JÉSSICA ISPADA

**A cinética de desenvolvimento embrionário e suas
relações com o perfil epigenético**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo, Instituto Butantã e Instituto de Pesquisas
Tecnológico para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

São Paulo

2018

JÉSSICA ISPADA

**A cinética de desenvolvimento embrionário e suas
relações com o perfil epigenético**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo, Instituto Butantã e Instituto de Pesquisas
Tecnológico para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Area de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcella Pecora Milazzotto

Versão Original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

ISPADA, JESSICA

A cinética de desenvolvimento embrionário e suas
relações com o perfil epigenético / JESSICA ISPADA;
orientadora Marcella Pecora Milazzotto. -- São
Paulo, 2018.

118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Embriões. 2. Bovino. 3. Morfocinética. 4.
Epigenética. I. Milazzotto, Marcella Pecora ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jéssica Ispada

Título da Tese: A cinética de desenvolvimento embrionário e suas relações com o perfil epigenético

Orientador: Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Comissão de Ética em Uso de Animais

Rua Catequese, 242, 8º andar · Bairro Jardim · Santo André - SP

CEP 09090-400 · Fone: (11) 4437.8424

ceua@ufabc.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado: “Metabolômica para avaliação não invasiva de embriões bovinos produzidos *in vitro*”, protocolado sob o nº 008/2014, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética em uso de animais” da Universidade Federal do ABC e foi aprovado em reunião de 18 de dezembro de 2014.

We certify that the research “Metabolomics for non-invasive evaluation of in vitro produced bovine embryo”, protocol number 008/2014, under the responsibility Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of Universidade Federal do ABC and was approved in the meeting of day December 18, 2014.

Santo André-SP, 09 de janeiro de 2015.

Profa. Dra. Renata Simões
Coordenadora da CEUA - UFABC

Universidade Federal do ABC

Dedico este trabalho a: você Wagner, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias.

A vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Sérgio e Ana.

A você, William, por ser a pessoa que faltava pra alegrar os meus dias e tornar a minha vida mais colorida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família. À minha mãe por ser um exemplo de determinação, de pessoa que vai atrás do que quer e não desiste. Ao meu pai, que sempre fez o certo para educar suas filhas, abrindo mão de tudo por nós. Ao meu marido, que é meu companheiro, meu conselheiro, meu amor, minha base. Que tem uma paciência enorme comigo e me ajuda em tudo que pode! E ao meu filho, por ter feito de mim uma pessoa completa e me fazer aproveitar cada pequena coisa da vida. Devo muito do que sou hoje a vocês, e mesmo se pudesse, não mudaria nada do que vivi até hoje, pois tudo isso foram apenas etapas para ter essa família linda! Agradeço também aos meus tios, que muitas vezes foram segundos pais, aos meus avós, que foram pais duas vezes, a minha irmã e aos meus primos por todos os momentos em família que compartilhamos.

Agradeço muito a Pro Marcella... por ser um exemplo de pesquisadora, professora, orientadora e pessoa. Por fazer com que seus alunos queiram dar o melhor de si mesmos, produzir trabalhos cada vez melhores, e não sintam medo de propor ideias. Sou grata por sua ajuda, compreensão, paciência, ensinamentos e amizade ao longo desta jornada. E que venham novos desafios! Com relação aos companheiros de laboratório, a primeira pessoa que quero agradecer é a Erika, primeiro por me falar para procurar a Marcella, porque eu não iria me arrepender... Você estava certa, não me arrependo nem um pouco! Nestes quatro anos conheci pessoas maravilhosas, faço parte de um grupo de pesquisa incrível, tive um excelente exemplo de orientadora, tudo isso porque você não desistiu de “me trazer pra cá”. Também agradeço muito todo o seu apoio nesses anos! A Camila tenho que agradecer por várias coisas, desde disciplinas, correria com coisas da USP, realização de experimentos... Foram tantas coisas ao longo desses quatro anos que seria impossível listar todas elas. A Kelly, pela ajuda com experimentos, por todo o apoio nos momentos de tensão, e pelas muitas risadas! Vocês se tornaram mais do que companheiras de trabalho, se tornaram amigas! A todos aqueles que são parte (Aline, Junior, Giulia, Otávio) e aqueles que já foram parte do nosso grupo (Glaucia, Bobbie), meus mais sinceros agradecimentos!!

Aos professores Marcela Sorelli e Marcelo Christoffolete e aos seus alunos, por todo o apoio em atividades do laboratório e momentos da vida!

Ao professor Marcelo Nogueira e a Patrícia Fontes pela oportunidade e ajuda para utilizar o Biomark.

Ao professor Marc-André Sirard e à Isabelle Dufort por toda a ajuda e apoio que possibilitaram a utilização do EmbryoGENE.

Aos membros da banca, titulares e suplentes. Obrigada por aceitarem este convite.

À Fapesp (2015/03381-0 e 2017/18384-0), a Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao programa de Biotecnologia e a Universidade de São Paulo, a todos os funcionários que sempre estiveram disponíveis para nos ajudar.

À Universidade Federal do ABC, por toda a infraestrutura, as oportunidades e a eficiência em resolver problemas.

Todos vocês são responsáveis pela conclusão desta tese e desta etapa da minha vida. Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

Ispada J. A cinética de desenvolvimento embrionário e suas relações com o perfil epigenético. Tese de doutorado em Interunidades em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O momento das primeiras divisões celulares pode predizer o potencial de desenvolvimento de um embrião, incluindo sua capacidade de estabelecer prenhez. Além de diferenças relacionadas ao metabolismo, estresse e sobrevivência, embriões com diferentes velocidades de desenvolvimento apresentam padrões transcricionais distintos, principalmente relacionados ao metabolismo energético e lipídico. Como o padrão transcricional é regulado por fatores epigenéticos este estudo visou caracterizar os mecanismos epigenéticos envolvidos neste fenótipo. Para isto, embriões bovinos foram produzidos *in vitro* utilizando sêmen sexado (fêmeas) e as 40 horas pós inseminação (hpi) foram classificados como Rápidos (4 ou mais células) ou Lentos (2 ou 3 células), permanecendo em cultivo até o estágio de blastocisto (168 hpi) (Capítulo 1) ou sendo avaliados com 40 hpi, 96 hpi ou 168 hpi (Capítulo 2). No capítulo 1, a análise da metilação global do genoma pelo sistema *EmbryoGENE Methylation DNA Array* (EDMA) identificou 11.584 regiões diferencialmente metiladas (DMRs) (7.976 regiões hipermetiladas em blastocistos derivados do grupo de clivagem rápida –FBL - e 3.608 regiões hipermetiladas em blastocistos derivados de embriões de clivagem lenta - SBL). Os FBL apresentaram mais regiões classificadas como hipermetiladas, distribuídas ao longo do genoma, como nos íntrons, exons, promotores e elementos de repetição, enquanto em SBL, as regiões hipermetiladas estavam mais presentes nas ilhas CpG. As DMRs foram agrupadas em relação aos processos biológicos a que estavam envolvidas, e algumas das vias mais afetadas foram relacionadas à sobrevivência/diferenciação celular e metabolismo energético/lipídico. Os perfis dos transcritos dos genes diferencialmente metilados (DMs) relacionados com estas vias também foram avaliados, e a maior parte revelou mudanças na quantificação relativa. No capítulo 2, foi avaliada ao longo do desenvolvimento a presença de metilações e hidroximetilações do DNA e modificações pós-traducionais de histonas (acetilação e trimetilação da lisina 9 da histona 3 e trimetilação da lisina 27 da histona 3 – H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3, respectivamente). A cinética das primeiras clivagens influenciou a maioria das modificações epigenéticas estudadas desde os estágios iniciais até o blastocisto (exceto

pela hidroximetilação do DNA e H3K27me3). A análise dos transcritos relacionados a inclusão ou remoção dessas modificações corroborou o padrão de modificações encontrado. É possível concluir que a cinética das primeiras clivagens apresenta relação com modificações epigenéticas nos embriões e que se manterão até o final do desenvolvimento pré-implantacional, resultando em blastocistos de padrão transcricional e metabólico distintos, podendo influenciar na viabilidade embrionária.

Palavras chave: Embriões. Bovino. Morfocinética. Epigenética.

ABSTRACT

Ispada J. The kinetics of embryonic development and its relationships with epigenetic profile. Ph.D. thesis in Interunidades em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

The timing of the first cell divisions may predict the developmental potential of an embryo, including its ability to establish pregnancy. Besides differences related to metabolism, stress, and survival, embryos with different speeds of development present distinct patterns of gene expression, mainly related to energy and lipid metabolism. As gene expression is regulated by epigenetic factors, and that includes DNA methylation patterns, in this study we compared the global DNA methylation profile of embryos with different kinetics of development in order to identify general pathways and regions that are most influenced by this phenotype. For this, bovine embryos were produced in vitro using sexed semen (females) and the 40 hours post insemination (hpi) were classified as Fast (4 or more cells) or Slow (2 or 3 cells), remaining in culture until the blastocyst stage (168 hpi) (Chapter 1) or evaluated at 40 hpi, 96 hpi or 168 hpi (Chapter 2). In Chapter 1, the analysis of global DNA methylation by EmbryoGENE DNA Methylation Array (EDMA) identified 11,584 differentially methylated regions (DMRs) (7,976 regions hypermethylated in blastocysts derived from the fast cleavage group -FBL- and 3,608 hypermethylated regions in blastocyst derived from the slow cleavage group -SBL). FBL presented more regions classified as hypermethylated, distributed throughout the genome, as in introns, exons, promoters and repeating elements, whereas in SBL, hypermethylated regions were more present in the CpG islands. DMRs were grouped in relation to the biological processes to which they were involved, and some of the most affected pathways were related to cell survival/differentiation and energy/lipid metabolism. Profiles of transcripts of differentially methylated (DMs) genes related to these pathways were also evaluated, and most presented changes in relative quantification. In Chapter 2, the presence of DNA methylations and hydroxymethylations and post-translational histone modifications (histone 3 lysine 9 acetylation and trimethylation and histone 3 lysine 27 trimethylation - H3K9ac, H3K9me3 and H3K27me3, respectively). The kinetics of the first cleavages influenced most of the epigenetic modifications studied

from the initial stages to the blastocyst (except DNA hydroxymethylations and H3K27me3). The analysis of the transcripts related to insertion or removal of these modifications corroborated the pattern of modifications. It is possible to conclude that the kinetics of the first cleavages is related with epigenetic modifications in embryos that will be maintained through the pre-implantation development, resulting in blastocysts with different transcriptional and metabolic patterns, which might influence the embryonic viability.

Keywords: Embryos. Bovine. Morphokinetics. Epigenetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da PIV indicando os principais eventos que devem ocorrer em cada uma destas etapas para garantir a formação dos blastocistos. **29**

Figura 2: (A) Processo de desmetilação passiva que ocorre durante as clivagens, sendo dependente da presença ou ausência de DNMT1. No processo de desmetilação passiva, as citosinas metiladas (representadas em preto) são diluídas entre as fitas de DNA durante o processo de replicação, resultando na formação do DNA com uma das fitas com citosinas metiladas e a outra fita com citosinas desmetiladas (representadas em branco); (B) Processo de desmetilação ativa realizado pelas enzimas TET. Estas enzimas são responsáveis pela oxidação de 5-metilcitosina (5mC) à 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina(5caC). Estas modificações intermediárias no processo de desmetilação e a própria 5mC podem sofrer a ação direta de enzimas (AID, TDG, entre outras) que culminaram com a ativação do mecanismo de excisão de base (BER); (C) Processo de metilação de novo realizado pelas enzimas DNMT3a ou DNMT3b, quando citosinas não metiladas (representadas em branco) são metiladas (representadas em preto) sem que exista marcação prévia. **34**

Figura 3: Representação da desmetilação do DNA no genoma paterno (azul) e materno (vermelho) iniciada logo após a fertilização. A menor intensidade de metilações do DNA é observada em embriões no estágio de 8-16 células, quando é iniciada a metilação ‘de novo’ do genoma embrionário (preto). **37**

Figura 4: Principais modificações pós-traducionais nas histonas H3 e H4. Os grupos adicionados ac – acetil (rosa); me – metil (verde); ph – fosforil (amarelo); Ub – ubiquitina (azul) em aminoácidos lisina (K), arginina (R), serina (S) ou treonina (T) (55). **38**

Figura 5: Diagrama de Venn representando as sondas expressas acima do background para blastocistos rápidos e lentos. Em vermelho são representadas as sondas expressas acima do background presentes apenas em FBL, em azul as sondas acima do background presentes apenas em SBL e em lilás as sondas expressas acima do background nos dois grupos. **59**

Figura 6: Gráfico de Volcano Plot demonstrando as DMRs hipermetiladas em FBL (Direita – 7976) e hipermetiladas em SBL (Esquerda – 3608). Cada ponto representa uma DMR, sendo localizada de acordo com seus valores de $\log_2(\text{Fold Change})$ e p valor.

Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$. **59**

Figura 7: Circular plot mostrando as DMRs mais significantes distribuídas entre os cromossomos e regiões *imprinted*. **60**

Figura 8: Regiões gênicas hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul) (próximo de promotor [PP] e distal de promotor [DP]). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 $P < 0.05$. **61**

Figura 9: Elementos de repetição hipermetilados em FBL (vermelho) e em SBL (azul) (baixa complexidade [LC], long-terminal-repeat[LTR], repetição simples [SR], long-interspersed repetitive elements [LINEs] e short-interspersed repetitive elements [SINEs]). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$. **62**

Figura 10: Proximidade de ilhas CpGs hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$. **63**

Figura 11: Comprimento de ilhas CpGs hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$. **63**

Figura 12: Densidade de metilações de ilhas CpGs em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$. **64**

Figura 13: Via hipotética de estresse e morte celular identificada como diferencialmente metilada. A esquematização foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos preto representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram as diferenças na expressão de DDIT3, NFE2L2, GPX1, TXNRD1, NOS2, BAX, BID, FOXO3, CASP9 e HSPA1A de FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$). **69**

Figura 14: Via de pluripotência identificada como diferencialmente metilada entre FBL e SBL. A representação foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos preto representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos

representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram a diferença na expressão de SALL4, NANOG, SOX2 e POU5F1 para FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$). **70**

Figura 15: Via proposta para o metabolismo lipídico identificada como diferencialmente metilada. A representação esquemática foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos preto representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram a diferença na expressão de FASN, SCD, ELOVL6, FADS2, PTGS2, ACSL3, ACSL6, PPAR α e PPAR γ para FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$). **71**

Figura 16: (A) Intensidade de fluorescência de 5mC e (B) 5hmC, em unidades arbitrárias, de embriões de cinética rápida (vermelho) e lenta (azul) as 40 hpi (CL), durante a ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Em (C) estão representados os genes identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinética rápida e lenta as 40 hpi (identificados por quadrado azul) e no estágio de blastocisto (identificados por quadrado vermelho). Em D estão representados os genes cujos transcritos atuam nos processos de metilação e desmetilação do DNA, assim como aqueles que atuam nos processos de síntese e consumo de SAM e α -cetoglutarato. A citosina (C) é metilada pelas enzimas DNMT1, DNMT3A ou DNMT3B, sendo convertida a 5-metilcitosina (5mC), através da transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM). Esta 5mC pode ser protegida da desmetilação pela proteína STELLA, ou ser oxidada pelas enzimas TET1, TET2 ou TET3, que utilizam o α -cetoglutarato (α KG), 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxilcitosina (5caC) ou 5-formilcitosina (5fC). Estes dois últimos podem ser glicosilados pela TDG e seguirem para o mecanismo de excisão de bases (BER – composto por: NEIL3, NEIL2, LIG3, XRCC1 e APEX1), retornando à forma de citosina não metilada. Ainda, 5mC e 5hmC podem ser convertidos por AICDA/APOBEC1 à Timina (T) e 5-metiluracila (5hmU), respectivamente, sendo a primeira removida por TDG/MBD4 e a segunda por TDG/SMUG1, ambas seguindo para o BER. Com relação aos metabolitos utilizados nestes processos, a SAM é convertida a partir de uma

metionina pela ação de MAT1A, MAT2A e MAT2B, podendo ser desviada para a produção de poliaminas por AMD1. O α -cetoglutarato pode ser produzido a partir do glutamato pela GLUT1 ou do isocitrato por IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDH3G, podendo seguir no ciclo do ácido tricarboxílico através da conversão à isosuccinato pela enzima OGDH.

85

Figura 17: Painel representativo com imagens demonstrando a intensidade de fluorescência 5mC e 5hmC em embriões de cinética rápida e lenta nos estágios de Clivagem (CL), Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Imagens obtidas em aumento de 400 vezes.

86

Figura 18: Resultados obtidos para a intensidade de fluorescência de H3K9ac (A) em embriões de cinética rápida (laranja) e lenta (verde) as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Em (B) são apresentadas imagens representativas do padrão de fluorescência para esta modificação em embriões de cinéticas distintas ao longo do desenvolvimento. Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. (C) genes identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinética rápida e lenta no estágio de blastocisto. (D) Representação esquemática dos processos de acetilação pelas enzimas ELP3 e HAT2A e desacetilação pela SIRT1 e SIRT6. Além disso, estão representadas as enzimas CS (converte Acetil-CoA e oxaloacetato em citrato, ACLY (conversão de citrato em Acetil-CoA), ACSS1, 2 e 3 (responsáveis pela conversão de acetato em Acetil-CoA), ACACA (responsável pelo desvio de Acetil-CoA para a produção de ácidos-graxos), que atuam na produção e consumo de Acetil-CoA.

88

Figura 19: Intensidade de fluorescência da tripla metilação de H3K9 em embriões de cinética rápida (laranja) e lenta (verde) as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL), apresentada na forma de gráfico (A) ou de imagens representativas (B). Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. Em (C) estão representados os transcritos identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinéticas distintas as 40 hpi (identificados por quadrado laranja) e Blastocisto (identificados por quadrado verde). Em (D) é possível visualizar as enzimas que atuam em cada uma das etapas do processo de desmetilação e metilação de H3K9.

90

Figura 20: Média da intensidade de fluorescência de H3K27me3 obtida para a em embriões com diferentes cinéticas as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL) (A). Embriões rápidos estão representados em laranja e embriões lentos em verde. Em (B) são apresentadas imagens representativas de cada uma destas

avaliações. Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. Em (C) é possível visualizar os transcritos identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinéticas distintas em CL (identificados por quadrado laranja) e Blastocisto (identificados por quadrado verde) e em (D) é possível visualizar as enzimas que atuam em cada uma das etapas do processo de desmetilação e metilação de H3K27. **92**

Figura 21: Conclusões obtidas através da associação dos resultados do Capítulo 1 e Capítulo 2. **93**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características morfológicas utilizadas na classificação de CCOs em grau I, II e III.	48
Tabela 2: Primers desenhados para a validação do EmbryoGENE DNA methylation <i>array</i> .	53
Tabela 3: Porcentagem de clivagem e de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto nos grupos FBL e SBL.	58
Tabela 4: Principais anotações hipermetiladas em embriões de clivagem rápida.	65
Tabela 5: Principais anotações hipermetiladas em embriões de clivagem lenta.	66
Tabela 6: Porcentagem de metilação do DNA das DMRs selecionadas para a validação do <i>microarray</i>	67
Tabela 7: Anticorpos utilizados para imunofluorescência.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

5caC	5-carboxilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AID	<i>Activation-induced deaminase</i>
APOBEC1	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo de excisão de base
BSA	Albumina sérica bovina
CCO	Complexo cumulus-oócito
cDNA	DNA complementar
CH₃	Grupamento metila ou metil
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
CpG	Citosina-Fosfato-Guanina
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DDIT3	<i>DNA damage inducible transcript 3</i>
DM	Diferencialmente metilado
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Distal de promotor
EDMA	<i>EmbryoGENE DNA methylation array</i>
FBL	Blastocistos derivados do grupo de “clivagem rápida”
FBL	Embrião clivado rápido
FGA	Embrião na fase de ativação do genoma derivados do grupo de “clivagem rápida”
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>

FSH	Hormônio folículo estimulante
gDNA	DNA genômico
H3K27me1	Mono metilação da lisina 27 da histona 3
H3K27me2	Bi metilação da lisina 27 da histona 3
H3K27me3	Tri metilação da lisina 27 da histona 3
H3K9ac	Acetilação da lisina 9 da histona 3
H3K9me1	Mono metilação da lisina 9 da histona 3
H3K9me2	Bi metilação da lisina 9 da histona 3
H3K9me3	Tri metilação da lisina 9 da histona 3
HCP	Regiões promotoras de alta intensidade de CpGs
HO·	Hidroxil ou hidroxila
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
hpi	Horas pós-inseminação
ICP	Regiões promotoras de intensidade intermediária de CpGs
iRNA	RNAs de interferência
KSOM	Potassium Simplex Optimization Medium
LCP	Regiões promotoras de baixa intensidade de CpGs
LH	Hormônio luteinizante
LINEs	<i>Long-interspersed repetitive elements</i>
LMA-PCR	Ligação mediada por amplificação em PCR
LTR	<i>Long-terminal-repeat</i>
MBP	<i>Methyl Binding Proteins</i>
miRNA	Micro RNAs
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
PBS	Solução fosfato-salina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHE	Penicilamina, hipotaurina, epinefrina
PP	Próximo de promotor
PVP	Polivinilpirrolidona
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time reverse transcription PCR</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPKM	<i>Reads Per Kilobase Million</i>

SBL	Blastocistos derivados do grupo de “clivagem lenta”
SCL	Embrião clivado lento
SCNT	Transferência nuclear de célula somática
SFB	Soro fetal bovino
SGA	Embrião na fase de ativação do genoma derivados do grupo de “clivagem lenta”
SINEs	<i>Short-interspersed repetitive elements</i>
SOF	Fluído sintético de oviduto
TA	Temperatura ambiente
TALP	<i>Tyrode’s albumin-lactate-pyruvate</i>
TCM-199	<i>Tissue Culture Medium-199</i>
TDG	Timidina DNA glicosilase
TET	<i>Ten-eleven-translocation</i>
VG	Vesícula germinativa
ΔCt	Delta Ct

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
ϵ	Épsilon
$<$	Menor que
$\%$	Porcentagem
$=$	Igual
®	Marca registrada
μ	Micro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Produção de embriões bovinos <i>in vitro</i>	27
2.2 Cinética do desenvolvimento embrionário	29
2.3 Mecanismos epigenéticos	31
2.3.1 Metilações do DNA	32
2.3.2 Metilações do DNA em embriões bovinos	35
2.3.3 Modificações pós-transcricionais de histonas	37
2.3.4 Modificações pós-traducionais de histonas em embriões bovinos	40
3 HIPÓTESES	43
CAPÍTULO 1	44
4 Objetivos.....	45
5 Material e Métodos	46
5.1 Delineamento experimental	46
5.1.1 Coleta e maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos	46
5.1.2 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	47
5.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	47
5.1.4 Classificação cinética	48
5.1.5 Avaliação de embriões em estágio de blastocisto	48
5.2 EmbryoGENE DNA methylation array (EDMA).....	48
5.2.1 Extração do DNA genômico.....	49
5.2.2 Digestão com enzima MseI	49
5.2.3 Ligação de adaptadores aos fragmentos de gDNA.....	49
5.2.4 Digestão com enzimas sensíveis à metilação do DNA.....	50
5.2.5 Eficiência da digestão de enzimas sensíveis à metilação do DNA.....	50
5.2.6 Seleção de fragmentos por ligação mediada em PCR (LMA-PCR).....	51
5.2.7 Purificação e remoção de adaptadores.....	51
5.2.8 Marcação do gDNA e hibridização do array	52
5.2.9 Validação dos resultados do Embryogene.....	52
5.3 Análise de transcritos.....	53
5.3.1 Extração de RNA.....	54
5.3.2 Síntese de cDNA	54
5.3.3 Pré-amplificação	54
5.3.4 Leitura em BioMark™ HD System.....	55
5.4 Análise dos resultados	55

6 Resultados.....	58
3.1 Produção de embriões bovinos	58
3.2 Regiões diferencialmente metiladas	58
3.3 Anotação Funcional	64
3.4 Validação dos resultados de EmbrioGENE.....	66
3.5 Análise de transcritos e correlação com padrão de metilação	67
7. Discussão.....	72
CAPÍTULO 2	77
8. Objetivos.....	78
9. Metodologia.....	79
9.1 Coleta de amostras.....	79
9.2 Imunofluorescência de 5mC e 5hmC	79
9.3 Imunofluorescência de H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3.	80
9.4 Análise de transcritos de RNAseq (Banco de dados)	81
9.5 Análise dos resultados	81
10. Resultados.....	83
10.1 Imunofluorescência de 5mC.....	83
10.2 Imunofluorescência de 5hmC.....	83
10.3 Análise de transcritos envolvidos na metilação e desmetilação do DNA	84
10.4 Imunofluorescência de H3K9ac	87
10.5 Análise de transcritos de genes envolvidos na acetilação e desacetilação de H3K9	87
10.6 Imunofluorescência de H3K9me3	89
10.7 Análise de transcritos de genes envolvidos na metilação e desmetilação de H3K989	
10.8 Imunofluorescência de H3K27me3	91
10.9 Análise de transcritos de genes envolvidos na metilação e desmetilação de H3K27	91
11 Discussão	94
12 CONCLUSÕES	100
BIBLIOGRAFIA	101
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

No dia 9 de junho de 1.981, ocorreu o nascimento do primeiro bezerro oriundo de produção in vitro (PIV) (1) revisado por (2). Quase 40 anos depois, esta técnica foi aperfeiçoada e é utilizada tanto para fins comerciais quanto para pesquisa básica e aplicada. Comercialmente, a PIV permite que ocorra encurtamento do intervalo geracional de animais de interesse zootécnico, além de aumentar a quantidade de prole que pode ser gerada a partir de gametas destes animais (3). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de in vitro de embriões bovinos do mundo (4), demonstrando a importância desta biotecnologia para o mercado nacional. Com relação às aplicações para pesquisa, a utilização de embriões bovinos pode ter enfoque no melhoramento das etapas da PIV, das técnicas de criopreservação e transferência embrionária e da recuperação e armazenamento de gametas; ou ser utilizada como ferramenta para compreender os eventos bioquímicos, moleculares e epigenéticos que ocorrem durante produção de gametas e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (3; 5).

