65 activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

LOPERA-VASQUEZ, R. et al. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. **Reproduction**, v. 153, n. 4, p. 461-470, 2017.

MACABELLI, C. H. et al. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e93287, 2014.

MACHTINGER, R.; LAURENT, L. C.; BACCARELLI, A. A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 2, p. dm055, 2015.

MAJID, S. et al. miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 73-84, 2013.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, p. 1, 2002.

MATSUI, M. et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. **Developmental Biology**, v. 178, n. 1, p. 179-185, 1996.

MAYER, W. et al. Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 501-502, 2000.

MCBRIDE, D. et al. Identification of miRNAs associated with the follicular–luteal. **Reproduction Research**, v. 144, p. 221-233, 2012.

MCGEADY, T. A. et al. Capítulo 10: Forms of Implantation and Placentation. In: **Veterinary Embryology**. Blackwell: Oxford, 2006.

MENEZO, Y. J. R. et al. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668-683, 2016.

MIORANZA, A. **Estudo in silico de elementos regulatórios do genoma e análise do padrão de metilação no DNA de embriões bovinos produzidos por fertilização in vitro e clonagem**. 2014, 39-67 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MITTELBRUNN, M. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature Communications**, v. 2, p. 282, 2011.

MORALES, H. et al. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 149-157, 1999.

NAGY, P. et al. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 22, p. 4251-4262, 2002. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/115/22/4251.abstract> >. Acesso em: 21 nov. 2016.

NASR-ESFAHANI, M. M.; JOHNSON, M. H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. **Development**, v. 113, n. 2, p. 551-560, 1991.

NEGRO, A.; BRAR, B. K. Essential Roles of Her2/erbB2 in Cardiac Development and Function. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 59, p. 1-12, 2004.

NG, Y. H. et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58502, 2013.

NGUYEN, C. T. et al. The PAF1 complex component Leo1 is essential for cardiac and neural crest development in zebrafish. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 167-175, 2010.

OKADA, Y.; YAMAGUCHI, K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-11, 2017.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature Genetics**, v. 19, n. 3, p. 219-220, 1998.

ONO, M.; KUWANO, M. Molecular Mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 7242-7251, 2006.

PINKAS-KRAMARSKI, R. et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signalling by combinatorial receptor interactions. **EMBO Journal**, v. 15, n. 10, p. 2452-2467, 1996.

PONTES, J. P. **Aspectos aplicados da produção in vitro de embriões Bos indicus**. 2009, 126-127 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2009.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.

REESE, J. et al. Expression of neu differentiation factor during the periimplantation period in the mouse uterus. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 719-727, 1998.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Science**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

RICARTE-FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006.

ROCHA-FRIGONI, N. A. D. S. **Estratégias para minimização do estresse oxidativo em sistemas de produção in vitro de embriões bovinos destinados à vitrificação**. 2016, 22-41 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S. et al. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 6, p. 797-805, 2014.

SAADELDIN, I. M. et al. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. **Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells)**, v. 16, n. 3, p. 223-234, 2014.

SALOMON, C. et al. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79636, 2013.

SANTOS, F. et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Developmental Biology**, v. 241, n. 1, p. 172-182, 2002.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s4, p. 148-155, 2012.

SPENCER, T. E. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 4, n. 23, p. 1-10, 2007.

STEFFENSEN, K. et al. Protein levels and gene expression of the epidermal growth factor receptors HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 1, p. 195-204, 2008.

SUZUKI, H. et al. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. 258, 2013. Disponível em:
< <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00258> >. Acesso em: 23 jan. 2017.

TAN, K. et al. Downregulation of miR-199a-5p Disrupts the Developmental Potential of In Vitro-Fertilized Mouse Blastocysts 1. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 3, p. 54-1, 2016.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581-593, 2009.

UYSAL, F.; AKKOYUNLU, G.; OZTURK, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. **Biochimie**, v. 116, p. 103-113, 2015.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VANROOSE, G. et al. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 463-469, 2000.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W460-W466, 2015.

WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18473-18477, 2008.

WATANABE, D. et al. Stage-and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. **Mechanisms of development**, v. 118, n. 1, p. 187-190, 2002.

WATANABE, T. et al. Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3738-3748, 2008.

WOSSIDLO, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature Communications**, v. 2, p. 241, 2011.

WYDOOGHE, E. et al. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? **Biological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 1-16, 2015.

XIONG, L. et al. DNA demethylation regulates the expression of miR-210 in neural progenitor cells subjected to hypoxia. **FEBS Journal**, v. 279, n. 23, p. 4318-4326, 2012.

YAMANAKA, K. I. et al. DNA methylation analysis on satellite I region in blastocysts obtained from somatic cell cloned cattle. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 4, p. 523-530, 2011.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35052073> >. Acesso em: 22 nov. 2016.

YOON, S. et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 1-10, 2014.

ZHANG, G. et al. Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 12, p. 6112-6124, 2015.

APÊNDICE A – Tabelas suplementares

Tabela suplementar S.1. Sequência dos *primers forward* específicos para o perfil de 378 miRNAs e 3 endógenos (*) presentes na placa de amplificação.

miRNA	Sequencia	miRNA	Sequencia
bta-let-7a-3p	CTATACAATCTACTGTCTTTC	bta-miR-302d	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGT
bta-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	bta-miR-3064	TTGCCACACTGCAACACCTTACA
bta-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	bta-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT
bta-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	bta-miR-30b-3p	CTGGGAGGTGGATGTTTACTT
bta-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	bta-miR-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT
bta-let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT	bta-miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
bta-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	bta-miR-30d	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT
bta-let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	bta-miR-30e-5p	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT
bta-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	bta-miR-30f	TGTAAACACCCTACACTCTCAGCT
bta-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	bta-miR-31	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
bta-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG	bta-miR-32	TATTGCACATGACTAAGTTGCAT
bta-miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA	bta-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	bta-miR-320b	AGCTGGGTTGAGAGGGTGGT
bta-miR-105a	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT	bta-miR-323	GCACATTACACGGTCGACCTCT
bta-miR-105b	TCAAATGCTCAGACTCCTTGGT	bta-miR-324	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
bta-miR-106a	AAAAGTGCTTACAGTGACAGGTA	bta-miR-326	CCTCTGGGCCCTTCCTCCAG
bta-miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGACAGAT	bta-miR-328	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT
bta-miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC	bta-miR-329a	AACACACCTGGTTAACCTTTTT
bta-miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	bta-miR-329b	AGAGGTTTTCTGGGTTTCTGTTT
bta-miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	bta-miR-330	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGA
bta-miR-1179	AAGCATTCTTTCATTGGTTGG	bta-miR-331-3p	GCCCCTGGGCTATCCTAGAA
bta-miR-1185	AGAGGATACCCTTTGTATGTT	bta-miR-331-5p	TCTAGGTATGGTCCCAGG
bta-miR-1193	TAGGTCACCCGTTTGACTATC	bta-miR-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT
bta-miR-1197	TAGGACACATGGTCTACTTCT	bta-miR-338	TCCAGCATCAGTGATTTTGTGTA
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG	bta-miR-339a	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCAC
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG	bta-miR-339b	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC
bta-miR-1224	GTGAGGACTCGGGAGGTGGAG	bta-miR-33a	GTGCATTGTAGTTGCATTGCA
bta-miR-1225-3p	CCGAGCCCCTGTGCCGCCCCCAG	bta-miR-33b	GTGCATTGCTGTTGCATTGC
bta-miR-1246	AATGGATTTTGGAGCAGG	bta-miR-340	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGCC
bta-miR-1247-3p	CGGGAACGTCGGGACTGGAGC	bta-miR-342	TCTCACACAGAAATCGACCCATCT
bta-miR-1247-5p	ACCCGTCCCGTGCGTCCCCGGA	bta-miR-345-3p	CCTGAAGTAGGGGTCTGGAG
bta-miR-1248	ACCTTCTTGTATAAGCACTGTGCTAAA	bta-miR-345-5p	GCTGACTCCTAGTCCAGTGCT
bta-miR-1249	ACGCCCTTCCCCCTTCTTCA	bta-miR-346	TGTCTGCCCGCATGCCTGCCTCT
bta-miR-124a	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-miR-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
bta-miR-124b	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-miR-34b	AGGCAGTGTAATTAGCTGATTG
bta-miR-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG	bta-miR-34c	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTG
bta-miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTA	bta-miR-361	TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC

bta-miR-1260b	ATCCCACCACTGCCACCA	bta-miR-362-3p	AACACACCTATTCAAGGATTC
bta-miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG	bta-miR-362-5p	AATCCTTGAACCTAGGTGTGAGT
bta-miR-126-5p	CATTATTACTTTTGGTACGCG	bta-miR-363	ATTGCACGGTATCCATCTGCG
bta-miR-127	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	bta-miR-365-3p	TAATGCCCTAAAAATCCTTAT
bta-miR-1271	CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA	bta-miR-365-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG
bta-miR-1277	TACGTAGATATATATGTATTTT	bta-miR-367	GAATTGCACTTTAGCAATGGTGA
bta-miR-128	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT	bta-miR-369-3p	AATAATACATGGTTGATCTTT
bta-miR-1281	TCGCCTCCTCCTCTCCC	bta-miR-369-5p	ATCGACCGTGTTATATTCGC
bta-miR-1282	TCGTTTGCCTTTTTCTGCTT	bta-miR-370	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
bta-miR-1284	TCTGCACAGACCTGGCTTTTC	bta-miR-371	AAGTGCCGCCATGTTTTGAGTGT
bta-miR-1287	TGCTGGATCAGTGGTTTGAGTC	bta-miR-374a	TTATAATACAACCTGATAAGTG
bta-miR-129	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-374b	ATATAATACAACCTGCTAAGTG
bta-miR-1291	TGGCCCTGACTGAAGACCTGCAGT	bta-miR-375	TTTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA
bta-miR-129-3p	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT	bta-miR-376a	ATCATAGAGGAAAAATCCACGT
bta-miR-129-5p	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-376b	ATCATAGAGGAAAAATCCATGTT
bta-miR-1296	TTAGGGCCCTGGCTCCATCTCC	bta-miR-376c	GTGGATATTCCTTCTATGTTTA
bta-miR-1298	TTCATTGGCTGTCCAGATGTA	bta-miR-376d	ATCATAGAGGAAAAATCCACAT
bta-miR-1301	TTGCAGCTGCCTAGGAGTGATTTT	bta-miR-376e	AACATAGAGGAAAAATCCACATT
bta-miR-1306	CCACCTCCCCTGCAAACGTCC	bta-miR-377	ATCACACAAAGGCAACTTTTGT
bta-miR-1307	ACTCGGCGTGGCGTCGGTCGTG	bta-miR-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-130a	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT	bta-miR-378b	ACTTGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-130b	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT	bta-miR-378c	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGT
bta-miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG	bta-miR-378d	CTGGACTTGGAGTCAGAAGACC
bta-miR-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	bta-miR-379	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-133b	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA	bta-miR-380-3p	TATGTAATGTGGTCCACGTCT
bta-miR-133c	ATTTGGTTCCATTTTACCAGC	bta-miR-380-5p	TGGTTGACCATAGAACATGCGC
bta-miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGTGG	bta-miR-381	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-1343-3p	CTCCTGGGGCCCGCACTCTC	bta-miR-382	GAAGTTGTTCTGTGGTGGATTCTG
bta-miR-1343-5p	TGGGGAGCGGCCCCGGGCGGG	bta-miR-383	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-135a	TATGGCTTTTTATTCTATGTGA	bta-miR-409a	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAT
bta-miR-135b	TATGGCTTTTCATTCTATGTGA	bta-miR-409b	GGGGTTACCCGAGCAACATTC
bta-miR-136	ACTCCATTTGTTTTGATGATGGA	bta-miR-410	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG	bta-miR-411a	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG	bta-miR-411b	TGGTCGACCATAAAACGTACGT
bta-miR-1388-3p	ATCTCAGGTTTGTACGCCGCA	bta-miR-411c-3p	TGTATGTCAACTGATCCACAGT
bta-miR-139	TCTACAGTGACGTGTCTCCAGT	bta-miR-411c-5p	GGTTGATCAGAGAACATACATT
bta-miR-140	TACCACAGGGTAGAACCACGGA	bta-miR-412	ACTTCACCTGGTCCACTAGCTGT
bta-miR-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG	bta-miR-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-miR-142-3p	AGTGTTTCTACTTTATGGATG	bta-miR-423-3p	AAGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT
bta-miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTAC	bta-miR-423-5p	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT
bta-miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCG	bta-miR-424-3p	CAAACGTGAGGCGCTGCTAT
bta-miR-144	TACAGTATAGATGATGTACTAG	bta-miR-424-5p	CAGCAGCAATTCATGTTTTGA
bta-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	bta-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCCGCC
bta-miR-146a	TGAGAACTGAATTCCATAGGTTGT	bta-miR-425-5p	ATGACACGATCACTCCCGTTGA

bta-miR-146b	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT	bta-miR-429	TAATACTGTCTGGTAATGCCGT
bta-miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA	bta-miR-431	TGTCTTGCAGGCCGTCATGCAGG
bta-miR-148a	TCAGTGCACACAGAACTTTGT	bta-miR-432	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGTGG
bta-miR-148b	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	bta-miR-433	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT
bta-miR-149-3p	GAGGGAGGGACGGGGGCTGTGC	bta-miR-448	TTGCATATGTAGGATGTCCCAT
bta-miR-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC	bta-miR-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
bta-miR-150	TCTCCCAACCTTGTACCACTGT	bta-miR-449b	AGGCAGTGTATTGTTAGCTGGC
bta-miR-151-3p	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	bta-miR-449c	AGGCAGTGCATCTCTAGCTGG
bta-miR-151-5p	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	bta-miR-449d	GAAGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-152	TCAGTGCATGACAGAACTTGGG	bta-miR-450a	TTTTGCGATGTGTTCTTAATAT
bta-miR-153	TTGCATAGTCACAAAAGTGATC	bta-miR-450b	TTTTGCAATATGTTCTGAATA
bta-miR-154a	TAGGTTATCCGTGTAGCCTTCG	bta-miR-451	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT
bta-miR-154b	AGAGGTCTTCCATGGTGCATTGG	bta-miR-452	TGTTTGCAGAGGAACTGAGAC
bta-miR-154c	AGATATTGCACGGTTGATCTCT	bta-miR-4523	GACCGAGAGGGCCTCGGCTGT
bta-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	bta-miR-453	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA
bta-miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	bta-miR-454	TAGTGCAATATTGCTTATAGGGT
bta-miR-15b	TAGCAGCACATCATGGTTTACA	bta-miR-455-3p	GCAGTCCATGGGCATATACACT
bta-miR-16a	TAGCAGCACGTAAATATTGGTG	bta-miR-455-5p	TATGTGCCTTTGGACTACATC
bta-miR-16b	TAGCAGCACGTAAATATTGGC	bta-miR-483	TCACTCCTCTCCTCCCGTCTT
bta-miR-17-3p	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT	bta-miR-484	TCAGGCTCAGTCCCCTCCCGAT
bta-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGAGGTAGT	bta-miR-485	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTGG
bta-miR-181a	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTT	bta-miR-486	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG
bta-miR-181b	AACATTCAATGCTGTCGGTGAGTT	bta-miR-487a	AATCATACAGGGACATCCAGT
bta-miR-181c	AACATTCAACCTGTCGGTGAGTTT	bta-miR-487b	AATCGTACAGGGTCATCCACTT
bta-miR-181d	AACATTCAATGTTGTCGGTGAGTT	bta-miR-488	TTGAAAGGCTGTTTCTTGCTC
bta-miR-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT	bta-miR-489	GTGACATCACATATATGGCGAC
bta-miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCAGTG	bta-miR-490	CAACCTGGAGGACTCCATGCTG
bta-miR-184	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT	bta-miR-491	AGTGGGGAACCTTCCATGAGG
bta-miR-185	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA	bta-miR-493	TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
bta-miR-186	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT	bta-miR-494	TGAAACATACACGGGAAACCTC
bta-miR-187	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGG	bta-miR-495	AAACAAACATGGTGCACTTCTT
bta-miR-188	CATCCCTTGCATGGTGGAGGGT	bta-miR-496	TGAGTATTACATGGCCAATCTC
bta-miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATA	bta-miR-497	CAGCAGCACACTGTGGTTTGTA
bta-miR-18b	TAAGGTGCATCTAGTGCAGTTA	bta-miR-499	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT
bta-miR-190a	TGATATGTTTGATATATTAGGT	bta-miR-500	TAATCCTTGCTACCTGGGTGAGA
bta-miR-190b	TGATATGTTTGATATTGGGTT	bta-miR-502a	AATGCACCTGGGCAAGGATTCA
bta-miR-191	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG	bta-miR-502b	AATCCACCTGGGCAAGGATTC
bta-miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCCAG	bta-miR-503-3p	GGAGTATTGTTTCTGCTGCCCGG
bta-miR-193a	GGGACTTTGTAGGCCAGTT	bta-miR-503-5p	TAGCAGCGGGAACAGTACTG
bta-miR-193a-3p	AACTGGCCTACAAAGTCCAGT	bta-miR-504	AGACCCTGGTCTGCACTCTGTC
bta-miR-193a-5p	TGGGTCTTTCGCGGCGAGATGA	bta-miR-505	CGTCAACACTTGCTGGTTTCTT
bta-miR-193b	AACTGGCCACAAAGTCCCGCTTT	bta-miR-532	CATGCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	bta-miR-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT
bta-miR-195	TAGCAGCACAGAAATATTGGCA	bta-miR-541	TGGTGGGCACAGAAATCCGGCCT

