LETÍCIA ESCOBAR CARREIRO

Avaliação funcional do gene *NANOG* na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos

SÃO PAULO

2022

LETÍCIA ESCOBAR CARREIRO

Avaliação funcional do gene *NANOG* na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4193
FMVZ

Carreiro, Letícia Escobar
Avaliação funcional do gene *NANOG* na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos / Letícia Escobar Carreiro. – 2022.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis.

1. CRISPR/Cas9. 2. Diferenciação celular. 3. Epiblasto. 4. Endoderma Primitivo. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.

São Paulo, 07 de julho de 2021
CEUAx N 2133201219

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcelo Demarchi Goissis
Área: Reprodução Animal
Equipe envolvida: Letícia Escobar Carreiro - (executante); Marcelo Demarchi Goissis - (orientador);

Título do projeto: "Avaliação funcional dos gene NANOG e GATA6 na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 26/03/2020, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 7th July 2021

CERTIFIED

We certify that the Research "Functional assessment of NANOG and GATA6 genes on cell lineage segregation of bovine embryos", protocol number CEUAx 2133201219 (ID 001350), under the responsibility Marcelo Demarchi Goissis, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day March 26, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação funcional dos gene NANOG e GATA6 na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos", protocolado sob o CEUAx nº 2133201219, sob a responsabilidade de Marcelo Demarchi Goissis, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 26 de março de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 27 de abril de 2022
CEUAx N 2133201219
(ID 001577)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcelo Demarchi Goissis
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Avaliação funcional dos gene NANOG na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos".

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 20/abril/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 20/abril/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "MudanÃ§a de tÃtulo para adequar ao conteÃºdo da disserta Ã§Ã£o que estÃ¡ em fase final de redaÃ§Ã£o para submissÃ£o. Removeu-se o termo GATA6, que Ã© um gene o qual acabou nÃ£o sendo estudado devido Ã s restriÃ§Ãµes de tempo impostas pela pandemia. ".

Comentário da CEUA: Título aprovado atendendo solicitação do responsável. Projeto desenvolvido sem o uso de animais.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARREIRO, Letícia Escobar

Título: Avaliação funcional do gene *NANOG* na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Professor Dr. Marcelo Demarchi Goissis _____

Instituição: FMVZ-USP Julgamento:_____

Professora Dra. Fabiana Fernandes Bressan _____

Instituição: FZEA-USP Julgamento:_____

Professora Dra. Fabíola Freitas de Paula-Lopes_____

Instituição: UNIFESP Julgamento:_____

À minha mãe e à minha avó, que me ensinaram a sonhar e ser forte.

AGRADECIMENTOS

Abro este texto agradecendo aos Orixás, em especial aos Donos do meu Ori, que me sustentam e fortalecem diariamente para que eu siga alcançando meus objetivos em harmonia com os propósitos que me foram dados.

Agradeço à minha mãe e minha avó pela vida, pela criação que me deram, pelos valores que me foram passados, por serem os meus maiores pilares de força. Se hoje aqui estou, e sou quem sou, é porque essas duas mulheres lutaram por mim e pelo meu futuro, me proveram tudo o que puderam e me amaram incondicionalmente. Amo vocês, serei constante e eternamente grata.

Agradeço à família Escobar, em especial ao meu tio Luiz Henrique, à minha tia Cíntia e às minhas primas Marina e Lígia, por embarcarem comigo nesse sonho e me receberem tão bem em sua casa, minha primeira morada paulistana, tão cheia de amor e saúde. Ter vivido um pouco no Campo Belo me proporcionou momentos inesquecíveis e levo o companheirismo dessa família como inspiração para a vida inteira.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Demarchi Goissis, sou imensamente grata por ter acreditado em mim e me acolhido como aluna, por confiar na minha capacidade e por me ensinar TANTO todos os dias! Por toda a parceria, pela paciência, por enfrentar ao meu lado todos os perrengues e por me mostrar que é possível ser acadêmico e ser tão humano. Obrigada por dividir seus conhecimentos de maneira tão excepcional, por ser um orientador tão incrível! Sua influência fez com que eu me tornasse realmente uma cientista e mais do que isso, uma pessoa melhor. O desafio de mergulhar no mundo da Medicina Veterinária não foi fácil, mas graças a você e às portas que me abriu, hoje sou uma biomédica encantada pela saúde animal. Foi uma honra indescritível desenvolver um projeto tão bacana e ser orientada por você, Marcelo!

À Camilla sou grata por tudo, desde os puxões de orelha até os bolos e mimos. Sua forma de trabalhar e atingir níveis de excelência são uma inspiração, vou levar tudo o que me ensinou para qualquer cargo que eu venha a desempenhar. Se um dia eu conseguir ser metade da profissional que você é, já vai ser muito show! Meus mais sinceros agradecimentos por estar comigo nos momentos mais difíceis, estar sempre pronta para colaborar e por ser também um ponto de luz e fé no laboratório.

Agradeço imensamente à Thaís, por toda a ajuda nas rotinas de FIV e PCR, pela companhia na bancada da Biologia Molecular, pelas conversas do dia a dia, por me acolher nas dificuldades e sempre estar disposta a pensar numa solução comigo. Sua companhia tornou essa experiência muito mais leve, mesmo quando tudo parecia estar dando errado. Você é uma profissional incrível e serei sempre grata por toda a ajuda que me deu.