De fato, a melhor compreensão dos eventos associados ao desenvolvimento embrionário, quais fatores ambientais exercem maior impacto nestes, e quais características fenotípicas destes embriões estão associadas ao maior sucesso na formação de blastocistos e sucesso da implantação podem permitir a seleção de embriões com maior potencial para gerar prenhez (6; 7). Uma ferramenta não invasiva para a seleção de embriões utilizada em humanos é baseada na morfocinética destes (8; 9), embora esta ainda seja controversa e pareça variar entre espécies (8; 10; 11). Sabe-se que embriões bovinos com cinéticas distintas durante as primeiras clivagens apresentam alterações metabólicas, no consumo e segregação de moléculas e no perfil de mRNA (12; 13; 14). Desta forma, é possível supor que esses embriões apresentem diferenças epigenéticas, fazendo-se necessária a compreensão da dimensão destas diferenças, visto que ao selecionar embriões de cinética distintas também estamos selecionando embriões com alterações em processos biológicos (12; 10).

Desde que o conceito de epigenética foi proposto por Conrad H. Waddington, nos primeiros anos da década de 1.940, um grande número de mecanismos específicos que desempenham papel crucial na definição do perfil de expressão gênica em diferentes tecidos ou em diferentes momentos vem sendo elucidados (15; 16). Esses mecanismos são, principalmente: a metilação e hidroximetilação do DNA, que consistem na presença

de um grupo metil (CH_3) ou hidroxil (HO^-), respectivamente, em citosinas; e as modificações pós-traducionais de histonas, uma grande variedade de alterações nos aminoácidos das caudas N-terminais de histonas, tais como metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, entre outros (15; 16).

Estes mecanismos epigenéticos desempenham papéis importantes no desenvolvimento embrionário inicial, quando o zigoto inicia intensas alterações epigenéticas (reprogramação), principalmente metilação e hidroximetilação de DNA, e metilação e acetilação de histonas, para garantir que o embrião tenha o potencial de gerar um indivíduo com grande diversidade celular (15; 17). Ainda, sabe-se que a PIV de embriões pode perturbar esta reprogramação epigenética, afetando assim a capacidade destes em se desenvolver corretamente (16). No entanto, poucos estudos se concentraram em entender como esses mecanismos trabalham juntos durante esta reprogramação embrionária e como, mesmo em grupos aparentemente homogêneos de embriões, esses mecanismos poderiam ser diferentemente ativados.

Com base nessas informações, o presente trabalho estudou embriões bovinos com diferentes cinéticas nas primeiras clivagens em diferentes estágios para expor as variações nos mecanismos epigenéticos que exercem função regulatória durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (16). Com este trabalho espera-se também compreender quais as possíveis consequências biológicas destas alterações epigenéticas em blastocistos gerados a partir de embriões de cinética rápida e lenta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de embriões bovinos *in vitro*

A PIV de embriões bovinos constitui um alvo para a aplicação de novos processos capazes de melhorar as taxas reprodutivas e, conseqüentemente, produtivas de bovinos (18). Em 2.016 o número de embriões PIV transferidos foi de 448.113 em todo o mundo e o Brasil foi responsável por aproximadamente 62% destas transferências, demonstrando seu importante papel na economia e produção brasileira (4). A PIV é uma técnica que contribui para a obtenção de embriões de matrizes de elevado interesse genético e desde o nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro*, em 1.981, foram obtidos avanços consideráveis nesta técnica (19). Atualmente, a PIV é dividida nas etapas de maturação e fecundação de oócitos e o cultivo *in vitro* de embriões (MIV, FIV e CIV, respectivamente).

Durante a MIV deverá ocorrer a maturação nuclear e citoplasmática/molecular dos oócitos, assim como ocorreria no ambiente *in vivo*. Resumidamente, na maturação nuclear, o oócito bovino que se encontrava bloqueado no diplóteno da prófase I (conhecido como a fase de vesícula germinativa – VG) retoma a meiose, promove a extrusão do primeiro corpúsculo polar e atinge a metáfase II, quando sofre um novo bloqueio meiótico. A retomada da meiose e extrusão do segundo corpúsculo polar ocorrem apenas após a fertilização (20). A maturação citoplasmática/molecular garante ao oócito a capacidade de ser fertilizado e de suportar estágios subsequentes do desenvolvimento. Este processo envolve, principalmente, a redistribuição de diversas organelas celulares (mitocôndrias, grânulos corticais, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e ribossomos) e estoque de mRNAs materno, proteínas e fatores de transcrição (21) (Figura 1). Problemas associados a MIV, como a utilização de meios de cultura não otimizados e condições ambientais diferentes das observadas fisiologicamente, levam a produção de oócitos incapazes de serem fertilizados e/ou suportar os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário em decorrência de falhas na maturação nuclear e, principalmente, na maturação citoplasmática/molecular (22).

Após a MIV, os oócitos maturados são incubados com espermatozoides capacitados ou que estão em processo de capacitação. Para a otimização do ambiente *in vitro*, diversas moléculas são acrescentadas ao meio para garantir que os espermatozoides

consigam realizar a capacitação (que fisiologicamente ocorre no trato reprodutor feminino) e, futuramente, a reação acrossomal (23). Somente após esta reação o espermatozoide conseguirá se ligar às componentes da zona pelúcida para que ocorra a fusão do espermatozoide ao oócito. Esta fusão desencadeia o processo de bloqueio de poliespermia ocasionado pela extrusão dos grânulos corticais induzida pela liberação do Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático liso. Esse evento é seguido de picos de Ca^{2+} decrescentes que são essenciais para a retomada e término da meiose oocitária e extrusão do segundo corpúsculo polar (24). A FIV constitui outro gargalo da PIV de embriões, pois problemas na preparação do espermatozoide levam à incapacidade deste em fecundar o oócito (23) (Figura 1).

Após a FIV, inicia-se o processo de CIV, a etapa mais longa da PIV. Neste momento, ocorrerão sucessivas divisões mitóticas que levarão ao aumento no número de blastômeros. Nas clivagens iniciais ocorre a divisão do conteúdo celular do blastômero-mãe entre os blastômeros-filhos até que, após o quarto ciclo de divisões (quando o embrião atinge o estágio de 8 células), aproximadamente, o embrião inicia a transcrição de seus próprios mRNAs (ativação do genoma embrionário) (25) (Figura 1). Esta etapa é crítica para o desenvolvimento embrionário e momento em que ocorre grande bloqueio na progressão do desenvolvimento. Nas divisões subsequentes, ocorre aumento do número celular resultando na formação da mórula que, futuramente, formará a mórula compacta ocasionada por mudanças nos perfis das junções entre as células. As clivagens seguintes serão acompanhadas pela diferenciação das primeiras linhagens celulares do desenvolvimento, a massa celular interna e trofotoderma que deixarão de ser blastômeros totipotentes e se tornarão pluripotentes, levando a formação do blastocisto (26).

Figura 1: Etapas da PIV indicando os principais eventos que devem ocorrer em cada uma destas etapas para garantir a formação dos blastocistos.

Embora a PIV tenha crescido substancialmente nas últimas décadas, ainda é uma técnica de baixa eficiência e que produz embriões de menor qualidade, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo*. Aproximadamente 30% dos oócitos submetidos à MIV se desenvolvem até o estágio de blastocisto (25) e menos de 50% dos embriões transferidos são capazes de gerar prenhez (27). Além disso, gestações produzidas por transferência de embriões oriundos de PIV estão associadas ao aumento na incidência de abortos, bezerros com maior tamanho e peso ao nascer, períodos de gestação mais longos, aumento da mortalidade perinatal e elevação de anomalias congênitas (28). Diante destes fatos, muitos estudos avaliando individualmente e buscando melhorias de cada uma das etapas envolvidas no processo de PIV e desenvolvendo metodologias que permitam identificar embriões de melhor qualidade e capacidade de estabelecer gestação vem sendo aplicados (29).

2.2 Cinética do desenvolvimento embrionário

Existem relatos de que a cinética embrionária representa um alvo potencial para prever a capacidade de desenvolvimento embrionário e a probabilidade deste embrião em estabelecer gestação. Em humanos, foi descrito que embriões que clivam primeiro (possuem 2 células em 25-27h) após injeção intracitoplasmática de espermatozoides apresentam maior taxa de gestação após a transferência do que embriões de clivagem posterior a este período (30) (31). Estes parâmetros parecem ser herdados do oócito, uma

vez que o embrião utiliza o estoque materno de mRNAs e proteínas durante as primeiras divisões embrionárias (32; 7).

A relação da cinética com perfis metabólicos vem sendo estudada na tentativa de se fornecer um método de seleção de viabilidade embrionária mais eficiente e não invasivo. Neste sentido, embriões de cinética de desenvolvimento mais lenta apresentam maiores níveis de transcritos de genes envolvidos em produção de energia por diversas vias como glicólise, fosforilação oxidativa, respiração celular, entre outros, sugerindo um metabolismo mais ativo (12). Estes embriões metabolicamente mais ativos, no entanto, parecem sofrer mais por danos ao Ácido desoxirribonucleico (DNA), o que poderia levar a ativação prematura do genoma e diminuição de qualidade do embrião (33); alto consumo de piruvato e glutamato na fase de mórula; e acúmulo de lipídios no estágio de blastocisto (12). Por outro lado, embriões bovinos de desenvolvimento rápido apresentam altos níveis de enzimas antioxidantes; menor metabolismo e índice glicolítico; menor reversão de aminoácidos (34); aumento no consumo de glicose na fase de ativação do genoma embrionário (12) e pouco acúmulo de lipídios no estágio de blastocistos (12).

Com relação à viabilidade embrionária, parece existir uma necessidade maior na ativação de mecanismos de sobrevivência em embriões de desenvolvimento rápido do que embriões lentos (13). Também já foi relatado que o consumo e secreção (produção) de metabólitos globais são diferentes entre embriões rápidos e lentos nas fases de clivagem, mórula e blastocisto (14).

Diferenças nos padrões transcricionais em embriões de cinética distinta sugerem que, entre estes grupos PIV, possam existir padrões epigenéticos distintos, visto que estes são importantes mecanismos regulatórios da transcrição gênica (16). A análise do perfil epigenético de embriões PIV com diferentes cinéticas de desenvolvimento representa um parâmetro relevante para identificação de embriões com maior semelhança aos produzidos *in vivo*, o que possibilitaria a identificação de embriões de maior qualidade (35) (36).

Dentro do contexto da cinética de desenvolvimento embrionário, não existem relatos sobre mudanças de padrões epigenéticos e suas possíveis relações com a qualidade embrionária para bovinos. Porém, em camundongos, já foi visto que embriões com alta cinética apresentam maiores perturbações no *imprinting* genômico do que aqueles com

baixa cinética de desenvolvimento. Embriões que se desenvolvem lentamente apresentaram maiores semelhanças a embriões produzidos *in vivo*, exibindo quantidades semelhantes de células, volume embrionário e metilação de genes que devem ser silenciados, como observado para o gene H19. Estes dados demonstram a possível relação entre a cinética embrionária e a existência de padrões epigenéticos aberrantes (10).

Estas informações revelam que existe grande controvérsia quanto à relação entre qualidade embrionária e cinética do desenvolvimento, principalmente quando são comparadas espécies distintas. Consequentemente, é necessário entender como a cinética embrionária está afetando, ou sendo um marcador, de diferenças metabólicas, morfológicas e epigenéticas, entre outras, existentes entre estes grupos.

2.3 Mecanismos epigenéticos

O conceito de epigenética foi introduzido no início da década de 40 por Conrad H. Waddington, sendo definido atualmente como qualquer atividade regulatória de genes que não envolvem mudanças na sequência do DNA e que pode persistir por uma ou mais gerações (16). O prefixo *epi*, de origem grega, significa “acima de”, representando uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética (37). Mudanças epigenéticas exercem um papel crucial na definição do perfil de expressão gênica em diferentes tecidos ou em tempos diferentes. Enquanto o código genético é considerado relativamente estático, o código epigenético, por sua vez, é considerado altamente dinâmico e tecido-específico na maioria das células de um mesmo organismo (16).

Os principais reguladores epigenéticos das células dos mamíferos incluem os seguintes mecanismos: metilação do DNA pela adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 de citosinas, predominantemente em regiões de DNA conhecidas como ilhas CpG (*Cytosine-Phosphate-Guanine*); modificações pós-traducionais de histonas, através de alterações nos resíduos presentes na cauda N-terminal de histonas, tais como metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, entre outros; remodelamento da cromatina através da ação de complexos proteicos dependentes de ATP, que alteram a localização e/ou estrutura dos nucleossomos; substituição de histonas por variantes com estabilidades diferentes ou especializadas em diferentes domínios de DNA; e ação de RNA não codificantes, como micro RNAs (miRNA) e RNAs de interferência (iRNA), que regulam a expressão gênica no nível pós-transcricional (17; 15; 16).

Os mecanismos de controle epigenético regulam funções celulares cruciais para a diferenciação celular e a plasticidade. Estas funções envolvem a garantia de estabilidade do genoma, inativação do cromossomo X, realização e manutenção do *imprinting* genômico, silenciamento de elementos de transposição do DNA, plasticidade em resposta à fatores ambientais diversos e estrutura e função celular tecido-específica (17; 15).

As regulações epigenéticas são especialmente importantes durante o desenvolvimento embrionário inicial, quando as células com DNA altamente inacessível para transcrição (gametas) são transformadas em células que têm DNA acessível para realizar a transcrição de um grande número de genes (blastômeros em estágios iniciais). No decorrer do desenvolvimento embrionário, o DNA desses blastômeros (até então totipotente) começa a perder a capacidade de transcrever alguns genes e ativa diferencialmente a transcrição de outros, levando a formação das primeiras linhagens de células embrionárias, a massa celular interna e o trofotoderma (blastômeros pluripotentes) (17; 15). Os principais mecanismos epigenéticos que atuam no desenvolvimento embrionário pré-implantacional de embriões bovinos e como eles são ativados e desativados ao longo deste desenvolvimento serão detalhados a seguir.

2.3.1 Metilações do DNA

Dentre os mecanismos epigenéticos conhecidos, a metilação do DNA é considerada a mais importante e, portanto, a mais estudada em mamíferos (38; 39). A metilação do DNA é uma modificação epigenética que consiste na metilação de citosinas, levando a formação de 5-metilcitosinas (5mC). Este mecanismo ocorre mais frequentemente em dinucleotídeos GpG em áreas genômicas conhecidas como ilhas CpG (regiões contendo mais de 200 pares de bases com aproximadamente 60% de dinucleótidos CpG), localizados principalmente em regiões promotoras de genes (40). Embora a metilação possa existir em dinucleotídeos não CpG, esse padrão é mais raro e sua função ainda é pouco conhecida (17). As metilações do DNA também estão relacionadas ao *imprinting* genômico e à indução de modificações pós-traducionais de histonas. O *imprinting* genômico é um fenômeno no qual um gene específico é silenciado em um alelo, dependendo da origem deste, podendo ser observado *imprinting* materno ou paterno (16).

A presença do grupamento metila em uma citosina pode reprimir fortemente a transcrição gênica por impedimento estérico, impedindo que os fatores de transcrição se liguem a essas regiões. A inibição da transcrição também pode ocorrer através de Proteínas de Ligação a Metila (MBP), proteínas que possuem afinidade pelo grupo metila, que se ligam aos dinucleotídeos CpGs metilados e atuam dificultando o acesso de fatores de transcrição (41). Elevados níveis de metilação em dinucleotídeos CpG em regiões promotoras estão associados principalmente à repressão da transcrição e, portanto, ao silenciamento gênico (17). No entanto, análises detalhadas de ilhas CpG levaram à classificação dos promotores em três categorias com base na diferença de quantidade de CpGs e no tamanho destas regiões. A alta intensidade de CpGs nas regiões promotoras (HCPs) tem sua metilação associada ao silenciamento da transcrição. Da mesma forma, regiões promotoras de intensidade intermediária de CpGs (ICPs) tornam-se inativas quando metiladas, levando ao silenciamento gênico e são mais frequentes em genes promotores relacionados a células pluripotentes e germinativas. Já em regiões promotoras de baixa densidade de CpGs (LCPs), que normalmente encontram-se hipermetiladas, permanecem ativas transcricionalmente, independentemente da presença ou ausência de metilações (17).

Durante a metilação, o grupo metila da S-adenosilmetionina é transferido para o DNA pelas enzimas DNA metiltransferase (DNMTs). As DNMTs são uma família de dois tipos diferentes de enzimas: aquelas envolvidas na manutenção de metilações durante processos de replicação, como o DNMT1; e enzimas que inserem metilações em regiões do DNA sem que estas apresentem indicação para metilação, tais como DNMT3a e DNMT3b (42). Além disso, existe a DNMT3-like (DNMT3l), uma proteína cataliticamente inativa que interage e regula a atividade de DNMT3a ou DNMT3b (17).

A remoção do grupamento metila do DNA, ou desmetilação, pode ocorrer passivamente ou ativamente. A forma passiva ocorre quando a manutenção da metilação pelas enzimas metiltransferases é inativada durante os ciclos celulares e na forma ativa a remoção do grupo metila ocorre através de enzimas desmetilases (Figura 2). O processo de desmetilação permite que marcas epigenéticas sejam apagadas durante o desenvolvimento ou em resposta a fatores ambientais (40). As enzimas responsáveis pela desmetilação são TET 1-3 (Ten-eleven-translocation). Estas enzimas têm a capacidade de oxidar a 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hC), que pode ser convertida

em 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC). Estas duas últimas formas são alvos da glicosilase de timidina do DNA (TDG) e processadas pela via de reparação por excisão de bases (BER) (17; 15). Além disso, 5mC e 5hmC podem ser convertidos em citosinas desmetiladas através da atuação de desaminases induzidas por ativação (AID) ou polipeptídeo catalítico de edição do mRNA da apolipoproteína B (APOBEC1), entre outros, a timidina e 5-hidroximetiluracila, respectivamente, levando a ativação de BER (17; 15).

Figura 2: (A) Processo de desmetilação passiva que ocorre durante as clivagens, sendo dependente da presença ou ausência de DNMT1. No processo de desmetilação passiva, as citosinas metiladas (representadas em preto) são diluídas entre as fitas de DNA durante o processo de replicação, resultando na formação do DNA com uma das fitas com citosinas metiladas e a outra fita com citosinas desmetiladas (representadas em branco); (B) Processo de desmetilação ativa realizado pelas enzimas TET. Estas enzimas são responsáveis pela oxidação de 5-metilcitosina (5mC) à 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC). Estas modificações intermediárias no processo de desmetilação e a própria 5mC podem sofrer a ação direta de enzimas (AID, TDG, entre outras) que culminaram com a ativação do mecanismo de excisão de base (BER); (C) Processo de metilação *de novo* realizado pelas enzimas DNMT3a ou DNMT3b, quando citosinas não metiladas (representadas em branco) são metiladas (representadas em preto) sem que exista marcação prévia.

Os padrões de metilações do DNA em células somáticas são na sua maioria estáveis e hereditários. Já em células germinativas durante a gametogênese e durante o desenvolvimento embrionário inicial o genoma é reprogramado epigeneticamente (15). Essa reprogramação ocorre por meio da desmetilação e metilação ‘de novo’, sendo regulado, no início do desenvolvimento embrionário, pelo estoque de DNMTs e TETs

materno do oócito e posteriormente, pela expressão destas enzimas após a ativação do genoma embrionário (15).