bta-miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	bta-miR-542-5p	TCGGGGATCATCATGTACAGAG
bta-miR-196b	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGA	bta-miR-543	AAACATTCGCGGTGCACTTCTT
bta-miR-197	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC	bta-miR-544a	ATTCTGCATTTTTAGCAAGTTC
bta-miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA	bta-miR-544b	ATTCTGCATTTCTAACAAGTTC
bta-miR-199a-5p	CCCAGTGTTCACTACCTGTT	bta-miR-545-3p	ATCAACAAACATTTATTGTGTG
bta-miR-199b	CCCAGTGTTAGACTATCTGTTC	bta-miR-545-5p	TCAGTAAATGTTTATTGGATG
bta-miR-199c	TACAGTAGTCTGCACATTGG	bta-miR-551a	GCGACCCAATCTTGGTTTCCA
bta-miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	bta-miR-551b	GGCGACCCATACTTGGTTTCAG
bta-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA	bta-miR-562	AAAGCAGCTGTACCATTTAC
bta-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	bta-miR-568	ATGTATAAATGTATACACAC
bta-miR-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATG	bta-miR-574	TGAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTG
bta-miR-200c	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	bta-miR-582	TTACAGTTGTTCAACCAGTTACT
bta-miR-202	TTCTATGCATATACTTCTTT	bta-miR-584	TGGTTTGCCTGGGACTGAG
bta-miR-204	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	bta-miR-592	ATTGTGTCAATATGCGATGATGT
bta-miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG	bta-miR-599	GTTGTGTCAGTTTATCAAAC
bta-miR-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	bta-miR-615	GGGGGTCCCCGGTGCTCGGATC
bta-miR-208a	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT	bta-miR-628	ATGCTGACATATTTACTAGAGG
bta-miR-208b	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT	bta-miR-631	AGACCTGGCTTAGACCTCAGC
bta-miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	bta-miR-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG
bta-miR-20b	CAAAGTGCTCACAGTGCAGGTA	bta-miR-653	GTGTTGAAACAATCTCTGTTG
bta-miR-210	ACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	bta-miR-654	TATGTCTGCTGACCATCACCTT
bta-miR-211	TTCCCTTTGTCATCCTTTGCC	bta-miR-655	ATAATACATGGTTAACCTCTCT
bta-miR-212	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTACT	bta-miR-656	AATATTATACAGTCAACCTCT
bta-miR-21-3p	AACAGCAGTCGATGGGCTGTCT	bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGTCCGTTGGT
bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	bta-miR-660	TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-215	ATGACCTATGAATTGACAGACA	bta-miR-664a	CAGGCTGGGGTGTGTGTGGATG
bta-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT	bta-miR-664b	TATTCATTTATCTCCCAGCCTAC
bta-miR-216a	TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA	bta-miR-665	ACCAGTAGGCCGAGGCCCT
bta-miR-216b	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA	bta-miR-669	TGTGGGTGTGTGCATGTGCGTG
bta-miR-217	TACTGCATCAGGAACTGATTGGAT	bta-miR-670	TCCCTGAGTATATGTGGTGAA
bta-miR-218	TTGTGCTTGATCTAACCATGTG	bta-miR-671	AGGAAGCCCTGGAGGGGCTGGAG
bta-miR-219	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG	bta-miR-677	CTCACTGATGAGCAGCTTCTGAC
bta-miR-219-3p	AGAATTGTGGCTGGACATCTG	bta-miR-7	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT
bta-miR-219-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCTT	bta-miR-708	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGG
bta-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	bta-miR-744	TGCGGGGCTAGGGCTAACAGCA
bta-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	bta-miR-758	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC
bta-miR-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	bta-miR-759	GCAGACTGCAAACAATTTTGAC
bta-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTG	bta-miR-760-3p	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA
bta-miR-224	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTA	bta-miR-760-5p	CCCCTCAGTCCACCAGAGCCCG
bta-miR-22-5p	AGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTA	bta-miR-761	GCAGCAGGGTGAAACTGACACA
bta-miR-23a	ATCACATTGCCAGGGATTCCA	bta-miR-763	CCAGCTGGGAGGAACCACTGGC
bta-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACCAC	bta-miR-764	GGTGCTCACTCGTCCTTCT
bta-miR-23b-5p	GGGTTCTGGCATGCTGATTT	bta-miR-767	TGCACCATGGTTGTCTGAGCATG
bta-miR-24	GTGCCACTGAGCTGATATCAGT	bta-miR-769	TGAGACCTCCGGGTCTGAGCT

bta-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	bta-miR-873	GCAGGAACTTGTGAGTCTCCT
bta-miR-25	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	bta-miR-874	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA
bta-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	bta-miR-875	TATACCTCAGTTTTATCAGGTG
bta-miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGTT	bta-miR-876	TGGATTTCTTTGTGAATCACCA
bta-miR-26c	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA	bta-miR-877	GTAAGAGAGATGGCGCAGGG
bta-miR-27a-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG	bta-miR-885	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
bta-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA	bta-miR-92a	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT
bta-miR-27b	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	bta-miR-92b	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC
bta-miR-28	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG	bta-miR-93	CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTA
bta-miR-296-3p	GAGGGTTGGGCGGAGGCTTTCC	bta-miR-935	CCAGTTACCGCTTCCGCTACCGC
bta-miR-296-5p	GAGGGCCCCCCCCAATCCT	bta-miR-9-3p	ATAAAGCTAGATAACCG
bta-miR-299	TGGTTTACCGTCCCACATACAT	bta-miR-940	AAGGCTGGGCCCCCGCTCCGC
bta-miR-29a	CTAGCACCATCTGAAATCGGTTA	bta-miR-95	TTCAACGGGTATTTATTGAGCA
bta-miR-29b	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	bta-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG
bta-miR-29c	TAGCACCATTTGAAATCGGTTA	bta-miR-96	TTTGGCACTAGCACATTTTTGCT
bta-miR-29d-3p	TAGCACCATTTGAAATCGATTA	bta-miR-98	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-29d-5p	TGACCGATTTCTCCTGGTGTT	bta-miR-99a-3p	CAAGCTCGCTTCTATGGGT
bta-miR-29e	TAGCATCATTTGAAATCAGTGTTT	bta-miR-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATCTTGT
bta-miR-301a	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGCAT	bta-miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
bta-miR-301b	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGCAT	bta-miR-99b*	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
bta-miR-302a	AAGTGCTTCCATGTTTTAGTGA	Hm/Ms/Rt T1 snRNA*	CGACTGCATAATTTGTGGTAGTGG
bta-miR-302b	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGTAG	RNT43 snoRNA*	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC
bta-miR-302c	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG		

Tabela suplementar S.2. Ensaios de microfluído dos 93 transcritos e 3 endógenos (*) avaliados para 8 repetições biológicas de embriões cultivados em alta ou baixa tensão de O₂.

Gene	ID (Thermo)	Nome
ACACA	Bt03213389_m1	Acetyl CoA carboxylase
ACSL3	Bt04282138_m1	Acyl-CoA Synthetase 3
ACSL6	Bt03231692_m1	Acyl-CoA Synthetase 6
ACTB*	PA5-16914	actin, beta
AQP3	Bt03253663_m1	aquaporin 3
ATF4	Bt03221057_m1	Activating transcription factor 4
ATP5L	Bt03210836_g1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit E
BAX	Bt03211777_g1	BCL2-Associated X Protein
BCL2	Bt04298952_m1	B-cell CLL/lymphoma 2
BID	Bt03241255_m1	BH3 interacting domain death agonist
CASP3	Bt03250954_g1	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP9	Bt04282453_m1	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
CAT	Bt03228713_m1	Catalase
CCND2	Bt03249250_m1	cyclin D2
CDCA8	Bt03257041_g1	Cell division cycle associated 8
CDK6	Bt04311264_m1	Cyclin-Dependent Kinase 6
CDX2	Bt03649157_m1	Homeobox protein CDX-2
DDIT3	Bt03251320_g1	DNA-damage-inducible transcript 3
Dnmt1	Bt03224737_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1
Dnmt3A	Bt01027164_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3A
Dnmt3B	Bt03259810_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3B
EGFR	AJT96D7	Epidermal growth factor - receptor
ELF5	Bt03220307_m1	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)
ELOVL6	Bt00907566_m1	ELOVL fatty acid elongase 6
FADS2	Bt03256255_g1	Fatty acid desaturase 2
FASN	Bt03210485_m1	Fatty Acid synthase
FOXO3	Bt03649334_s1	forkhead box O3
G6PD	Bt03649181_m1	Glucose 6 phosphate desidrogenase
GADD45A	Bt03225650_m1	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GAPDH*	Bt03210912_g1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLRX2	Bt03229700_m1	glutaredoxin 2
GPX1	Bt03259217_g1	Glutathione Peroxidase 1
GPX4	Bt03259611_m1	Glutathione peroxidase 4
GSK3A	Bt03273695_m1	Glycogen Synthase Kinase 3 alpha
H19	Custom TaqMan	Imprinted Maternally Expressed Transcript
H1FOO	Bt03228652_g1	H1 histone family, member O, oocyte-specific
H2AFZ	Bt03216346_g1	H2A histone family, member Z
H3F3A	Bt03278804_g1	H3 histone, family 3A
H3F3B	Bt04319377_g1	H3 histone, family 3B (H3.3B)
HAND1	Bt04318733_g1	Heart and neural crest cell derivative 1
HDAC2	Bt03244871_m1	histone deacetylase 2
HIF1A	Bt03259341_m1	Hypoxia inducible factor 1 (transcription factor)
HP1	Bt03246076_m1	Heterochromatin protein 1
HSF1	Bt03249686_m1	Heat Shock Transcription Factor 1
HSP90AA1	Bt03218068_g1	Heat Shock Protein 90kDa Alpha
HSPA1A	Bt03292670_g1	heat shock 70kDa protein 1A
HSPA5	Bt03244880_m1	Glucose-regulated protein, 78kDa

HSPD1	Bt04301470_g1	Heat Shock 60kDa protein 1A
IGF1R	Bt03649217_m1	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IMPDH1	Bt00995384_m1	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1
IMPDH2	Bt03226238_g1	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2
IFNT2	Bt03210589_g1	Interferon tau
KEAP1	Bt03817661_m1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LIPE	Bt03253691_m1	Lipase, hormone-sensitive (HSL)
LUM	Bt03211920_m1	Lumican
MAPK1	Bt03216718_g1	Mitogen-Activated Protein Kinase
MORF4L2	Bt03270996_m1	mortality factor 4 like 2
MTIF3	Bt03231844_m1	mitochondrial translational initiation factor 3
NANOG	Bt03220541_m1	Nanog homeobox
NFE2L2	Bt03251880_m1	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NFkB2	Bt03272789_g1	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 2
NOS2	Bt03249597_m1	Nitric oxide synthase 2, inducible
NOS3	Bt03217679_m1	nitric oxide synthase 3
NR1H3	Bt03218363_m1	nuclear receptor subfamily 1 group H member 3
OTX2	Bt04316301_g1	Orthodenticle Homeobox 2
PA2G4	Bt03211241_g1	Proliferation-Associated 2G4
PAF1	Bt03239371_g1	RNA Polymerase II Associated Factor
PPARG	Bt03217547_m1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PFKP	Bt04316551_m1	Phosphofructokinase
PGK1	Bt03225854_mH	Phosphoglycerate Kinase 1
POU5F1	Bt03223846_g1	POU class 5 homeobox 1 (OCT4)
PPARGC1A	Bt01016720_m1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
PPARA	Bt03220821_m1	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPIA*	Bt03224617_g1	Peptidylprolyl Isomerase A
PRDX1	Bt03223684_m1	Peroxiredoxin-1
PRDX3	Bt03214402_m1	peroxiredoxin 3
PRKCD	Bt03224587_g1	
PTGS2/COX2	Bt03214489_m1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
REST	Bt03278318_s1	RE1-silencing transcription factor
SALL4	Bt04298191_g1	Spalt-Like Transcription Factor 4
SCD	Bt04307476_m1	Stearoyl-CoA desaturase
SOD1	Bt03215423_g1	superoxide dismutase 1, soluble
SOD2	Bt03244551_m1	superoxide dismutase 2, mitochondrial
SOX2	Bt03278318_s1	SRY (sex determining region Y)-box 2
SREBF1	Bt03276370_m1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription F1
SREBF2	Bt04283467_m1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription F2
STAT3	Bt03259871_g1	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TFAM	Bt03260078_m1	Transcription Factor A, Mitochondrial
TNFRSF21	Bt03250597_m1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21
TNFRSF21	Bt03250597_m1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21
TP53	Bt03223213_m1	tumor protein p53
TXN	Bt03222879_m1	Thioredoxin
TXNRD1	Bt03215471_m1	Thioredoxin reductase 1
VEGFA	Bt03213282_m1	Vascular Endothelial Growth Factor A
VNN1	Bt03220248_m1	Vanin 1
XBP1	Bt03227621_g1	X-Box Binding Protein 1

Tabela suplementar S.3. Lista completa da expressão relativa dos 378 miRNAs para 3 repetições biológicas em blastocistos bovinos cultivados em alta e baixa tensões de oxigênio.

Genes	Alto O ₂		Baixo O ₂	
	Média	DP	Média	DP
bta-let-7b	ND		ND	
bta-let-7c	0,001029	0,000302	0,001370	0,000198
bta-let-7d	0,001513	0,000134	0,001736	0,000674
bta-let-7e	0,001827	0,000492	0,002007	0,000961
bta-let-7f	0,001068	0,000333	0,001040	0,000204
bta-let-7g	0,000203	0,000061	0,000170	0,000088
bta-let-7i	ND		ND	
bta-miR-100	ND		0,000094	0,000028
bta-miR-101	0,003075	0,000125	0,001997	0,000718
bta-miR-103	0,009131	0,002349	0,010468	0,003065
bta-miR-105a	0,000386	0,000186	ND	
bta-miR-105b	0,001252	0,000236	0,001404	0,000180
bta-miR-106a	0,036482	0,010689	0,037450	0,009418
bta-miR-106b	0,012447	0,005078	0,015084	0,008924
bta-miR-107	0,000544	0,000162	0,000541	0,000121
bta-miR-10a	0,001593	0,000251	0,001108	0,000254
bta-miR-10b	0,001761	0,000359	0,002053	0,000430
bta-miR-1185	ND		ND	
bta-miR-1193	ND		ND	
bta-miR-1197	ND		0,000057	0,000012
bta-miR-122	0,000166	0,000116	0,000150	0,000105
bta-miR-122	0,000070	0,000019	ND	
bta-miR-1224	0,251972	0,037428	0,271867	0,041329
bta-miR-1225-3p	0,078412	0,006785	ND	
bta-miR-1246	21,030835	1,014413	21,230900	1,981096
bta-miR-1247-3p	0,014039	0,003877	0,013321	0,002578
bta-miR-1247-5p	0,069030	0,010843	0,082851	0,007042
bta-miR-1248	0,163652	0,010807	0,148606	0,018073
bta-miR-1249	0,000911	0,000083	0,000993	0,000088
bta-miR-124a	0,000683	0,000332	ND	
bta-miR-124b	0,000722	0,000162	ND	
bta-miR-125a	0,001893	0,000409	0,001880	0,000438
bta-miR-125b	0,000515	0,000128	0,000406	0,000141
bta-miR-1260b	0,599688 ^a	0,020980	0,543880 ^b	0,024688
bta-miR-126-3p	ND		0,000092	0,000026
bta-miR-126-5p	ND		0,000266	0,000312
bta-miR-127	ND		ND	
bta-miR-1271	0,005370	0,001223	0,006043	0,001324
bta-miR-128	0,000715	0,000329	0,000742	0,000110