Ao meu companheiro de café, gaúcho gauchão, Felipe, agradeço por me mostrar o “caminho das pedras” dos experimentos, pela amizade e por sempre me ajudar a entender o mundo da Veterinária. Não imaginava ser tão próxima de alguém tão diferente de mim, CAPAZ! Foi a melhor coisa que poderia ter me acontecido! Quantos aprendizados e risadas eu dei nesses 2 anos e meio... Que você continue alegrando os lugares por onde passa e sendo essa pessoa amiga e prestativa, o sucesso vem como consequência. Toda a minha gratidão, já com um gostinho amargo de saudade!

À professora Mayra e ao professor Visintin, muito obrigada por todo suporte e cuidados oferecidos e por toda a atenção dada ao laboratório e aos alunos. São grandes chefes e professores, que seguem me inspirando a ser o meu melhor. O legado de vocês permanece e se eterniza em cada aluno que passa pelo laboratório.

Aos amigos que fiz, Larissa, Vivian, Eric, Adriano, Carlos, agradeço a amizade e companhia, pelas trocas e momentos tão divertidos. Aos estagiários que pude conviver, ensinar e aprender, Matheus, Gabriel, Talita, Gallus e Fernanda, me sinto grata por ter feito parte da vida acadêmica de vocês e por sempre me deixarem tão confortável para compartilhar os conhecimentos que adquiri na minha jornada. À Julia Rosenberg, dedico a conclusão desse trabalho. Sua presença foi importante, necessária e segue sendo lembrada com muito amor e carinho.

Agradeço aos meus amigos queridos da vida, Alexia, Caroline Antônio, Ricardo, Marina Gallo, Nicole, Mariah, Mateus Veiga, Felipe, Bruno, Bianca, Leonan, Marcus, Carla, Marina Monroe, Lucas, Marcos, Bibi e Rana. Espero que vocês sintam que apesar da saudade e da distância que nos separam, a força da nossa amizade permanece SEMPRE. Peço desculpas pelas mensagens que não consegui responder, por esse período de ausência e caos interno e externo. Cada um de vocês, com o seu jeitinho, me ajudou a chegar viva e sã até aqui (sã, será?). Me faltam palavras, me sobra gratidão. Eu amo muito vocês.

À minha namorada, noiva, amiga, parceira, fechamento, Anna Carolina, por ter me dado todo o suporte para que eu conseguisse alcançar essa linha de chegada. Por ser uma grande amiga, me ouvir, me aconselhar, cuidar de mim, estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, vibrar com cada experimento que deu certo e me consolar quando as coisas não aconteceram dentro do esperado. Dividir a vida com você é uma grande benção e eu sou muito grata por essa oportunidade. Amo você, obrigada por crescer junto comigo e me motivar a continuar lutando, dia após dia.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela realização de um sonho. Ao Departamento de Reprodução Animal, Laboratório de Fertilização In Vitro, Clonagem e Transgenia Animal e Laboratório de Biologia do Espermatozoide pela estrutura, conhecimento e a oportunidade de fazer parte de um grupo tão especial de profissionais, muito obrigada!

Concluo agradecendo à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa de Mestrado (Processo 2019/22649-5), ao CNPQ e à CAPES pelo apoio financeiro aos experimentos realizados.

RESUMO

CARREIRO, L. E. **Avaliação funcional do gene *NANOG* na segregação de linhagens celulares em embriões bovinos.** 2022. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O desenvolvimento embrionário pré-implantacional é marcado pelos primeiros eventos de diferenciação celular em mamíferos. O primeiro evento de segregação celular consiste na separação entre a massa celular interna (MCI) e o trofectoderma (TE), enquanto a segunda diferenciação é o momento da separação entre epiblasto (EPI) e endoderma primitivo (PrE) dentro da MCI. Os mecanismos moleculares que controlam essa diferenciação envolvem a expressão temporal de fatores de transcrição específicos. Dados recentes indicam que o estudo do desenvolvimento embrionário inicial bovino seria um bom modelo para humanos. Sabe-se que, em camundongos, o fator de transcrição NANOG atua opostamente a outro fator de transcrição, GATA6 e as análises de expressão gênica agrupam populações celulares de forma que NANOG e GATA6 tornam-se mutuamente excludentes em EPI e PrE. O presente projeto procurou testar a hipótese de que NANOG é necessário para a especificação de EPI e repressão de PrE em embriões bovinos. Para tal, almejou-se realizar a deleção gênica de *NANOG* mediada por CRISPR/Cas9 em zigotos produzidos *in vitro*. Os grupos experimentais consistiram em zigotos microinjetados 8 ou 16 horas após a FIV com os RNA guias visando a deleção do gene *NANOG* em duas concentrações, 12,5 ou 80 ng/µl, e Cas9, sendo denominados Cas9-12,5 e Cas9-80, respectivamente, enquanto o grupo controle não foi microinjetado. Posteriormente os embriões foram cultivados para avaliação das taxas de clivagem, formação de blastocistos e desenvolvimento, análise da expressão proteica por imunofluorescência, análise de expressão gênica e genotipagem. Foi avaliada a expressão proteica de SOX17, um marcador de PrE por imunofluorescência, entretanto, nenhum dos blastocistos do grupo Cas9-12,5 apresentou a deleção esperada no gene *NANOG.* Foi observada uma diminuição importante da expressão de *NANOG* no grupo experimental Cas9-80 quando comparado ao grupo controle ($p=0.0360$), indicando que houve uma perturbação da expressão gênica, porém sem indícios de deleção total de *NANOG* nestas condições. As condições de tratamento do grupo Cas9-80, entretanto, não afetaram a expressão gênica de GATA6. Portanto,

foi possível reduzir a expressão de *NANOG* com uso do sistema CRISPR em bovinos, sem alteração na formação de blastocistos e na expressão de GATA6, o qual tem relação com a diferenciação em PrE.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9, Diferenciação celular, Epiblasto, Endoderma Primitivo.