2.3.2 Metilações do DNA em embriões bovinos

No contexto da reprodução, sabe-se que os gametas de mamíferos apresentam maior quantidade de metilações do DNA do que células somáticas e que durante a gametogênese e o desenvolvimento embrionário ocorrem dois ciclos de reprogramação em padrões epigenéticos (17). O primeiro ciclo ocorre durante a gametogênese com a desmetilação do DNA nas células germinativas primordiais, que ocorre em diferentes momentos e locais em machos e fêmeas, e o subsequente estabelecimento de um padrão metilações do DNA específico de espermatozoides os oócitos (17). Nos gametas masculinos, a remetilação do DNA inicia-se ainda no desenvolvimento fetal e é finalizada antes do nascimento, ocorrendo a manutenção destas metilações durante as divisões meióticas. Já em gametas femininos, a remetilação do DNA inicia-se apenas após o nascimento, durante a fase de crescimento oocitário, com este oócito bloqueado na prófase da meiose I (17).

O segundo ciclo de desmetilação inicia-se após a fecundação, quando o genoma paterno e materno são desmetilados ativamente e passivamente, respectivamente, com exceção de alguns genes e regiões (100-200 genes, aproximadamente, e alguns retrotransposons) (16). Durante as primeiras clivagens, o genoma do embrião é ativamente desmetilado, através da atividade enzimática das TETs e passivamente desmetilado devido à redução na quantidade da enzima DNMT1, responsável pela manutenção de metilações durante a divisão celular (5; 17). Na ausência de DNMT1, as enzimas DNMT3a e DNMT3b parecem garantir a manutenção de algumas metilações do DNA, preservando assim o *imprinting* de alguns genes (16). Este processo de desmetilação ocorre até, aproximadamente, o embrião atingir o estágio de 8-16 células, quando inicia-se a metilação ‘de novo’ do DNA embrionário (43) (Figura 3).

A metilação ‘de novo’, que consiste na adição de um grupo metil pelas enzimas DNMT3a e DNMT3b em uma fita de DNA sem que a fita oposta contenha citosinas metiladas, também ocorre em embriões bovinos, embora não exista consenso na literatura sobre o momento do desenvolvimento em que esta metilação inicia-se (44; 45; 46; 47). Esse processo de remetilação do DNA parece ocorrer de maneira diferente entre os

blastômeros, no entanto, existem relatos controversos se são as células da massa celular interna ou as trofoblásticas que apresentam maiores níveis de metilação do DNA (Figura 3) (45; 46; 47).

Essas variações epigenéticas são necessárias durante o desenvolvimento embrionário e são afetadas por fatores ambientais. O uso de técnicas de reprodução assistida, como protocolos de superovulação, PIV de embriões e criopreservação, pode afetar o padrão de metilação do DNA em gametas, embriões e proles. Além disso, em bovinos, o uso de técnicas de reprodução assistida parece estar relacionado à Síndrome do Bezerro Gigante, uma síndrome relacionada à falha na reprogramação epigenética e manutenção de *imprinting* parental (16). Com relação aos estágios de PIV, já foi relatado que, durante a MIV, há um aumento na atividade das enzimas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b em relação aos oócitos maturados *in vivo* (48). Durante a CIV, há relatos de reprogramação anormal de genes que devem sofrer *imprinting* em um dos alelos durante o desenvolvimento bovino normal (16).

O padrão de metilação de embriões bovinos PIV, *in vivo* ou que permaneceram durante um período de tempo *in vitro* e, posteriormente, são transferidos em diferentes estágios de desenvolvimento (zigoto, 4 células ou 16 células) e cultivados *in vivo* até o estágio de blastocisto também é alterado. Neste trabalho foi relatado que quanto maior o período de cultivo *in vitro*, maior o grau de desregulação da metilação do DNA em promotores e outras regiões gênicas. Além disso, os blastocistos que permaneceram *in vitro* em todos os estágios apresentaram níveis mais elevados de metilação do DNA do que os embriões produzidos completamente *in vivo*, e as principais diferenças observadas ocorreram em regiões gênica e promotores (49).

Existem ainda relatos na literatura que demonstram a relação entre a metilação do DNA e modificações pós-traducionais das histonas. Essa relação ocorre através da interação das metilações do DNA com proteínas que se ligam à estas regiões, recrutam um complexo proteico que contém histona desacetilases e histona metiltransferases (50; 51). Juntos, esses dados demonstram que a metilação do DNA pode induzir mudanças estruturais na cromatina através das modificações de histonas.

Figura 3: Representação da desmetilação do DNA no genoma paterno (azul) e materno (vermelho) iniciada logo após a fertilização. A menor intensidade de metilações do DNA é observada em embriões no estágio de 8-16 células, quando é iniciada a metilação ‘de novo’ do genoma embrionário (preto).

2.3.3 Modificações pós-transcricionais de histonas

As histonas, compostas por um domínio C-terminal globular e uma cauda N-terminal flexível, são os componentes básicos dos nucleossomos, que por sua vez constituem a cromatina. Cada nucleossomo é formado por um octâmero de histonas contendo pares de cada histona, H2A, H2B, H3 e H4, circundados por 146-147 pares de bases de DNA (52) revisado por (53).

A cauda N-terminal, que se projeta da superfície dos nucleossomos, é composta por aminoácidos em quantidade e tipos variáveis e está sujeita a extensas modificações pós-traducionais, que implicam na ativação ou inativação transcricional, constituição da cromatina e replicação de DNA (54). Modificações de histona incluem acetilação de resíduos de lisina, metilação de resíduos de lisina e arginina, ubiquitinação de resíduos de lisina e fosforilação de resíduos de serina e treonina, entre outros. A acetilação e metilação das histonas H3 e H4 estão entre as modificações pós-traducionais de histonas mais abundantes e, portanto, são as mais estudadas (Figura 4). A acetilação de lisinas, por exemplo, está associada a estados de transcrição de genes ativos. Por outro lado, a metilação de lisinas e argininas, embora geralmente associada ao silenciamento gênico, também podem levar a ativação da transcrição gênica, dependendo da região de inserção na histona N-terminal e da quantidade de metilações presentes (uma, duas ou três) (54).

Figura 4: Principais modificações pós-traducionais nas histonas H3 e H4. Os grupos adicionados ac – acetil (rosa); me – metil (verde); ph – fosforil (amarelo); Ub – ubiquitina (azul) em aminoácidos lisina (K), arginina (R), serina (S) ou treonina (T) (55).

Existem duas formas pelas quais a acetilação de histonas regula a transcrição gênica. A primeira delas é reduzindo a carga positiva das proteínas histonas, diminuindo assim a afinidade destas à molécula de DNA (carregada negativamente), o que leva ao afrouxamento desta união e maior exposição do DNA aos fatores de transcrição (56). A segunda é através da criação, estabilização ou quebra de regiões de interação entre a cromatina e proteínas reguladoras, como fatores de transcrição ou proteínas que atuam na condensação da cromatina (57; 58). Existem proteínas que possuem bromodomínios capazes de reconhecer o grupo acetil nas histonas e tornar a cromatina mais acessível aos remodeladores e aos fatores de transcrição (59). As regiões de localização de acetilação mais descritas na literatura são as lisinas K5, K8, K12, K16 da histona 4 e as lisinas K9, K14, K18, K23 da histona 3 (60).

Já foi descrito que as enzimas acetil-transferase de histonas (HATs) e desacetilases de hitonas (HDACs) atuam regulando a transcrição genica, ao promoverem a inserção ou remoção, respectivamente, do grupamento acetila à calda N-terminal das histonas (61). Existem 17 tipos de enzimas HAT, que são divididas em dois tipos, A e B. As HATs tipo A são encontradas no núcleo e regulam a expressão gênica, trabalhando principalmente como co-ativadores da transcrição. As HATs do tipo B estão localizadas principalmente no citoplasma e têm função acetilar histonas recém formadas (62). A inserção do grupo acetila é feita por HATs específicas para cada região N-terminal através da transferência do grupo acetil da acetil-coenzima A (Acetil-CoA) para a região ϵ -amino da lisina alvo (63). A remoção desse grupo é feita pelas HDACs ou KDACs, levando a

liberação de ânions acetato (64). Existem 18 HDAC divididas em classe I (HDAC1–3 e 8), classe II (HDAC4–7 e 9), classe III ou sirtuinas (SIRT1–7), e classe IV (HDAC11) (64).

Outra importante modificação pós-traducional das histonas é a metilação dos resíduos de aminoácidos lisina e arginina através da inserção de, até três para lisinas e até dois para argininas, grupamentos metila provenientes da SAM (65). A maior parte das metilações de aminoácidos de histonas estão relacionadas ao silenciamento gênico. Ao contrário da acetilação, a metilação das histonas não causa alterações de carga, mas pode provocar a mudança conformacional desta proteína, formando um local específico para ligação de outras proteínas (65; 66).

O papel da metilação de histonas no controle da expressão gênica depende da localização do resíduo de aminoácido onde este é inserido e da quantidade de grupos metil adicionados a este. Por exemplo, a trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) estão associadas ao aumento da transcrição genica e formação de eucromatina (forma descompactada da cromatina). Por outro lado, a tripla metilação das lisinas 9 ou 27 na histona 3 (H3K9me3; H3K27me3, respectivamente) estão relacionadas à redução da transcrição e à formação de heterocromatina (forma compacta da cromatina) (67; 68). A presença de H3K9me3, por exemplo, pode promover o rearranjo da cromatina através da ligação com a proteína da heterocromatina 1 (HP1) que, por sua vez, se liga a uma histona metiltransferase (HMT), promovendo assim a trimetilação de outras H3K9 próximas. Estas histonas servirão então como um local de ligação para novas proteínas HP1, promovendo a propagação da estrutura da heterocromatina ao longo do cromossomo, até que um elemento delimitador seja encontrado (69).

As enzimas responsáveis pela metilação das histonas são as histonas metiltransferases (HMTs) e as responsáveis pela remoção são as histonas desmetilases (HMDs). Existem 3 classes de enzimas HMTs: as metiltransferases de lisinas que possuem domínio SET, metiltransferases de lisinas que não possuem domínio SET, e as metiltransferases de arginina (70). Inicialmente, acreditava-se que a metilação de histonas era um processo irreversível. A identificação a primeira desmetilase de lisinas de histonas (KDM1A) é relativamente recente (71). Deste então, outras enzimas desmetilases de histonas foram identificadas, sendo atualmente classificadas como pertencentes à família KDM1 (dois membros: KDM1A e KDM1B) e à família de desmetilases contendo

domínio Jumonji C (JmJC), o maior grupo de desmetilases de histonas (Até o momento foram identificadas 20 enzimas que realizam a desmetilação de lisinas de histonas) (72). A descoberta dessas enzimas demonstrou que as metilações de histonas são muito mais dinâmicas do que previamente estimado e podem ser inseridas ou removidas de acordo com a necessidade celular (73).

2.3.4 Modificações pós-traducionais de histonas em embriões bovinos

As modificações pós-traducionais das histonas desempenham um papel crucial no desenvolvimento de embriões bovinos, permitindo mudanças no padrão de expressão gênica em momentos/regiões específicos. Sabe-se que nos cromossomos de origem paterna, logo após a fertilização, ocorre a substituição de protaminas por histonas que apresentam altos níveis de acetilação e baixos níveis de metilação. Neste período inicial, o genoma materno sofre poucas alterações, mantendo os mesmos padrões de acetilação de lisinas e metilação da argininas e lisinas em histonas H3 e H4 (74).

Durante o início do desenvolvimento embrionário, em bovinos, inicia-se a mudança nos níveis de acetilação das histonas. Logo após as primeiras clivagens, ocorre a redução nas acetilações de H3K9 e H3K18, até que estas atinjam baixos níveis no estágio de 8-16 células. Após essa etapa, observa-se um aumento na acetilação dessas lisinas até o estágio do blastocisto, onde é observada maior intensidade de acetilação de K18 em células do trofotoderma do que em células da massa celular interna (75). As acetilações de H4K5 e H4K8, no entanto, são similares entre embriões durante primeiras clivagens e no estágio de 8-16 células, mostrando apenas aumento de acetilação destas lisinas após este estágio e sem que exista diferença nos níveis de acetilação entre as células do trofotoderma e massa celular interna (75).

Com relação à presença de HATs e HDACs, existem poucos relatos detalhando a expressão destas enzimas ao longo do desenvolvimento embrionário de bovinos. Já foi demonstrada presença de mRNA de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7, HAT1 e HAT2 em oócitos, embriões de 2 células, 8 células e blastocistos (76). Neste trabalho, a expressão de HAT1, mas não de HAT2, diferiu ao longo do desenvolvimento, sendo elevada em embriões no estágio de blastocisto. Neste mesmo estágio do desenvolvimento, também foi observado aumento da expressão de HDAC1 e HDAC2 em relação aos embriões de 2 ou 8 células. Enquanto isso, HDAC3 e HDAC7 não diferem entre os

estágios de desenvolvimento embrionário (76). Estes achados sugerem que, principalmente no estágio de blastocisto, estão ocorrendo eventos simultâneos de acetilação e desacetilação, provavelmente para garantir que estes embriões sejam capazes de inserir e remover acetilações específicas e ativar a expressão de genes conforme sua necessidade.

Com relação aos níveis de metilação da histona, já foi relatado que logo após as primeiras clivagens, há uma redução nos níveis de trimetilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) até o estágio de 8-16 células (77), enquanto os níveis de bimetilação dessa mesma lisina (H3K9me2) permanecem inalterados entre esses estágios (75). Após o estágio de 8-16 células, há aumento da bimetilação e trimetilação desta lisina até o estágio de blastocisto (75). No entanto, é importante ressaltar que a presença de H3K9me3 já foi reportada como não sofrendo alterações ao longo do desenvolvimento, demonstrando que não existe concordância na literatura sobre esta modificação pós-traducional em embriões de bovinos (78). A metilação de H3K9 é particularmente importante porque parece seguir o mesmo perfil observado para a metilação do DNA, ambos mecanismos epigenéticos capazes de reduzir a transcrição gênica (77).

Dentre as enzimas que atuam na metilação de histonas, poucas foram estudadas em embriões de bovinos. Sabe-se que SETDB1, uma metiltransferase específica para H3K9, é abundante em oócitos e embriões até o estágio de 8 células, quando começa a decair atingindo baixos níveis em blastocistos (79). Enquanto isso, SUV39H1 e SUV39H2, que também atuam na metilação de H3K9, apresentam altos níveis de expressão apenas em estágio de 2 células e 4 células, respectivamente (78). Já SMYD3, uma metiltransferase específica de H3K4 (tripla metilação que exerce papel permissivo à transcrição do DNA) é observada em baixos níveis ao longo do desenvolvimento até o estágio de mórula, quando ocorre um pico na quantidade de mRNA desta enzima (80).

Com relação as enzimas que atuam na desmetilação de histonas, já foi detectada a presença de HDM3A, HDM4A e HDM4C ao longo do desenvolvimento embrionário de bovinos, sendo observadas em menor quantidade apenas em embriões de 4 ou 8 células. Já HDM5B, outra desmetilase de histonas, está ausente em estágios iniciais do desenvolvimento, apenas sendo observada após o estágio de 8 células (81), tendo sua origem na transcrição do genoma do próprio embrião. Enquanto isso, HDM4D e HDM4E (específicas de H3K9me3 e H3K9me2), embora detectadas em todos os estágios do

desenvolvimento embrionário, apresentam expressão aumentada nos estágios de 8 e 16 células (82). JMJD3 apresenta níveis elevados em oócitos, redução ao longo do desenvolvimento embrionário e aumento novamente em embriões no estágio de blastocisto (83). JMJD1C, outra desmetilase que contém domínio JmJC, também é observada em altos níveis ao longo do desenvolvimento embrionário, embora em níveis mais baixos do que os observados em oócitos (84).

A associação das informações sobre as modificações pós-traducionais de histonas e as enzimas responsáveis por essas modificações ao longo do desenvolvimento embrionário de bovinos demonstra que a grande maioria destas sofre drástica variação no momento de ativação do genoma embrionário (8-16 células, aproximadamente), característico da reprogramação que estes embriões sofrem nesta fase. No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre a importância destas modificações pós-traducionais e da associação destas com as metilações do DNA em embriões de bovinos, além de quais seriam as reais consequências de falhas na ativação destes mecanismos epigenéticos para o embrião.

Com base nas informações fornecidas, o capítulo 1 deste trabalho visou identificar a alteração no padrão de metilação do DNA, assim como as regiões em que estas são encontradas, de blastocistos bovinos PIV a partir de embriões com cinéticas distintas. Ainda foi avaliada a alteração no perfil de transcritos envolvidos em vias identificadas como diferencialmente metiladas entre estes embriões. No capítulo 2 foram avaliados os padrões de metilação e desmetilação global do DNA e de modificações pós-traducionais de histonas (acetilação de H3K9 e trimetilação de H3K9 e H3K27) em embriões bovinos de cinéticas distintas ao longo do desenvolvimento. Para melhor compreensão destes resultados, foi feita a avaliação do perfil de transcritos de genes relacionados a estes mecanismos epigenéticos. A divisão deste trabalho em capítulo 1 e 2 foi realizada para facilitar a compreensão e correlação dos resultados obtidos em cada uma das análises.

3 HIPÓTESES

Considerando que:

- Embriões de cinéticas de desenvolvimento distintas apresentam diferenças metabólicas e no perfil global de transcritos na fase de blastocisto sem evidente alteração morfológica
- Modificações no padrão epigenético nas primeiras fases do desenvolvimento são cruciais para o adequado desenvolvimento embrionário, fetal e do indivíduo adulto

A hipótese deste trabalho é que embriões bovinos de cinética distinta durante as primeiras clivagens ativam diferentemente mecanismos epigenéticos logo no início do desenvolvimento embrionário o que resulta na produção de blastocistos com perfis globais de marcas epigenéticas distintos com impacto no perfil transcricional.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÕES DO DNA EM BLASTOCISTOS BOVINOS

4 Objetivos

O objetivo geral deste capítulo foi a identificação de diferenças no padrão global de metilações do DNA em embriões de cinética distintas. Para tal, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar o padrão metilômico de embriões PIV com diferentes cinéticas de desenvolvimento;
- Analisar os transcritos de genes pertencentes à vias diferencialmente metiladas de embriões PIV com cinética de desenvolvimento rápida e lenta.

5 Material e Métodos

5.1 Delineamento experimental

Foi realizada a coleta de embriões bovinos PIV no estágio de blastocisto para (1) utilização da plataforma EmbryoGENE, que permite a identificação do padrão global de metilações do DNA (10 blastocistos/grupo em 4 réplicas); (2) validação da plataforma de *microarray* utilizada (10 blastocistos/grupo em 3 réplicas); (3) análise de transcritos relacionados as vias diferencialmente metiladas utilizando BioMark™ HD System (Fluidigm, San Francisco) (3 blastocistos/grupo em 4 réplicas).

Para isto, os embriões foram produzidos como descrito a seguir:

5.1.1 Coleta e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos

Ovários de animais oriundos de abatedouro comercial foram transportados para o laboratório em solução salina estéril (Anexo A). Os CCOs foram coletados pela técnica de aspiração folicular com o auxílio de seringa e agulha e selecionados (graus I e II) de acordo com as características morfológicas (85) (Tabela 1) em estereomicroscópio. Os CCOs foram lavados em meio Pré-MIV [Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) - HEPES contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 50 µg/mL de gentamicina e 0,2 mM de piruvato de sódio (Anexo B)] e em meio MIV [TCM-199 - Bicarbonato contendo 10% de SFB, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de estradiol, 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10 µg/mL de hormônio luteinizante (LH) (Anexo C)], sendo, posteriormente, divididos em grupos de 25-30 CCOs e submetidos a maturação em gotas de 90 µL do meio MIV, sob óleo mineral por 22-24

Tabela 8: Características morfológicas utilizadas na classificação de CCOs em grau I, II e III.

Classificação		Descrição
Grau I		Mais de três camadas compactas de células do cumulus e oócito com citoplasma escuro e homogêneo
Grau II		Três camadas compactas de células do cumulus e oócito com citoplasma escuro e homogêneo ou com pequenas irregularidades
Grau III	Parcialmente denudos	Oócitos com ausência de células do cumulus em áreas inferiores a um terço de sua superfície

Denudos e/ou degenerados	Oócitos com ausência da maioria ou total de células do cumulus em sua superfície e/ou apresentando sinais evidentes de degeneração, como presença de vacúolos ou desintegração do citoplasma
Expandidos	Células do cumulus expandidas, com aumento de volume total e aspecto gelatinoso
Zona pelúcida	Zona pelúcida rompida, sem o conteúdo citoplasmático

5.1.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Os meios de cultura TALP (Tyrode's albumin-lactate-pyruvate) utilizados para purificação do sêmen e FIV foram preparados segundo Parrish et al. (23; 86) (Anexo D). Após 22-24 horas de maturação, os CCOs foram lavados em meio FIV gota composto pela solução TALP modificada com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) – Livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina e 0,2 mM de piruvato de sódio, 17.500 USP/mL de heparina e 0,044 µL/mL de PHE (Penicilamina 2 µM, hipotaurina 1µM, epinefrina 0,25 µM) (Anexos E e F). Em seguida, grupos de 25-30 CCOs foram transferidos para gotas de 60 µL de meio FIV gota. Em cada manipulação, palhetas de sêmen sexado (fêmeas) foram descongeladas durante 30 segundos à 37°C e purificadas em gradiente de Percoll (Percoll 80% e Percoll 40% - Anexo G) pela centrifugação a 6.000 g por 6 minutos. O sedimento (100 uL de pellet) foi centrifugado a 3.000 g por 3 minutos em 600 uL de meio FIV. O volume final de pellet retirado foi de 90 uL, sendo utilizados 12 uL para a fertilização de 6 - 7 gotas. Os oócitos foram incubados em estufa à 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e alta umidade com os espermatozoides por 18 horas.

5.1.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos à técnica de denudação para a remoção das células do cumulus com auxílio de micropipeta. Depois desta etapa, os presumíveis zigotos foram transferidos para gotas de 90 µL de meio de cultivo 1 [*Potassium Simplex Optimization Medium* (KSOM -Millipore®), suplementado com 9% de SFB, 0,02 µL/mL de gentamicina e 8 µL/mL de aminoácidos não essenciais e 16 µL/mL de aminoácidos essenciais (Anexo H)] e meio de cultivo 2 [*Synthetic Oviduct Fluid* (SOF – Anexo I), suplementado com 2% de aminoácidos essenciais, 1% de aminoácidos não essenciais e 5% de SFB (Anexo J)] cobertas por óleo mineral e

cultivados em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade, onde permaneceram até o momento da coleta das amostras para análise.

5.1.4 Classificação cinética

Para a classificação dos grupos de embriões rápidos e lentos a clivagem embrionária foi avaliada 22 horas após o início da CIV (40 horas pós-inseminação - hpi) (87) (88). Neste momento foram separados em diferentes gotas os embriões dos grupos clivado rápido (4 ou mais células) e clivado lento (2 ou 3 células). Embriões com uma célula foram avaliados posteriormente para comporem o índice total de clivagem, no entanto não foram utilizados para as análises. Foram obtidos os dados de clivagem total (número total de clivados/número total de oócitos), clivados lento (número de clivados lento/número total de oócitos) e clivados rápido (número de clivados rápido/número total de oócitos). Os embriões permaneceram em cultivo para avaliação das próximas fases de desenvolvimento.