bta-miR-1281	0,018695	0,006881	0,016732	0,002583
bta-miR-1282	ND		ND	
bta-miR-1284	ND		0,000278	0,000174
bta-miR-1287	0,000173	0,000083	0,000260	0,000179
bta-miR-129	0,001982	0,000640	0,001920	0,000717
bta-miR-1291	0,033389	0,005704	0,037435	0,001302
bta-miR-129-3p	0,000391	0,000032	ND	
bta-miR-129-5p	0,002129	0,000717	ND	
bta-miR-1296	ND		ND	
bta-miR-1298	ND		0,000141	0,000069
bta-miR-1301	ND		0,000080	0,000020
bta-miR-1306	0,001085	0,000450	0,001229	0,000208
bta-miR-1307	0,071044	0,011111	0,083743	0,012828
bta-miR-130a	0,000644	0,000239	0,000623	0,000211
bta-miR-130b	0,023613	0,008660	0,023976	0,007973
bta-miR-132	0,000264	0,000059	ND	
bta-miR-133a	ND		0,001396	0,000737
bta-miR-133b	ND		ND	
bta-miR-133c	ND		0,000127	0,000054
bta-miR-134	ND		ND	
bta-miR-1343-3p	0,015811	0,004689	0,012024	0,004069
bta-miR-1343-5p	0,145174	0,013273	0,165255	0,029997
bta-miR-135a	0,000113	0,000054	ND	
bta-miR-135b	ND		ND	
bta-miR-136	ND		0,000134	0,000024
bta-miR-137	ND		ND	
bta-miR-138	0,007836	0,000842	0,009144	0,001235
bta-miR-1388-3p	0,003209	0,000652	0,003526	0,001226
bta-miR-139	0,000700	0,000138	0,000470	0,000323
bta-miR-140	0,000194 ^a	0,000027	0,000349 ^b	0,000076
bta-miR-141	0,003520	0,000966	0,002602	0,000453
bta-miR-142-5p	ND		ND	
bta-miR-143	0,002318	0,001470	0,002417	0,001087
bta-miR-145	ND		ND	
bta-miR-146a	ND		0,000169	0,000070
bta-miR-146b	0,000279	0,000151	0,000338	0,000321
bta-miR-147	ND		ND	
bta-miR-148a	0,010448	0,001841	0,009647	0,001815
bta-miR-148b	0,009024	0,002015	0,008337	0,001601
bta-miR-149-3p	0,144476	0,029342	0,150662	0,019330
bta-miR-149-5p	0,002419	0,000338	ND	
bta-miR-150	0,001538	0,000694	0,001133	0,001265
bta-miR-151-3p	0,006869	0,001488	0,005736	0,000923
bta-miR-151-5p	0,011920	0,002359	0,012712	0,004945

bta-miR-152	ND		ND	
bta-miR-153	ND		ND	
bta-miR-154a	0,000153	0,000032	ND	
bta-miR-154b	0,000426	0,000131	0,000244	0,000168
bta-miR-154c	0,000228	0,000211	0,000163	0,000103
bta-miR-155	0,000385 ^a	0,000090	0,000173 ^b	0,000092
bta-miR-15a	0,004533	0,001036	0,003543	0,000813
bta-miR-15b	0,010217	0,002214	0,009870	0,002730
bta-miR-16a	0,010348	0,002776	0,009737	0,001632
bta-miR-16b	0,023888	0,007464	0,024263	0,009054
bta-miR-17-3p	0,001139	0,000459	0,000782	0,000319
bta-miR-17-5p	0,007152	0,002069	0,007865	0,001707
bta-miR-181a	0,000081	0,000016	ND	
bta-miR-181b	0,000267	0,000095	0,000326	0,000199
bta-miR-181c	ND		ND	
bta-miR-181d	0,000344	0,000019	ND	
bta-miR-182	0,000388	0,000391	0,000407	0,000112
bta-miR-183	ND		ND	
bta-miR-184	0,000313	0,000098	0,000257	0,000148
bta-miR-185	0,001184	0,000399	ND	
bta-miR-186	0,002278	0,000606	0,001389	0,000540
bta-miR-187	0,005016	0,000452	0,004311	0,001734
bta-miR-188	0,001606	0,000302	ND	
bta-miR-18a	0,006899	0,001582	0,006594	0,001286
bta-miR-18b	0,003117	0,001265	0,002710	0,000423
bta-miR-190a	0,000603	0,000211	0,000566	0,000143
bta-miR-190b	0,000090	0,000037	ND	
bta-miR-191	0,004533	0,001046	ND	
bta-miR-192	0,002348	0,000026	0,002168	0,000621
bta-miR-193a	ND		ND	
bta-miR-193a-3p	ND		0,000493	0,000166
bta-miR-193a-5p	0,001682	0,000330	0,002009	0,001247
bta-miR-193b	0,000111	0,000035	0,000106	0,000052
bta-miR-194	0,006437	0,001045	0,006153	0,001935
bta-miR-195	0,003523	0,001121	0,003648	0,000589
bta-miR-196a	0,000899	0,000058	0,000800	0,000242
bta-miR-196b	0,001103	0,000421	0,000819	0,000448
bta-miR-197	ND		ND	
bta-miR-199a-3p	ND		ND	
bta-miR-199a-5p	ND		ND	
bta-miR-199b	ND		ND	
bta-miR-199c	ND		ND	
bta-miR-19a	0,003829 ^a	0,001135	0,001358 ^b	0,000300
bta-miR-19b	0,003755	0,002123	0,001641	0,000319

bta-miR-200a	0,000150	0,000071	ND	
bta-miR-200b	0,001927	0,000406	0,002271	0,000273
bta-miR-200c	0,001721	0,000496	0,002431	0,000162
bta-miR-202	0,000306	0,000221	0,000519	0,000338
bta-miR-204	0,000527	0,000300	0,000269	0,000097
bta-miR-205	0,000770	0,000372	0,000883	0,000526
bta-miR-206	ND		0,000460	0,000125
bta-miR-208a	ND		0,000060	0,000027
bta-miR-20a	0,038580	0,007451	0,036791	0,009136
bta-miR-20b	0,015488	0,002515	0,015130	0,003607
bta-miR-210	0,003161 ^a	0,000335	0,005046 ^b	0,000839
bta-miR-211	0,000616	0,000153	0,000386	0,000200
bta-miR-212	0,000082	0,000041	0,000087	0,000048
bta-miR-21-3p	ND		ND	
bta-miR-214	ND		0,002908	0,001349
bta-miR-215	0,001510	0,000014	0,001803	0,000901
bta-miR-21-5p	0,001432	0,000498	0,001797	0,000391
bta-miR-216a	0,000682	0,000038	ND	
bta-miR-216b	ND		ND	
bta-miR-217	ND		ND	
bta-miR-218	ND		ND	
bta-miR-219	ND		ND	
bta-miR-219-3p	0,000972	0,000353	ND	
bta-miR-219-5p	0,000200	0,000097	ND	
bta-miR-221	0,005569	0,001061	0,004894	0,001629
bta-miR-222	0,005099	0,001475	0,004718	0,000636
bta-miR-223	ND		0,000087	0,000045
bta-miR-22-5p	0,000670 ^a	0,000165	0,001015 ^b	0,000123
bta-miR-224	ND		ND	
bta-miR-23a	0,003998	0,000482	0,003722	0,000645
bta-miR-23b-3p	0,002839	0,000361	0,002415	0,000920
bta-miR-23b-5p	0,000422	0,000139	0,000290	0,000053
bta-miR-24	0,000270	0,000105	0,000304	0,000079
bta-miR-24-3p	0,003921	0,000645	0,003192	0,000460
bta-miR-25	0,013192	0,004264	0,011789	0,002812
bta-miR-26a	0,014912	0,003067	0,015226	0,002445
bta-miR-26b	0,003041	0,000039	0,003268	0,001262
bta-miR-27a-3p	0,001404	0,000268	0,001334	0,000144
bta-miR-27a-5p	ND		0,000344	0,000211
bta-miR-27b	0,003876	0,001031	0,003801	0,000661
bta-miR-28	0,002217	0,000515	0,002255	0,000061
bta-miR-296-3p	0,006298	0,000691	0,005628	0,000933
bta-miR-296-5p	ND		0,001666	0,000700
bta-miR-299	ND		ND	

bta-miR-29a	0,000576	0,000129	0,000473	0,000191
bta-miR-29b	0,000150	0,000029	0,000159	0,000099
bta-miR-29c	0,000367	0,000086	0,000545	0,000232
bta-miR-29d-3p	ND		ND	
bta-miR-29d-5p	ND		ND	
bta-miR-29e	ND		ND	
bta-miR-301a	0,000323	0,000214	0,000302	0,000107
bta-miR-301b	0,000277	0,000134	0,000240	0,000164
bta-miR-302a	0,004713	0,001732	0,004459	0,001332
bta-miR-302b	0,002264	0,000327	0,002453	0,000616
bta-miR-302c	0,000906	0,000724	0,001337	0,000262
bta-miR-302d	0,008904	0,002697	0,009022	0,001068
bta-miR-3064	ND		0,000222	0,000032
bta-miR-30a-5p	0,012228	0,004879	0,009701	0,001126
bta-miR-30b-3p	0,000252	0,000112	0,000151	0,000077
bta-miR-30b-5p	0,004180	0,000988	0,003979	0,000609
bta-miR-30c	0,008389	0,001915	0,007459	0,000914
bta-miR-30d	0,010447	0,002462	0,009284	0,001989
bta-miR-30e-5p	0,011915	0,002550	0,009564	0,002226
bta-miR-30f	ND		0,004299	0,000733
bta-miR-31	0,000607	0,000095	0,000702	0,000681
bta-miR-32	0,000264	0,000115	ND	
bta-miR-320a	0,018252	0,003437	0,019688	0,000610
bta-miR-320b	0,003674	0,000610	0,003610	0,001110
bta-miR-323	11,369218	2,106507	10,306215	2,077691
bta-miR-324	0,000760	0,000190	0,000944	0,000056
bta-miR-326	ND		0,002599	0,000851
bta-miR-328	0,002293	0,000746	ND	
bta-miR-329a	ND		ND	
bta-miR-329b	ND		0,000117	0,000073
bta-miR-330	ND		0,001541	0,000437
bta-miR-331-3p	0,000262	0,000121	0,000090	0,000070
bta-miR-331-5p	0,001479	0,000387	ND	
bta-miR-335	0,000094	0,000018	ND	
bta-miR-338	0,000398	0,000138	0,000366	0,000245
bta-miR-339a	0,005527	0,000930	0,005560	0,000745
bta-miR-339b	0,006959	0,000910	ND	
bta-miR-33a	0,000255	0,000064	0,000299	0,000190
bta-miR-33b	ND		0,000253	0,000205
bta-miR-340	0,000220	0,000131	ND	
bta-miR-342	0,002242	0,000686	0,001775	0,000447
bta-miR-345-3p	ND		0,001590	0,000587
bta-miR-345-5p	0,001455	0,000035	0,001509	0,000334
bta-miR-346	0,020668	0,007458	0,016558	0,002437

bta-miR-34a	0,012045	0,001922	0,011681	0,001737
bta-miR-34b	0,001038	0,000365	0,000472	0,000108
bta-miR-34c	0,000649 ^a	0,000051	0,000485 ^b	0,000037
bta-miR-361	0,002134	0,000218	0,001981	0,000479
bta-miR-362-3p	0,000407	0,000319	0,000360	0,000215
bta-miR-362-5p	0,000612	0,000173	0,000753	0,000125
bta-miR-363	0,000230	0,000139	0,000187	0,000071
bta-miR-365-3p	0,001228	0,000362	0,001463	0,000497
bta-miR-365-5p	0,003763	0,001573	0,004112	0,002803
bta-miR-367	0,000071	0,000035	ND	
bta-miR-369-3p	0,000341	0,000246	0,000290	0,000171
bta-miR-369-5p	ND		0,000124	0,000077
bta-miR-370	0,003769	0,000281	0,003353	0,000802
bta-miR-371	0,083009	0,023344	0,061044	0,018188
bta-miR-374a	0,001105	0,000473	0,001606	0,000257
bta-miR-374b	0,001048	0,000237	0,001457	0,000555
bta-miR-375	0,000535	0,000063	0,000712	0,000247
bta-miR-376a	ND		0,000247	0,000124
bta-miR-376b	0,000099	0,000048	ND	
bta-miR-376c	0,000555	0,000510	0,000467	0,000337
bta-miR-376d	0,000423	0,000282	0,000166	0,000077
bta-miR-376e	0,000195	0,000088	0,000173	0,000062
bta-miR-377	0,000298	0,000231	0,000183	0,000127
bta-miR-378	0,016802	0,001515	0,012555	0,002639
bta-miR-378b	0,015470 ^a	0,002936	0,010368 ^b	0,000715
bta-miR-378c	0,001568	0,000220	0,001089	0,000303
bta-miR-378d	ND		ND	
bta-miR-379	0,001490	0,000742	0,001153	0,000093
bta-miR-380-3p	0,000411	0,000148	0,000210	0,000126
bta-miR-380-5p	ND		0,000542	0,000159
bta-miR-381	0,000655	0,000256	0,000544	0,000084
bta-miR-382	0,000957	0,000520	0,000806	0,000176
bta-miR-383	ND		ND	
bta-miR-409a	0,000110	0,000085	ND	
bta-miR-409b	ND		ND	
bta-miR-410	ND		ND	
bta-miR-411a	0,001258	0,001122	0,000785	0,000077
bta-miR-411b	ND		ND	
bta-miR-411c-3p	0,000492	0,000495	ND	
bta-miR-411c-5p	0,000268	0,000245	0,000121	0,000052
bta-miR-412	0,000101	0,000054	ND	
bta-miR-421	0,004266	0,000480	0,005511	0,000897
bta-miR-423-3p	0,004160	0,000836	0,003715	0,000508
bta-miR-423-5p	0,002310	0,000505	0,002467	0,000445

bta-miR-424-3p	ND	ND
bta-miR-424-5p	0,013530 0,004772	0,008336 0,001207
bta-miR-425-3p	ND	ND
bta-miR-425-5p	0,002016 0,000497	0,001815 0,000228
bta-miR-429	0,000817 0,000347	0,000676 0,000214
bta-miR-431	0,001502 0,000417	0,001276 0,000083
bta-miR-432	0,000427 0,000160	0,000352 0,000166
bta-miR-433	0,001209 0,000097	0,001018 0,000171
bta-miR-448	ND	ND
bta-miR-449a	0,002098 0,000906	0,001327 0,000195
bta-miR-449b	ND	0,000236 0,000098
bta-miR-449c	0,001008 0,000774	0,000923 0,000185
bta-miR-449d	ND	ND
bta-miR-450a	0,000334 0,000256	ND
bta-miR-450b	ND	ND
bta-miR-451	ND	ND
bta-miR-452	0,000274 0,000073	0,000215 0,000189
bta-miR-4523	ND	ND
bta-miR-453	0,000504 0,000060	0,000622 0,000109
bta-miR-454	ND	0,000191 0,000057
bta-miR-455-3p	ND	ND
bta-miR-455-5p	0,000155 0,000092	ND
bta-miR-483	0,000134 0,000040	0,000133 0,000101
bta-miR-484	0,000742 0,000025	0,000615 0,000254
bta-miR-485	ND	ND
bta-miR-486	0,008368 0,001908	0,009680 0,003245
bta-miR-487a	ND	0,000543 0,000283
bta-miR-487b	0,000326 0,000258	0,000141 0,000084
bta-miR-488	0,000513 0,000203	0,000424 0,000111
bta-miR-489	0,000131 0,000027	ND
bta-miR-490	ND	0,001210 0,000619
bta-miR-491	0,000250 0,000142	ND
bta-miR-493	0,008685 0,001652	ND
bta-miR-494	2,766477 0,345955	3,194450 1,124804
bta-miR-495	ND	ND
bta-miR-496	0,000109 0,000082	0,000096 0,000070
bta-miR-497	0,000716 0,000104	0,000716 0,000168
bta-miR-499	0,000096 0,000069	ND
bta-miR-500	0,001262 0,000391	0,001263 0,000404
bta-miR-502a	ND	ND
bta-miR-502b	ND	ND
bta-miR-503-3p	0,032026 0,009199	0,026995 0,004863
bta-miR-503-5p	0,004346 0,002184	0,001612 0,000247
bta-miR-504	0,000813 0,000517	ND