ABSTRACT

CARREIRO, L. E. **Functional evaluation of *NANOG* gene in segregation of cell lineages in bovine embryos.** 2022. 89f. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The early cell differentiation events mark the preimplantation embryonic development in mammals. The first cell differentiation event consists of the segregation between the trophectoderm (TE) and the inner cell mass (ICM), while the second event occurs within the ICM, with the segregation of epiblast (EPI) and primitive endoderm (PrE) lineages. The molecular mechanisms in the control of these events include time-related expression of specific transcription factors. Recent data indicate that the study of bovine embryos would be a good model for early human development. In mice, the transcription factor NANOG works opposite to another transcription factor, GATA6, and gene expression leads to cell population clusters in such a way that NANOG and GATA6 become mutually exclusive in EPI and PrE. This study sought to test the hypothesis that NANOG is necessary for EPI specification and PrE repression in bovine embryos. For this purpose, this study targeted CRISPR/Cas9-mediated *NANOG* deletion of *in vitro* produced zygotes. The experimental groups consisted of microinjected embryos with guide RNAs in two concentrations, 12.5 or 80 ng/µl, and Cas9 protein (Cas9-12.5 and Cas9-80) aiming to delete the *NANOG* gene, while the control group was not microinjected. Subsequently, embryos were cultured for evaluation of cleavage rates, blastocyst formation, and development rates, protein expression analysis by immunofluorescence, gene expression analysis, and genotyping. The protein expression of SOX17, a marker of PrE, was evaluated by immunofluorescence, however, none of the Cas9-12.5 embryos presented the expected gene deletion of *NANOG*. A significant decrease in *NANOG* expression ($p=0.0360$) was observed in the Cas9-80 experimental group when compared to the control group, suggesting a disturbance of gene expression, but with no evidence of *NANOG* full deletion under these conditions. The Cas9-80 treatment conditions, however, did not affect *GATA6* gene expression. Therefore, it was possible to reduce the expression of *NANOG* using the CRISPR system in cattle embryos, without changing the blastocysts formation and the expression of PrE differentiation-related gene *GATA6*.

Keywords: CRISPR/Cas9, Cell differentiation, Epiblast, Primitive Endoderm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo da morfologia e expressão de marcadores de linhagem celular durante o desenvolvimento inicial de embriões bovinos e murinos 30

Figura 2: Influência da polaridade celular e da via de sinalização Hippo na diferenciação celular TE e ICM em embriões de camundongos 33

Figura 3: Papel da via FGF/ERK na especificação de células EPI e PrE em embriões de camundongos 40

Figura 4: Confirmação da clonagem da sequência dos gRNAs no plasmídeo pX330-Cas9-Bbs1 50

Figura 5: Representação gráfica da sequência do gene *NANOG* em bovinos 56

Figura 6: Gráficos apresentando média e erro padrão das médias das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento obtidas nos experimentos de micromanipulação 60

Figura 7: Aquisição de imagens de imunocitoquímica de embriões bovinos fixados com paraformaldeído 4% em D9, dos grupos Controle e Cas9-12,5 62

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA extraído de blastocistos D9 produzidos in vitro, com FIV de 8 horas de duração 63

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% de DNA extraído de embriões 8-células produzidos in vitro, com FIV de 16 horas de duração 64

Figura 10: Alinhamento das sequências de DNA dos grupos Controle e Cas9-80 obtidas através de Sequenciamento Sanger 65

Figura 11: Gráficos da quantificação dos fatores de transcrição NANOG e GATA6 de embriões bovinos D9, em número de cópias por ng de cDNA de cada embrião avaliado.....66

Figura 12: Média da quantificação do número de cópias dos fatores de transcrição NANOG e GATA6 por ng de cDNA dos grupos experimentais Controle e Cas9-80.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos principais eventos e mecanismos biológicos que ocorrem nos embriões de camundongos e bovinos.....43

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos para clonagem dos gRNAs. Em letras minúsculas as sequências adaptadoras para clonagem molecular.....47

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na síntese das guias de gRNAs.....51

Tabela 4: Grupos e condições de microinjeção gRNA/Cas9 - *NANOG*.....53

Tabela 5: Média das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento obtidas nas microinjeções de gRNA/Cas9 NANOG.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

AGE – Ativação do genoma embrionário

ATP – Trifosfato de adenosina

Bbs1 – Do inglês *Bardet-Biedl Syndrome 1*

BSA – Albumina Sérica Bovina

cDNA – DNA complementar

CDX2 – Do inglês *Caudal type homeobox* 2

CEFAP – Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIV – Cultivo *in vitro*

CO_2 – Gás carbônico

CRISPR – Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Inter-espaçadas

D4 – Dia 4 após a fertilização *in vitro*

D9 – Dia 9 após a fertilização *in vitro*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPF – Dias pós fertilização