5.1.5 Avaliação de embriões em estágio de blastocisto

Após 150 horas do início do CIV (168 hpi), os embriões que atingiram o estágio de blastocisto expandido foram classificados como FBL (blastocistos derivados do grupo de “clivagem rápida”) e SBL (blastocistos derivados do grupo de “clivagem lenta”). Neste momento, os blastocistos foram retirados do cultivo e armazenados a -80°C para análise posterior.

5.2 EmbryoGENE DNA *methylation array* (EDMA)

As amostras de embriões bovinos PIV e armazenados em freezer -80 °C foram submetidas à análise de metilação do DNA utilizando EmbryoGENE DNA *methylation array* (EDMA). Foram realizadas 4 replicatas contendo *pool* de 10 blastocistos por grupo.

5.2.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico (gDNA) foi realizada com AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) com eluição das amostras em 30 µL. Para qualificar e quantificar o DNA extraído foi feita a análise de absorbância óptica com Nanodrop ND-1000 *spectrophotometer* (NanoDrop Technologies Inc.) e eletroforese em de gel de 0,5% agarose à 45 volts por 2 h.

5.2.2 Digestão com enzima MseI

Todas as amostras de gDNA (2 vezes de 15 µL para cada amostra) foram submetidas a fragmentação com a enzima MseI (5'-T/TAA-3') em solução composta por 0,5 µL de MseI, 0,5 µL de BSA (100x), 5 µL NEB buffer 4 (10x), 28 µL de água livre de DNase/RNase e DNA controle (spike-in) à 37°C por 16 horas seguida por incubação à 65°C por 20 minutos. O gDNA foi precipitado com 1 µg de solução linear de acrilamida (Ambion) como carregador e 5 µL de buffer acetato de sódio (3 M, pH 5,5) acrescida de 330 µL de etanol 95% por 2 horas à -80°C. A solução foi centrifugada (>10.000g/2 minutos à 4°C), o pellet foi lavado com etanol 70% por 20 minutos à -80°C e centrifugada nas mesmas condições. O pellet foi seco ao ar e ressuspendido em 5 µL de água livre de DNase/RNase.

5.2.3 Ligação de adaptadores aos fragmentos de gDNA

Adaptadores foram ligados aos fragmentos de gDNA digeridos pela MseI através da utilização de 0,5 µL de cada primer (MseLig 21: 5'-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT-3', MseLig 12: 5'-TAA CTA GCA TGC-3', 100 µM) em 0,5× One-Phor-All plus Buffer (Pharmacia Biotech) e 1,5 µL água livre de DNase/RNase. O anealamento foi iniciado a 65°C por 20 minutos seguido por decréscimo da temperatura de 1°C/min até 15°C. Em seguida, com as amostras ainda à 15°C, foi feita a adição de 1 µL de Adenosina trifosfato (ATP - 10mM) e 1 µL de T4 DNA ligase (5U/µL) e incubação à 15°C por 16 horas.

5.2.4 Digestão com enzimas sensíveis à metilação do DNA

Foi realizada a fragmentação do gDNA através das enzimas de restrição de FastDigest™ [HpaII (5'-C/CGG-3'), HinP1I (5'-GC/GC-3') e AciI (5'-C/CGC-3')]. A cada amostra foram adicionados 5 µL de FastDigest buffer (10X), 0,5 µL de HpaII (10U/µL), 0,5 µL de HinP1I e 34 µL de água livre de DNase/RNase. As amostras foram incubadas por 12 horas à 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,5 µL de AciI, 5 µL de FastDigest buffer (10X) e 44,5 µL de água livre de DNase/RNase à cada amostra, que foram incubadas por 4 horas à 37°C. A inativação enzimática foi feita por 10 minutos à 80°C após o término da incubação.

5.2.5 Eficiência da digestão de enzimas sensíveis à metilação do DNA

Para determinar a eficiência da fragmentação com FastDigest™ foi realizada detecção por *polymerase chain reaction* quantitativa (qPCR) dos controles (spiked-in). Resumidamente, foi preparada uma solução contendo 1,6 µL de MgCl₂ (25mM), 2 µL de LightCycler FastStart (10x) DNA Master SYBR Green mix (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC, Canada), 14,4 µL de água livre de DNase/RNase e 5 µL de *primers* (forward e reverse - 10µM) para cada uma das fragmentações enzimáticas (para sítios de HpaII, HinP1I ou AciI) (89). À esta solução foram adicionados 1 µL de água – controle negativo; ou 1 µL de amostra; ou 1 µL 1/100 spike-in diluído em 1/1000 – controle positivo. As condições utilizadas para o qPCR foram: Denaturação - 95°C por 10 minutos; Amplificação - 50 ciclos de 95°C por 5 segundos, 52°C por 5 segundos e 72°C por 20 segundos; Fusão - 1 ciclo iniciado de 94°C por 5 segundos, 72°C por 30 segundos, 94°C por 0 segundos e resfriamento 40°C por 0 segundos (alteração de temperatura de 0,2°C/segundo). A especificidade do Amplicon é utilizada para calcular a eficiência da fragmentação e é determinada pela forma da curva de fusão e a diferença de limiar de ciclo (ΔC_t) entre metilados (protegidas à fragmentação com enzimas sensíveis à metilação) e não-metilados (desprotegidas à fragmentação com enzimas sensíveis à metilação). Caso a fragmentação não tenha sido eficiente para alguma enzima o procedimento de fragmentação para esta foi repetido.

5.2.6 Seleção de fragmentos por ligação mediada em PCR (LMA-PCR)

A amplificação seletiva dos fragmentos foi realizada utilizando dois *rounds* de ligação mediada em PCR (LMA-PCR). Após a precipitação e lavagem das amostras de gDNA como descrito no item 3.2.2 e ressuspensão em 10 µL de água livre de DNase/RNase, o primeiro *round* de LMA-PCR foi realizado utilizando 0,5 µL de cada primer *forward* e *reverse* (MseLig 21 e MseLig 12), 0,5 µL de One-Phor-All plus Buffer, 3 µL de Ex-Taq™ buffer (TaKaRa), 1 µL de Ex-Taq™ enzyme (TaKaRa), 3 µL de MgCl₂ (25mM), 8 µL de Desoxirribonucleotídeos fostatados (dNTPs) e 23,5 µL de água livre de DNase/RNase. As condições do primeiro *round* de LMA-PCR foram: 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 75 segundos; 34 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 105 segundos; ciclo final de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos.

Para o segundo *round* de LMA-PCR (essencial para a obtenção de amplicons suficientes para as etapas futuras) foram utilizadas 3 reações por amostra do produto do primeiro *round* de LMA-PCR. Foram adicionados à 0,75 µL de gDNA de cada amostra (3 reações) 0,75 µL de primer MseLig21, 5 µL de PCR Buffer 1 (Roche/Boehringer Mannheim, Expand Long Template), 4 µL de dNTPs (2,5mM), 0,8 µL de Expand Long Template Enzyme Mix (Roche/Boehringer Mannheim) e 38,7 µL de água livre de DNase/RNase. As condições do primeiro *round* de LMA-PCR foram: Ciclo inicial de 94°C por 60 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; 14 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos; 9 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; ciclo final de 72°C por 5 minutos. The quality and concentration of DNA were evaluated as described above. A qualidade dos amplicons foi determinada utilizando 5 µL de produto de PCR em gel de agarose 0,8%.

5.2.7 Purificação e remoção de adaptadores

O produto de LMA-PCR foi purificado utilizando o kit de purificação de PCR 28104 (Qiagen) e eluído em 43,5 µL de Buffer de eluição 1/10. Para a remoção dos

adaptadores, 20 µL de cada amostra foi incubada com 5 µL de buffer 4 NEB (10X), 0,5 µL BSA (100x), 1 µL de MseI (10 U/µL) e 48 µL água livre de DNase/RNase à 37°C por 16 horas, seguida de 65°C por 20 minutos. As amostras foram purificadas utilizando o kit de purificação de PCR 28104 e eluídas em 43,5 µL de Buffer de eluição 1/10. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro NanoDrop 1000 para determinar a qualidade e quantidade de gDNA das amostras.

5.2.8 Marcação do gDNA e hibridização do *array*

Foi realizada a marcação de 2 µg de gDNA por amostra com Cy-3 ou Cy-5 utilizando o Universal Linkage System Fluorescent gDNA labelling kit (Kreatech Biotechnology), sendo que para cada µg de gDNA foi adicionado 1 µL de buffer de marcação 10× à 85°C por 30 minutos seguida de incubação à 4°C por 3 minutos. O kit de purificação de PCR 28104 foi utilizado para remoção dos marcadores não reativos e purificação das amostras. Para validar a incorporação do corante e concentração de gDNA foram mensuradas em espectrômetro NanoDrop 1000.

A hibridização das amostras foi iniciada com a incubação do gDNA marcado com Cy-3 ou Cy-5, comparando uma réplica de blastocistos rápidos à blastocistos lentos, com 25 µL de Cot-1 DNA de bovinos (1mg/mL, Applied Genetics Laboratories), 2,6 µL de Agente de bloqueio 100x (Agilent) e 130 µL de buffer de hibridização 2 x HI-RPM (Agilent) à 95°C por 3 minutos e 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 65 µL de Agilent-CGHBBlock para eliminar o ruído do background do *array*. Foram alocados 245 µL das amostras na lâmina de *microarray* e a hibridização foi realizada em forno à 65°C e 10 rpm por 40 horas. As lâminas foram lavadas de acordo com instruções do fabricante e foi feita leitura das lâminas com PowerScanner (Tecan) seguida de análise utilizando Array-Pro Analyzer 6.3 software (MediaCybernetics).

5.2.9 Validação dos resultados do Embryogene

Foram coletados 10 embriões por grupo em 4 replicatas técnicas. Estes embriões foram submetidos à 3 ciclos de congelamento/descongelamento seguida de incubação

com proteinase K (200 µg/mL). As amostras foram divididas em 3 grupos (10 µL em cada): Controle—DNA fragmentado apenas com a enzima MseI; HpaII—DNA fragmentado com as enzimas MseI e HpaII, e HinP1I—DNA fragmentado com as enzimas MseI e HinP1I (FastDigest-TermoFisher Scientific™, USA). A fragmentação foi feita por 16 horas à 37°C, seguida de incubação por 10 minutos à 80°C seguido de resfriamento à 4°C. O gDNA foi lavado em etanol 70%, seco ao ar, e ressuspendido em 50 µL de água livre de DNase/RNase. Foi feita a amplificação do gDNA em RT-qPCR com *primers* (Tabela 9) desenhados especificamente para regiões que foram previamente identificadas como diferencialmente metiladas e que o amplicon continha apenas uma região de fragmentação para HpaII ou HinP1I e sem região para MseI. A reação de amplificação foi feita utilizando 20 µL de volume total, sendo composto de 1 µL de amostra, 1 µL do primer forward, 1 µL do primer reverse, 7 µL de água livre de DNase/RNase e 10 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix no Rotor-Gene Q da Qiagen.

Tabela 9: *Primers* desenhados para a validação do EmbryoGENE DNA methylation array.

DMR	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicon Length
edma_met_11_10337	gcacgactcccttctagaca	ggcagaggatctacagcca	84
edma_met_03_16369	cacatgtagaactggcca	ttctcctctacgaccctaggta	91
edma_met_20_08418	ttctcctctacgaccctaggta	gaagtgccccgttacttct	97
edma_met_13_05328	gaagtgccccgttacttct	ctgacgtccaggagacc	83
edma_met_02_07813	ccataatgacacactccgtt	aggctctatgggacagca	87
edma_met_10_01759	aggctctatgggacagca	gtcttctggaagcacctcc	84
edma_met_21_11309	gtcttctggaagcacctcc	ccagaggagctgtagatcct	113

5.3 Análise de transcritos

A análise de transcritos foi feita utilizando BioMark™ HD System. Para este experimento foram coletadas 4 replicatas contendo 3 blastocistos expandidos por grupo.

5.3.1 Extração de RNA

O RNA de *pool* de 3 blastocistos expandidos por grupo foi extraído com PicoPure® RNA Isolation Kit (Applied Biosystems™, USA KIT0204) como descrito pelo fabricante. Basicamente, foi feita a incubação das amostras com buffer de extração à 42°C por 30 minutos. As amostras foram submetidas à incubação com DNase (Qiagen, USA #79254) à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida da purificação de RNA em coluna. Após esta etapa, o RNA de cada amostra foi eluído em 13 µL de buffer de eluição. As amostras foram armazenadas a -20°C por um dia e em seguida utilizadas para síntese de cDNA por transcriptase reversa.

5.3.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita através da utilização do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA #4368814) como sugerido pelo fabricante. Inicialmente o RNA extraído de cada uma das amostras foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e a concentração foi ajustada para 50 ng/µL em água livre de DNase/RNase. Resumidamente, à 10 µL de cada amostra de RNA foram adicionados 2 µL de buffer 10x RT, 0,8 µL de dNTPs (25X), 2 µL de solução *primers* randômicos (10x RT), 1 µL de transcriptase reversa (MultiScribe®) e 4,2 µL de água livre de DNase/RNase e incubados à 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos seguido de resfriamento à 4°C.

5.3.3 Pré-amplificação

Foi realizada a pré-amplificação do cDNA utilizando mix contendo 2 µL de cada ensaio TaqMan (Applied Biosystems, USA) (Anexo K). A amplificação foi realizada à 95°C por 10 minutos, 14 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos e resfriamento à 4°C em solução contendo 3,75 µL do mix de ensaios TaqMan e Master Mix Pré-Amp e 1,25 µL das amostras. As amostras pré-amplificadas foram diluídas 1:5

em solução de suspensão de DNA (20 µL) e armazenadas a -20°C até o momento da reação de PCR.

5.3.4 Leitura em BioMark™ HD System

Foi realizada a preparação do *chip* como descrito pelo fabricante. Resumidamente, foi injetado fluido de controle nos acumuladores nas porções centrais superiores e inferiores do chip, que foi então inserido no IFC controller (Fluidigm, USA) por 20 minutos. Foram preparadas soluções contendo 3 µL dos ensaios TaqMan e 3 µL do Assay Loading Reagent (alocadas na região de ensaios do *chip*) e 3,6 µL de TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,36 µL de TaqMan Sample Loading Reagent (Applied Biosystems, USA) e 3,25 µL do cDNA de amostra pré-amplificada (alocadas na região de amostras do chip). Após disposição dos ensaios e amostras o chip foi novamente inserido no IFC controller para carregamento das misturas. Em seguida, o chip foi transferido para o BioMark™ HD Real-Time PCR (Fluidigm, USA) para reação de PCR em tempo real de acordo com o protocolo TaqMan GE 96x96 Standard, consistindo de incubação à 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

5.4 Análise dos resultados

Os dados de produção embrionária foram avaliados quanto às premissas para análise de variância utilizando teste D'Agostino & Pearson. Os dados resultantes foram paramétricos, consequentemente foram analisados utilizando o Teste-T. Os resultados foram apresentados em forma de tabela com a média $\pm$ erro padrão da média para os grupos FBL e SBL.

Os dados obtidos através do Embryogene foram analisados como descrito por (49). Resumidamente, *probes* que apresentaram intensidade de sinal acima do *background* foram normalizados, ajustados a um modelo linear e a metilação diferencial foi inferida por estatística bayesiana utilizando o pacote *Limma Bioconductor* versão 3.6.9. Foram consideradas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) os fragmentos de

DNA que apresentaram $P < 0,05$ e $\log_2(\text{fold-change}) \geq 1,5$. As comparações entre os embriões de cinética rápida e lenta foram realizadas utilizando o pacote MADE4 do *Bioconductor*. A quantidade de sondas acima do *background* e DMRs diferentes entre os grupos foram apresentados na forma de diagrama *Venn* e *Volcano Plot*, respectivamente. Além disso, foi gerado um *Circular Plot* com os valores arbitrários de *fold-change* e P valor dos ~ 15,000 elementos mais significantes identificados, mostrando os elementos mais variáveis.

A análise de diferentes enriquecimentos foi realizada através de uma série de *scripts* integrados que categorizam as informações com base em densidade de ilhas CpG, comprimento da ilha CpG, distância de ilhas CpG, a localização genômica e tipos de elementos repetitivos, visando a observação da metilação do DNA em escala genômica. Estes scripts pertencem a versão fornecida pelo EmbryoGENE *methylation analysis pipeline* (EMAP) que utiliza o R versão 2.12.1 com o pacote Limma para a análise dos dados brutos.

Genes foram classificados como diferencialmente metilados quando uma sonda diferencialmente metilada era localizada no corpo do gene. Caso um gene possuísse mais de uma sonda em seu corpo, o valor considerado era o que apresentasse maior *fold-change* e menor P valor. Foi realizada análise destes dados (2325 gene hipermetilados e 1207 hipometilados em embriões rápidos) utilizando *David Functional Annotation*. As metilações foram avaliadas de acordo com 3 categorias diferentes: processos biológicos, componentes celulares, e funções moleculares.

As análises de validação dos resultados do EDMA foram feitas através das diferenças entre os valores de Ct do gDNA não digerido e os valores de Ct dos digeridos ($\Delta Ct = Ct \text{ digerido} - Ct \text{ não digerido}$) para as 7 DMRs. Estas regiões foram selecionadas baseadas na localização gênica, presença ou ausência de ilhas CpGs e status de metilação, tentando diversificar o máximo possível estes parâmetros. A porcentagem de metilação do DNA foi inversamente proporcional ao valor obtido pela digestão enzimática com HpaII ou HinPII. Os resultados foram apresentados na forma de tabela com os valores de porcentagem de metilação do DNA para os grupos FBL e SBL.

Para a análise de transcritos, foram calculadas as variações de mRNA normalizados pela expressão de transcritos de controle endógeno (PPIA) identificado pelo

NormFinder (90), e os valores de ΔCt (delta Ct) foram calculados a partir dos Cts (*Cycle Threshold*) obtidos para cada gene de interesse. Os valores de ΔCt foram submetidos ao teste de detecção de *outliers* e ao Teste-T. As análises foram feitas utilizando o software Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA) e os resultados foram apresentados na forma de gráficos em figuras representando as vias de interesse.

6 Resultados

3.1 Produção de embriões bovinos

As taxas de PIV foram determinadas para embriões rápidos e lentos com base no número de embriões totais que clivaram ($58,0 \pm 3,4$) e se tornam blastocistos ($16,0 \pm 2,8$). Não houve diferença na taxa de clivagem (FBL: $45,1 \pm 3,0$ e SBL: $54,9 \pm 3,0$; $P = 0,41$) ou porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto (FBL: $55,1 \pm 4,6$ e SBL: $44,9 \pm 4,6$;) entre os grupos (Tabela 10).

Tabela 10: Porcentagem de clivagem e de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto nos grupos FBL e SBL

	% de clivagem			% de blastocisto		
PIV	$58,0 \pm 3,4$ (1362/2480)			$16,0 \pm 2,8$ (233/1362)		
	FBL	$45,1 \pm 3,0$ (611/1362)	$P = 0,41$	FBL	$55,1 \pm 4,6$ (129/233)	$P = 0,26$
	SBL	$54,9 \pm 3,0$ (751/1362)		SBL	$44,9 \pm 4,6$ (104/233)	

3.2 Regiões diferencialmente metiladas

Os dados de metiloma foram utilizados para identificar as regiões diferencialmente metiladas entre os grupos de desenvolvimento rápido e lento. De 414.566 sondas utilizadas, 9.082 estavam acima do background apenas em FBL, 20.670 apenas em SBL e 47.713 em ambos os grupos (Figura 5). FBL apresentou maior número de regiões hipermetiladas do que SBL (7.976 vs. 3.608) (Figura 6). As DMRs foram distribuídas em todos os cromossomos, e a análise dos genes *imprinted* mostrou que esses genes estavam hipermetilados (seis de *imprinting* paterno e dois de *imprinting* materno) e hipometilados (quatro de *imprinting* paterno e dois de *imprinting* materno) em FBL em relação à SBL (Figura 7Figura).

Figura 5: Diagrama de Venn representando as sondas expressas acima do background para blastocistos rápidos e lentos. Em vermelho são representadas as sondas expressas acima do background presentes apenas em FBL, em azul as sondas acima do background presentes apenas em SBL e em lilás as sondas expressas acima do background nos dois grupos.

Figura 6: Gráfico de *Volcano Plot* demonstrando as DMRs hipermetiladas em FBL (Direita – 7976) e hipermetiladas em SBL (Esquerda – 3608). Cada ponto representa uma DMR, sendo localizada de acordo com seus valores de $\log_2(\text{Fold Change})$ e p valor. Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$.

Figura 7: Circular plot mostrando as DMRs mais significativas distribuídas entre os cromossomos e regiões imprinted.

A análise de regiões gênicas diferencialmente metiladas mostrou que blastocistos do grupo rápido apresentam mais hipermetilações nas regiões intrônica (FBL: 3.121; SBL: 1.424), exônica (FBL: 484; SBL: 379), próxima de promotor (FBL: 152; SBL: 75), promotora (FBL: 467; SBL: 184), promotor distal (FBL: 1.172; SBL: 540) e regiões não próximas a genes (FBL: 2.539; SBL: 987) do que o observado em blastocistos lentos (Figura 8).

Figura 8: Regiões gênicas hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul) (próximo de promotor [PP] e distal de promotor [DP]). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 $P < 0.05$.

Com relação aos elementos de repetição, foi observado que *short-interspersed repetitive elements* (SINEs) (FBL: 1.452; SBL: 770), *long-interspersed repetitive elements* (LINEs) (FBL: 1.298; SBL: 532), *long-terminal-repeat* (LTR) retrotransposons (FBL: 736; SBL: 293), elementos repetitivos de baixa complexidade (FBL: 66; SBL: 57) e repetições simples (FBL: 360; SBL: 266) também apresentaram maiores hipermetilações em embriões rápidos do que lentos (Figura 9Figura).

Figura 9: Elementos de repetição hipermetilados em FBL (vermelho) e em SBL (azul) (baixa complexidade [LC], *long-terminal-repeat* [LTR], repetição simples [SR], *long-interspersed repetitive elements* [LINEs] e *short-interspersed repetitive elements* [SINEs]). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$.

Embriões lentos, entretanto, exibiram mais hipermetilações em ilhas CpGs (FBL: 129; SBL: 246) do que embriões rápidos, enquanto estes apresentaram maior hipermetilação nas regiões CpG *Shore* (FBL: 560; SBL: 304), CpG *Shelf* (FBL: 1.756; SBL: 952) e *Open Sea* (FBL: 5490; SBL: 2087) (Figura 10).

Analisando as ilhas CpGs, foram observadas mais hipermetilações em embriões lentos em ilhas CpGs de comprimento longo (FBL: 14; SBL: 41), intermediário (FBL: 79; SBL: 152) e curto (FBL: 36; SBL: 53) (Figura 11) e com densidade maior (FBL: 17; SBL: 35), intermediária (FBL: 81; SBL: 143) e menor (FBL: 31; SBL: 68) (Figura 12) do que em blastocistos rápidos.

Figura 10: Proximidade de ilhas CpGs hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$.

Figura 11: Comprimento de ilhas CpGs hipermetiladas em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$.