bta-miR-505	0,003078	0,000217	0,002669	0,000272
bta-miR-532	0,001179	0,000223	0,001247	0,000507
bta-miR-539	0,000202	0,000133	0,000114	0,000020
bta-miR-541	0,003354	0,000232	0,003373	0,001013
bta-miR-542-5p	0,000187	0,000098	ND	
bta-miR-543	0,000318	0,000241	0,000215	0,000122
bta-miR-544a	ND		ND	
bta-miR-544b	0,000159	0,000025	ND	
bta-miR-545-3p	0,000210	0,000130	0,000298	0,000208
bta-miR-545-5p	0,000279	0,000184	ND	
bta-miR-551a	ND		ND	
bta-miR-551b	ND		ND	
bta-miR-574	0,141889	0,029544	0,127980	0,039946
bta-miR-584	ND		ND	
bta-miR-592	0,000381	0,000008	0,000441	0,000040
bta-miR-615	420,575487	109,357699	352,724073	87,013235
bta-miR-628	ND		ND	
bta-miR-631	1,535186	0,225185	1,404892	0,221630
bta-miR-652	0,002250	0,000230	0,002096	0,000209
bta-miR-654	0,006276	0,001883	0,005889	0,001827
bta-miR-655	ND		ND	
bta-miR-656	0,000257	0,000113	0,000276	0,000037
bta-miR-658	0,002665	0,000399	0,002867	0,000745
bta-miR-660	0,001521	0,000684	ND	
bta-miR-664a	0,018613	0,005344	0,018738	0,003497
bta-miR-664b	0,006484	0,001814	0,006783	0,000717
bta-miR-665	0,025948	0,004018	0,029323	0,005238
bta-miR-669	0,049626	0,005529	0,044333	0,007570
bta-miR-670	ND		ND	
bta-miR-671	ND		ND	
bta-miR-677	0,129555	0,022456	0,133903	0,015336
bta-miR-7	0,012303	0,003969	0,014095	0,004916
bta-miR-708	0,000965	0,000187	0,000938	0,000159
bta-miR-744	0,001565	0,000312	0,001486	0,000157
bta-miR-758	ND		ND	
bta-miR-760-3p	0,003009	0,000643	0,002430	0,001097
bta-miR-760-5p	0,015170	0,002419	ND	
bta-miR-761	ND		0,000262	0,000189
bta-miR-763	ND		0,002464	0,000108
bta-miR-764	0,000178	0,000021	ND	
bta-miR-767	0,000765	0,000156	0,000600	0,000254
bta-miR-769	ND		ND	
bta-miR-873	ND		0,000621	0,000302
bta-miR-874	0,009683	0,002360	0,012071	0,002753

bta-miR-875	ND		ND	
bta-miR-876	ND		ND	
bta-miR-877	0,015559	0,002886	0,018626	0,004690
bta-miR-885	0,001344	0,000268	ND	
bta-miR-92a	0,026056	0,008353	0,028445	0,003946
bta-miR-92b	0,019912	0,004212	0,019111	0,001400
bta-miR-93	0,023387	0,000501	0,022373	0,004299
bta-miR-935	ND		ND	
bta-miR-9-3p	ND		ND	
bta-miR-940	0,310951	0,212843	0,177820	0,031243
bta-miR-95	0,000301	0,000135	0,000188	0,000140
bta-miR-9-5p	0,010149	0,002377	0,012209	0,002812
bta-miR-96	0,000454	0,000118	0,000406	0,000169
bta-miR-98	ND		0,000151	0,000086
bta-miR-99a-3p	ND		ND	
bta-miR-99a-5p	ND		0,000221	0,000112
bta-miR-99b	0,046660	0,007197	0,040226	0,008030

DP = Desvio padrão

ND = Não determinado

Letras diferentes indicam diferença significativa para $p \leq 0,05$

Tabela suplementar S.4. Expressão relativa dos 93 RNAm avaliados para 8 repetições biológicas para embriões cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio.

Genes	Alto O ₂		Baixo O ₂	
	Média	DP	Média	DP
ACACA	0,0140	0,0055	0,0102	0,0048
ACSL3	0,0733 ^a	0,0158	0,0456 ^b	0,0162
ACSL6	0,0299	0,0062	0,0226	0,0089
AQP3	0,1160	0,0233	0,1025	0,0206
ATF4	0,0684	0,0235	0,0575	0,0119
ATP5L	0,3098 ^a	0,0352	0,2635 ^b	0,0177
BAX	0,0588 ^a	0,0144	0,0396 ^b	0,0137
BCL2	ND		ND	
BID	0,0065 ^a	0,0009	0,0047 ^b	0,0014
CASP3	0,0033	0,0014	0,0022	0,0008
CASP9	0,0075 ^a	0,0017	0,0050 ^b	0,0019
CAT	0,0204 ^a	0,0040	0,0143 ^b	0,0032
CCND2	0,0486 ^a	0,0125	0,0356 ^b	0,0094
CDCA8	0,0272 ^a	0,0062	0,0173 ^b	0,0052
CDK6	0,0012	0,0005	0,0008	0,0005
CDX2	0,0286	0,0051	0,0244	0,0026
DDIT3	0,0067	0,0019	0,0075	0,0027
Dnmt1	0,0042	0,0015	0,0033	0,0016
Dnmt3A	0,1587 ^a	0,0368	0,0992 ^b	0,0381
Dnmt3B	0,0663	0,0193	0,0506	0,0174
EGFR	0,0083 ^a	0,0027	0,0054 ^b	0,0014
ELF5	ND		ND	
ELOVL6	0,1360	0,0237	0,1292	0,0477
FADS2	0,0435	0,0231	0,0315	0,0171
FASN	0,1587	0,0455	0,1166	0,0361
FOXO3	0,0035	0,0013	0,0032	0,0015
G6PD	0,0359	0,0104	0,0332	0,0110
GADD45A	0,0090	0,0028	0,0071	0,0019
GLRX2	0,0225 ^a	0,0051	0,0138 ^b	0,0026
GPX1	0,1205	0,0302	0,1243	0,0176
GPX4	0,0747	0,0241	0,0631	0,0132
GSK3A	0,0287	0,0081	0,0230	0,0047
H19	ND		ND	
H1FOO	ND		ND	
H2AFZ	0,1475 ^a	0,0440	0,0876 ^b	0,0303
H3F3A	ND		ND	
H3F3B	0,0080 ^a	0,0024	0,0053 ^b	0,0025
HAND1	0,0037 ^a	0,0008	0,0027 ^b	0,0011
HDAC2	0,0133	0,0030	0,0081	0,0021
HIF1A	0,0053	0,0022	0,0038	0,0017
HP1	0,0066	0,0021	0,0052	0,0018
HSF1	0,0379 ^a	0,0098	0,0278 ^b	0,0063
HSP90AA1	0,6412 ^a	0,1272	0,4061 ^b	0,0510

HSPA1A	0,0078	0,0046	0,0091	0,0054
HSPA5	0,1711	0,0283	0,1278	0,0565
HSPD1	0,1359 ^a	0,0253	0,0851 ^b	0,0271
LIPE	0,0005	0,0004	0,0007	0,0004
LUM	ND		ND	
KEAP1	0,0103 ^a	0,0020	0,0076 ^b	0,0027
IFNT2	0,0172 ^a	0,0046	0,0098 ^b	0,0054
IMPDH2	0,0396	0,0085	0,0312	0,0080
IMPDH1	0,0085	0,0035	0,0067	0,0028
IGF1R	0,0089	0,0029	0,0067	0,0035
NFE2L2	0,0094 ^a	0,0029	0,0058 ^b	0,0015
NANOG	0,0075 ^a	0,0041	0,0030 ^b	0,0013
MTIF3	0,0022	0,0010	0,0015	0,0010
MORF4L2	0,0061 ^a	0,0014	0,0040 ^b	0,0016
MAPK1	0,0306 ^a	0,0090	0,0220 ^b	0,0061
PA2G4	0,0528 ^a	0,0122	0,0370 ^b	0,0101
OTX2	0,0350 ^a	0,0141	0,0205 ^b	0,0070
NR1H3	0,0006	0,0002	0,0005	0,0003
NOS2	0,0047	0,0017	0,0057	0,0025
NOS3	ND		ND	
NFkB2	0,0102	0,0023	0,0070	0,0037
PPARA	ND		ND	
PPARG	0,0005 ^a	0,0003	0,0001 ^b	0,0001
PPARGC1A	ND		ND	
POU5F1	0,3006	0,0551	0,2478	0,0631
PGK1	0,0256 ^a	0,0038	0,0551 ^b	0,0146
PFKP	0,0011	0,0006	0,0012	0,0009
PAF1	0,0181 ^a	0,0037	0,0138 ^b	0,0043
PTGS2	0,1674 ^a	0,0342	0,1038 ^b	0,0324
PRKCD	0,0067 ^a	0,0015	0,0048 ^b	0,0019
PRDX3	0,0178 ^a	0,0023	0,0137 ^b	0,0035
PRDX1	0,5321 ^a	0,0967	0,3912 ^b	0,0559
SOX2	0,0156	0,0068	0,0114	0,0056
SOD2	0,0222	0,0160	0,0162	0,0070
SOD1	0,0380 ^a	0,0061	0,0264 ^b	0,0074
SCD	0,0500	0,0161	0,0474	0,0195
SALL4	0,0609	0,0191	0,0443	0,0167
REST	0,0048 ^a	0,0012	0,0033 ^b	0,0011
TNFAIP6	ND		ND	
TNF	ND		ND	
TFAM	0,0136 ^a	0,0045	0,0073 ^b	0,0019
STAT3	0,0318 ^a	0,0107	0,0157 ^b	0,0047
SREBF2	0,0510	0,0135	0,0447	0,0142
SREBF1	0,0039 ^a	0,0014	0,0024 ^b	0,0007
XBP1	0,0310	0,0128	0,0218	0,0104
VEGFA	0,0108	0,0034	0,0136	0,0041
VNN1	ND		ND	
TXNRD1	0,0418 ^a	0,0080	0,0315 ^b	0,0099

TXN	0,2684 ^a	0,0408	0,1961 ^b	0,0425
TNFRSF21	0,0154 ^a	0,0025	0,0104 ^b	0,0024

DP = Desvio padrão

ND = Não determinado

Letras diferentes indicam diferença significativa para $p \leq 0,05$

Tabela suplementar S.5. Expressão relativa dos 8 miRNAs avaliados para 4 repetições biológicas de blastocistos bovinos produzidos por fertilização *in vitro* e cultivados em alta tensão de oxigênio na ausência e presença de suplementação do meio de cultivo com antioxidantes (cisteína e cisteamina).

miRNA	Alto O ₂		Alto O ₂ C+C	
	Média	DP	Média	DP
bta-miR-378b	0,015492	0,002474	0,0135923	0,005465
bta-miR-34c	0,000819	0,000045	0,0007618	0,000211
bta-miR-19a	0,003942	0,002048	0,0023332	0,001342
bta-miR-155	0,000295	0,000089	0,0005147	0,000313
bta-miR-1260b	1,108667	0,183919	1,5459604	0,904383
bta-miR-22-5p	0,000428	0,000082	0,0004917	0,000229
bta-miR-210	0,003038	0,000290	0,0025527	0,000457
bta-miR-140	0,000211	0,000026	0,0001709	0,000033

DP = Desvio padrão

ND = Não determinado

Tabela suplementar S.6.Lista completa da expressão relativa dos miRNAs do conteúdo dos exossomos isolados do meio de cultivo nos dias 3 e 7 do cultivo de embriões produzidos por fertilização *in vitro* e expostos a diferentes condições atmosféricas, alta e baixa tensão de oxigênio para 3 repetições biológicas.

miRNA	Meio de Cultivo D3				Meio de Cultivo D7			
	Alto O ₂		Baixo O ₂		Alto O ₂		Baixo O ₂	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
bta-let-7a-3p	0,000053	0,000026	0,000046	0,000006	0,000394	0,000128	0,000246	0,000156
bta-let-7a-5p	0,004216	0,001518	0,006361	0,005002	0,027993	0,007275	0,013952	0,007279
bta-let-7b	0,016006	0,003516	0,021152	0,004032	0,016345	0,005207	0,011395	0,001806
bta-let-7c	0,013826	0,004203	0,019434	0,005022	0,022220 ^a	0,00179	0,014038 ^b	0,003194
bta-let-7d	0,001298	0,000745	0,002503	0,002085	0,011030	0,002793	0,005640	0,002549
bta-let-7e	0,005294	0,002638	0,009220	0,004365	0,027226	0,011835	0,012801	0,003965
bta-let-7f	0,001858	0,000984	0,002809	0,001911	0,011347	0,003275	0,006024	0,003095
bta-let-7g	0,007274	0,001574	0,009008	0,000732	0,009749	0,001767	0,006428	0,003435
bta-let-7i	0,007614	0,001787	0,010129	0,002461	0,014200	0,005682	0,007126	0,001504
bta-miR-1	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-100	0,001130	0,000610	0,001954	0,000658	0,004866	0,002186	0,003038	0,000765
bta-miR-101	0,004199	0,000622	0,005291	0,001448	0,008580	0,003875	0,006716	0,002761
bta-miR-103	0,002404	0,000393	0,002243	0,000287	0,009868	0,00348	0,006688	0,001997
bta-miR-105a	ND		ND		ND		0,000433	0,0006
bta-miR-105b	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-106a	0,059105	0,011821	0,077520	0,008662	0,075695	0,032331	0,061637	0,01364
bta-miR-106b	0,016475	0,004662	0,018395	0,002810	0,021240	0,010335	0,013631	0,003669
bta-miR-107	ND		ND		0,000786	0,000456	0,000329	0,000206
bta-miR-10a	0,000624	0,000363	0,000534	0,000176	0,002592	0,000924	0,001609	0,000667
bta-miR-10b	0,001080	0,000123	0,001348	0,000282	0,003910	0,001168	0,003282	0,000963
bta-miR-1179	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-1185	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-1193	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-1197	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-122	0,000316	0,000044	0,000229	0,000117	0,000562	0,000258	ND	
bta-miR-122	0,000247	0,000081	0,000157	0,000025	0,000467	0,000202	0,000603	0,000056
bta-miR-1224	0,021057	0,010745	0,017470	0,007456	0,322673 ^a	0,082482	0,14715 ^b	0,081556
bta-miR-1225-3p	0,001642	0,000544	0,002356	0,000103	ND		ND	
bta-miR-1246	3,925356	0,921643	5,883385	0,999932	7,142996	1,255276	9,761624	3,301708
bta-miR-1247-3p	0,000916	0,000190	0,001170	0,000345	0,004406	0,003501	0,005345	0,006607
bta-miR-1247-5p	0,000739	0,000529	0,001396	0,000836	0,011492	0,00584	ND	
bta-miR-1248	ND		ND		0,000198	0,000119	0,000192	0,000152
bta-miR-1249	ND		ND		ND		0,000674	0,00081
bta-miR-124a	0,000142	0,000121	ND		0,000322	0,000203	ND	
bta-miR-124b	0,000094	0,000054	0,000122	0,000052	0,000337	0,000317	0,000541	0,000696
bta-miR-125a	0,007865 ^a	0,003027	0,014014 ^b	0,002159	0,017496	0,005657	0,010529	0,003164
bta-miR-125b	0,014730 ^a	0,005284	0,024617 ^b	0,003299	0,069636	0,023783	0,038821	0,012363