EPI – Epiblasto

ERK – Do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*

FGF – Do inglês *Fibroblast growth factor*

FGF2 – Do inglês *Fibroblast growth factor 2*

FGF4 – Do inglês *Fibroblast growth factor 4*

FGFR – Do inglês *Fibroblast growth factor receptor*

FGFR1 – Do inglês *Fibroblast growth factor receptor 1*

FGFR2 – Do inglês *Fibroblast growth factor receptor 2*

FGFR3 – do inglês *Fibroblast growth factor receptor 3*

FIV – Fertilização *in vitro*

FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

GATA 3 – Do inglês GATA *Binding Protein 3*

GATA 4 – Do inglês GATA *Binding Protein 4*

GATA 6 – Do inglês GATA *Binding Protein 6*

GRB2 – Do inglês *Growth factor receptor-bound* protein *2*

gRNA – RNA guia

H_2O – Água

hESCs – Células-tronco embrionárias humanas

HH – Meio de cultivo Hamster-Hepes

hiPSCs – Células-tronco humanas de pluripotência induzida

hpi – Horas após inseminação *in vitro*

IVT – Do inglês *in vitro transcription*

KSOM – Do inglês *Potassium simplex optimized medium*

LATS1/2 – Do inglês *Large tumor suppressor kinase 1/2*

MAPK – Do inglês *Mitogen-activated protein kinase*

MCI – Massa celular interna

MEK – Do inglês *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MIV – Maturação *in vitro*

NANOG – Do inglês *Nanog Homeobox protein*

OCT4 – Do inglês *octamer-binding transcription factor 4*

PARD3 – Do inglês *Partitioning defective 3 homolog*

PARD6 – Do inglês *Partitioning defective 6 homolog*

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIV – Produção *in vitro*

PKC – Do inglês *Protein kinase C*

PNK – Do inglês *Polynucleotide Kinase*

POU5F1 – Do inglês *POU Class 5 Homeobox 1*

PrE – Endoderma primitivo

PVP – Polivinilpirrolidona

Px330-Cas9 – Plasmídeo Px330 associado à Cas9

q-RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

rpm – Rotações por minuto

siRNA – RNA de interferência

SOX2 – Do inglês *SRY-Box Transcription Factor 2*

SOX17 – Do inglês *SRY-Box Transcription Factor 17*

TALENs – Do inglês *Transcription activator-like effector nucleases*

TALP – Meio de cultivo à base de piruvato de lactato de Tyrode

TAZ – Do inglês *Tafazzin protein*

TE – Trofectoderma

TEAD4 – Do inglês *TEA Domain Transcription Factor 4*

Wwtr1 – Do inglês *WW Domain Containing Transcription Regulator 1*

YAP – Do inglês *yes-associated protein*

ZA – Do inglês *zonula adherens*

ZFN – Do inglês *Zinc-finger nucleases*

Nomenclaturas para Bovinos e Humanos:

Gene – Maiúsculo e itálico

Proteína – Maiúsculo

Nomenclaturas para camundongos:

Gene – Minúsculo e itálico

Proteína - Maiúsculo

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....23

2. CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA: Eventos de diferenciação celular em embriões bovinos e murinos pré-implantacionais.....26

2.1 Introdução.....27

2.2 Dinâmicas do desenvolvimento.....28

2.3 Primeiro Evento de Diferenciação Celular.....31

2.4 Segundo Evento de Diferenciação Celular.....38

2.5 Conclusão.....42

3. CAPÍTULO III - Avaliação funcional do gene *NANOG* em bovinos.....45

3.1. INTRODUÇÃO.....45

3.2 OBJETIVOS.....46

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....46

3.3.1 Local do experimento e período de execução.....46

3.3.2 Delineamento experimental.....46

3.3.3 Construções moleculares.....47

3.3.4 Síntese in vitro dos gRNAs.....48

3.3.4.1 Anelamento e Fosforilação.....48

3.3.4.2 Clonagem Molecular.....48

3.3.4.3 Síntese *in vitro* dos gRNAs.....50

3.3.5 Produção in vitro de embriões bovinos.....51

3.3.6 Microinjeção em zigotos bovinos.....52

3.3.7 Imunofluorescência e aquisição de imagens.....54

3.3.8. Extração de DNA.....55

3.3.9 Genotipagem.....55

3.3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA.....56

3.3.11. Análise da expressão gênica q-RT-PCR.....57

3.3.12. Análise Estatística.....57

3.4. RESULTADOS.....58

3.4.1. Desempenho das microinjeções de gRNA/Cas9 NANOG.....58

3.4.2 Imunofluorescência.....61

3.4.3 Genotipagem 62

3.4.4 Análise da expressão gênica por q-RT-PCR.....65

3.5. DISCUSSÃO 67

3.6. CONCLUSÃO 70

4. REFERÊNCIAS.....71

ANEXOS 89

1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Em 1880, o zoologista Edouard Van Beneden foi o primeiro pesquisador a descrever a formação das três camadas germinativas básicas, em coelhos. Edouard também demonstrou que as sucessivas clivagens do zigoto levariam à formação de uma “vesícula blastodérmica”, processo que atualmente é bem descrito e estabelecido como a formação do blastocisto (Van Beneden, Julin, 1880; revisado por Alexandre, 2001).