Figura 12: Densidade de metilações de ilhas CpGs em FBL (vermelho) e em SBL (azul). Foram consideradas DMRs hipermetiladas regiões com $\log_2(\text{fold-change})$ absoluto ≥ 1.5 e $P < 0.05$.

3.3 Anotação Funcional

A análise em David Functional Annotation revelou que 101 vias de processos biológicos, 44 componentes celulares e 49 funções moleculares foram hipermetiladas em embriões rápidos e 27 vias de processos biológicos, 8 componentes celulares e 27 funções moleculares estavam hipermetiladas em lentos. As principais anotações hipermetiladas observadas em FBL (Tabela 11: **Principais anotações hipermetiladas em embriões de clivagem rápida**.Tabela 11) e SBL (Tabela 12) encontram-se representadas de acordo com o número de genes envolvidos em cada anotação.

Tabela 11: Principais anotações hipermetiladas em embriões de clivagem rápida.

Processos Biológicos		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Processo metabólico de fosfato	134	2,21E ⁻⁰⁹
Cascata de sinalização intracelular	83	6,16E ⁻⁰³
Transporte iônico	80	3,08E ⁻⁰²
Processo catabólico de macromoléculas	55	2,22E ⁻⁰²
Regulação de morte celular programada	51	2,06E ⁻⁰²
Regulação de proliferação celular	47	2,69E ⁻⁰²
Regulação da transdução de sinal mediada por GTPase	43	3,40E ⁻⁰⁶
Organização do citoesqueleto	29	7,01E ^{-02*}
Morfogênese de componentes celulares	25	2,48E ⁻⁰²
Metabolismo de ácidos graxos	21	7,84E ⁻⁰³
Componentes celulares		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Membrana plasmática	171	2,30E ⁻⁰³
Lúmen de organelas	88	9,56E ⁻⁰³
Retículo endoplasmático	65	4,48E ⁻⁰²
Aparato Golgi	61	6,39E ⁻⁰³
Citosol	50	2,61E ⁻⁰³
Funções Moleculares		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Ligação iônica	388	7,47E ⁻⁰⁶
Ligação de nucleotídeo	273	3,13E ⁻⁰⁶
Ligação de ATP	199	2,58E ⁻⁰⁹
Atividade de proteína quinase	102	9,08E ⁻¹⁰
Ligação de RNA	57	5,78E ⁻⁰²

Tabela 12: Principais anotações hipermetiladas em embriões de clivagem lenta.

Processos Biológicos		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Processo metabólico de fosfato	55	2,66E ⁻⁰²
Processamento de RNA	27	2,10E ⁻⁰²
Regulação da transdução de sinal mediada por GTPase	24	2,89E ⁻⁰⁴
Geração de precursores metabólicos e energia	20	8,53E ⁻⁰² *
Regulação de transdução de sinal de proteína Ras	18	2,82E ⁻⁰³
Desenvolvimento embrionário de cordatos	17	5,94E ⁻⁰² *
Morfogênese de componentes celulares	15	3,13E ⁻⁰²
Secreção	14	4,17E ⁻⁰²
Proliferação celular	13	5,25E ⁻⁰²
Desenvolvimento de blastocisto	8	5,14E ⁻⁰³
Componentes celulares		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Membrana plasmática	88	1,57E ⁻⁰²
Mitocondrias	58	1,74E ⁻⁰²
Retículo endoplasmático	34	9,59E ⁻⁰² *
Aparato Golgi	14	4,16 E ⁻⁰²
Spliceossomo	10	2,77 E ⁻⁰²
Funções Moleculares		
Termo	Número de genes hipermetilados	P valor
Ligação de nucleotídeo	135	9,46E ⁻⁰⁴
Ligação de ATP	84	1,53E ⁻⁰²
Atividade de proteína quinase	44	2,11E ⁻⁰³
Atividade reguladora de GTPase	30	8,52E ⁻⁰⁵
Ligação FAD	9	1,79E ⁻⁰²

3.4 Validação dos resultados de EmbryoGENE

A validação do EmbryoGENE DNA methylation *array* foi realizada por digestão com enzimas sensíveis a metilação do DNA seguida por digestão com RT-qPCR para 7 DMRs. Das regiões amplificadas, 6 apresentaram o mesmo padrão de metilação do DNA observado para FBL e SBL através da análise utilizando o EmbryoGENE (Tabela 13).

Tabela 13: Porcentagem de metilação do DNA das DMRs selecionadas para a validação do *microarray*

DMRs	Metilação do DNA em FBL (%)	Metilação do DNA em SBL (%)	Resultados do RT-qPCR	Resultados do <i>microarray</i>
edma_met_1_1_10337	39,1	55,4	Hipermetilados em SBL	Hipermetilados em SBL
edma_met_0_3_16369	12,3	50,6	Hipermetilados em SBL	Hipermetilados em SBL
edma_met_2_0_08418	19,1	100	Hipermetilados em SBL	Hipermetilados em SBL
edma_met_1_3_05328	100	38,0	Hipermetilados em FBL	Hipermetilados em SBL
edma_met_0_2_07813	100	74,7	Hipermetilados em FBL	Hipermetilados em FBL
edma_met_1_0_01759	99,5	59,8	Hipermetilados em FBL	Hipermetilados em FBL
edma_met_2_1_11309	78,8	48,9	Hipermetilados em FBL	Hipermetilados em FBL

3.5 Análise de transcritos e correlação com padrão de metilação

Com base no processo biológico identificado como diferentemente metilados, selecionamos 23 genes para análise do perfil de transcrição e também para correlacionar com o status de metilação do DNA. Esses genes foram selecionados a partir de processos biológicos identificados na análise de anotação funcional como contendo genes diferencialmente metilados, considerando sua importância para o desenvolvimento e viabilidade do embrião. Foram selecionados 10 genes relacionados ao estresse/morte celular (BAX, BID, CASP9, DDIT3, FOXO3, GPX1, HSPA1A, NFE2L2, NOS2 e TXNRD1); 4 genes envolvidos no controle de pluripotência ou diferenciação celular (NANOG, POU5F1, SALL4 e SOX2); e 9 genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (ACSL3, ACSL6, ELOVL6, FADS2, FASN, PPAR α , PPAR γ , PTGS2 e SCD). Também foi feita a correlação com genes identificados como hiper ou hipometilados de ambos os grupos.

Quanto aos resultados da expressão gênica, 5 dos genes selecionados como hipermetilados em SBL, e destes, 1 estava hiperexpresso (SCN) e 4 não diferiram estatisticamente (TXNRD1, FOXO3, FASN e PTGS2). Outros 13 genes foram selecionados como hipermetilados em FBL e, destes, 2 foram hiperexpressos (POU5F1 e

HSPA1A), 2 foram hipoexpressos (FADS e PPAR α) e 9 não apresentaram diferença estatística (BAX, BID, ELOVL6, ACSL3, GPX1, NFE2L2, APAF1, SALL4 e PPAR γ). Dos genes analisados, 5 não apresentaram diferença no status de metilação embora pertencessem as vias identificadas como diferencialmente metiladas. Destes, 3 foram hiperexpressos em SBL (DDIT3, NANOG e ACSL6), NOS2 foi hipoexpresso em FBL e SOX2 não diferiu estatisticamente (Figuras 13, 14 e 15).

Figura 13: Via hipotética de estresse e morte celular identificada como diferencialmente metilada. A esquematização foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos pretos representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram as diferenças na expressão de DDIT3, NFE2L2, GPX1, TXNRD1, NOS2, BAX, BID, FOXO3, CASP9 e HSPA1A para FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$).

Figura 14: Via de pluripotência identificada como diferencialmente metilada entre FBL e SBL. A representação foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos pretos representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram a diferença na expressão de SALL4, NANOG, SOX2 e POU5F1 para FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$).

Figura 15: Via proposta para o metabolismo lipídico identificada como diferencialmente metilada. A representação esquemática foi feita considerando o status de metilação do DNA e quantidade de transcritos em FBL em comparação com SBL. Círculos pretos representam genes hipermetilados; círculos cinza representam genes hipometilados; círculos brancos representam genes sem diferença na metilação do DNA; triângulos em azul representam genes hiperexpressos; triângulos em vermelho representam genes hipoexpressos; quadrados em cinza representam genes sem diferença nos níveis de RNA. Os gráficos mostram a diferença na expressão de FASN, SCD, ELOVL6, FADS2, PTGS2, ACSL3, ACSL6, PPARα e PPARγ para FBL e SBL (* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$).

7. Discussão

A seleção de embriões com maior potencial para gerar a prenhez é importante para melhorar as taxas de sucesso da PIV e, nesse contexto, a morfocinética representa uma ferramenta promissora para a seleção de embriões bovinos. Estudos recentes mostraram que embriões com cinéticas distintas de desenvolvimento apresentam diferenças relacionadas a danos no DNA (33), consumo de substratos do meio (12), secreção de metabólitos (14), armazenamento de energia (12), atividade de enzimas antioxidantes (34) e perfil de transcrição gênica global (12). Visto que embriões de cinética distintas apresentam diferenças fenotípicas e em perfis globais de transcritos, fez-se necessário o estudo dos mecanismos epigenéticos que poderiam estar associados a essas alterações.

Os dados disponíveis na literatura sobre os padrões epigenéticos em embriões com cinéticas distintas são escassos, tendo sido descritos apenas superficialmente em camundongos. Já se sabe que técnicas de reprodução assistida, como protocolos de superovulação, PIV de embriões e criopreservação, podem afetar o padrão epigenético em gametas, embriões e prole (16). A caracterização do perfil epigenético responsável pela manutenção dos diferentes fenótipos observados em embriões de cinética distintas poderia auxiliar na compreensão do desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Desta forma, no presente estudo, avaliamos como a cinética das primeiras clivagens pode influenciar o perfil global de metilação do DNA em embriões bovinos PIV, visando identificar vias gerais e regiões mais influenciadas pela cinética. Visto que embriões machos e fêmeas exibem padrões distintos de reprogramação epigenética (47; 91), no presente estudo foi excluída a interferência do sexo através da utilização de sêmen sexado para FIV, tal medida foi adotada para garantir que as diferenças de metilação do DNA observadas fossem relacionadas exclusivamente à cinética do desenvolvimento.

Curiosamente, neste trabalho não foi observada diferença estatística nas taxas de clivagem ou produção de blastocistos entre os embriões com diferentes cinéticas. Este resultado difere do relatado na literatura, onde embriões de cinética rápida apresentam maior conversão a blastocistos do que embriões de cinética lenta, embora estes grupos apresentem a mesma proporção de embriões machos e fêmeas no estágio de blastocisto (13; 12). No entanto, estes relatos foram gerados através da utilização de sêmen convencional, enquanto os resultados obtidos no presente estudo utilizaram sêmen sexado

para a produção de embriões o que pode influenciar o desenvolvimento embrionário de maneira geral.

Já se sabe que o uso de sêmen sexado, embora forneça um importante instrumento de pesquisa e produção comercial (92), diminui as taxas de produção de blastocistos (93) e proporção de blastocistos de grau 1, além de retardar a formação destes blastocistos (94) durante a PIV. O sêmen sexado também diminui a taxa de concepção, nascimento de bezerros e aumento na taxa média de natimortos quando este é utilizado para inseminação artificial (95). De fato, o uso de sêmen sexado reduziu as taxas de desenvolvimento embrionário no presente estudo, independentemente da classificação cinética, quando comparado aos dados existentes na literatura para a PIV de embriões (25). Consequentemente, é possível inferir que a ausência de diferença na taxa de produção de blastocistos de cinética distintas seja apenas efeito das baixas taxas decorrentes do uso de sêmen sexado.

Com relação à metilação do DNA, sabe-se que durante o desenvolvimento embrionário inicial, o genoma masculino e feminino sofrem uma onda de desmetilação durante as primeiras clivagens, o que leva à liberação de diversos genes para a transcrição, com exceção de alguns genes *imprinted* e elementos de repetição (96). Esses eventos são responsáveis pela geração de blastômeros totipotentes (altamente desmetilados) a partir de células especializadas (gametas altamente metilados) (97). De acordo com nossos resultados, a metilação global do DNA foi maior no grupo FBL do que no SBL. Várias causas podem explicar essa diferença, como a incapacidade de promover a desmetilação de maneira correta durante as clivagens iniciais ou a ativação precoce/tardia das enzimas responsáveis pela metilação ‘de novo’ do DNA, as DNMTs. Alterações nestes eventos poderiam levar à falha na reprogramação epigenética necessária para a formação de um embrião capaz de atingir o estágio de blastocisto e, futuramente, gerar prenhez (98; 99).

Estudos prévios já demonstraram que existem diferenças no perfil global de metilação do DNA entre embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (49). Embora o padrão de metilação das ilhas CpG seja semelhante entre estes grupos, embriões PIV exibem maior quantidade de DMRs em regiões de promotores, exons, introns e elementos de repetição, como LINE, SINE, LTR e elementos de repetição de baixa complexidade (49). No presente estudo, o grupo FBL apresentou maior quantidade de hipermetilações em todas as regiões gênicas e elementos de repetição, enquanto o grupo SBL apresentou

maior quantidade de hipermetilações em ilhas CpG. Estes resultados sugerem que embriões de clivagem rápida parecem ser mais sensíveis ao sistema de cultivo *in vitro*, o que resultaria em níveis elevados de metilação do DNA em regiões gênicas.

O aumento exacerbado de metilações do DNA, característico de embriões PIV (49) e observado em maior frequência em embriões de cinética rápida, pode ser um mecanismo desencadeado pelo ambiente para garantir que apenas genes essenciais para as próximas fases do desenvolvimento sejam expressos. No entanto, são necessários mais estudos para tentar estabelecer uma relação entre a qualidade de blastocistos provenientes de embriões com cinéticas distintas, visto que os dados obtidos na literatura são controversos. Em camundongos, por exemplo, sabe-se que embriões com alta cinética apresentam maiores perturbações no *imprinting* genômico do que aqueles com baixa cinética de desenvolvimento, além de apresentarem maior diferença dos produzidos *in vivo*, exibindo quantidades distintas de células, volume embrionário e metilação de genes *imprinted* (10). Já para embriões de humanos, existem relatos que indicam que embriões de cinética rápida apresentam maiores chances de implantação (30) (31).

A análise de enriquecimento genômico apontou diversas vias cruciais para o desenvolvimento embrionário que foram identificadas como diferencialmente metiladas entre os grupos FBL e SBL. Em FBL, as vias hipermetiladas incluíam as de morte celular, pluripotência/diferenciação celular e metabolismo lipídico. Embora o papel da metilação do DNA no silenciamento gênico seja dependente da região gênica e da abundância das metilações (99), decidimos investigar a correlação entre o status de metilação e transcritos de genes específicos envolvidos nos processos biológicos citados. Para isto, foi realizado o RT-qPCR para verificar a expressão relativa de alguns genes de interesse com a finalidade de identificar se a definição de uma via como diferencialmente metilada de fato pode representar um preditivo de alteração em um processo biológico.

Como mencionado anteriormente, a via de morte celular foi uma das identificadas como hipermetiladas em FBL quando comparada à SBL. Sabe-se que, geralmente, os blastocistos ativam mecanismos apoptóticos através da via de ativação mitocondrial quando expostos a condições estressantes (100). Esse mecanismo, embora potencialmente prejudicial por reduzir drasticamente o número de blastômeros, também é uma maneira de impedir que uma célula danificada gere células filhas afetadas (101). Neste trabalho, além das diferenças no status de metilação, CASP9, a caspase iniciadora

foi hiperexpressa em FBL. No entanto, BID - um dos responsáveis pela liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol (102), e APAF1 – componente do complexo apoptosômico juntamente com a caspase 9 e o citocromo c (103), encontram-se hipermetilados em FBL. Além disso, a HSPA1A - proteína que inibe a translocação da BAX para a membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e a atividade do apoptosomo - encontrava-se hipoexpresso (104) (Figura 13). Juntos, esses resultados sugerem que, embora os estímulos pró-apoptóticos estejam presentes, os transcritos de proteínas efetoras parecem inibir a progressão da morte celular em FBL. Corroborando esses resultados, estudos prévios do nosso grupo não encontraram alterações na fragmentação do DNA e na atividade das caspases 3 e 7 em FBL e SBL (13).

A via de diferenciação celular também foi identificada como hipermetilada em FBL. A pluripotência em uma célula é mantida principalmente pelo controle de POU5F1 (OCT4), SALL4, SOX2 e NANOG (105). Em camundongos, a formação da massa celular interna também é regulada por esses quatro genes (106). Além disso, dos dois genes (NANOG e SOX2) que não foram identificados como diferencialmente metilados entre os grupos, apenas o NANOG foi hipoexpresso em FBL, enquanto o SOX2 não diferiu (Figura 14). Isso poderia sugerir que FBL está em um estágio de diferenciação posterior ao de SBL, uma vez que eles diferem na quantidade de transcritos que mantêm a célula em estágio pluripotente (105) e apresentam níveis mais altos de metilação do DNA, outra característica da diferenciação avançada em células (99). É importante salientar que todos os embriões utilizados para estes experimentos foram coletados no mesmo dia (D7) e se encontravam em estágio de blastocisto expandido. Isto demonstra que, embora os blastocistos de cinética rápida e lenta apresentem morfologia e número de células semelhantes (13), seus blastômeros podem estar em diferentes níveis de pluripotência celular.

Com relação ao metabolismo de lipídeos, foi observada maior correlação entre o status de metilação e os resultados de expressão gênica. O metabolismo lipídico no embrião pré-implantacional é importante para o armazenamento de energia, a estruturação dos blastômeros, na função de membranas (107) e nas taxas de sobrevivência após a criopreservação (108). Diferenças no conteúdo lipídico já foram previamente descritas em embriões rápidos e lentos (12). De fato, embora o número de gotas lipídicas em FBL seja maior (12), o metabolismo lipídico parece ser mais ativo no SBL (109). Os

resultados obtidos no presente experimento corroboram esses dados e sugerem que a via lipídica mais ativa em SBL não envolve o metabolismo do colesterol, e sim a síntese de ácidos graxos, uma vez que enzimas chave desta via encontram-se hipometiladas e/ou hiperexpressas em SBL, como ACL3, ELOV6 e FADS2. (Figura 15) A hipometilação e a hiperexpressão do PPAR α também sugerem um intenso metabolismo lipídico, uma vez que este gene é expresso predominantemente em tecidos com altas taxas de catabolismo de ácidos graxos (110).

É importante ressaltar que a análise de metilação do DNA através do EmbryoGENE fornece a intensidade da fluorescência liberada diferencialmente por fragmentos de DNA com base em suas quantidades relativas de metilação do DNA. Portanto, quando uma DMR é identificada como hipermetilada, é possível afirmar que a região possui maior número de metilações; no entanto, não podemos determinar se essas metilações estão de fato silenciando o gene. Em parte, isso pode explicar a ausência de correlação entre alguns resultados de metilação e padrão de transcrição de alguns genes. Esta ausência de correlação também pode ser explicada devido à presença de microRNAs e outras modificações epigenéticas, como as modificações pós-traducionais de histonas (99; 16). Dentre os resultados obtidos para a metilação do DNA neste trabalho, algumas DMRs foram classificadas como pertencentes a microRNAs e algumas enzimas reguladoras de modificações pós-traducionais de histonas, corroborando a hipótese de que outros mecanismos epigenéticos também estão controlando a quantidade de transcritos nestes embriões.

Para compreender como as diferenças de status de metilação de DNA e expressão de fatores relacionados ao controle epigenético entre embriões de cinética rápida e lenta são estabelecidas é necessário estudar como estes embriões se comportam ao longo de todo o desenvolvimento embrionário e também a interação da metilação do DNA com outras vias epigenéticas. Algumas destas possíveis avaliações serão detalhadas no Capítulo 2 desta tese.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES CINÉTICAS

8. Objetivos

O objetivo geral deste capítulo foi a identificação de diferenças epigenéticas ao longo do desenvolvimento de embriões bovinos com cinética distintas. Para tal, foram sugeridos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar o padrão da 5-metilcitosina (5mC), 5 hidroximetilcitosina (5hmC), acetilação e trimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9ac e H3K9me3, respectivamente), trimetilação de lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) de embriões bovinos com diferentes cinéticas durante as primeiras clivagens ao longo do desenvolvimento;
- Analisar os transcritos de genes relacionados ao controle epigenético disponíveis em banco de dados para embriões bovinos com cinéticas de desenvolvimento distintas e relacionar estes dados com os padrões epigenéticos observados para 5mC, 5hmC, H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3.

9. Metodologia

9.1 Coleta de amostras

A coleta de embriões bovinos foi feita em três estágios de desenvolvimento distintos. A primeira coleta foi realizada as 40 hpi de embriões no estágio de clivagem (CL), tanto para clivados rápidos (FCL) quanto para clivados lentos (SCL). A segunda coleta foi realizada no D4, após a ativação do genoma (GA) embrionário, também para embriões de cinética rápida (FGA) ou lenta (SGA). A última coleta foi realizada no estágio de blastocisto (BL) em D7, quando apenas embriões expandidos de cinética rápida (FBL) e lenta (SBL) foram coletados. Estas amostras foram utilizadas para identificar a intensidade de (1) 5mC (5-10 estruturas por estágio e por grupo, coletados em 4 replicatas biológicas); (2) 5hmC (6-13 estruturas por estágio e por grupo, coletados em 4 replicatas biológicas), H3K9ac (5-10 estruturas por estágio e por grupo, coletados em 4 replicatas biológicas), H3K9me3 (7-9 estruturas por estágio e por grupo, coletados em 3 replicatas biológicas) e H3K27me3 (5-9 estruturas por estágio e por grupo, coletados em 3 replicatas biológicas): Os embriões foram produzidos como descrito nos itens 5.1.1; 5.1.2 e 5.1.3 e classificados como descrito no item 5.1.4 do capítulo 1.

9.2 Imunofluorescência de 5mC e 5hmC

Para a coloração por imunofluorescência 5mC e 5hmC, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (p/v) em solução fosfato-salina (PBS) 10 mM por 15 minutos, permeabilizados por 15 minutos com solução de Triton-X 0,2% em PBS 10 mM, desnaturados com solução ácida (3 N HCl em água) por 30 minutos e neutralizados em solução básica (100 mM Tris-base em água) durante 10 minutos. Todas estas incubações foram realizadas à temperatura ambiente (TA). Em seguida, estes embriões foram bloqueados com solução de bloqueio [2% de BSA em 0,05% Triton X-100 diluído em PBS contendo 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP)] *over night* à 4°C e incubados durante 2 horas com anticorpos primários contra 5hmC ou 5mC e 1 hora com anticorpos secundários à TA. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio no momento de uso. A lista completa de anticorpos e diluições utilizados está detalhada na tabela 7. Os embriões foram então corados com iodeto de propídeo (0,05 mg/mL) para

identificação dos núcleos e colocados em lâminas. As lâminas foram analisadas com o microscópio Leica Microsystems DM16000 B acoplado com câmera Leica modelo DFC365 FX. Foram utilizados os filtros vermelho (Y3 - excitação/emissão 538-617 nm) e verde (L5 - excitação/emissão 512-542 nm). As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ v1.52c para quantificação do fluoróforo emitido.