bta-miR-1260b	0,012403	0,002990	0,012769	0,003687	0,129142	0,060097	0,114420	0,020387
bta-miR-126-3p		ND		ND		ND	0,000102	0,000045
bta-miR-126-5p		ND		ND	0,000086	0,000039		ND
bta-miR-127	0,000226	0,000102	0,000140	0,000049	0,001571	0,00184	0,001933	0,002175
bta-miR-1271	0,000183	0,000122	0,000147	0,000048	0,001084	0,000327	0,000772	0,00024
bta-miR-1277		ND		ND		ND		ND
bta-miR-128		ND	0,000083	0,000043	0,001012	0,000686	0,000606	0,00053
bta-miR-1281	0,000610	0,000405	0,000662	0,000098	0,013335	0,0203	0,025750	0,040497
bta-miR-1282		ND		ND		ND		ND
bta-miR-1284		ND		ND	0,000236	0,000265	0,000619	0,00096
bta-miR-1287		ND		ND	0,000176	0,000151	0,000219	0,00021
bta-miR-129	0,000159	0,000041	0,000090	0,000023		ND		ND
bta-miR-1291		ND		ND	0,000672	0,000991	0,001213	0,001872
bta-miR-129-3p		ND	0,000102	0,000026	0,000477	0,000155	0,000452	0,000233
bta-miR-129-5p	0,000087 ^a	0,000018	0,000051 ^b	0,000014	0,000969	0,001315	0,002304	0,003668
bta-miR-1296		ND	0,000099	0,000046	0,003208	0,00491	0,007226	0,011331
bta-miR-1298		ND		ND		ND	0,000100	0,000098
bta-miR-1301		ND		ND		ND		ND
bta-miR-1306	0,000262	0,000058	0,000220	0,000151		ND	0,001316	0,000322
bta-miR-1307	0,000799	0,000102		ND		ND	0,005298	0,003473
bta-miR-130a	0,002090	0,000581	0,001663	0,000759	0,005000	0,002663	0,003953	0,001437
bta-miR-130b	0,002077	0,000754	0,001515	0,000570	0,005146	0,002455	0,003277	0,001431
bta-miR-132	0,011368	0,004978	0,014864	0,002155	0,006033 ^a	0,001734	0,013094 ^b	0,003733
bta-miR-133a	0,000097	0,000013		ND	0,000584	0,000732	0,000897	0,001236
bta-miR-133b		ND		ND		ND		ND
bta-miR-133c		ND		ND		ND		ND
bta-miR-134		ND		ND		ND	0,000806	0,001205
bta-miR-1343-3p	0,000384	0,000117	0,000460	0,000178	0,004078	0,002963	0,006614	0,007571
bta-miR-1343-5p	0,005362	0,001446	0,010665	0,006273	0,096209	0,116756	0,072942	0,082677
bta-miR-135a		ND	0,000094	0,000047		ND	0,000047	0,000018
bta-miR-135b		ND		ND	0,000071	0,0000305		ND
bta-miR-136		ND		ND		ND		ND
bta-miR-137		ND	0,000046	0,000016		ND		ND
bta-miR-138	0,000412	0,000256		ND	0,001704	0,00089	0,002059	0,001198
bta-miR-1388-3p	0,000288	0,000050	0,000233	0,000131	0,001056	0,000823	0,001444	0,001889
bta-miR-139	0,000207	0,000063	0,000095	0,000040	0,000447	0,000314	0,000462	0,000567
bta-miR-140	0,000506	0,000107	0,000785	0,000320	0,003187	0,001935	0,001541	0,000725
bta-miR-141		ND		ND	0,000126	0,000046	0,000109	0,000114
bta-miR-142-3p		ND		ND		ND		ND
bta-miR-142-5p		ND		ND		ND		ND
bta-miR-143	0,000479	0,000182	0,000434	0,000176		ND	0,001058	0,000282
bta-miR-144		ND		ND		ND		ND
bta-miR-145		ND		ND		ND		ND
bta-miR-146a		ND		ND		ND		ND

bta-miR-146b	ND		ND		0,000100	0,000024	ND	
bta-miR-147	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-148a	0,004438	0,000208	0,004807	0,000212	0,022441	0,008316	0,013946	0,004794
bta-miR-148b	0,003685	0,000602	0,004261	0,000536	0,015866	0,004868	0,009669	0,002291
bta-miR-149-3p	0,016122	0,006372	0,028339	0,008076	0,086046	0,08904	0,062329	0,053771
bta-miR-149-5p	ND		ND		0,001086	0,00171	0,003263	0,005226
bta-miR-150	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-151-3p	0,001318	0,000598	0,001793	0,000309	0,003417	0,001412	0,003118	0,000822
bta-miR-151-5p	0,001260	0,000588	0,001306	0,000296	0,003968	0,001531	0,002655	0,000843
bta-miR-152	0,000119	0,000055	0,000130	0,000072	0,000676	0,000407	0,000754	0,000754
bta-miR-153	ND		ND		ND		0,000059	0,000040
								7
bta-miR-154a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-154b	0,000098	0,000061	0,000058	0,000018	ND		ND	
bta-miR-154c	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-155	0,018478	0,005583	0,026651	0,001019	0,026479	0,01057	0,021364	0,005935
bta-miR-15a	0,016459 ^a	0,003191	0,023170 ^b	0,002800	0,024970	0,009791	0,026226	0,004554
bta-miR-15b	0,002420	0,000714	0,003560	0,000703	0,007757	0,003547	0,004533	0,000694
bta-miR-16a	0,055078	0,008133	0,068178	0,005740	0,073093	0,023726	0,066621	0,011601
bta-miR-16b	0,079801 ^a	0,015448	0,107801 ^b	0,007672	0,114106	0,043119	0,109082	0,012491
bta-miR-17-3p	ND		0,000079	0,000045	0,000404	0,00023	0,000356	0,000401
bta-miR-17-5p	0,002180	0,000644	0,002870	0,000330	0,003886	0,001209	0,003199	0,001
bta-miR-181a	0,000823	0,000301	0,000765	0,000403	0,001721	0,000834	ND	
bta-miR-181b	0,001155	0,000173	0,001071	0,000236	ND		0,001836	0,000632
bta-miR-181c	0,000125	0,000106	0,000092	0,000033	0,000821	0,000263	ND	
bta-miR-181d	0,001990	0,000264	0,001699	0,000165	0,002633	0,000479	0,002380	0,000549
bta-miR-182	0,000065	0,000020	ND		0,001262 ^a	0,000186	0,000417 ^b	0,000155
bta-miR-183	ND		0,000053	0,000005	0,000450	0,000271	0,000250	0,000214
bta-miR-184	ND		ND		0,000150	0,000083	0,000118	0,000054
bta-miR-185	0,001293	0,000201	0,001754	0,000457	0,002006	0,000635	0,002778	0,000759
bta-miR-186	0,004965	0,002168	0,005479	0,001305	0,013082	0,004602	0,010151	0,004179
bta-miR-187	0,000327	0,000174	0,000326	0,000038	0,001629	0,001768	0,002817	0,003615
bta-miR-188	0,002226	0,000984	0,002599	0,000477	0,001968	0,000747	0,003680	0,001019
bta-miR-18a	0,003453	0,000665	0,003244	0,000208	0,007773	0,002446	0,005297	0,002076
bta-miR-18b	0,000966	0,000488	0,000933	0,000110	0,002835	0,001315	0,001625	0,000587
bta-miR-190a	ND		ND		0,000210	0,000094	0,000078	0,000043
bta-miR-190b	0,000262	0,000170	0,000175	0,000018	0,000068	0,000040	0,000189	0,000077
bta-miR-191	0,000839	0,000305	0,000934	0,000276	0,003141	0,001691	0,002077	0,000637
bta-miR-192	0,000122	0,000050	0,000110	0,000043	0,000681	0,000622	0,000984	0,001132
bta-miR-193a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-193a-3p	ND		0,000026	0,000008	0,000187	0,00017	ND	
bta-miR-193a-5p	0,002079	0,000296	0,002175	0,000490	0,003137	0,000699	0,003805	0,001133
bta-miR-193b	0,000079	0,000039	ND		ND		ND	
bta-miR-194	0,000347	0,000199	0,000651	0,000067	0,001628	0,000439	0,001130	0,000437
bta-miR-195	0,025295 ^a	0,006350	0,040635 ^b	0,001090	0,021443	0,008048	0,023199	0,000883

bta-miR-196a	ND	0,000136	0,000077	ND	ND
bta-miR-196b	ND	ND	0,000113	0,000043	0,000178 0,000224
bta-miR-197	0,000380 0,000222	0,000462 0,000053	0,003576 0,002117	0,005054 0,005914	
bta-miR-199a-3p	0,000694 0,000328	0,000870 0,000037	0,004983 0,00253	0,003030 0,000733	
bta-miR-199a-5p	0,000157 0,000102	0,000260 0,000145	0,002657 0,002122	0,001482 0,001379	
bta-miR-199b	ND	ND	0,000603 0,000415	0,000411 0,000295	
bta-miR-199c	0,001880 0,000404	0,002181 0,000812	0,009875 0,00601	0,007330 0,003757	
bta-miR-19a	0,014049 0,014613	0,009954 0,005607	0,043488 0,025699	0,013545 0,008152	
bta-miR-19b	0,013371 0,013047	0,009965 0,005004	0,044082 0,025771	0,014395 0,008805	
bta-miR-200a	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-200b	0,000261 0,000268	0,000535 0,000066	0,000349 0,000041	0,000415 0,000113	
bta-miR-200c	ND	0,000064 0,000034	0,000207 0,000081	ND	
bta-miR-202	0,116085 0,025989	0,133426 0,005942	0,095483 0,019924	0,127769 0,02816	
bta-miR-204	0,000239 0,000016	0,000258 0,000045	0,014959 ^a 0,00459	0,006079 ^b 0,00281	
bta-miR-205	0,000242 0,000093	0,000239 0,000131	0,001782 0,000535	ND	
bta-miR-206	0,000121 0,000018	0,000094 0,000034	0,000379 0,000284	0,000761 0,00102	
bta-miR-208a	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-208b	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-20a	0,048405 0,013546	0,054338 0,001410	0,071453 0,030666	0,056360 0,024557	
bta-miR-20b	0,020868 0,005423	0,024130 0,001658	0,029010 0,009279	0,021776 0,006271	
bta-miR-210	0,023072 0,006785	0,032484 0,006847	0,009398 ^a 0,001824	0,031734 ^b 0,008556	
bta-miR-211	0,000433 0,000144	0,000354 0,000120	0,017770 ^a 0,002527	0,007352 ^b 0,003023	
bta-miR-212	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-21-3p	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-214	0,000111 0,000004	0,000100 0,000040	0,002882 0,004029	0,005096 0,007676	
bta-miR-215	0,000096 ^a 0,000047	0,000187 ^b 0,000032	0,000596 0,000513	0,000492 0,000202	
bta-miR-21-5p	0,000724 0,000325	0,000811 0,000334	0,014978 0,012552	0,005749 0,002444	
bta-miR-216a	ND	ND	0,000261 0,000306	ND	
bta-miR-216b	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-217	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-218	ND	0,000091 0,000012	0,000094 0,000032	0,000090 0,000052	
bta-miR-219	0,000194 0,000059	0,000109 0,000012	0,000508 0,000209	ND	
bta-miR-219-3p	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-219-5p	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-221	0,006385 0,001000	0,004819 0,001555	0,041849 ^a 0,006376	0,023096 ^b 0,007627	
bta-miR-222	0,009604 0,000743	0,008951 0,003447	0,063750 0,018768	0,038462 0,012331	
bta-miR-223	ND	ND	ND	0,000084 0,000064	
bta-miR-22-3p	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-224	0,000315 0,000159	0,000439 0,000103	0,000367 ^a 0,000050	0,000174 ^b 0,000095	
bta-miR-22-5p	0,000923 0,000345	0,000828 0,000153	0,003422 0,001217	0,002157 0,000128	
bta-miR-23a	0,005771 0,001826	0,004701 0,000509	0,061274 ^a 0,019386	0,028383 ^b 0,006599	
bta-miR-23b-3p	0,000183 0,000073	0,000163 0,000034	0,011463 0,005412	0,004873 0,001617	
bta-miR-23b-5p	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-24	ND	ND	ND	ND	

bta-miR-24-3p	0,009130	0,001446	0,012130	0,001903	0,068305	0,026626	0,037743	0,010164
bta-miR-25	0,028558	0,004724	0,034104	0,005086	0,038250	0,004359	0,046187	0,013802
bta-miR-26a	0,010231	0,003484	0,015108	0,003161	0,029323	0,010772	0,014725	0,004596
bta-miR-26b	0,003799	0,000731	0,004517	0,000341	0,006905	0,001835	0,004261	0,001666
bta-miR-26c	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-27a-3p	0,014423	0,002385	0,014555	0,004945	0,054793	0,020766	0,039068	0,012118
bta-miR-27a-5p	ND		ND		ND		0,000403	0,000611
bta-miR-27b	0,002027	0,000279	0,001635	0,000138	0,051125	0,025152	0,024021	0,008453
bta-miR-28	0,000589	0,000235	0,000601	0,000100	0,003086	0,001662	0,001724	0,000658
bta-miR-296-3p	0,000127	0,000082	ND		0,001366	0,001347	0,002630	0,003912
bta-miR-296-5p	0,000265	0,000058	0,000329	0,000073	0,001493	0,001414	0,001909	0,002473
bta-miR-299	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-29a	0,024983	0,006684	0,034426	0,009092	0,066961	0,045698	0,041214	0,012196
bta-miR-29b	0,001030	0,000324	0,000886	0,000324	0,013341	0,010828	0,004101	0,001594
bta-miR-29c	0,024821	0,007540	0,032822	0,009911	0,050108	0,02823	0,036279	0,010417
bta-miR-29d-3p	0,001459	0,000692	0,002699	0,000760	0,002280	0,00088	0,002102	0,000964
bta-miR-29d-5p	ND		0,000040	0,000024	ND		ND	
bta-miR-29e	0,000143	0,000100	0,000350	0,000101	0,002180	0,001573	0,000861	0,000369
bta-miR-301a	ND		ND		0,000362	0,0002	0,000204	0,000141
bta-miR-301b	ND		ND		0,000406 ^a	0,000207	0,000070 ^b	0,000027
bta-miR-302a	ND		ND		0,000192	0,000085	0,000122	0,000049
bta-miR-302b	ND		ND		0,000050	0,0000142	ND	
bta-miR-302c	ND		ND		0,000275	0,000164	ND	
bta-miR-302d	ND		ND		0,000689 ^a	0,000222	0,000306 ^b	0,000044
bta-miR-3064	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-30a-5p	0,004971	0,000909	0,006513	0,000841	0,019116	0,009104	0,012977	0,005532
bta-miR-30b-3p	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-30b-5p	0,001467	0,001065	0,002508	0,000412	0,006615	0,003144	0,003619	0,001396
bta-miR-30c	0,000634	0,000065	0,000755	0,000111	0,006378	0,002703	0,002903	0,00144
bta-miR-30d	0,004969	0,000745	0,006192	0,000621	0,018357	0,009571	0,012613	0,005141
bta-miR-30e-5p	0,005299	0,002080	0,006806	0,000745	0,019446	0,011559	0,013916	0,005268
bta-miR-30f	ND		0,000069	0,000024	0,002270	0,001057	0,001196	0,000579
bta-miR-31	0,008219	0,004434	0,011415	0,004280	0,016802	0,006445	0,009713	0,003831
bta-miR-32	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-320a	0,022278	0,001819	0,024667	0,003147	0,032737	0,019571	0,035846	0,003454
bta-miR-320b	0,000769	0,000184	0,000812	0,000122	0,002013	0,002167	0,003766	0,003664
bta-miR-323	9,082775	2,864347	4,752929	0,806267	7,631288	3,338651	5,852869	1,246201
bta-miR-324	0,000497	0,000075	0,000501	0,000118	0,003976	0,004506	0,001332	0,000827
bta-miR-326	0,001404	0,002102	0,000324	0,000261	0,003331	0,005128	0,009984	0,016263
bta-miR-328	0,000230	0,000057	0,000191	0,000013	ND		ND	
bta-miR-329a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-329b	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-330	0,000051	0,000006	0,000040	0,000007	0,000840	0,001152	ND	
bta-miR-331-3p	0,000202	0,000235	0,000121	0,000074	0,001698	0,001029	0,000367	0,000206