O desenvolvimento de condições eficientes para o cultivo de embriões mamíferos *in vitro* (McLaren, Biggers, 1958; Chang, 1959) foi fundamental para o avanço das pesquisas em embriologia. No mesmo período, Albert Dalcq e Jacques Mulnard foram pioneiros na criação de hipóteses acerca da primeira diferenciação celular embrionária, e acreditavam que o destino celular era definido através de um gradiente de concentração de “substâncias morfogenéticas” (Dalcq, 1957; Mulnard, 1960; Alexandre, 1992; revisado por Alexandre, 2001). Em 1967, foi proposto um modelo denominado “*inside-outside*”, que considerava a posição dos blastômeros como fator decisivo para a determinação do destino da linhagem celular, modelo este que é considerado até os dias atuais (Tarkowski e Wróblewska, 1967; revisado por Sasaki, 2010).

A evolução das técnicas de biologia molecular, bem como as descobertas no campo da genética e suas aplicações, revolucionou a pesquisa em embriologia, uma vez que o processo do desenvolvimento embrionário passou a ser entendido como consequência da ativação e transcrição de genes (revisado por Murillo-González, 2001). Desde então, os estudos sobre a biologia do desenvolvimento buscam não apenas compreender cronológica e morfologicamente os eventos embrionários, mas também caracterizá-los geneticamente (Brachet, 1974).

O estabelecimento e modulação gênica de linhagens de células-tronco de camundongos (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomas, Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1987), e a reprogramação destas em células germinativas (Bradley et al., 1984), possibilitaram a criação dos primeiros animais com silenciamento de determinados genes (*knock-out*) (Thompson et al., 1989).

Os modelos *knock-out* murinos tornaram possível a avaliação do efeito da ausência dos genes no organismo, produzindo também conhecimento sobre a atuação funcional dos genes estudados (Rossant, Nagy, 1995; Müller, 1999). A

técnica possibilitou o estudo e caracterização de diversos genes envolvidos nos eventos de diferenciação celular pré-implantação (Yuan et al., 1995; Nichols et al., 1998; Strumpf et al., 2015; Nishioka et al., 2008; Ralston et al., 2010; Keramari et al., 2010; Frankenberg et al., 2011; Frum et al., 2013; Tan et al., 2013; Bessonnard et al., 2014; Le Bin et al., 2014; Wang et al., 2021).

Outras técnicas que se utilizam de nucleases sítio-específicas para provocar quebras da fita dupla, como as nucleases *zinc-finger* (ZFNs) (Hauschild et al., 2011) e nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALENs - *transcription activator-like effector nucleases*) (Carlson et al., 2012) são capazes de promover pequenas inserções e deleções genéticas através da união de extremidades não-homólogas. Apesar das dificuldades de execução que essas técnicas ainda enfrentam, aumentaram a especificidade da modulação genética e ampliaram o leque de possibilidades nos estudos do genoma bovino (Yu et al., 2011; Carlson et al., 2012; Proudfoot et al., 2015; Wei et al., 2015; Yum et al., 2018).

Surgindo como promissora alternativa, o CRISPR é a sigla em inglês para Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Inter-espaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). É um mecanismo de imunidade adaptativa presente em bactérias e arqueas contra vírus bacteriófagos, que foi descrito inicialmente em E. Coli em 1987 (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989). Em 2012, foi descoberta a possibilidade do uso do sistema CRISPR/Cas como uma ferramenta de edição genética (Jinek et al., 2012) e pouco depois, já foi adaptado com sucesso para aplicação em células de origem mamífera (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Jinek et al., 2013).

Em embriões, a possibilidade de inserções e deleções gênicas sítio-específicas logo foi relatada em espécies como *Danio rerio* (Zebrafish) (Hwang et al., 2013; Chang et al., 2013) e *Drosophila melanogaster* (Bassett et al., 2013; Sebo et al., 2014; Bassett, Liu, 2014). Em mamíferos, estudos pioneiros abordaram a técnica através da microinjeção de embriões de camundongos (Wang et al., 2013; Mashiko et al., 2014; Fujii et al., 2014; Fujihara, Ikawa, 2014; Zhou et al., 2014), porcos (Hai et al., 2014; Whitworth et al., 2014; Kwon, Namgoong, Kim, 2015; Wang et al., 2015), e possibilitou uma maior eficiência no estabelecimento de modelos *knock-in* e *knock-out* em bovinos (Bevacqua et al., 2016; Daigneault et al., 2018b; Lamas-Toranzo et al., 2020; Owen et al., 2020; Hennig et al., 2020; Ortega et al., 2020; Owen et al., 2021; Xiao et al., 2021; Gim et al., 2021).

Estudos focados no desenvolvimento inicial de embriões bovinos sugerem que este pode ser um outro modelo para estudo do desenvolvimento embrionário inicial. Por exemplo, em contraste com o que se observa em murinos, o gene *OCT4* é expresso no TE até estágios tardios do blastocisto e sua expressão não é regulada diretamente pelo fator de transcrição CDX2, indicando que a diferenciação do TE em bovinos pode ocorrer por diferentes mecanismos moleculares (Berg et al., 2011). A deleção de *OCT4* (*POU5F1)*, através da microinjeção de CRISPR/Cas9 em zigotos bovinos, impediu a formação de blastocistos (Daigneault et al., 2018a), e diferentemente do que ocorre em camundongos, causou diminuição da expressão de *CDX2,* o qual está envolvido com a diferenciação do TE.