9.3 Imunofluorescência de H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3.

Para o ensaio de imunofluorescência de H3K9me3, H3K9ac e H3K27me3, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (p/v) em PBS 10 mM por 30 minutos e permeabilizados por 30 minutos com solução de Triton-X 0,2% em PBS 10 mM, ambas incubações à TA. Em seguida, estes embriões foram bloqueados com solução bloqueadora (2% de BSA em 0,05% Triton X-100 diluído em PBS/PVP) a 37°C por 3 horas e incubados por 2 horas com anticorpos primários anti H3K9me3, H3K9ac ou H3K27me3 e 1 hora com anticorpos secundários. Todos os anticorpos foram diluídos em solução bloqueadora e a incubação foi realizada à TA. A lista completa de anticorpos utilizados e as suas diluições estão descritas na tabela 7. Embriões foram então corados com Hoechst 33342 (10 µg/mL em PBS/PVP) para identificação dos núcleos e analisados no microscópio Leica Microsystems DM16000 B acoplado com câmera Leica modelo DFC365 FX para a obtenção de imagens. Foram utilizados os filtros azul (I3 - excitação/emissão 350–490 nm) e verde (L5 - excitação/emissão 512-542 nm) para estas análises. A quantidade de fluoróforo emitido em cada um dos núcleos foi quantificada através do software ImageJ v1.52c.

Tabela 14: Anticorpos utilizados para imunofluorescência.

Epigenetic mark	Primary antibody	Dilution	Manufacturer	Secondary antibody	Dilution	Manufacturer
H3K9me3	ab71999	1:200	Abcam	a 21206	1:300	Life technologies
H3K9ac	ab12179	1:300	Abcam	ab150109	1:300	Abcam
H3K27me3	ab6002	1:100	Abcam	ab150109	1:200	Abcam
5mC	39649	1:200	Active Motif	ab150109	1:300	Abcam
5hmC	ab214728	1:200	Abcam	a 21206	1:300	Life technologies

9.4 Análise de transcritos de RNAseq (Banco de dados)

Foi realizada a análise de transcritos envolvidos em etapas de inserção e remoção de metilações do DNA e das modificações de histonas analisadas por imunofluorescência (H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3), além de genes chave de vias metabólicas possivelmente envolvidas nessas modificações. Para essa análise foi usado o banco de dados previamente descrito para embriões de desenvolvimento rápido e lento às 40 hpi e no estágio de blastocisto (12). Cada um dos transcritos foi escolhido a partir de relatos prévios na literatura da sua participação nos eventos (111) e com o auxílio do banco de dados *Histome: The Histone Infobase* (112) (disponível em: <http://www.actrec.gov.in/histome/>). Dados de *Reads Per Kilobase Million (RPKM)* de cada um dos transcritos foi submetido a análise univariada para verificar possíveis diferenças entre os grupos.

9.5 Análise dos resultados

As imagens obtidas para os ensaios de imunofluorescência foram analisadas pelo software ImageJ. Para isso, a área do núcleo foi demarcada e a média da intensidade de fluorescência foi quantificada, descontando o valor de *background* da imagem. A média de intensidade de fluorescência por núcleo para cada um dos grupos foi submetida à análise para detecção de *outliers* (Grubbs' test com Alpha = 0,05). Em seguida, estes dados foram submetidos ao teste D'Agostino & Pearson. Em caso de resultados com distribuição normal, foi realizado Teste-T para as comparações de cinética e ANOVA para comparações entre os estágios do desenvolvimento com posterior teste Dunn para múltiplas comparações. Em caso de dados não paramétricos, foi realizado o teste Mann-Whitney para avaliações de cinética e Kruskal-Wallis para avaliações de estágios do desenvolvimento. Os dados obtidos foram apresentados na forma de gráficos para cada modificação epigenética avaliada, nos quais a intensidade de fluorescência foi representada na forma de Unidades Arbitrárias (U.A.).

Os valores de RPKM para cada um dos genes de interesse foram submetidos ao Teste-T utilizando o software Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). A lista completa

de genes avaliados e os valores de RPKM e P valor estão descritos no Anexo L e M. Os genes que apresentaram $P \leq 0,1$ foram apresentados na forma de *heatmap* gerado através do site Heatmapper (113), com valores de RPKM normalizados entre 0 e 1.

10. Resultados

10.1 Imunofluorescência de 5mC

Os resultados obtidos para a presença de 5mC, uma marca epigenética restritiva, demonstraram que existe menor intensidade de fluorescência em embriões de cinética lenta, quando comparados à embriões de cinética rápida ao longo de todo o desenvolvimento (SCL $3,68 \pm 0,57$ U.A. vs FCL $12,18 \pm 0,34$ U.A.; SGA $6,75 \pm 0,22$ U.A. vs FGA $9,10 \pm 0,30$ U.A.; SBL $10,15 \pm 0,19$ U.A. vs FBL $13,14 \pm 0,19$ U.A.; $P < 0,0001$) (Figura 16 A e Figura 17). Além disso, houve aumento na intensidade das metilações do DNA com a progressão do desenvolvimento em embriões lentos ($P < 0,0001$), enquanto embriões rápidos apresentam redução na intensidade de metilações do DNA entre as fases de clivagem e ativação do genoma, seguida por aumento desta no estágio de blastocisto ($P < 0,0001$) (Figura 16 A). Foram analisados 17-54 núcleos em CL, 69-74 em GA e 368-486 em BL.

10.2 Imunofluorescência de 5hmC

A análise de 5hmC, uma etapa do processo de desmetilação do DNA, revelou menor intensidade de fluorescência para esta marcação em embriões de cinética lenta, quando comparados à embriões de cinética rápida nos estágios de ativação do genoma embrionário e blastocisto, (SGA $14,89 \pm 0,25$ U.A. vs FGA $39,44 \pm 0,87$ U.A.; SBL $11,57 \pm 0,21$ U.A. vs FBL $17,01 \pm 0,33$ U.A.; $P < 0,0001$) embora em clivados não seja observada diferença estatística entre os grupos (SCL $22,75 \pm 0,83$ U.A. vs FCL $24,06 \pm 0,77$ U.A.; $P = 0,156$) (Figura 16 B e Figura 17). Além disso, foi observada diferença na intensidade das metilações do DNA com a progressão do desenvolvimento para os dois grupos ($P < 0,0001$). No entanto, enquanto embriões rápidos apresentaram aumento na intensidade de fluorescência entre as fases de clivagem e ativação do genoma e redução nesta entre as fases de ativação do genoma e blastocistos, os embriões lentos apresentaram apenas redução na intensidade de fluorescência ao longo do desenvolvimento (Figura 16 B). Foram analisados 28-53 núcleos em CL, 75-163 em GA e 310-576 em BL.

10.3 Análise de transcritos envolvidos na metilação e desmetilação do DNA

Foram avaliados 30 genes (Figura 16 D) que estão relacionados com a metilação do DNA (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L); desmetilação do DNA (TET1, TET2, TET3, TDG, AICDA, APOBEC1, MBD4, SMUG1, NEIL3, NEIL2, LIG3, XRCC1 e APEX1); proteção de regiões metiladas (STELLA); síntese e consumo de SAM (AMD1, MAT1A, MAT2A e MAT2B) e envolvidos na síntese e consumo de α -cetoglutarato (GLUD1, IDH3B, IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDH3G e OGDH) em embriões de cinéticas distintas em fase de clivados e blastocistos. Dos genes avaliados, apenas DNMT3L não foi detectado nos dados de RNAseq consultados. Foi observada hiperexpressão dos genes STELLA e DNMT3A em embriões lentos as 40 hpi e hiperexpressão de GLUD1, IDH3A, IDH3B, IDH1, IDH3G, AMD1, MAT2A, MAT2B, MBD4, NEIL3, LIG3, XRCC1, APEX1, STELLA, TET1, TET2, DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) em embriões lentos no estágio de blastocistos. Apenas os genes AICDA e TET3 foram hiperexpressos em embriões rápidos no estágio de blastocisto (Figura 16 C).

Figura 16: (A) Intensidade de fluorescência de 5mC e (B) 5hmC, em unidades arbitrárias, de embriões de cinética rápida (vermelho) e lenta (azul) as 40 hpi (CL), durante a ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Em (C) estão representados os genes identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinética rápida e lenta as 40 hpi (identificados por quadrado azul) e no estágio de blastocisto (identificados por quadrado vermelho). Em D estão representados os genes cujos transcritos atuam nos processos de metilação e desmetilação do DNA, assim como aqueles que atuam nos processos de síntese e consumo de SAM e α -cetoglutarato. A citosina (C) é metilada pelas enzimas DNMT1, DNMT3A ou DNMT3B, sendo convertida a 5-metilcitosina (5mC), através da transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM). Esta 5mC pode ser protegida da desmetilação pela proteína STELLA, ou ser oxidada pelas enzimas TET1, TET2 ou TET3, que utilizam o α -cetoglutarato (α KG), 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxilcitosina (5caC) ou 5-formilcitosina (5fC). Estes dois últimos podem ser glicosilados pela TDG e seguirem para o mecanismo de excisão de bases (BER – composto por: NEIL3, NEIL2, LIG3, XRCC1 e APEX1), retornando à forma de citosina não metilada. Ainda, 5mC e 5hmC podem ser convertidos por AICDA/APOBEC1 à Timina (T) e 5-metiluracila (5hmU), respectivamente, sendo a primeira removida por TDG/MBD4 e a segunda por TDG/SMUG1, ambas seguindo para o BER. Com relação aos metabolitos utilizados nestes processos, a SAM é convertida a partir de uma metionina pela ação de MAT1A, MAT2A e MAT2B, podendo ser desviada para a produção de poliaminas por AMD1. O α -cetoglutarato pode ser produzido a partir do glutamato pela GLUT1 ou do isocitrato por IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDH3G, podendo seguir no ciclo do ácido tricarboxílico através da conversão à isossuccinato pela enzima OGDH.

Figura 17: Paineis representativos com imagens demonstrando a intensidade de fluorescência 5mC e 5hmC em embriões de cinética rápida e lenta nos estágios de Clivagem (CL), Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Imagens obtidas em aumento de 400 vezes.

10.4 Imunofluorescência de H3K9ac

A avaliação de intensidade de fluorescência de H3K9ac, uma marcação epigenética permissiva, aparece em maior intensidade em embriões de cinética rápida do que em embriões de cinética lenta em CL e GA (FCL $72,78 \pm 1,25$ U.A. vs SCL $35,06 \pm 2,63$ U.A.; FGA $29,40 \pm 1,17$ U.A. vs SGA $17,52 \pm 1,16$ U.A.; $P < 0,0001$). No entanto, esta marcação é observada em maior intensidade em embriões de cinética lenta no estágio de blastocisto (FBL $13,33 \pm 0,37$ U.A. vs SBL $38,14 \pm 1,17$ U.A.; $P < 0,0001$) (Figura 18 A e B). Além disso, foi observada redução na intensidade de fluorescência para H3K9ac em embriões rápidos ao longo do desenvolvimento ($P < 0,0001$), enquanto embriões lentos apresentam redução desta marcação entre CL e GA, seguido de aumento entre os estágios de GA e blastocisto ($P < 0,0001$) (Figura 18 A e B). Foram analisados 24-40 núcleos em CL, 48-147 em GA e 393-821 em BL.

10.5 Análise de transcritos de genes envolvidos na acetilação e desacetilação de H3K9

Foram avaliados 4 genes envolvidos nos processos de acetilação (ELP3 e HAT2A) e desacetilação de H3K9 (SIRT1 e SIRT6), 1 gene que atua na produção de citrato (CS), 4 que atuam na produção de acetil-CoA (ACYL e ACSS1-3) e 1 que atua no desvio do Acetil-CoA para a produção de ácidos graxos (ACACA). A produção e consumo de Acetil-CoA foi avaliada visto que este é o doador do grupo acetil durante a acetilação dessas proteínas (Figura 18 D). Destes genes, ELP3, SIRT1 e ACYL foram hiperexpressos em blastocistos lentos (Figura 18 C).

Figura 18: Resultados obtidos para a intensidade de fluorescência de H3K9ac (A) em embriões de cinética rápida (laranja) e lenta (verde) as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL). Em (B) são apresentadas imagens representativas do padrão de fluorescência para esta modificação em embriões de cinéticas distintas ao longo do desenvolvimento. Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. (C) genes identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinética rápida e lenta no estágio de blastocisto. (D) Representação esquemática dos processos de acetilação pelas enzimas ELP3 e HAT2A e desacetilação pela SIRT1 e SIRT6. Além disso, estão representadas as enzimas CS (converte Acetil-CoA e oxaloacetato em citrato), ACLY (conversão de citrato em Acetil-CoA), ACSS1, 2 e 3 (responsáveis pela conversão de acetato em Acetil-CoA), ACACA (responsável pelo desvio de Acetil-CoA para a produção de ácidos-graxos), que atuam na produção e consumo de Acetil-CoA.

10.6 Imunofluorescência de H3K9me3

A intensidade de fluorescência de H3K9me3, uma modificação pós-traducional de histonas restritiva, foi maior em embriões rápidos as 40 hpi e no blastocisto (FCL $15,68 \pm 0,84$ U.A. vs SCL $9,88 \pm 0,91$ U.A.; FBL $17,82 \pm 0,34$ U.A. vs SBL $14,11 \pm 0,24$ U.A.; $P < 0,0001$) (Figura 19 A e B), enquanto os embriões lentos apresentaram maior intensidade durante a ativação do genoma (SGA $8,78 \pm 0,29$ U.A. vs FGA $6,67 \pm 0,45$ U.A.; $P < 0,0001$) (Figura 19 A e B). O perfil da intensidade de fluorescência da tripla metilação de H3K9 é diferente para embriões rápidos e lentos ao longo do desenvolvimento. Durante a transição entre CL e GA embriões rápidos apresentam redução ($P < 0,0001$) enquanto lentos não apresentam alteração na intensidade desta modificação. Ambos os grupos apresentam aumento desta modificação na transição da GA para blastocisto, embora este fenômeno seja mais pronunciado em embriões rápidos. Nesta análise, foram quantificados 55-62 núcleos CL, 67-97 núcleos de GA e 402-467 núcleos de BL.

10.7 Análise de transcritos de genes envolvidos na metilação e desmetilação de H3K9

Foram avaliados 7 transcritos de genes envolvidos na metilação (SETDB1, SETDB2, SUV39H1, SUV39H2, EHMT1, EHMT2 e PRDM2) e 10 relacionados à desmetilação de H3K9 (KDM1A, KDM1B, KDM3A, KDM3B, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM4D, KDM7A e JMDM1F) (Figura 19 D). Destes genes, KDM3A e KDM7A estavam hiperexpressos em SCL, enquanto SETDB1, SETDB2, SUV39H1, KDM1A, KDM1B, KDM3A e KDM3C foram hiperexpressos em blastocistos lentos (Figura 19 C). Nenhum gene envolvido nesta modificação epigenética foi observado como hiperexpresso em embriões rápidos.

B

D

Figura 19: Intensidade de fluorescência da tripla metilação de H3K9 em embriões de cinética rápida (laranja) e lenta (verde) as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL), apresentada na forma de gráfico (A) ou de imagens representativas (B). Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. Em (C) estão representados os transcritos identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinéticas distintas as 40 hpi (identificados por quadrado laranja) e Blastocisto (identificados por quadrado verde). Em (D) é possível visualizar as enzimas que atuam em cada uma das etapas do processo de desmetilação e metilação de H3K9.

10.8 Imunofluorescência de H3K27me3

Não foi observada diferença na intensidade de fluorescência para H3K27me3, uma marcação epigenética restritiva, as 40 hpi (FCL $4,81 \pm 0,77$ U.A. vs SCL $4,05 \pm 0,83$ U.A.; $P=0,898$). Embriões rápidos apresentaram maior fluorescência em GA (FGA $7,80 \pm 0,51$ U.A. vs SGA $5,39 \pm 0,35$ U.A.; $P=0,001$) enquanto os lentos no estágio de blastocisto (FBL $11,20 \pm 0,57$ U.A. vs SBL $21,42 \pm 1,00$ U.A.; $P<0,0001$) (Figura 20 A e B). Além disso, embora não exista alteração desta modificação entre CL e GA em embriões lentos, foi observado aumento na transição para a fase de blastocisto ($P<0,0001$). Curiosamente, foi observado aumento progressivo desta modificação em embriões rápidos ($P<0,0001$) com a progressão do desenvolvimento (Figura 20 A e B). Para esta análise, foram quantificados 21-33 núcleos de embriões CL, 57-83 de GA e 147-286 de BL.

10.9 Análise de transcritos de genes envolvidos na metilação e desmetilação de H3K27

Foram avaliados 8 genes envolvidos no processo de desmetilação (KDM6A, KDM6B e KDM7A) e metilação (EZH1, EZH2, NSD3, EHMT1 e EHMT2) (Figura 20 D). Em CL, embriões lentos apresentaram maior quantidade de transcritos de KDM7A e KDM3A e menor quantidade de EZH1 em relação à embriões rápidos neste mesmo estágio. Na fase de blastocisto, foi observada maior expressão de KDM3A e EZH2 e menor expressão de KDM6B em embriões lentos, quando comparados à embriões rápidos (Figura 20 C).

Figura 20: Média da intensidade de fluorescência de H3K27me3 obtida para a em embriões com diferentes cinéticas as 40 hpi (CL), durante a Ativação do Genoma (GA); e Blastocisto (BL) (A). Embriões rápidos estão representados em laranja e embriões lentos em verde. Em (B) são apresentadas imagens representativas de cada uma destas avaliações. Imagens obtidas em aumento de 400 vezes. Em (C) é possível visualizar os transcritos identificados como diferencialmente expressos entre embriões de cinéticas distintas em CL (identificados por quadrado laranja) e Blastocisto (identificados por quadrado verde) e em (D) é possível visualizar as enzimas que atuam em cada uma das etapas do processo de desmetilação e metilação de H3K27.

11 Discussão

Compreender os eventos epigenéticos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário tem sido foco de um grande número de pesquisas (44; 45; 46; 47; 43; 49). Usualmente, estes trabalhos tentam estabelecer quais são os perfis ideais destes eventos pela comparação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (49; 114); ou embriões PIV e por transferência nuclear (SCNT) (115; 116); ou ainda utilizando moduladores para afetar eventos epigenéticos na tentativa de compreender sua importância (117; 118). Estes estudos consideram os embriões PIV, sob as mesmas condições de cultivo, como um grupo tipicamente homogêneo. No entanto, já foi relatado que embriões PIV e diferenciados apenas pela cinética das primeiras clivagens apresentam ativação de mecanismos bioquímicos e metabólicos distintos, e que estas poderiam estar relacionadas a maior ou menor possibilidade de sucesso após a transferência (12; 13; 14; 31; 6).

A cinética do desenvolvimento embrionário já é uma ferramenta utilizada para a seleção de embriões humanos para a transferência e poderia ser um preditivo de qualidade para a seleção de embriões bovinos (6; 7; 9). Foi demonstrado no capítulo 1 desta tese que blastocistos de bovinos que apresentam cinéticas distintas nas primeiras clivagens possuem diferentes perfis de metilação global do DNA e que isso leva a ativação de vias biológicas distintas entre estes embriões. Ainda, no capítulo anterior, blastocistos de cinética rápida apresentaram maior quantidade global de metilações do DNA do que blastocistos lentos. Estes dados corroboram os resultados da quantificação de 5mC, em que embriões de cinética rápida apresentaram maior quantidade desta marcação ao longo de todo o desenvolvimento embrionário resultando em blastocistos com maior quantidade de metilações do DNA, quando comparados à embriões lentos.

Sabe-se que, logo após a fecundação, inicia-se o processo de desmetilação passiva e ativa do DNA, esta última através de enzimas TETs, que utilizam α -cetoglutarato durante o processo de desmetilação, e que são responsáveis pela oxidação de 5mC em 5hmC, 5caC e 5fC. Diferente de 5caC e 5fC, que são marcações que não permanecem no DNA, a 5hmC pode ser apenas uma etapa no processo de desmetilação ativa ou pode permanecer no DNA e, dependendo de sua localização, regular negativamente a transcrição gênica (17). Neste trabalho foi possível observar que os processos de desmetilação e metilação ‘de novo’ do DNA em embriões rápidos parecem ocorrer de acordo com o descrito na literatura, apresentando alta intensidade no início do desenvolvimento, seguida de redução até o estágio de 8-16 células, e aumento progressivo

das metilações do DNA até o estágio de blastocisto (45; 47). Concomitantemente à redução de 5mC, foi observado uma relação inversamente proporcional na intensidade de fluorescência de 5hmC.

Embriões de cinética lenta, por outro lado, não realizaram o processo de desmetilação e metilação ‘de novo’ como esperado durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional normal (44; 45; 46; 47). Estes embriões apresentam apenas aumento de 5mC e redução de 5hmC progressivamente ao longo do desenvolvimento. Em relação ao padrão de transcritos, em embriões lentos, foi observada maior quantidade de DNMT3A e STELLA logo no início do desenvolvimento, embora estes apresentassem menor quantidade de metilações do DNA neste mesmo estágio, em comparação aos embriões de cinética rápida. Visto que a quantidade de metilações do DNA em embriões lentos é observada em níveis substancialmente baixos ao longo de todo o desenvolvimento, esta pode ser uma característica que foi herdada do oócito que, por sua vez, apresentaria metilações do DNA abaixo das quantidades necessárias. Na tentativa de compensar a baixa metilação do DNA, ainda durante o processo de maturação, o oócito poderia estocar maior quantidade de mRNA de DNMT3A, na tentativa de garantir a manutenção destas metilações evitando a desmetilação passiva, e STELLA, na tentativa de prevenir a desmetilação do DNA ativa pelas enzimas TET (17).

Os resultados de RNAseq demonstraram que embriões lentos parecem ativar simultaneamente mecanismos opostos no estágio de blastocisto. Ao mesmo tempo que estes apresentam maior expressão de genes responsáveis pela metilação do DNA (DNMT1, 3A e 3B) e maior expressão de STELLA (responsável pela prevenção da desmetilação através da ligação com 5mC), também ativam mecanismos de início do processo de desmetilação ativa (TET1 e 2) e termino através do mecanismo BER (NEIL3, LIG3 e APEX1) (17; 119). Além disso, blastocistos de cinética lenta também apresentam maior expressão dos genes GLUD1 e IDH (responsáveis pela conversão de glutamato e isocitrato, respectivamente, ao α -cetoglutarato) sem que ocorra aumento na expressão de OGDH (responsável pela conversão de α -cetoglutarato ao isosuccinato no ciclo do ácido tricarboxílico) levantando a possibilidade de que, de fato, estes blastocistos lentos estejam produzindo mais α -cetoglutarato para garantir a atividade das TETs (120). Por outro lado, embora tenha sido observado aumento de transcritos das enzimas responsáveis pela produção de SAM (MAT2A e 2B), doador do grupo metil durante a metilação do DNA, também foi observado aumento na transcrição da enzima responsável pelo desvio de SAM para a síntese de poliaminas (AMD1) (121; 122). A associação destes resultados

leva a interpretação de que embriões lentos estão tentando promover a metilação do DNA, visto que também apresentam maior ativação deste mecanismo, mas parecem não estar sendo tão eficientes nesta atividade quanto embriões rápidos, que mesmo apresentando menor expressão destas enzimas possuem níveis elevados de 5mC. Além disso, blastocistos lentos estão ativando mecanismos de desmetilação e de proteção a desmetilação provavelmente como tentativa de realizar as desmetilações necessárias para a reprogramação epigenética que deveria ter ocorrido no estágio de 8-16 células, mas também tentando não reduzir drasticamente as poucas metilações que possuem através da proteção de STELLA.