bta-miR-331-5p	0,000659	0,000143	0,000516	0,000213	0,001501	0,001214	0,002861	0,003595
bta-miR-335	0,000510	0,000178	0,000658	0,000089	0,000397	0,000254	0,000642	0,000414
bta-miR-338	0,000328	0,000084	0,000458	0,000126	0,000683	0,000123	ND	
bta-miR-339a	0,000089	0,000018	0,000094	0,000022	0,003510	0,004448	0,007320	0,01157
bta-miR-339b	ND		0,000221	0,000031	0,004727	0,004061	0,005075	0,007368
bta-miR-33a	ND		0,000040	0,000008	0,000930	0,000911	ND	
bta-miR-33b	ND		ND		0,000145	0,000051	0,000096	0,000064
bta-miR-340	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-342	ND		ND		ND		0,000569	0,000477
bta-miR-345-3p	0,000680	0,000316	0,000735	0,000076	0,001152	0,00102	0,002327	0,002025
bta-miR-345-5p	0,000097	0,000061	ND		0,000898	0,00087	0,001143	0,00167
bta-miR-346	0,000084 ^a	0,000010	0,000178 ^b	0,000019	0,006478	0,010321	0,017600	0,028238
bta-miR-34a	0,000511	0,000048	0,000353	0,000185	0,003657 ^a	0,001235	0,001448 ^b	0,000769
bta-miR-34b	0,000075	0,000045	0,000111	0,000015	0,001200	0,000434	0,000617	0,000319
bta-miR-34c	0,000148	0,000125	0,000071	0,000069	0,001148	0,00037	0,000731	0,000405
bta-miR-361	0,000241	0,000185	0,000298	0,000094	0,001116	0,000413	ND	
bta-miR-362-3p	0,000463	0,000128	0,000643	0,000170	0,001194	0,000964	0,001064	0,000785
bta-miR-362-5p	0,000058	0,000019	0,000076	0,000036	0,000283	0,000061	0,000185	0,000069
bta-miR-363	ND		ND		ND		0,000242	0,000188
bta-miR-365-3p	0,001346	0,000540	0,002239	0,000463	0,009000	0,003265	0,004484	0,001626
bta-miR-365-5p	0,003855	0,001782	0,003343	0,000697	0,013456	0,018865	0,034910	0,042547
bta-miR-367	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-369-3p	0,000963	0,000306	0,000615	0,000051	0,000803	0,000312	0,000475	0,000066
bta-miR-369-5p	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-370	ND		0,000099	0,000080	0,000784	0,00119	0,002007	0,003072
bta-miR-371	ND		0,000023	0,000004	0,024835	0,013441	0,011596	0,004983
bta-miR-374a	0,000616	0,000259	0,000748	0,000075	0,001311	0,000408	0,000848	0,000323
bta-miR-374b	0,000768 ^a	0,000343	0,001416 ^b	0,000126	0,002067	0,000901	0,001053	0,000174
bta-miR-375	0,000241	0,000043	0,000198	0,000055	0,000231	0,000078	0,000389	0,000197
bta-miR-376a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-376b	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-376c	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-376d	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-376e	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-377	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-378	0,000640	0,000324	0,000588	0,000170	0,011191	0,005357	0,007110	0,001811
bta-miR-378b	0,000513	0,000280	0,000503	0,000204	0,011009	0,00467	0,006271	0,001528
bta-miR-378c	0,000067	0,000034	0,000068	0,000032	0,001235	0,00052	0,000726	0,00035
bta-miR-378d	ND		ND		0,000544	0,00054	0,000676	0,000867
bta-miR-379	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-380-3p	0,000639	0,000136	0,000326	0,000162	ND		ND	
bta-miR-380-5p	0,000076	0,000040	ND		ND		ND	
bta-miR-381	ND		ND		ND		0,000638	0,000961
bta-miR-382	0,000208	0,000071	0,000123	0,000039	0,000426	0,000202	0,000222	0,000228

bta-miR-383	ND	0,000046	0,000008	ND	0,000400	0,000525
bta-miR-409a	ND	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-409b	ND	ND	ND	ND	ND	
bta-miR-410	0,000074	0,000043	ND	ND	0,000351	0,000544
bta-miR-411a	0,000072	0,000017	0,000046	0,000016	0,000141	0,000061
bta-miR-411b	ND	ND	ND	0,000055	0,0000301	ND
bta-miR-411c-3p	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-411c-5p	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-412	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-421	0,004513	0,002615	0,001426	0,000844	0,003836	0,004168
bta-miR-423-3p	0,000360	0,000097	0,000497	0,000128	0,002852	0,001542
bta-miR-423-5p	0,003704	0,000759	0,003262	0,000235	0,004618	0,001087
bta-miR-424-3p	ND	ND	ND	0,000219	0,00028	0,000358
bta-miR-424-5p	0,004172	0,000137	0,004522	0,001261	0,009992	0,004516
bta-miR-425-3p	0,001159	0,000028	0,001188	0,000413	0,009303	0,006346
bta-miR-425-5p	0,001134 ^a	0,000276	0,002279 ^b	0,000246	0,002555	0,000684
bta-miR-429	0,000490 ^a	0,000120	0,000235 ^b	0,000095	0,000492	0,000087
bta-miR-431	ND	ND	ND	ND	0,001753	0,002682
bta-miR-432	0,000162	0,000056	0,000169	0,000050	0,000430	0,000568
bta-miR-433	0,000579 ^a	0,000087	0,000307 ^b	0,000045	0,001180	0,001294
bta-miR-448	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-449a	ND	0,000059	0,000018	0,001117 ^a	0,000352	0,000450 ^b
bta-miR-449b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-449c	ND	ND	ND	0,000223	0,000273	0,000579
bta-miR-449d	0,000157	0,000092	0,000093	0,000027	0,002146	0,003203
bta-miR-450a	ND	ND	ND	0,000330 ^a	0,0000992	0,000133 ^b
bta-miR-450b	ND	ND	ND	0,000337	0,000121	0,000142
bta-miR-451	0,001589	0,000659	0,000851	0,000187	0,000908	0,000283
bta-miR-452	ND	0,000040	0,000008	ND	ND	ND
bta-miR-4523	0,002333	0,003905	0,001926	0,003215	0,000530	0,000696
bta-miR-453	0,000092	0,000033	0,000072	0,000020	0,000242	0,000145
bta-miR-454	ND	ND	ND	0,000544 ^a	0,000039	0,000240 ^b
bta-miR-455-3p	ND	ND	ND	0,000106	0,000063	0,000091
bta-miR-455-5p	ND	0,000036	0,000013	0,000791	0,000193	0,000669
bta-miR-483	ND	0,000106	0,000063	0,000444	0,000649	ND
bta-miR-484	0,000361	0,000268	0,000476	0,000175	0,001983	0,000979
bta-miR-485	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-486	0,000702	0,000126	0,000444	0,000199	0,007489	0,008203
bta-miR-487a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-487b	ND	ND	ND	0,000075	0,000052	ND
bta-miR-488	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bta-miR-489	0,000121	0,000044	0,000058	0,000022	0,000272	0,000274
bta-miR-490	ND	ND	ND	ND	0,001785	0,002902
bta-miR-491	0,000193 ^a	0,000097	0,000414 ^b	0,000052	ND	0,000520

bta-miR-493	0,000088	0,000078	ND		0,003208	0,004836	0,006133	0,009587
bta-miR-494	0,032518	0,020469	0,023311	0,008754	0,557093	0,52174	0,460564	0,36218
bta-miR-495	0,000129	0,000106	ND		ND		ND	
bta-miR-496	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-497	0,007951	0,002013	0,008302	0,002341	0,007368	0,002879	0,010851	0,002837
bta-miR-499	0,000093	0,000027	0,000134	0,000056	ND		0,000203	0,000126
bta-miR-500	0,001202	0,000408	0,001818	0,000634	0,001387	0,000086	0,001216	0,000158
bta-miR-502a	ND		0,000043	0,000010	0,000174	0,000135	0,000247	0,000312
bta-miR-502b	0,000154	0,000061	0,000121	0,000050	0,000661	0,000166	0,000521	0,000291
bta-miR-503-3p	ND		0,000598	0,000133	0,002844	0,003321	0,004124	0,005131
bta-miR-503-5p	0,000512	0,000100	0,000291	0,000280	0,002326	0,000793	0,001704	0,000523
bta-miR-504	ND		ND		ND		0,000830	0,001249
bta-miR-505	0,000255	0,000105	0,000179	0,000060	ND		ND	
bta-miR-532	0,001106	0,000179	0,001248	0,000238	0,001491	0,000428	ND	
bta-miR-539	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-541	0,000694	0,000170	0,000437	0,000207	0,001740	0,001225	0,003133	0,003817
bta-miR-542-5p	0,000085	0,000031	0,000041	0,000015	0,000162	0,000125	0,000176	0,000113
bta-miR-543	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-544a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-544b	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-545-3p	0,000192	0,000060	0,000200	0,000167	0,000365	0,000168	0,000268	0,000203
bta-miR-545-5p	ND		0,000157	0,000058	0,000462	0,000244	0,000361	0,000115
bta-miR-551a	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-551b	ND		0,000058	0,000018	ND		0,000154	0,000041
bta-miR-562	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-568	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-574	0,044429	0,009295	0,028481	0,006449	0,247200	0,380251	0,504979	0,666354
bta-miR-582	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-584	ND		0,000222	0,000031	0,001366	0,001412	0,002584	0,003868
bta-miR-592	0,000138	0,000075	0,000114	0,000059	0,000192	0,000115	ND	
bta-miR-599	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-615	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-628	ND		ND		0,000076	0,000024	ND	
bta-miR-631	1,406104	0,473802	0,762666	0,104904	1,058150	0,463734	1,037000	0,127075
bta-miR-652	0,001080	0,000335	0,001497	0,000046	0,002576	0,000851	ND	
bta-miR-653	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-654	ND		ND		0,000206	0,000254	ND	
bta-miR-655	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-656	0,000176 ^a	0,000053	0,000086 ^b	0,000015	0,000154	0,000017	ND	
bta-miR-658	0,001250	0,000236	0,001407	0,000186	0,003809	0,001925	0,003668	0,002494
bta-miR-660	0,001838	0,000346	0,002549	0,000773	0,003635	0,00097	0,003962	0,000664
bta-miR-664a	0,001068	0,000766	0,001291	0,000470	0,003545	0,004387	0,009808	0,013303
bta-miR-664b	0,000053 ^a	0,000028	0,000145 ^b	0,000027	0,000415	0,000203	ND	
bta-miR-665	0,000340	0,000072	0,000320	0,000088	0,006443	0,009227	ND	

bta-miR-669	0,002022	0,000700	0,001736	0,000525	0,040075	0,063603	0,123774	0,179924
bta-miR-670	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-671	0,000081	0,000037	0,000089	0,000035	0,000267	0,000243	0,000484	0,000381
bta-miR-677	0,000404	0,000363	0,000399	0,000327	0,001363	0,000477	0,000880	0,00073
bta-miR-7	ND		ND		0,000410	0,000148	ND	
bta-miR-708	0,001513	0,000467	0,001899	0,000355	0,005422	0,000373	0,003915	0,001083
bta-miR-744	ND		0,000066	0,000017	0,000323	0,000368	ND	
bta-miR-758	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-759	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-760-3p	0,000961	0,000215	0,001119	0,000238	0,003292	0,003807	0,007002	0,008154
bta-miR-760-5p	0,000195	0,000074	0,000266	0,000061	0,002782	0,0042	0,004914	0,007017
bta-miR-761	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-763	0,000116	0,000034	ND		0,000887	0,001424	0,002162	0,003389
bta-miR-764	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-767	0,000174	0,000079	0,000093	0,000026	ND		ND	
bta-miR-769	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-873	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-874	0,000450	0,000224	0,000552	0,000382	ND		ND	
bta-miR-875	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-876	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-877	0,001561	0,000629	0,001642	0,000100	0,006012	0,006312	0,012174	0,013763
bta-miR-885	0,000117	0,000063	ND		0,000835	0,000915	0,001343	0,00199
bta-miR-92a	0,048486	0,004943	0,050891	0,005469	0,075874	0,005324	0,078715	0,027699
bta-miR-92b	0,002946	0,001026	0,003188	0,000363	0,025257	0,013078	0,025097	0,026586
bta-miR-93	0,012252	0,001952	0,014998	0,000342	0,020580	0,00645	0,015150	0,003157
bta-miR-935	0,000133	0,000067	0,000166	0,000094	0,000578	0,000599	0,000790	0,00088
bta-miR-9-3p	ND		ND		ND		ND	
bta-miR-940	0,005495	0,002092	0,005487	0,001396	0,039957	0,028503	0,034291	0,026895
bta-miR-95	ND		ND		ND		0,000108	0,000079
bta-miR-9-5p	ND		0,000068	0,000030	0,000354	0,000134	0,000195	0,000089
bta-miR-96	ND		0,000272	0,000205	0,001223 ^a	0,000054	0,000381 ^b	0,000229
bta-miR-98	ND		0,000150	0,000143	0,001075 ^a	0,000236	0,000314 ^b	0,000095
bta-miR-99a-3p	0,000178	0,000103	0,000178	0,000161	0,000390	0,000086	0,000609	0,000245
bta-miR-99a-5p	0,006383	0,001945	0,007911	0,000052	0,012229	0,003421	0,009177	0,001331

DP = Desvio padrão

ND = Não determinado

Letras diferentes indicam diferença significativa para $p \leq 0,05$

APÊNDICE B – Artigo submetido na Reproductive Sciences

Title: Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts

Authors: Monalisa M. Bomfim¹; Gabriella M. Andrade¹; Maite del Collado¹; Juliano R. Sangalli¹; Patrícia K. Fontes²; Marcelo F. G. Nogueira³; Flávio V. Meirelles¹; Juliano C. da Silveira¹; Felipe Perecin^{1*}

¹Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil; ²Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ³Department of Biological Sciences, School of Science, Humanities and Languages – São Paulo State University, Assis, SP, Brazil.

***Corresponding author:**

Felipe Perecin
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Animal Sciences and Food Engineering
University of São Paulo
Av. Duque de Caxias Norte, 225
Pirassununga, SP, Brazil, 13635900
Phone: +55 19 35654162
Email: fperecin@usp.br

Short title: Oxidative stress disturbances in embryo

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Grant sponsor: This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP – grants 2014/21042-6 2014/21034-3, 2014/22887-0, 2013/08135-2 and 2012/50533-2). The

fundings had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

During in vitro fertilization of mammalian embryos, the conceptuses are exposed to conditions distinct from the oviduct-uterine environment, including atmospheric oxygen that promotes cellular oxidative stress and consequently alters gene expression. High oxygen tension during embryo development has been associated with low pregnancy rates and increased embryonic apoptosis. Herein, we investigated the association of high (20% O₂) and low (5% O₂) oxygen tension during embryo culture with levels of reactive oxygen species (ROS), and changes in expression of oxidative stress-related and epigenetic-related transcripts and miRNAs in bovine blastocysts. Additionally we determined the global DNA methylation levels in the resulting embryos. Our results indicate that high oxygen tension leads to increased ROS levels in bovine blastocysts produced in vitro, which leads to increased expression of *CAT*, *GLRX2*, *KEAP1*, *NFR2*, *PRDX1*, *PRDX3*, *SOD1*, *TXN*, and *TXNRD1*, as well as the oxidative stress-related bta-miR-210. We also demonstrated that embryos undergoing oxidative stress have altered expression of the epigenetic-associated transcripts *DNMT3A*, *H2AFZ*, *H3F3B*, *HDAC2*, *MORF4L2*, *REST*, and *PAF1*, which correlates with increased global DNA methylation levels. Our results suggest that DNA hypermethylation is mediated by the deregulation of epigenetic-related enzymes due to oxidative stress.

Keywords: Epigenetic, microRNA, embryo development, ER stress.

Introduction

In vitro production (IVP) of bovine embryos can be achieved in culture using two atmospheric conditions: high oxygen (20%) or low oxygen (5%) tension. High oxygen tension has been described as a condition that increases stressful factors, such as oxidative stress, in bovine and mouse embryos.^{1,2} Oxidative stress induced by high oxygen tension during in vitro embryo culture has been associated with cellular apoptosis³ and low pregnancy rates.^{4,5}

Oxidative stress in oxidant and antioxidant cell systems represents a disruption in the ratio of the production and degradation of reactive oxygen species (ROS), which are products of cellular aerobic metabolism. These metabolites are partially reduced molecules that are unstable and highly reactive.⁶ ROS interact with lipid, carbohydrate, and nucleic acid molecules, promoting cell damage such as lipid peroxidation, membrane and mitochondrial DNA changes, endoplasmic reticulum damage, and protein denaturation, and can also alter the meiotic cycle.^{7,8}

Early embryo development occurs during migration of the embryo through the oviduct, under oxygen tension close to 5 to 7% under ideal physiological in vivo conditions.^{7,9} During this time, embryonic epigenetic reprogramming occurs, and environmental disturbances could lead to altered epigenetic patterns.¹⁰ Epigenetic reprogramming involves a wave of pronuclei demethylation, followed by a wave of *de novo* methylation.^{10,11} This process allows the modification of methylation levels inherited by parents (except for imprinted loci) and determines the methylation pattern of the embryos.^{12,13}

Methylation is a well-known epigenetic modification characterized by the addition of a methyl radical at the 5-position of a cytosine molecule (5-methylcytosine).¹⁴ Typically, DNA methylation is established by DNA methyltransferases. The DNA methyltransferase 1 (DNMT1) maintains methylation patterns, preserving epigenetic information among subsequent cellular generations;¹⁵ and DNA methyltransferase 3 (DNMT3A and DNMT3B) establishes new patterns of methylation, determining the cell's individual epigenetic pattern.^{16,17} All DNMT isoforms can be detected during early embryo development, although DNMT3A is predominantly expressed.¹⁸

Variations in oxygen tension in in vitro culture conditions can alter DNA methylation levels in mammalian embryos,¹⁹ and can promote significant changes in transcript

expression in bovine embryos.^{20,21} Oxidative stress also can induce changes in miRNA levels in cancer cells.²² In addition, the miR-210 has been described like a miRNA upregulated in general at low oxygen condition in cancer cell culture.²³ Thus, altered oxygen tension can potentially induce major disturbances in miRNAs levels in embryonic cells leading to developmental problems. However, the effect of oxidative stress on miRNA expression in embryos is poorly explored.