Ainda, NANOG e GATA6 são apontados como os principais fatores relacionados à diferenciação celular da MCI, orquestrando a segregação entre epiblasto (EPI) e endoderma primitivo (PrE), sob modulação da via de sinalização FGF/ERK. A deleção de GATA6 em embriões de camundongos leva à formação de MCI contendo apenas células EPI (Schrode et al., 2014), apresentando NANOG. Por sua vez, a deleção de NANOG leva à falha na formação de ambas as linhagens da MCI devido a falha na secreção parácrina de FGF4 (Frankenberg et al., 2011). O FGF4 age na via de sinalização ERK, cuja inibição leva a formação de MCI contendo apenas células do EPI. Entretanto, também diferentemente de camundongos, a modulação farmacológica da via ERK não alterou a quantidade de células apresentando GATA6 em embriões bovinos (Kuijk et al., 2012), sugerindo mais diferenças entre as espécies.

Sendo imprescindível uma compreensão mais profunda dos eventos iniciais e mecanismos moleculares de diferenciação celular em embriões mamíferos para a realização deste trabalho, foi elaborada uma revisão de literatura das publicações mais relevantes e atuais acerca do desenvolvimento embrionário pré-implantacional de bovinos e murinos (Capítulo II), publicada em janeiro de 2022 na revista *Animal Reproduction.* Ainda, visando aumentar o conhecimento sobre os mecanismos biológicos da diferenciação de EPI e PrE, buscamos testar a hipótese que a deleção do gene NANOG em embriões bovinos iria interferir no segundo evento de diferenciação celular, modificando o padrão de expressão dos fatores de transcrição relacionados e prejudicando a formação do epiblasto.

2. CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA: Eventos de diferenciação celular em embriões bovinos e murinos pré-implantacionais.

Cell differentiation events in pre-implantation mouse and bovine embryos

Letícia Escobar Carreiro[1], Gabriel Siqueira dos Santos[1], Felipe Eduardo Luedke[1], Marcelo Demarchi Goissis[1]

[1] Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

PMID: 35035540 PMCID: PMC8747937 DOI: 10.1590/1984-3143-AR2021-0054 Publicado em língua inglesa em 7 de janeiro de 2022 e traduzido na íntegra para este trabalho.

Resumo

A embriogênese em mamíferos se inicia a partir da fertilização do oócito, que resulta na formação do zigoto. Os eventos iniciais são críticos para o sucesso do desenvolvimento do embrião. Logo após ativação do genoma embrionário, os blastômeros se diferenciam entre as células da massa interna celular (MCI) ou do trofectoderma (TE), que posteriormente darão origem ao embrião e à placenta, respectivamente. Esta primeira diferenciação envolve processos celulares e moleculares, incluindo a polaridade celular relacionada à ativação de vias de sinalização intracelulares, que regulam a transcrição de genes relacionados ao TE. O segundo evento de diferenciação celular consiste na segregação da MCI em epiblasto (EPI) e hipoblasto ou endoderma primitivo (PrE). Este segundo evento envolve a sinalização parácrina, levando a expressão diferencial de genes que irão definir o destino celular. Atualmente, estes processos são bem detalhados em murinos, mas estudos recentes sugerem que embriões bovinos também podem ser bons modelos de pesquisa, uma vez que possuem muitas similaridades com a embriogênese inicial humana. Neste trabalho de revisão, reunimos as principais informações presentes na literatura sobre os eventos iniciais de diferenciação celular em bovinos e murinos, sugerindo que ambos os modelos devem ser analisados e estudados de maneira

complementar, para um melhor entendimento do desenvolvimento embrionário inicial humano.

Palavras-chave: Desenvolvimento inicial, embriogênese, massa celular interna, trofectoderma, blastocisto.

2.1 Introdução

A embriogênese inicial em mamíferos é caracterizada por uma série de eventos que têm início a partir da formação do zigoto. O sucesso desta etapa depende principalmente das primeiras clivagens e da diferenciação das primeiras linhagens celulares, processos essenciais para a implantação do embrião e para o desenvolvimento do feto (como revisado por Alberio, 2019).

O início do desenvolvimento embrionário é orquestrado por RNAs e proteínas maternas, presentes desde o processo de oogênese. Esse material materno irá auxiliar processos biossintéticos básicos, coordenar as primeiras divisões mitóticas e direcionar a especificação inicial de linhagens celulares. Conforme o avanço do desenvolvimento, inicia-se o processo de ativação do genoma embrionário (AGE). A partir deste momento, os embriões são capazes de se desenvolverem independentemente do genoma materno, até a formação de um blastocisto composto por três distintas linhagens celulares: O trofectoderma (TE), um epitélio exterior de células polarizadas que cerca um grupo de células apolares, a massa interna celular (MCI). A MCI, por sua vez, dará origem a dois tipos celulares distintos, as células do epiblasto (EPI) e do endoderma primitivo (PrE) (Underhill e Robins, 2016).

O TE será responsável por dar origem aos trofoblastos da placenta, após a implantação do embrião ao útero (Underhill e Robins, 2016). Já o EPI dará origem aos três tecidos intraembrionários, o endoderma, o mesoderma e o ectoderma, que darão origem aos mais diversos tecidos e órgãos do feto em desenvolvimento (Sheng, 2015). O PrE por sua vez formará o saco vitelino, composto por células de endoderma visceral e parietal (Bassalert et al., 2018).