Sabe-se que as metilações do DNA, ou ausência delas, pode levar a ativação e inativação de enzimas responsáveis pela regulação de modificações pós-traducionais de histonas (50; 51). Baseando-se nestas informações, foram avaliados os padrões de acetilação e tripla metilação de H3K9 e tripla metilação de H3K27 e o perfil de transcritos de enzimas relacionadas à inserção (*writers*) e remoção (*erasers*) destas modificações pós-traducionais de histonas que, conhecidamente, sofrem reprogramação durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional.

Já foi descrito na literatura que embriões bovinos apresentam desacetilação de H3K9 durante as primeiras clivagens, quando é observada redução desta marcação do estágio de 2 células até o estágio de 8-16 células. Em seguida, ocorre acetilação desta lisina, resultando em aumento até o estágio de blastocisto (75). Esta modificação de histona tem caráter permissivo à transcrição gênica e, normalmente, é encontrada associada a regiões do DNA com poucas metilação (60). Embriões de cinéticas distintas apresentam diferenças na intensidade de fluorescência de H3K9ac já no início do desenvolvimento, quando embriões rápidos apresentam maior quantidade desta marcação. Curiosamente, não houve diferença na quantidade de transcritos para nenhum dos genes envolvidos nos processos de acetilação ou desacetilação, apenas relacionados à produção de Acetil-CoA, neste mesmo estágio, levantando a possibilidade de que esta marcação epigenética, assim como o padrão de metilação do DNA, também possa ser herdado dos gametas, porém sem que ocorra estoque de mRNA durante a maturação oocitária na tentativa de reverter este perfil. De fato, embriões de cinética rápida e lenta apresentaram redução nos níveis de acetilação de H3K9 entre a transição do estágio de clivados até 8-16 células, embora esta transição seja mais pronunciada em embriões rápidos. Após este estágio, enquanto embriões lentos promovem aumento nas acetilações de H3K9, embriões rápidos continuaram promovendo a desacetilação desta lisina.

Embriões lentos apresentaram hiperexpressão de transcritos para uma enzima responsável pela acetilação (ELP3) e uma responsável pela desacetilação (SIRT1) de H3K9 (112), o que não justificaria a diferença observada entre os grupos de cinéticas distintas. No entanto, genes envolvidos na produção de Acetil-CoA, metabolito utilizado como doador de grupo acetil no processo de acetilação, encontraram-se aumentados em embriões lentos, sugerindo que este possui mais substrato para realizar de acetilações (123), justificando a presença de maior intensidade de H3K9ac.

Com relação à H3K9me3, uma modificação pós-traducional de histonas que exerce papel repressivo na expressão gênica, foi observado que embriões de cinética rápida apresentam redução desta marcação epigenética durante as primeiras clivagens até o estágio de ativação do genoma, atingindo baixos níveis. Em seguida, ocorre aumento da intensidade de fluorescência para H3K9me3 até estágio de blastocisto. Este padrão de desmetilação seguido de remetilação de H3K9 observado em embriões rápidos está de acordo com o padrão observado na literatura durante o desenvolvimento pré-implantacional de bovinos (77; 75). Ainda, nestes embriões, esta modificação pareceu acompanhar o perfil de desmetilação e metilação observado para 5mC, característica já descrita na literatura (77). Não foi observada desmetilação de H3K9me3 entre o início do desenvolvimento e ativação do genoma em embriões lentos. Embora estes embriões apresentassem maior quantidade de transcritos de KDM3A e KDM7A no início do desenvolvimento, estas enzimas são desmetilases específicas para mono ou bimetilação de H3K9 (112) não exercendo atividade em H3K9me3. Entre os estágios de ativação do genoma e blastocisto, embora ambos os grupos de embriões apresentem aumento de H3K9me, este é mais sutil em blastocistos lentos, embora estes apresentem hiperexpressão de 3 (SETDB1, SETDB2 e SUV39H2) das 4 enzimas responsáveis pela inserção da triplametilação em H3K9 (112). Este efeito pode ser provocado pela hiperexpressão de desmetilases responsáveis pela remoção de metilação de H3K9me1 e H3K9me2 (KDM4C, KDM3A, KDM1B e KDM1A) em blastocistos lentos, sem que ocorra diferença na expressão de enzimas responsáveis pela inserção de mono ou bimetilações em H3K9 (EHMT1, EHMT2 e PRDM2) (112), o que impediria a formação de etapas intermediárias (H3K9me1 e H3K9me2) necessárias para a inserção da triplametilação de H3K9.

Com relação a H3K27me3, foi observado que, embora embriões de cinéticas distintas apresentem a mesma quantidade desta marcação, embriões rápidos apresentaram aumento progressivo desta modificação com a progressão do desenvolvimento

embrionário, enquanto embriões lentos apresentaram aumento apenas após o estágio de ativação do genoma. Embora seja observada hiperexpressão de transcritos de enzima responsável pela desmetilação (KDM7A) e hipoexpressão de transcritos de enzimas que atuam na metilação (EZH1) em embriões lentos no início do desenvolvimento, nenhuma destas duas enzimas atua diretamente em H3K27me3, apresentando atividade apenas na desmetilação/metilação de etapas intermediárias (H3K27me1 e H3K27me2) de H3K27me3 (112). Na fase de blastocisto, foi observado que embriões lentos possuem hiperexpressão de EZH1, cuja enzima é responsável por inserção de metilações em H3K27me1, H3K27me2 e H3K27me3, e de KDM6A, responsável unicamente pela desmetilação de H3K27me3 (112). Enquanto isso, blastocistos rápidos apresentaram hiperexpressão de KDM6B, uma desmetilase que atua tanto na remoção do grupamento metila de H3K27me3 quanto H3K27me2 (112). A maior expressão de metilase e menor expressão de desmetilase de embriões lentos pode explicar porque o aumento de H3K27me3, embora observado em embriões de ambas cinéticas do desenvolvimento na transição da fase de ativação do genoma embrionário para o estágio de blastocisto, é mais pronunciado em blastocistos de cinética lenta.

Embriões de cinéticas distintas diferem tanto com relação à metilações e desmetilações do DNA quanto a modificações pós-traducionais de histonas que, conhecidamente, sofrem reprogramação no período pré-implantacional (75). Curiosamente, com exceção de H3K27me3, todas as modificações epigenéticas avaliadas apresentavam o seu caráter mais permissivo à transcrição (menor 5mC, menor H3K9me3 e maior H3K9ac) em embriões lentos, em relação aos rápidos. Talvez a tripla metilação de H3K27 seja o único mecanismo restritivo à transcrição que embriões de cinética lenta estão conseguindo ativar de modo eficiente, na tentativa de reduzir a expressão excessiva de mRNAs e aumentar o silenciamento gênico necessário para as diferenciações celulares das próximas etapas do desenvolvimento embrionário (26). No entanto, é importante ressaltar que o perfil de H3K27me3 em embriões rápidos, assim como os outros mecanismos epigenéticos avaliados neste trabalho, é mais semelhante ao descrito na literatura (124) do que o perfil observado em embriões lentos.

Já foi descrito que embriões de cinética lenta apresentam maior semelhança à embriões produzidos *in vivo* (12), no entanto, estes embriões parecem apresentar maior perturbação nas reprogramações epigenéticas que precisam ocorrer durante o desenvolvimento embrionário. Esta semelhança à embriões produzidos *in vivo* pode, na verdade, demonstrar que os embriões de cinética lenta não são responsivos ao estresse

provocado pelo ambiente *in vitro*, ativando mecanismos que só seriam eficientes em condições ideais de cultivo. Enquanto isso, embriões de cinética rápida conseguiriam responder melhor as condições não otimizadas do cultivo *in vitro* e ativar mecanismos de modo eficiente para garantir, entre outras coisas, a reprogramação epigenética necessária para a formação de um blastocisto de melhor qualidade.

12 CONCLUSÕES

Embriões bovinos de cinéticas distintas durante as primeiras clivagens ativam diferentemente mecanismos epigenéticos logo no início do desenvolvimento embrionário o que resulta na produção de blastocistos com perfis globais de marcas epigenéticas distintos com impacto no perfil transcricional. Estas diferenças resultam na ativação de processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares distintas (Figura 21).

Figura 21: Conclusões obtidas através da associação dos resultados do Capítulo 1 e Capítulo 2.

BIBLIOGRAFIA

1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. 1982, 27:147–158.
2. Sirard MA. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*. 2018, 156(1):R1-R7.
3. Nandi S, Kumar VG, Chauhan MS. In vitro production of bovine embryos: We need to stop or proceed - A review. *Agric Rev*. 2006, 27(2):122-129.
4. Perry G. 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. s.l. : IETS Data Retrieval Committee. 2017, 1-16.
5. Sirard MA. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *J Dev Orig Health Dis*. 2017, 8(4):411-417.
6. Sigalos GA, Triantafyllidou O, Vlahos NF. Novel embryo selection techniques to increase embryo implantation in IVF attempts. *Arch Gynecol Obstet*. 2016, 294(6):1117-1124.
7. Alves GP, Cordeiro FB, de Lima CB, et al. Transcriptional pattern of granulosa cells and follicular fluid composition are associated to bovine embryo morphokinetics and development: A system biology approach and potential altered pathways. *Reprod Fert Develop*. 2018, Epub Ahead of Print.
8. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011, 26:2658-2671.
9. Cruz M, Garrido N, Herrero J, et al. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*. 2012, 25:371-381.
10. MarketVelker BA, Denomme MM, Mann MR. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. *Biology of Reproduction*. 2012, 86(5):143, 1-16.
11. Gutierrez-Adan A, White CR, Van Soom A, et al. Why we should not select the faster embryo: lessons from mice and cattle. *Reproduction, Fertility, and Development*. 2015, 27(5):765-775.
12. Milazzotto MP, Goissis MD, Chitwood JL, et al. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*. 2016, 83(4): 324-336.
13. Silva T, Santos EC, Annes K, et al. Morphokinetic-related response to stress in individually cultured embryos. *Theriogenology*. 2016, 86(5):1308–17.
14. Dos-Santos EC, de-Lima CB, Annes K, et al. Noninvasive characterization of metabolites secreted in culture media by bovine embryos during in vitro production. *Journal of Biomedical Optics*. 2016, 21(7): 75002.
15. Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*. 2017, 18:643–658.

16. Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics*. 2014;9(6):803-15
17. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*. 2014, 15; 28(8): 812–828.
18. Hall V, Hinrichs K, Lazzari G, et al. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Vet J*. 2013, 197(2):128-42
19. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 1982, 27(1):147-58.
20. Lonergan P, Trudee Fair. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016, 4:255-68.
21. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009, 71(5):836-48.
22. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod*. 2000, 62(2):355-64.
23. Parrish JJ. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 2014, 81(1):67-73.
24. Gardner AJ, Evans JP. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev*. 2006, 18(1-2):53-61.
25. El-Aziz AHA, Mahrous UE, Kamel SZ, et al. Factors Influencing in vitro Production of Bovine Embryos: A Review. *Asian J Anim Vet Adv*. 2016, 11(12):737-756.
26. Wei Q, Zhong L, Zhang Z, et al. Bovine Lineage Specification Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from zygote to blastocyst. *Biol of Reprod* . 2017, 97(1):5–17.
27. Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, et al. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. *Pesq agropec bras*. 2000, 35(1): 241.
28. Rumpf R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. 2007, *R Bras Zootec*. 2007, 36: 229-233.
29. Penitente-Filho JM. Improved in vitro production systems for bovine embryos. *CAB Reviews*. 2015, 10(048):1-14.
30. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, et al. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod*. 2002, 17(2):407-12.

31. Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod.* 2003, 18(4):821-5.
32. Schultz RM. From egg to embryo: A peripatetic journey. *Reproduction.* 2005, 130(6):825-8.
33. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, et al. The Quiet Embryo Hypothesis : Molecular Characteristics Favoring Viability. *Mol Reprod Dev.* 2007, 74(10):1345-53.
34. Leese HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays.* 2002;24(9):845-9.
35. Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:315-25.
36. Corcoran D, Fair T, Lonergan P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online.* 2005 Sep;11(3):340-8.
37. Oliveira NFP, Planello AC, Andia DC, et al. Metilação do DNA e câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2010, 56(4): 493-499
38. Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays.* 1999, 21(5):402-11.
39. Niller HH, Demcsák A, Minarovits J. DNA Methylation in Eukaryotes: Regulation and Function. In: Krell T. (eds) *Cellular Ecophysiology of Microbe. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* 2017. Springer, Cham
40. Morgan HD, Dean W, Coker HA, et al. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 2004, 279:52353–52360.
41. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002, 59(2):241-57.
42. Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2007, 100(1):7-23.
43. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie.* 2015, 116:103-13.
44. Zhang S, Chen X, Wang F, et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. *Sci Rep.* 2016, 6:30345.
45. Hou J, Liu L, Lei T, et al. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Sci China C Life Sci.* 2007, 50(1):56-61.
46. Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98(24):13734-8.
47. Dobbs KB, Rodriguez M, Sudano MJ, et al. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS ONE.* 2013, 8(6):e66230.

48. Warnecke PM, Mann JR, Frommer M, et al. Bisulfite sequencing in preimplantation embryos: DNA methylation profile of the upstream region of the mouse imprinted H19 gene. *Genomics*. 1998, 51(2):182-90.
49. Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Hoelker M, et al. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. *PLoS One*. 2015, 10(11): e0140467 .
50. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998, 393:386–389.
51. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998, 18:6538–6547.
52. Luger K, Mäder AW, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997, 389:251–260.
53. Ettig R, Kepper N, Stehr R, et al. Dissecting DNA-Histone Interactions in the Nucleosome by Molecular Dynamics Simulations of DNA Unwrapping. *Biophys J*. 2011, 101(8):1999-2008.
54. Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, et al. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio*. 2013, 3:363-9.
55. Voet D, Voet J, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
56. Allfrey VG, Faaukner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964, 51:786-94.
57. Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(2):392-4.
58. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005, 41(16):2381-402.
59. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007, 128:693-705.
60. Huynh NC, Everts V, Ampornaramveth RS. Histone deacetylases and their roles in mineralized tissue regeneration. *Bone Reports*. 2017, 7:33-40.
61. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997, 389:349-352.
62. Guo SW. Chapter 22 - The Epigenetics of Endometriosis. [book auth.] TO. Tollefsbol. *Epigenetics in Human Disease*. s.l. : Elsevier, 2012.
63. Galdieri L, Zhang T, Rogerson D, et al. Protein Acetylation and Acetyl Coenzyme A Metabolism in Budding Yeast. *Eukaryot Cell*. 2014, 13(12): 1472–1483.
64. Vogelauer M, Krall AS, McBrien MA, et al. Stimulation of Histone Deacetylase Activity by Metabolites of Intermediary Metabolism. *J Biol Chem*. 2012, 287(38): 32006–32016.

65. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011, 21(3): 381–395.
66. Till Bartke, Vermeulen M, Xhemalce B, et al. Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation. *Cell.* 2010, 143(3): 470–484.
67. Park JS, Jeong YS, Shin ST, et al. Dynamic DNAmethylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Dev Dyn.* 2007, 236(9): 2523-33.
68. Bártoová E, Krejčí J, Harnicarová A, et al. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 2008, 56(8):711-21.
69. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al. *Biologia celular e molecular.* 7. ed. Porto Alegre : Artmed, 2014.
70. Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone methyl-transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab.* 2010, 12(4): 321–327.
71. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004, 119: 941 – 953.
72. D'Oto A, Tian Q, Davidoff AM, et al. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J Med Oncol Ther.* 2016, 1(2): 34–40.
73. Agger K, Christensen J, Cloos PA, et al. The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev.* 2008, 18(2):159-68.
74. Rodriguez-Osorio N, Dogan S, Memili E. Epigenetics of Mammalian Gamete and Embryo Development. [book auth.] Hasan Khatib. *Livestock Epigenetics.* s.l. : John Wiley & Sons, 2012.
75. Wu X, Li Y, Xue L, et al. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. *Zygote.* 2010, 19: 31–45.
76. McGraw S, Robert C, Massicotte L, et al. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod.* 2003, 68(2):383-9.
77. Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, et al Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol.* 2003, 13(13):1116-21.
78. Zhang S, Wang F, Fan C, et al. Dynamic changes of histone H3 lysine 9 following trimethylation in bovine oocytes and pre-implantation embryos. *Biotechnol Lett.* 2016, 38(3):395-402.
79. Golding MC, Snyder M, Williamson GL, et al. Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1 is required for development of the bovine blastocyst. *Theriogenology.* 2015, 84(8):1411-22. .
80. Bai H, Li Y, Gao H, et al. Histone methyltransferase SMYD3 regulates the expression of transcriptional factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Cytotechnology.* 2016, 68(4):849-59.

81. Pagé-Larivière F, Sirard MA. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. *Cell Reprogram*. 2014, 16(1):40-53.
82. Liu X, Wang Y, Gao Y, et al. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Development*. 2018, 145:dev158261.
83. Canovas S, Cibelli JB, Ross PJ. Jumonji domain-containing protein 3 regulates histone 3 lysine 27 methylation during bovine preimplantation development. *PNAS*. 2012, 109(7):2400–2405.
84. Li CH, Gao Y, Wang S, et al. Expression pattern of JMJD1C in oocytes and its impact on early embryonic development. *Genet Mol Res*. 2015, 14(4):18249-58.
85. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979, 48(1):76-86.
86. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, et al. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. *Biol Reprod*. 1988, 38(5):1171-80.
87. Hashimoto S, Kato N, Saeki K, et al. Selection of high-potential embryo by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertility and Sterility*. 2012, 97: 332–337.
88. Cruz M, Garrido N, Herrero J, et al. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*. 2012, 25: 371–381.
89. Shojaei Saadi HA, O'Doherty AM, Gagne D, et al. An integrated platform for bovine DNA methylome analysis suitable for small samples. *BMC Genomics*. 2014, 15: 451.
90. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization. *Can Res*. 2004, 64(15):5245–50.
91. Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Rath D, et al. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiological Genomics*. 2008, 32(2):264-272.
92. De Vries A, Overton M, Fetrow J, et al. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Dairy Sci*. 2008, 91(2):847-56.
93. Souza Cáceres MB, Leite da Silva WA, Bini de Lima AC, et al. Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in sexed semen. *Theriogenology*. 2016, 86(8):1944-52.
94. Mikkola M, Taponen J. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology*. 2017, 87:135-140.
95. Djedović R, Bogdanović V, Stanojević D. et al. Involuntary reduction in vigour of calves born from sexed semen. *Acta Vet Hung*. 2016, 64(2):229-38.
96. Lane N, Dean W, Erhardt S, et al. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. 2003, 35: 88-93.

97. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000, 9(16):2395–402.
98. Mann MR, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol.* 2002;3(2):REVIEWS1003.
99. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 2014, (28):812–28.
100. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009, 43:95–118.
101. Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 295(1):37–42.
102. Cereghetti GM, Scorrano L. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene.* 2006, 25:4717–24.
103. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010, 123:3209–14.
104. Barrier M, Dix DJ, Mirkes PE. Inducible 70 kDa heat shock proteins protect embryos from teratogen-induced exencephaly: analysis using Hspala/a1b knockout mice. *Clin Mol Teratol.* 2009, 85(8):732–40.
105. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 2009, 18(7):1093–108.
106. Chen L, Wang D, Wu Z, et al. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res.* 2010, 20:982–93.
107. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction.* 2011, 122:131–8.
108. Abe H, Yamashita S, Satoh T, et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.* 2002, 61:57–66.
109. Dos-Santos EC, Martinho H, Annes K, et al. Raman-based noninvasive metabolic profile evaluation of in vitro bovine embryos. *J Biomed Opt.* 2016, 21(7):075002.
110. Yoon M. The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol Res.* 2009, 60(3):151–9.
111. Reid MA, Dai Z, Locasale JW. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nature Cell Biology.* 2017, 19: 1298–1306.
112. Khare SP, Habib F, Sharma R, et al. HlStome: a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(Database issue):D337–42.

113. Babicki S, Arndt D, Marcu A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(W1):W147-53.
114. Urrego R, Bernal-Ulloa SM, Chavarría NA, et al. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in *Bos indicus* blastocysts produced in vivo and in vitro. *Zygote.* 2017, 25(2):131-140.
115. Liu X, Wang Y, Gao Y, et al. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. . *Development.* 2018, 16;145(4).
116. Min B, Cho S, Park JS, et al. Transcriptomic Features of Bovine Blastocysts Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *G3 (Bethesda).* 2015, 5(12):2527-38.
117. Zhang H, Wang Y, Sang Y, et al. Combination of S-adenosylhomocysteine and scriptaid, a non-toxic epigenetic modifying reagent, modulates the reprogramming of bovine somatic-cell nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev.* 2014, 81(1):87-97.
118. Ikeda S, Tatemizo A, Iwamoto D, et al. Enhancement of histone acetylation by trichostatin A during in vitro fertilization of bovine oocytes affects cell number of the inner cell mass of the resulting blastocysts. *Zygote.* 2009, 17(3):209-15.
119. Drohat AC, Coey CT. Role of Base Excision “Repair” Enzymes in Erasing Epigenetic Marks. *Chem Rev.* 2016, 116:12711–12729.
120. Carey BW, Finley LW, Cross JR, et al. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2015, 518(7539):413-6.
121. Quinlan CL, Kaiser SE, Bolaños B, et al. Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A. *Nat Chem Biol.* 2017, 13(7):785-792.
122. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, et al. Increased Recycling of Polyamines Is Associated With Global DNA Hypomethylation in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism.* 2012, 64(6):1809–1817.
123. Etchegaray JP, Mostoslavsky P. Interplay between metabolism and epigenetics: a nuclear adaptation to environmental changes. *Mol Cell.* 2016, 62(5): 695–711.
124. Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction.* 2008, 136:777-785.