In the present study, we tested whether bovine embryos exposed to high and low oxygen tension in vitro develop alterations in ROS and DNA methylation levels in the resulting blastocysts. Along with these functional modifications, we assessed the relative expression of genes related to oxidative stress responses, cellular stress responses, and epigenetic remodeling, as well as the expression of an miRNA associated with oxidative stress. We show that high oxygen tension in vitro promotes ROS accumulation in embryos and increased global DNA methylation. These functional modifications are followed by coordinated alterations in the expression patterns of stress-related and epigenetic-related genes and miRNAs.

Materials and Methods

A series of experiments were conducted to investigate the effects of oxygen tension during in vitro embryo culture. Reagents and media were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Faculty of Animal Science and Food Engineering – University of Sao Paulo, under protocol number 5763200215, and is in accordance with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation. For all experiments, incubator conditions for oocytes and embryos were maintained at 38.5°C and with maximum humidity. The gaseous atmosphere was 5% CO₂ and air for in vitro maturation, for IVF, and for in vitro culture of embryos grown under high oxygen tension. Atmosphere conditions of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ were used during in vitro culture of embryos grown under low oxygen tension.

In vitro embryo production

Bovine ovaries from a local slaughterhouse were collected and transported to the laboratory in thermal bottles filled with phosphate-buffered saline (PBS) until processing. Ovarian follicles between 3-6 mm were aspirated with 18-gauge needles and the oocytes selected under a stereomicroscope. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were washed in TCM199 culture medium supplemented with sodium pyruvate (22 µg/mL), gentamicin (50 µg/mL) and 10% extracellular vesicle-depleted bovine fetal serum (EVfreeFBS). Extracellular vesicle depletion was performed by ultracentrifugation at $120\,000 \times g$ for 16 h. Non-atretic COCs with compact cumulus and homogeneous cytoplasm were selected and matured in vitro in TCM199 supplemented with 26 mM sodium bicarbonate, 22 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL gentamicin, 10% EVfreeFBS, 0.5 µL/mL follicle stimulating hormone (FSH; Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), and 5 U/mL human chorionic gonadotropin (hCG, Vetecor® 5000 U.I. Intervet, São Paulo, SP, Brazil). After COC selection and grading, a total of 20-25 structures (Grade I and II) were placed in 100 µL droplets of maturation medium covered with mineral oil and incubated for 22 hours.

Following maturation, oocytes underwent IVF with frozen-thawed semen originated from a Nellore bull. Capacitated sperm were obtained after percoll gradient (45% and 90%). This study used semen from only one bull throughout the experiments. Fertilization medium was composed of Tyrode's-lactate (TL) stock, 50 µg/mL gentamicin, 22 µg/mL sodium pyruvate, 40 µL/mL PHE (2 mM D-penicillamine, 1 mM hypotaurine, and 245 µM epinephrine), 5.5 UI/mL heparin, and 6 mg/mL BSA (bovine serum albumin). After 18 hours, presumptive zygotes were partially denuded, and a monolayer of cumulus cells was kept to constitute the pseudo co-culture.²⁴ Culture medium during development was the same for all groups: SOFaaci with 5 mg/mL BSA, 22 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL gentamicin, and 2.5% EVfreeFBS. Presumptive zygotes were divided in two groups for development under either high (20% O₂) or low (5% O₂) oxygen tension. On day 3, cleavage rates were assessed, and on day 7, blastocyst rates were determined and samples were collected. Samples were either fixed for imaging analysis or stored at -80°C until further use. This experiment comprised 23 independent embryo cultures distributed over a period of one year.

ROS levels

Blastocysts (34 and 38 grown under high and low oxygen tension, respectively, from four different routines) were stained with 1 mmol/L of CellROX Green (Molecular Probes) for 30 min at 37°C. Immediately after, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and placed between a slide and coverslip. Fluorescence was captured by epifluorescence microscopy at 488 nm, using 40X objective. Images were analyzed using the ImageJ software (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to measure f. i.

RNA isolation

Total RNA, including small non-coding RNAs, was extracted from pools of 10 blastocysts by using QIAzol Lysis reagent followed by purification of the aqueous phase in miRNeasy® micro kit (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) following the manufacturer's instructions. RNA pellets were dissolved in 14 µL RNase-free water. RNA concentrations were measured using NanoDrop 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Gene expression

Gene expression analysis was performed using Biomark HD (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA), using eight different routines of pools of 10 blastocysts. The relative expression of 31 genes was determined (Table 1) in eight biological replicates. A total of 100 ng total RNA was reverse transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Foster, City, CA, USA), according to manufactures's instructions. Sequence-specific preamplification used approximately 5 ng (1.25 µL) cDNA, 1.25 µL assay mix (Taqman® Assay was pooled to a final concentration of 0.2X for each of the 96 assays), and 2.5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (#4391128). The reactions were incubated at 95°C for 10 min and 14 cycles of 95°C for 15 s followed by 60°C for 4 min. These preamplified products were diluted 6-fold prior to RT-qPCR analysis.

Table 1. Gene symbols, gene names and assay ID used for relative expression of transcripts related to oxidative stress, cellular stress and epigenetic remodeling.

Gene symbol	Assay ID*	Gene name
<i>ATF4</i>	Bt03221057_m1	Activating transcription factor 4
<i>CAT</i>	Bt03228713_m1	Catalase
<i>DDIT3</i>	Bt03251320_g1	DNA-damage-inducible transcript 3
<i>DNMT1</i>	Bt03224737_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1
<i>DNMT3A</i>	Bt01027164_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3A
<i>DNMT3B</i>	Bt03259810_m1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3B
<i>FOXO3</i>	Bt03649334_s1	Forkhead box O3
<i>GADD45A</i>	Bt03225650_m1	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>GLRX2</i>	Bt03229700_m1	Glutaredoxin 2
<i>GPX1</i>	Bt03259217_g1	Glutathione Peroxidase 1
<i>GPX4</i>	Bt03259611_m1	Glutathione peroxidase 4
<i>GRP78</i>	Bt03244880_m1	Glucose-regulated protein, 78kDa
<i>H2AFZ</i>	Bt03216346_g1	H2A histone family, member Z
<i>H3F3A</i>	Bt03278804_g1	H3 histone, family 3A
<i>HDAC2</i>	Bt03244871_m1	Histone deacetylase 2
<i>HIF1A</i>	Bt03259341_m1	Hypoxia inducible factor 1 (transcription factor)
<i>HSP90AA1</i>	Bt03218068_g1	Heat Shock Protein 90kDa Alpha
<i>HSPA1A</i>	Bt03292670_g1	Heat shock 70kDa protein 1A
<i>IMPDH1</i>	Bt00995384_m1	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1
<i>KEAP1</i>	Bt03817661_m1	Kelch-like ECH-associated protein 1
<i>MORF4L2</i>	Bt03270996_m1	Mortality factor 4 like 2
<i>NRF2</i>	Bt03251880_m1	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
<i>PAF1</i>	Bt03239371_g1	RNA Polymerase II Associated Factor
<i>PRDX1</i>	Bt03223684_m1	Peroxiredoxin-1
<i>PRDX3</i>	Bt03214402_m1	Peroxiredoxin 3
<i>REST</i>	Bt03278318_s1	RE1-silencing transcription factor
<i>SOD1</i>	Bt03215423_g1	Superoxide dismutase 1, soluble
<i>SOD2</i>	Bt03244551_m1	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
<i>TXN</i>	Bt03222879_m1	Thioredoxin
<i>TXNRD1</i>	Bt03215471_m1	Thioredoxin reductase 1
<i>XBP1</i>	Bt03227621_g1	X-Box Binding Protein 1
<i>ACTB**</i>	PA5-16914	Actin beta
<i>GAPDH**</i>	Bt03210912_g1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>PPIA**</i>	Bt03224617_g1	Peptidylprolyl Isomerase A

* Thermo Fisher Scientific; ** housekeepings

For mRNA expression analysis, the prepared sample solution consisted of 2.25 μ L cDNA (preamplified products), 2.5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems), and 0.25 μ L 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm); and the assay solution consisted of 2.5 μ L of 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) and 2.5 μ L of 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). The 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits

(Fluidigm) chip was used for data collection. After priming, the chip was loaded with 5 μ L of each assay solution and 5 μ L of each sample solution. The qPCR thermal cycling was performed using Biomark HD System and TaqMan GE 96x96 Standard protocol, as follows: one stage of Thermal Mix (50°C for 2 min, 70°C for 20 min, and 25°C for 10 min); a Hot Start stage (50°C for 2 min and 95°C for 10 min); and 40 cycles of denaturation (95°C for 15 s), primer annealing, and extension (60°C for 60 s). To identify the differences in transcript levels between blastocysts cultured under high and low oxygen tension, raw Ct values were normalized to the geometrical mean of three internal controls (ACTB, GAPDH, and PPIA; Table 2). Normalized Cts were transformed to $2^{-\Delta Ct}$ to obtain the relative expression value. Expression levels were determined in eight biological replicates.

MicroRNA expression

The level of bta-miR-210 was investigated by RT-qPCR. Total RNA from three different routines of pools of 10 blastocysts was used for cDNA reverse transcription preparation using Mix from miScriptII RT Kit (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) following the manufacturer's instructions. Reactions of 10 μ L were carried out with approximately 100 ng total RNA, 2 μ L 5x Hiflex buffer, 2 μ L 10x Nucleic Mix, 1 μ L reverse transcriptase, and water at 37°C for 60 min, followed by 5 min at 95°C.

Real time qPCR reactions were performed with 1,2 ng of the resulting cDNA using SYBR Green PCR Master Mix (#1020722) and sequence-specific forward (Table 3) and reserve universal primers (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands). The PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min; and 45 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 70°C for 30 s. PCR was carried out using the QuantStudio6 Flex system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Melt curve analyses confirmed the amplification of specific cDNA products. Samples with three or more melt curves were discarded. To identify differences in miRNA levels in blastocysts cultured under high or low oxygen tension, raw Ct values were normalized by the geometrical mean of three internal controls (RNU43 snoRNA, Hm/Ms/Rt U1 snRNA, and bta-miR-99b; Table 2). Normalized Cts were transformed to $2^{-\Delta Ct}$ to obtain the relative expression value. Expression levels were determined in three biological replicates.

Table 2. Forward sequence-specific primers used for determining the relative expression of bovine miRNAs. Housekeeping small non-coding RNAs used for normalization are indicated (*).

miRNA	Sequence
bta-miR-210	5' ACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA 3'
RNU43 snoRNA*	5' CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC 3'
Hm/Ms/Rt U1 snRNA*	5' CGACTGCATAATTTGTGGTAGTGG 3'
bta-miR-99b*	5' CACCCGTAGAACCGACCTTGCG 3'

Global DNA methylation levels

Global DNA methylation was determined by immunofluorescence to detect 5mC in blastocysts developed under high or low oxygen tension. Twelve blastocysts grown under high oxygen tension and nine grown under low oxygen tension were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and stored in PBS at 4°C for future analysis. Embryos were permeabilized with 0.5% saponin in PBS incubated for 10 min at room temperature. DNA denaturation process was achieved by exposing samples to 4 N HCl for 12 min, and neutralization by 100 mM Tris HCl solution for 20 min. Embryos were blocked in PBS solution with 1% BSA and 0.3 M glycine for 1 hour. After blocking, samples were incubated with primary antibody for 5-methylcytidine (1:500, #SC56615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at 4°C. The following morning, samples were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody, anti-mouse IgG (1:500, #A11029, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 1 hour at room temperature. Fluorescence was evaluated by confocal microscopy, Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, WZ, Germany), using a 40X oil immersion objective. Samples were excited with HeNe 543 laser, using the emission gate between 590 to 630 nm. A total of five Z-stack images per embryo were acquired and five blastomeres per image (25 blastomeres/embryo) were used for analysis with ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to measure f. i.

Statistical data analysis

Comparisons between high and low oxygen tension were made by two-tailed Student's T-test following two-sample and homoscedastic parameters. Levene's test was used to test homoscedasticity. Data were log-transformed for ROS and global DNA

methylation analysis. All analyses were performed using SAS 9.3 Software (SAS Institute), and statistical significance was assumed if $p \leq 0.05$ unless otherwise indicated.

Results

In vitro development of bovine embryos under high and low oxygen tension

Embryos grown in vitro under high and low oxygen tension resulted in similar cleavage and blastocyst rates on day 3 and day 7 of embryonic development, respectively. These data were acquired over 23 routines of in vitro embryo production. Cleavage rates were 83.23% and 82.92% for high and low oxygen tension, respectively, and the blastocyst rates were 27.24% and 23.96% for high and low oxygen tension, respectively (Table 3).

Table 3. Cleavage and blastocysts rates during in vitro production of bovine embryos under high (20%) and low (5%) oxygen tensions.

	No	Nc	Cleavage Rate (mean $\pm$ SD)	Nb	Blastocyst Rate (mean $\pm$ SD)
High O₂	1,908	1,591	83.23% $\pm$ 4.23	485	27.24% $\pm$ 10.99
Low O₂	1,872	1,557	82.92% $\pm$ 6.31	422	23.96% $\pm$ 9.36
TOTAL	3,780	3,148	-	907	-

No= Number of oocytes; Nc= Number of cleavage embryos; Nb= Number of blastocysts; SD= standard deviation

ROS levels

To evaluate ROS levels, we collected blastocysts exposed to high and low oxygen tension over the course of seven days in culture. We observed significantly higher levels of ROS in embryos cultured under high tension (1.057 ± 0.136 fluorescence intensity [f.i.]) compared to those cultured at low oxygen tension (0.945 ± 0.181 f.i.; Figure 1).

Figure 1. Reactive oxygen species (ROS) levels. (A) ROS levels in bovine blastocysts produced in vitro under high (20%) and low (5%) oxygen tensions. Bars represent the group average and error bars represent the standard error of the mean. Bars with different letters above them are statistically different ($p \leq 0.05$). Representative photomicrographs of a blastocyst cultured under high (B) and low (C) oxygen tensions stained with CellROX Green (Molecular Probes) for intracellular ROS analysis. Embryos of photomicrographs was analyze by epifluorescence microscopy at 488 nm and using 40X objective.

mRNA levels in blastocysts exposed to high and low oxygen tension

We investigated the effects of oxygen tension on blastocyst transcript levels of twelve genes associated with oxidative stress responses (Figure 2A) and ten genes associated with cellular stress responses (Figure 2B). The expression of ten (*CAT*, *GLRX2*, *HSP90AA1*, *KEAP1*, *NRF2*, *PRDX1*, *PRDX3*, *SOD1*, *TXN*, and *TXNRD1*) out of the 22 genes analyzed was higher ($p \leq 0.05$) in embryos cultured at high oxygen tension compared to low oxygen tension (Figure 2A and 2B; Supplementary Table S1).

Additionally, we analyzed the effect of oxidative stress on the expression levels of nine mRNAs related to epigenetic remodeling (Figure 3). We found that seven genes (*DNMT3A*, *H2AFZ*, *H3F3B*, *HDAC2*, *MORF4L2*, *PAF1*, and *REST*) were upregulated in embryos cultured at high oxygen tension compared to those grown at low oxygen tension (Figure 3; Supplementary Table S1).

Figure 2. Relative levels of transcripts associated with the oxidative stress response (A) and cellular stress response (B). Relative expression of 22 genes in bovine blastocysts produced in vitro under high (20%) and low (5%) oxygen tension. Bars represent the group average for eight biological replicates. Error bars represent the standard error of the mean. Bars with different letters above them are statistically different ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Relative levels of transcripts associated with epigenetic remodeling. Relative expression of nine genes in bovine blastocysts produced in vitro under high (20%) and low (5%) oxygen tension. Bars represent the group average for eight biological replicates. Error bars represent the standard error of the mean. Bars with different letters above them are statistically different ($p \leq 0.05$).

miRNA-210 level in blastocysts cultured in high and low oxygen tension

The effect of high and low oxygen tension on miRNA-210 expression levels was examined in bovine blastocysts. The bta-miR-210 was downregulated ($p \leq 0.05$) in embryos cultured at high oxygen tension (0.003161 ± 0.000335) compared to low oxygen tension (0.005046 ± 0.000839 ; Figure 4).

Figure 4. Relative levels of microRNA expression. Relative expression bta-miR-210 in bovine blastocysts produced in vitro under high (20%) and low (5%) oxygen tension. Bars represent the group average for three biological replicates. Error bars represent the standard error of the mean. Brackets indicate differences between groups considering the informed p-value.