As primeiras diferenciações celulares do embrião são intensamente estudadas em camundongos, sendo esse modelo animal a maior fonte de informações sobre o assunto. Apesar de existirem algumas diferenças cruciais na regulação dos primeiros eventos do desenvolvimento, existem evidências que embriões bovinos podem ser

bons modelos para compreender o desenvolvimento embrionário humano (Chen et al., 2009). Foi demonstrado, por exemplo, que fatores como OCT4 e CDX2, importantes para a primeira especificação celular, apresentam um padrão temporal e espacial de expressão semelhante em embriões humanos (Chen et al., 2009; Niakan e Eggan, 2013) e bovinos (Berg et al., 2011), mas que é diferente nos embriões murinos (Niwa et al., 2005; Strumpf et al., 2005; Niakan e Eggan, 2013).

Considerando a importância da correta formação dessas linhagens celulares para o sucesso do desenvolvimento embrionário, este estudo tem como objetivo reunir as principais informações presentes na literatura acerca dos eventos de diferenciação celular pré-implantacionais, propondo uma análise comparativa entre o desenvolvimento inicial de embriões bovinos e murinos.

2.2 Dinâmicas do desenvolvimento

Em mamíferos, o zigoto recém-fertilizado passa por divisões celulares simétricas, denominadas clivagens, um mecanismo relativamente conservado entre as espécies. Os blastômeros nessa etapa inicial são relativamente esféricos, parecidos entre si e se tornam menores a cada clivagem (Johnson e Ziomek, 1981; Johnson e McConnel, 2004).

Os eventos que resultam nas maiores modificações morfológicas no desenvolvimento embrionário pré-implantacional acontecem durante a compactação embrionária, onde há um grande aumento dos contatos intercelulares e a formação de blastocisto (Johnson, 2009). Apesar de existirem mecanismos regulatórios genéticos relativamente conservados em mamíferos, o desenvolvimento inicial em bovinos e murinos apresenta diferenças importantes, principalmente em aspectos cronológicos.

Em embriões murinos, a compactação tem início no estágio de 8 células, os blastômeros achatam suas superfícies apicais, formando um agrupado de células com limites celulares indistintos (Lo e Gilula, 1979; Becker e Davies, 1995). Durante esse momento, são formados os domínios de membrana apical e basolateral, onde o domínio apical apresenta, por exemplo, a proteína Ezrina (Louvet et al., 1996) e, a adesão celular provocada por proteínas que caracterizam a junção epitelial *zonula adherens* (ZA), forma a região de contato da membrana no domínio basolateral entre as células epiteliais (Aberle et al., 1996).

Mais adiante, entre o estágio de 16 e 32 células dos embriões de camundongo, as Na,K-ATPases, proteínas transmembrana localizadas nas membranas basolaterais de células do TE, são capazes de transportar fluidos e íons, provocando a formação da blastocele, uma cavidade que contém o fluido blastocélico, caracterizando o processo de cavitação embrionária, que culminará na formação do blastocisto e na primeira diferenciação celular (Kidder, Watson, 2005).

Nos embriões bovinos produzidos in vivo, entretanto, evidências apontam o início da compactação aproximadamente no estágio de 32 células, após 5 dias completos desde a inseminação, e a cavitação começa apenas após o estágio de 64 células (Van Soom et al., 1997). Em embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), a formação de blastocisto tem início pouco mais cedo, já no 5º dia após a fertilização, após o estágio de 32 células. Isso se deve ao fato de que os embriões produzidos in vivo possuem uma compactação mais firme e prolongada, iniciando a blastulação mais tardiamente (Van Soom et al., 1992; Van Soom et al., 1997).

O aspecto morfológico nesta etapa do desenvolvimento é o fator mais indicativo sobre a qualidade embrionária para a transferência de embriões (Watson, 1999). Apesar dos estágios de desenvolvimento apresentarem morfologia bastante semelhante em embriões bovinos e murinos, há divergências no tempo de duração de cada estágio e no momento da ocorrência de eventos morfológicos marcantes como a compactação e formação da blastocele (Figura 1). Ainda, há diferenças no padrão de expressão e função das proteínas relacionadas à formação do TE (como CDX2 e YAP) e da MCI (por exemplo OCT4, SOX2, NANOG, GATA4, GATA6 e SOX17) (Yamanaka et al., 2006; Wicklow et al., 2014; Sharma et al., 2020). Os mecanismos de regulação genética, os perfis de expressão proteica e as vias de sinalização celular relacionadas aos eventos de diferenciação celular, serão detalhados e aprofundados a seguir.