ANEXOS

ANEXO A - Solução fisiológica ou Salina 0,9%

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
NaCl	Sigma	S-5886	9g
Agua destilada			1L

ANEXO B - Meio de lavagem MIV (Pré-MIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
M-199 com HEPES	Gibco	12380-028	4,5 mL
Soro Fetal Bovino 10%	Gibco	16140-014	0,5 mL
Pyruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	10 µl
Gentamicina 50µg/ml	Sigma	G-1264	25 µl
Filtrar em 0,22 µm			

ANEXO C - Meio de maturação *in vitro* (MIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
M-199 com Bicarbonato	Gibco	11150-026	4,5 mL
Soro Fetal Bovino 10%	Gibco	16140-014	0,5 mL
Pyruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	10 µl
Gentamicina 50µg/ml	Sigma	G-1264	25 µl
FSH 0,5µg/ml	Bioniche	Folltropin-V	5 µl
hCG 7UI/ml	Intervet	Chorulon	50 µl
Filtrar em 0,22 µm			
Estradiol 1µg/ml	Sigma	E-4389	5 µl

ANEXO D - Soluções estoques para a FIV - TALP-Sêmen e TALP-Stock

Reagentes	Fabricante	Catálogo	TALP	TALP
			STOCK (50 ml)	SÊMEN (50 ml)
NaCl	Sigma	S-5886	0,3330g	0,2910g
KCl	Sigma	P-5405	0,0120g	0,0115g
MgCl ₂	Sigma	M-2393	0,0050g	0,0040g
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	0,00205g	0,00175g
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	0,1050g	0,1050g
CaCl ₂ H ₂ O	Sigma	C-5670	0,0150g	0,015g
Ác.Lactico syr.	Sigma	L-7900	71,5 µ	155 µL
Hepes	Sigma	H-0891	***	0,1190g
pH = 7,4				OSM=295 – 300
Filtrar em 0,22 µm				

ANEXO E - Meio de Fertilização *in vitro* (FIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume (10 mL)
TL – Stock (Anexo D)			10 mL
BSA Livre de Ácidos Graxos	Sigma	A-7511	0,060 g
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	20 µL
Gentamicina 50µg/mL	Sigma	G-1264	50 µL
Filtrar em 0,22 µm			

ANEXO F - Meio de gotas de Fertilização *in vitro* (FIV gota)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume (4 mL)
Meio – FIV (Anexo G)	***	***	3.640 mL
Heparina 140usp/mg	Sigma	H-9399	40 µL
PHE			160 µl
Filtrar em 0,22 µm			

ANEXO G - Gradiente de Percoll (“Percollzinho”)

Reagentes	Volume Percoll 90%
-----------	--------------------

Percoll	0,9mL
Solução 10X	0,1mL
CaCl ₂ 2H ₂ O 1M (0,7350g/5mL de água Milli Q)	2µL
MgCl ₂ 6H ₂ O 0,1M (0,1015g/5mL de água Milli Q)	3,9µL
Ácido Lático (Lactado de Na ⁺)	3,7µL
NaHCO ₃	0,0021g
Diluir 533,3 µL do Percoll 90% em 66,67 µL de TI Semen para o Percoll 80%	
Diluir 300 µL de Percoll 80% em 300 µL de TI Semen para o Percoll 40%	

ANEXO H – KSOM suplementado

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume (5 mL)
KSOM	Gibco	MR-107-D	4,5 mL
Aminoácidos essenciais	Sigma	M-5550	80 µL
Aminoácidos não essenciais	Sigma	M-7145	40 µL
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	450 µL
Gentamicina	Sigma	G-1264	1 µL
Preparar na hora do uso			

ANEXO I – Solução SOF estoque

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume (100 mL)
NaCl	Sigma	S-5886	0,6294g
KCl	Sigma	P-5405	0,0534g
KH ₂ PO ₄	Sigma	P-5655	0,0162g
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	0,2106g
Na Lactato	Sigma	L-7900	0,0370g
Ácido Pirúvico	Sigma	P-3662	0,0034g
L-glutamina	Sigma	G-8540	0,0146g
MgCl ₂ 7H ₂ O		M-2393	0,0098g
CaCl ₂		C-5670	0,0252g
Filtrar em 0,22 µm			

ANEXO J – Meio SOF suplementado (SOFaa)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume (5 mL)
-----------	------------	----------	---------------

Meio SOF estoque (Anexo I)			4,6mL
Aminoácidos essenciais	Sigma	M-5550	0,100mL
Aminoácidos não essenciais	Sigma	M-7145	0,050mL
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	0,250mL
Preparar na hora do uso			

ANEXO K – Lista de genes utilizados para análise de transcritos no Biomark

Gene	Nome	Código TaqMan	UniGene
ACSL3	Acyl-CoA Synthetase 3	Bt04282138_m1	Bt.89521
ATF4	Activating transcription factor 4	Bt03221057_m1	BT.49442
ACTB	Actin beta	PA5-16914	BT.14186
BAX	BCL2-Associated X Protein	Bt03211777_g1	Bt.109788
BCL2	BCL2-Associated X Protein	Bt03211777_g1	Bt.109788
CCND2	Cyclin D2	Bt03249250_m1	Bt.4895
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Bt03210912_g1	Bt.87389
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A	Bt03224617_g1	Bt.43626
CDK6	Cyclin-Dependent Kinase 6	Bt04311264_m1	Bt.25462
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Bt03251320_g1	BT.65257
DNMT1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1	Bt03224737_m1	BT.108052
DNMT3A	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3A	Bt01027164_m1	BT.64560
DNMT3B	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3B	Bt03259810_m1	BT.22977
EGFR	epidermal growth factor receptor	-	Bt.6422
ELOVL6	Fatty acid elongase 6	Bt00907566_m1	Bt.2073
G6PD	Glucose 6 phosphate dehydrogenase	Bt03649181_m1	Bt.65227
GPX1	Glutathione Peroxidase 1	Bt03259217_g1	Bt.4317
H1FOO	H1 Histone Family Member O, Oocyte Specific	Bt03228652_g1	Bt.36838
H2AFZ	H2A Histone Family Member Z	Bt03216346_g1	Bt.2515
H3F3A	H3 Histone, Family 3A	Bt03278804_g1	Bt.60099
H3F3B	H3 Histone, Family 3B	Bt04319377_g1	Bt.15474
HDAC2	Histone Deacetylase 2	Bt03244871_m1	Bt.27729
HP1	Heterochromatin protein 1	Bt03246076_m1	Bt.22333
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	Bt03649217_m1	Bt.12759
NANOG	Nanog homeobox	Bt03220541_m1	Bt.47449
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	Bt03251880_m1	Bt.17324
PA2G4	Proliferation-Associated 2G4	Bt03211241_g1	Bt.106792
PFKP	Phosphofructokinase	Bt04316551_m1	Bt.3794
POU5F1 (OCT4)	POU class 5 homeobox 1	Bt03223846_g1	Bt.92603
PPARA	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha	Bt03220821_m1	Bt.18241
PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	Bt03217547_m1	Bt.3862
SALL4	Spalt-Like Transcription Factor 4	Bt04298191_g1	Bt.8493
SCD	Sodium voltage-gated channels	Bt04307476_n1	Bt.65021
TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1	Bt03215471_m1	Bt.5534

ANEXO L – Lista de transcritos consultados de dados de RNAseq, classificados de acordo com as modificações epigenéticas em que atuam, para embriões coletados em 40 hpi.

Modificação	Função	Gene	RPKM de FBL	RPKM de SBL	P valor	Overexpresso em:
5mC	Writers	DNMT1 - DNA methyltransferase 1	112,6±8,43	93,31±6,94	0,1529	
		DNMT3A - DNA methyltransferase 3A	16,33±0,69	16,56±2,49	0,9340	
		DNMT3B - DNA methyltransferase 3B	43,88±4,39	61,33±4,26	0,0463	SBL
	Erasers (5hmC Writers)	TET1 - Tet methylcytosine dioxygenase 1	0,44±0,19	0,31±0,12	0,5736	
		TET2 - Tet methylcytosine dioxygenase 2	50,24±2,28	44,87±2,64	0,1988	
		TET3 - Tet methylcytosine dioxygenase 3	32,41±1,05	30,39±4,49	0,6836	
	Erasers	APOBEC1 - Apolipoprotein B MRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1	0,03±0,03	0,07±0,04	0,4391	
		TDG - Thymine DNA Glycosylase	0,12±0,04	0,09±0,08	0,7975	
		AICDA - Activation Induced Cytidine Deaminase	0,33±0,33	0,06±0,06	0,4711	
		MBD4 - methyl-CpG binding domain protein 4	198,1±2,83	177,7±9,90	0,1186	
		SMUG1 - Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1	0,07±0,04	0,02±0,02	0,2267	
		NEIL2 - Nei Like DNA Glycosylase 2	19,26±1,20	15,39±2,55	0,2417	
		LIG3 - DNA Ligase 3	38,35±2,30	42,38±3,74	0,4106	
		XRCC1 - X-Ray Repair Cross Complementing 1	9,28±0,96	6,35±1,94	0,2474	
		APEX1 - Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1	85,73±5,36	76,68±11,54	0,5164	
		STELLA - Developmental Pluripotency-Associated Protein 3	1525±23,40	1669±13,76	0,0061	SBL
	SAM	MAT2A - Methionine adenosyltransferase	39,79±2,07	34,70±5,64	0,4453	
		MAT2B - Methionine adenosyltransferase	164,9±5,15	154,6±1,36	0,1244	
		AMD1 - Adenosylmethionine Decarboxylase 1	16,02±2,34	35,20±4,632	0,0209	SBL
	α -Ceto-glutarato	IDH1 - Isocitrate Dehydrogenase 1	28,99±4,46	41,05±6,03	0,1832	
		IDH2 - Isocitrate Dehydrogenase 2	0,36±0,10	0,15±0,09	0,1935	
		IDH3A - Isocitrate Dehydrogenase 3A	9,31±0,74	7,10±1,03	0,1556	

		IDH3B - Isocitrate Dehydrogenase 3B	1,86±0,46	1,34±0,32	0,4086	
		IDH3G - Isocitrate Dehydrogenase 3G	8,11±0,81	5,55±2,24	0,3430	
		GLUD1 - Glutamate Dehydrogenase 1	119,1±4,69	112,5±9,15	0,5560	
		OGDH - Oxoglutarate Dehydrogenase	6,15±0,71	5,19±1,45	0,5823	
H3K9ac	Writers	ELP3 - Elongator complex protein 3	10,14±0,12	11,90±2,03	0,4362	
		HAT2A - Histone acetyltransferase 2A	52,49±6,50	47,69±2,14	0,5220	
	Erasers	SIRT1 - NAD-dependent deacetylase sirtuin-1	5,18±0,55	11,60±5,09	0,2782	
		SIRT6 - NAD-dependent deacetylase sirtuin-6	4,58±0,16	3,10±0,89	0,1772	
	Acetyl-CoA	CS - Citrate Synthase	497,1±6,79	542,4±12,94	0,0362	SBL
		ACSS1 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 1	0,13±0,05	0,05±0,01	0,2257	
		ACSS2 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2	2,74±0,23	3,29±0,24	0,1814	
		ACSS3 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 3	0,58±0,11	0,21±0,03	0,0294	SBL
		ACACA - Acetyl-CoA Carboxylase Alpha	10,72±0,92	11,62±1,36	0,6153	
		ACLY - ATP citrate lyase	79,52±4,60	77,79±4,35	0,7986	
H3K9me3	Writers	SETDB1 - SET domain containing 1B	94,51±5,09	92,65±4,86	0,8044	
		SETDB2 - SET domain containing 2B	16,88±3,01	16,89±2,02	0,9966	
		SUV39H1 - suppressor of variegation 3-9 homolog 1	59,73±4,31	72,21±6,23	0,1750	
		SUV39H2 - suppressor of variegation 3-9 homolog 2	17,78±1,32	12,75±4,90	0,3779	
	Erasers	KDM4A - Lysine-specific demethylase 4A	24,59±1,22	22,48±3,49	0,5993	
		KDM4B - Lysine-specific demethylase 4B	1,61±0,17	2,17±0,67	0,3779	
		KDM4C - Lysine-specific demethylase 4C	14,91±0,62	15,79±2,66	0,7640	
		KDM4D - Lysine-specific demethylase 4D	0,22±0,12	0,06±0,06	0,3327	
H3K9me2	Writers	EHMT1 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	2,62±0,43	2,07±0,36	0,3822	
		EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	8,07±1,25	8,27±2,31	0,9416	
		PRDM2 - PR domain zinc finger protein 2	189,2±22,63	146,9±1,75	0,1355	
	Erasers	JHDM1F - Histone lysine demethylase PHF8	13,43±1,24	11,24±0,88	0,2262	
		KDM3A - Lysine-specific demethylase 3A	8,90±0,60	12,16±0,71	0,0247	SBL

		KDM3B - Lysine-specific demethylase 3B	5,28±0,47	5,03±0,18	0,6571	
		KDM1B - Lysine-specific demethylase 1B	34,03±2,70	35,78±2,81	0,6769	
		KDM7 - Lysine-specific demethylase 7	9,67±0,96	16,18±1,85	0,0355	SBL
		KDM1A - Lysine-specific demethylase 1A	57,91±2,05	75,22±8,72	0,1255	
		KDM4C - Lysine-specific demethylase 4C	14,91±0,62	15,79±2,66	0,7640	
		KDM4D - Lysine-specific demethylase 4D	0,22±0,12	0,06±0,06	0,3327	
H3K9me1	Writers	EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	8,07±1,25	8,27±2,31	0,9416	
	Erasers	KDM1A - Lysine-specific demethylase 1A	57,91±2,05	75,22±8,72	0,1255	
		KDM3A - Lysine-specific demethylase 3A	8,90±0,60	12,16±0,71	0,0247	SBL
		KDM3B - Lysine-specific demethylase 3B	5,28±0,47	5,03±0,18	0,6571	
H3K27me3	Writers	EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	47,09±2,61	45,06±3,24	0,6507	
		NSD3 - Nuclear SET domain-containing protein 3	58,71±4,85	73,78±8,75	0,2062	
	Erasers	KDM6A - Lysine-specific demethylase 6A	1,32±0,19	1,06±0,29	0,4854	
		KDM6B - Lysine-specific demethylase 6B	2,32±0,31	1,67±0,43	0,2892	
H3K27me2	Writers	EZH1 - Enhancer of zeste homolog 1	2,76±0,10	2,22±0,21	0,0832	FBL
		EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	47,09±2,61	45,06±3,24	0,6507	
		NSD3 - Nuclear SET domain-containing protein 3	58,71±4,85	73,78±8,75	0,2062	
	Erasers	JHDM1F - Histone lysine demethylase PHF8	13,43±1,24	11,24±0,88	0,2262	
		KDM6B - Lysine-specific demethylase 6B	2,32±0,31	1,67±0,43	0,2892	
		KDM7 - Lysine-specific demethylase 7	9,67±0,96	16,18±1,85	0,0355	SBL
H3K27me1	Writers	EZH1 - Enhancer of zeste homolog 1	2,76±0,10	2,22±0,21	0,0832	FBL
		EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	47,09±2,61	45,06±3,24	0,6507	
		EHMT1 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	2,62±0,43	2,07±0,36	0,3822	
		EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	8,07±1,25	8,27±2,31	0,9416	

ANEXO M – Lista de transcritos consultados de dados de RNAseq, classificados de acordo com as modificações epigenéticas em que atuam, para embriões coletados em estágio de blastocisto.

Modificação	Função	Gene	RPKM de FBL	RPKM de SBL	P valor	Overexpresso em:
5mC	Writers	DNMT1 - DNA methyltransferase 1	2,737±0,22	3,965±0,33	0,037	SBL
		DNMT3A - DNA methyltransferase 3A	42,16±5,59	69,56±8,91	0,0598	SBL
		DNMT3B - DNA methyltransferase 3B	28,98±3,73	46,95±3,26	0,0221	SBL
	Erasers (5hmC Writers)	TET1 - Tet methylcytosine dioxygenase 1	52,42±6,60	85,67±4,33	0,0136	SBL
		TET2 - Tet methylcytosine dioxygenase 2	5,02±0,69	7,72±0,27	0,0216	SBL
		TET3 - Tet methylcytosine dioxygenase 3	2,31±0,41	1,18±0,24	0,0743	FBL
	Erasers	APOBEC1 - Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1	0,67±0,32	1,18±0,12	0,2145	
		TDG - Thymine DNA Glycosylase	0,92±0,29	2,12±0,56	0,1411	
		AICDA - Activation Induced Cytidine Deaminase	5,66±0,37	3,35±0,91	0,0787	FBL
		MBD4 - methyl-CpG binding domain protein 4	3,44±0,82	6,36±0,47	0,0374	SBL
		SMUG1 - Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1	0,56±0,11	0,29±0,10	0,1504	
		NEIL2 - Nei Like DNA Glycosylase 2	0,28±0,19	0,413±0,06	0,5408	
		LIG3 - DNA Ligase 3	5,13±0,41	6,48±0,14	0,0348	SBL
		XRCC1 - X-Ray Repair Cross Complementing 1	2,12±0,38	3,06±0,19	0,0822	SBL
		APEX1 - Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1	13,44±3,56	46,89±6,37	0,0100	SBL
		STELLA - Developmental Pluripotency-Associated Protein 3	16,02±2,34	35,20±4,63	0,0209	SBL
	SAM	MAT2A - Methionine adenosyltransferase	18,46±2,90	39,23±9,15	0,0966	SBL
		MAT2B - Methionine adenosyltransferase	4,00±0,25	9,59±1,32	0,0144	SBL
		AMD1 - Adenosylmethionine Decarboxylase 1	19,35±2,40	51,65±7,36	0,0140	SBL
	α -Ceto-glutarato	IDH1 - Isocitrate Dehydrogenase 1	30,23±6,94	145,4±29,93	0,0200	SBL
		IDH2 - Isocitrate Dehydrogenase 2	1,70±0,95	1,83±0,34	0,9036	
		IDH3A - Isocitrate Dehydrogenase 3A	13,41±1,65	49,30±9,84	0,0228	SBL

		IDH3B - Isocitrate Dehydrogenase 3B	16,16±3,45	31,08±4,16	0,0508	SBL
		IDH3G - Isocitrate Dehydrogenase 3G	7,22±0,68	10,64±1,25	0,0736	SBL
		GLUD1 - Glutamate Dehydrogenase 1	113,1±25,25	251,2±14,77	0,0092	SBL
		OGDH - Oxoglutarate Dehydrogenase	4,38±0,11	4,51±0,17	0,5331	
H3K9ac	Writers	ELP3 - Elongator complex protein 3	2,18±0,36	6,16±0,95	0,0177	SBL
		HAT2A - Histone acetyltransferase 2A	7,108±1,43	18,56±2,04	0,0101	SBL
	Erasers	SIRT1 - NAD-dependent deacetylase sirtuin-1	14,34±3,04	32,23±3,71	0,0204	SBL
		SIRT6 - NAD-dependent deacetylase sirtuin-6	0,51±0,17	0,60±0,11	0,7009	
	Acetyl-CoA	CS - Citrate Synthase	86,51±9,06	231,6±31,72	0,0117	SBL
		ACSS1 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 1	2,19±0,43	3,18±0,13	0,0903	SBL
		ACSS2 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2	0,29±0,19	0,12±0,05	0,4242	
		ACSS3 - Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 3	0,01±0,01	0,10±0,06	0,1795	
		ACACA - Acetyl-CoA Carboxylase Alpha	7,80±0,89	8,75±0,51	0,4104	
		ACLY - ATP citrate lyase	20,36±2,31	36,88±3,67	0,0189	SBL
H3K9me3	Writers	SETDB1 - SET domain containing 1B	2,94±0,32	5,01±0,27	0,0081	SBL
		SETDB2 - SET domain containing 2B	2,02±0,33	5,20±0,41	0,0038	SBL
		SUV39H1 - suppressor of variegation 3-9 homolog 1	2,15±0,6	1,73±0,16	0,5433	
		SUV39H2 - suppressor of variegation 3-9 homolog 2	1,16±0,11	3,41±0,62	0,0235	SBL
	Erasers	KDM4A - Lysine-specific demethylase 4A	16,85±1,33	16,87±1,2	0,9930	
		KDM4B - Lysine-specific demethylase 4B	0,55±0,23	0,56±0,15	0,9613	
		KDM4C - Lysine-specific demethylase 4C	4,64±0,27	7,58±0,45	0,0049	SBL
		KDM4D - Lysine-specific demethylase 4D	0,04±0,03	0,01±0,01	0,3026	
H3K9me2	Writers	EHMT1 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	1,17±0,13	0,95±0,20	0,4233	
		EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	3,20±0,35	2,83±0,55	0,5990	
		PRDM2 - PR domain zinc finger protein 2	15,11±1,19	18,47±1,24	0,1228	
	Erasers	JHDM1F - Histone lysine demethylase PHF8	13,38±1,69	15,34±1,53	0,4393	
		KDM3A - Lysine-specific demethylase 3A	12,91±0,38	20,87±2,29	0,0266	SBL

		KDM3B - Lysine-specific demethylase 3B	10,68±2,59	13,3±1,31	0,4185	
		KDM1B - Lysine-specific demethylase 1B	0,43±0,01	0,96±0,08	0,0024	SBL
		KDM7 - Lysine-specific demethylase 7	3,37±1,27	3,96±0,54	0,6908	
		KDM1A - Lysine-specific demethylase 1A	19,87±4,67	48,14±4,05	0,0103	SBL
		KDM4C - Lysine-specific demethylase 4C	4,64±0,27	7,58±0,45	0,0049	SBL
		KDM4D - Lysine-specific demethylase 4D	0,04±0,03	0,01±0,01	0,3026	
H3K9me1	Writers	EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	3,20±0,35	2,83±0,55	0,5990	
	Erasers	KDM1A - Lysine-specific demethylase 1A	19,87±4,67	48,14±4,05	0,0103	SBL
		KDM3A - Lysine-specific demethylase 3A	12,91±0,38	20,87±2,29	0,0266	SBL
		KDM3B - Lysine-specific demethylase 3B	10,68±2,59	13,3±1,31	0,4185	
H3K27me3	Writers	EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	9,57±1,05	15,69±0,22	0,0047	SBL
		NSD3 - Nuclear SET domain-containing protein 3	1,23±0,23	1,62±0,41	0,4496	
	Erasers	KDM6A - Lysine-specific demethylase 6A	8,59±1,16	25,43±1,00	0,0004	SBL
		KDM6B - Lysine-specific demethylase 6B	2,83±0,29	1,31±0,21	0,0140	FBL
H3K27me2	Writers	EZH1 - Enhancer of zeste homolog 1	1,50±0,50	1,46±0,25	0,9411	
		EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	9,57±1,05	15,69±0,22	0,0047	SBL
		NSD3 - Nuclear SET domain-containing protein 3	1,23±0,23	1,62±0,41	0,4496	
	Erasers	JHDM1F - Histone lysine demethylase PHF8	13,38±1,69	15,34±1,53	0,4393	
		KDM6B - Lysine-specific demethylase 6B	2,83±0,29	1,31±0,21	0,0140	FBL
		KDM7 - Lysine-specific demethylase 7	3,37±1,27	3,96±0,54	0,6908	
H3K27me1	Writers	EZH1 - Enhancer of zeste homolog 1	1,50±0,50	1,46±0,25	0,9411	
		EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2	9,57±1,05	15,69±0,22	0,0047	SBL
		EHMT1 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	1,17±0,13	0,95±0,20	0,4233	
		EHMT2 - Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	3,20±0,35	2,83±0,55	0,5990	