Global DNA methylation analysis

The global levels of DNA methylation were determined in bovine blastocysts using an antibody against 5-methylcytosine (5mC). The global DNA methylation levels were different between blastocysts cultured in high and low oxygen tension. Embryos cultured at high oxygen tension demonstrated higher DNA methylation levels (22.86 ± 9.69 f.i.) compared to low oxygen tension (19.49 ± 9.08 f.i.; Figure 5).

Figure 5. Global DNA methylation levels. (A) Levels of global DNA methylation determined by confocal microscopy and image analysis in bovine blastocysts produced in vitro under high (20%) and low (5%) oxygen tension. Bars represent the group average and error bars represent the standard error of the mean. Bars with different letters above them are statistically different ($p \leq 0.05$). Representative photomicrographs of bovine embryos cultured in high (B) and low (C) oxygen tension immunostained for 5-methylcytosine antibody (#SC56615). Embryos of photomicrographs was analyze by confocal microscopy using the emission gate between 590 to 630 nm and 40X objective with oil.

Discussion

Present study aimed to identified the changes induced by oxidative stress condition during in vitro early embryo development. For this purpose the embryos were produced in vitro and developed in different atmospheres. Bovine embryos were cultured at high (20%) or low (5%) oxygen tension. Cleavage and blastocyst rates following exposure to these two atmospheres were similar between groups (Table 1). This is consistent with previous studies

that found similar cleavage and blastocyst rates after in vitro culture of embryos grown under different oxygen tensions.^{21,25} In addition, reduced pregnancy rates of embryos cultured in high oxygen tension have been reported,^{4,5} suggesting that high oxygen tension has detrimental effects that arise later in development. Our next goal was to determine if the high oxygen tension was able to generate an oxidative stress condition. For that we evaluated the formation of ROS, an indicative of oxidative stress.³ We found that high oxygen tension promotes an increase in ROS levels in the blastocysts (Figure 1), likely leading to increased cellular damage. Excessive ROS levels are related to poor embryo quality and delayed embryo development due to oxidative stress damage.² Our results demonstrate that ROS level variations due to the gaseous atmosphere do not lead to noticeable differences in embryo developmental rates. However, as has been reported,³ embryos produced under higher oxygen tension are more prone to further detrimental consequences on development.

To determine whether molecular consequences of oxidative stress could be detected as early as the blastocyst stage, we measured the expression of genes involved in the oxidative stress response. Interestingly, nine (*CAT*, *GLRX2*, *KEAP1*, *NRF2*, *PDRX1*, *PRDX3*, *SOD1*, *TXN*, and *TXNRD1*) out of the twelve genes (also including *GPX1*, *GPX4*, and *SOD2*) had higher expression under high oxygen tension compared to low oxygen tension (Figure 2A). These results clearly indicate that ROS scavenging systems or other antioxidant responses are activated in blastocysts with increased ROS levels. For example, *CAT* converts H_2O_2 into water,¹ *SOD1* catalyzes a dissolution reaction to remove ROS,²⁶ *PRDX1* and *PRDX3* are thioredoxin-dependent peroxide reductases that reduce the intracellular concentrations of H_2O_2 ,²⁷ *TXN* is a disulfide reductase that reduces ROS levels,^{28,29} and *KEAP1* and *NRF2* are involved in the transcriptional activation of genes that improve the expression of antioxidant enzymes.³⁰ *GLRX2* is a member of the glutaredoxin family proteins that maintain cellular thiol homeostasis.³¹ Thiol molecules are responsible for glutathione (GSH) synthesis through the γ -glutamyl-cysteine cycle. GSH is a non-enzymatic embryo antioxidant that removes excess ROS by reducing peroxides and hydroperoxides in inactive products.^{32,33} On the other hand, overexpression of *GLRX2* can effectively protect *TXN* from oxidation, preserving its function in the mitochondrial oxidative stress response.³⁴ Therefore, although there were no effects on the rate of blastocyst development, blastocysts grown under high and low oxygen

tension have molecular differences characterized by the upregulation of antioxidant systems.

The high levels of oxygen under which the embryos developed activate oxidative stress responses in the resulting blastocysts, as elucidated by upregulation of antioxidant pathways. To test if other cellular stress responses are also activated in these embryos, we assessed the expression of genes associated with the endoplasmic reticulum (ER) stress response (*ATF4*, *DDIT3*, *GRP78*, *HSPA1A*, and *XBP1*), with DNA damage repair and DNA/RNA metabolism (*GADD45A*, *HSP90AA1*, and *IMPDH1*), apoptosis (*FOXO3*), and hypoxia (*HIF1A*). Only *HSP90AA1* mRNA levels differed between embryos produced under high and low oxygen tension (Figure 2B). *HSP90AA1* belongs to the HSP90 family of molecular chaperones. The HSP90 proteins modulate DNA repair machinery in response to DNA damage.³⁵⁻³⁷ Thus, the most likely reason for the increase in *HSP90AA1* expression in blastocysts derived from high oxygen culture conditions relies on the HSP90-induced activation of DNA repair. The increase in ROS levels in these blastocysts, a well-known trigger of DNA damage, supports this assumption. Hence, there is no evidence that the cellular insults generated by high oxygen tension result in ER stress response activation, FOXO-induced apoptosis, or hypoxia-induced gene transcription activation. On the other hand, the results support that HSP90-induced DNA damage repair may occur.

Reproductive biotechnologies, such as in vitro fertilization (IVF), generate changes in DNA methylation dynamics during development.³⁸ In view of this, we investigated the expression levels of genes involved in epigenetic remodeling (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *H2AFZ*, *H3F3B*, *HDAC2*, *MORF4L2*, *PAF1*, and *REST*) (Figure 3). We found that the transcripts of two histone genes, *H2AFZ* and *H3F3B*, are upregulated in high oxygen tension conditions compared to low. In addition, the mRNA of *MORF4L2*, a gene that participates in the histone acetyltransferase complex, was upregulated under high oxygen tension. Similarly, *HDAC2* (a histone deacetylating agent), *REST* (mediates deacetylation and demethylation of some histone sites), and *PAF1* were also found to be upregulated under high oxygen tension. *PAF1* is involved in histone methylation, and *PAF1* expression is important to allow proper cellular differentiation as demonstrated in mice.³⁹ *DNMT3A* transcripts were also increased in embryos grown under high oxygen tension compared to low tension. *DNMT3A* performs de novo methylation preferentially in the methylation islands (CpGs), an essential process involved in establishment of embryonic methylation levels.⁴⁰ Therefore, these results

indicate that intense epigenetic remodeling occurs in response to high oxygen tension during early embryo development in cattle.

In view of the reports of changes in miRNA expression induced by oxidative stress during culture of different cell types,^{22,23} we investigated the expression of miR-210 to different atmosphere condition. Our results demonstrate that miR-210 is downregulated in embryos cultured under high oxygen tension. miR-210 serves as a marker of hypoxia.²³ In addition, miR-210 plays a pivotal role in regulating mitochondrial activity, and consequently ROS production.⁴¹ Specifically, miR-210 targets intermediate genes of oxidative metabolism in mitochondria, reducing oxidative phosphorylation and ROS formation.⁴¹ Accordingly, embryos produced under low oxygen tension have lower ROS levels and higher bta-miR-210 expression. The expression of miR-210 is controlled by transcription factors and by methylation in the promoter CpG island. In particular, miR-210 transcription is regulated by HIF1A,⁴² the expression of which was not affected by oxygen tension in our study. Additionally, miR-210 expression is directly controlled by DNA methylation in its promoter region.⁴³ Therefore, the increase in DNA methyltransferase 3A and in global DNA methylation, as demonstrated in our study for embryos produced under high oxygen tension, may lead to methylation of the miR-210 gene and reduced expression. Thus, our results are consistent with increased ROS production under high oxygen tension, reduced bta-miR-210 expression, and a probable increase in methylation of bta-miR-210 methylation islands.

In order to identify DNA methylation level modifications in bovine blastocysts grown under high and low oxygen tension, we determined the global levels of 5mC by immunofluorescence and confocal imaging. The global DNA methylation levels increased in embryos cultured in high oxygen tension compared to low oxygen tension. The increased DNA methylation levels are likely an indirect effect of the oxidative stress induced in the embryo. Cellular oxidative stress, ROS accumulation, and methylation level changes have already been reported by others.^{19,44} Overexpression of DNMT1 under oxidative stress is thought to be responsible for increased methylation by preventing proper demethylation during early embryonic reprogramming.^{22,45} We did not observe a difference in *DNMT1* expression in blastocysts cultured in high and low oxygen tension. However, we did demonstrate that oxidative stress deregulates the expression of epigenetic enzymes involved in de novo methylation (*DNMT3A*) and histone modification (*HDAC2*, *MORF4L2*,

PAF1, and *REST*), which could ultimately explain the observed increase in global DNA methylation.

In conclusion, we found that high oxygen tension during in vitro bovine embryo production increases ROS levels compared to low oxygen tension in the resulting blastocysts. The high ROS levels indicate the presence of oxidative stress, which is accompanied by increased expression of genes related to antioxidant responses, decreased expression of bta-miR-210, and the recruitment of DNA-repair machinery. Several transcripts of epigenetic writers and erasers are upregulated in blastocysts produced under oxidative stress conditions, suggesting a global epigenetic disturbance. This is supported by an increase in global DNA methylation levels in the corresponding embryos. Therefore, while developmental rates of embryos cultured under high and low oxygen tensions are similar, molecular changes arise as early as the preimplantation stage. The intricate relationship between the molecular mechanisms involved in embryo competence acquisition and reprogramming under oxidative stress, as well as the long-term repercussions, are still not completely understood.

Acknowledgements

The authors are thankful to CRV Lagoa that kindly donated the semen for bovine embryo in vitro production.

Funding

This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP – grants 2014/21042-6 2014/21034-3, 2014/22887-0, 2013/08135-2 and 2012/50533-2). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schultz GA, Watson AJ. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod*. 1995;53:532-540.
2. Amin A, Gad A, Salilew-Wondim D, et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. *Mol Reprod Dev*. 2014;81:497-513.
3. Yoon S, Choi S, Sim J, et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled. *Biol Reprod*. 2014;90:1–10.
4. Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts PM, Evers JLH. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*. 1999;14:465-469.
5. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;7:1-41.
6. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-843.
7. Harvey AJ. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*. 2007;98:113-128.
8. Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Nogueira E, Accorsi MF, Mingoti GZ. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26:797-805.
9. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. 1993;99:673-679.
10. Mann MRW, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol*. 2002;3:1-4.
11. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*. 2001;293:1089-1093.
12. Nakamura T, Liu Y, Nakashima H, et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*. 2012;486:415-419.
13. Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*. 2014;111:4139-4144.
14. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.

15. Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.* 2008;22:1607-1616.
16. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99:247-257.
17. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie.* 2015;116:103-113.
18. Watanabe D, Sato T, Amano T, et al. Stage-and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev.* 2002;118:187-190.
19. Li W, Goossens K, Poucke MV, et al. High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression. *Reprod Fertil Dev.* 2014;28:948-959.
20. Rizos D, Lonergan P, Boland MP, et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod.* 2002;66:589-595.
21. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 2004;71:1108-1119.
22. He J, Xu Q, Jing Y, et al. Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR-199a/125b and DNA methylation. *EMBO Reports.* 2012;13:1116-1122.
23. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007;27:1859-1867.
24. Wydooghe E, Vandaele L, Heras S, et al. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;92:1-16.
25. Gaspar RC, Arnold DR, Corrêa CAP, et al. Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro-produced embryos in a bovine model. *Theriogenology.* 2015;83:1408-1415.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2015:354-410.
27. Leyens G, Knoops B, Donnay I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2004;69:243-251.
28. Matsui M, Oshima M, Oshima H, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol.* 1996;178:179-185.
29. Bing YZ, Hirao Y, Takenouchi N, et al. Effects of thioredoxin on the preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology.* 2003;59:863-873.

30. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev.* 2006;38:769-789.
31. Gladyshev VN, Liu A, Novoselov SV, et al. Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2. *J Biol Chem.* 2001;276:30374-30380.
32. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of Glutathione Synthesis of In Vitro Matured Bovine Oocytes and-ItsEffect on Embryo Development and Freezability. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:451-457.
33. Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, De Matos DG, Donnay I, Zicarelli L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology.* 2003;60:943-952.
34. Zhang H, Du Y, Zhang X, Lu J, Holmgren A. Glutaredoxin 2 reduces both thioredoxin 2 and thioredoxin 1 and protects cells from apoptosis induced by auranofin and 4-hydroxynonenal. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21:669-681.
35. Kaplan KB, Li R. A prescription for 'stress' - the role of Hsp90 in genome stability and cellular adaptation. *Trends Cell Biol.* 2012;22:576-583.
36. Fang Q, Inanc B, Schamus S, et al. HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase β . *Nat Commun.* 2014;26:5513-5553.
37. Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, Prince T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene.* 2015;570: 8-16.
38. Wrenzycki C, Niemann H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:649-656.
39. Ding L, Paszkowski-Rogacz M, Nitzsche A, et al. A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell stem cell.* 2009;4:403-415.
40. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998;19: 219-220.
41. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative Stress and MicroRNAs in Vascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2013;14: 17319-17346.
42. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle.* 2010;9:1072-83.
43. Xiong L, Wang F, Huang X, et al. DNA demethylation regulates the expression of miR-210 in neural progenitor cells subjected to hypoxia. *FEBS J.* 2012;279:4318-4326.
44. Yamanaka K, Kaneda M, Inaba Y, et al. DNA methylation analysis on satellite I region in blastocysts obtained from somatic cell cloned cattle. *Anim Sci J.* 2011;82:523-530.
45. Biniszkiewicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2124-2135.

Supplementary Table S1. Relative expression of 31 mRNAs related with oxidative stress responses, cellular stress responses and epigenetic remodeling in eight biological replicates of bovine blastocysts cultured under high (20%) or low (5%) oxygen tensions.

Genes	High O ₂		Low O ₂	
	Mean	SD	Mean	SD
<i>ATF4</i>	0.0684	0.0235	0.0575	0.0119
<i>CAT</i>	0.0204 ^a	0.0040	0.0143 ^b	0.0032
<i>DDIT3</i>	0.0067	0.0019	0.0075	0.0027
<i>DNMT1</i>	0.0042	0.0015	0.0033	0.0016
<i>DNMT3A</i>	0.1587 ^a	0.0368	0.0992 ^b	0.0381
<i>DNMT3B</i>	0.0663	0.0193	0.0506	0.0174
<i>FOXO3</i>	0.0035	0.0013	0.0032	0.0015
<i>GADD45A</i>	0.0090	0.0028	0.0071	0.0019
<i>GLRX2</i>	0.0225 ^a	0.0051	0.0138 ^b	0.0026
<i>GPX1</i>	0.1205	0.0302	0.1243	0.0176
<i>GPX4</i>	0.0747	0.0241	0.0631	0.0132
<i>GRP78</i>	0.1711	0.0283	0.1278	0.0565
<i>H2AFZ</i>	0.1475 ^a	0.0440	0.0876 ^b	0.0303
<i>H3F3B</i>	0.0080 ^a	0.0024	0.0053 ^b	0.0025
<i>HDAC2</i>	0.0133 ^a	0.0030	0.0081 ^b	0.0021
<i>HIF1A</i>	0.0053	0.0022	0.0038	0.0017
<i>HSP90AA1</i>	0.6412 ^a	0.1272	0.4061 ^b	0.0510
<i>HSPA1A</i>	0.0078	0.0046	0.0091	0.0054
<i>IMPDH1</i>	0.0085	0.0035	0.0067	0.0028
<i>KEAP1</i>	0.0103 ^a	0.0020	0.0076 ^b	0.0027
<i>MORF4L2</i>	0.0061 ^a	0.0014	0.0040 ^b	0.0016
<i>NRF2</i>	0.0094 ^a	0.0029	0.0058 ^b	0.0015
<i>PAF1</i>	0.0181 ^a	0.0037	0.0138 ^b	0.0043
<i>PRDX1</i>	0.5321 ^a	0.0967	0.3912 ^b	0.0559
<i>PRDX3</i>	0.0178 ^a	0.0023	0.0137 ^b	0.0035
<i>REST</i>	0.0048 ^a	0.0012	0.0033 ^b	0.0011
<i>SOD1</i>	0.0380 ^a	0.0061	0.0264 ^b	0.0074
<i>SOD2</i>	0.0222	0.0160	0.0162	0.0070
<i>TXN</i>	0.2684 ^a	0.0408	0.1961 ^b	0.0425
<i>TXNRD1</i>	0.0418 ^a	0.0080	0.0315 ^b	0.0099
<i>XBP1</i>	0.0310	0.0128	0.0218	0.0104

SD = Standard deviation

Different letters within lines indicate difference ($p \leq 0,05$).