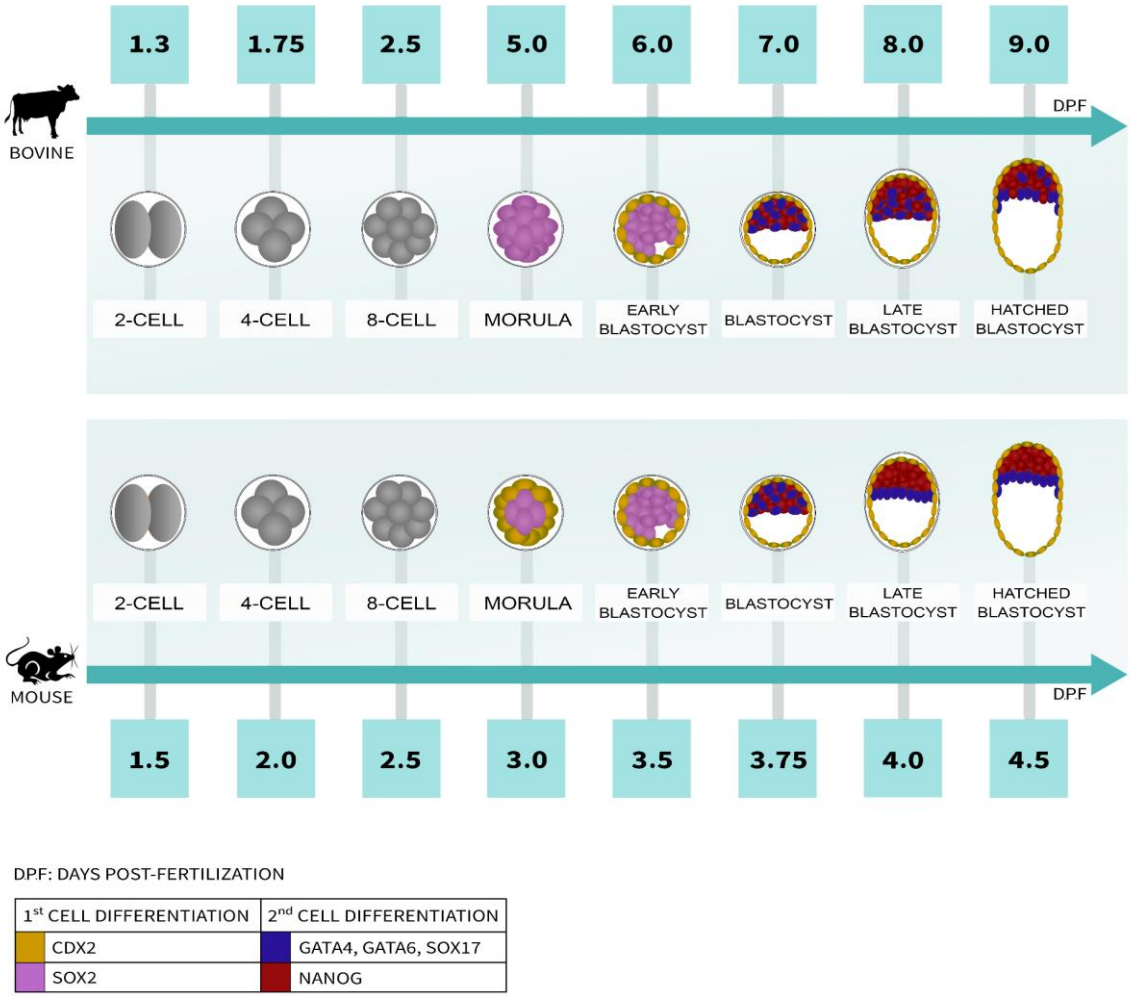

Figura 1: Linha do tempo da morfologia e expressão de marcadores de linhagem celular durante o desenvolvimento inicial de embriões bovinos e murinos (Carreiro et al., 2022).

Durante o desenvolvimento inicial, as principais divergências entre embriões bovinos e camundongos ocorrem na duração de cada estágio e no tempo de ocorrência dos eventos morfológicos. Por exemplo, a compactação dá origem à mórula em 5 dpf em bovinos e 3 dpf em camundongos, e a formação do blastocisto ocorre rapidamente em camundongos, logo após 18 horas após o estágio de mórula, enquanto o blastocisto bovino só se forma em 7 dpf. Ao contrário dos embriões de camundongos, as mórulas bovinas não expressam o marcador trofectoderma CDX2 (dourado) nas células externas e SOX2 (lilás) está presente em todas as células. Neste ponto, os embriões expressam o marcador de epiblasto NANOG e GATA6 em todas as células. Após a formação do blastocisto, NANOG (vermelho) e marcadores de endoderma primitivos como GATA4, GATA6, SOX17 (azul) são mutuamente exclusivos, formam um padrão de expressão “sal e pimenta” na massa celular interna em embriões bovinos e camundongos. No estágio de blastocisto tardio em camundongo, 4 dias pós fertilização (dpf), blastômeros expressando marcadores de epiblasto ou marcadores de endoderma primitivos formam camadas diferentes, enquanto no estágio de blastocisto eclodido em bovinos (9 dpf) essas duas linhagens ainda não estão separadas em camadas. Os embriões são representados bidimensionalmente para facilitar a compreensão.

2.3 Primeiro Evento de Diferenciação Celular

Em mamíferos, as primeiras clivagens darão origem a um embrião composto por blastômeros semelhantes e totipotentes, com potencial de diferenciação em todas as linhagens celulares (Fleming e Johnson, 1988). Durante o desenvolvimento, a primeira diferenciação dos blastômeros leva à formação das células epiteliais do TE ou células da MCI. Em estágios pós-implantacionais, o TE dará origem ao ectoderma extra-embrionário e aos trofoblastos da placenta, enquanto a MCI será responsável por desenvolver o embrião propriamente dito e o endoderma extra-embrionário (Strumpf et al., 2005).

São aceitos atualmente dois modelos, elaborados em camundongos, que procuram explicar os mecanismos envolvidos na primeira diferenciação. O primeiro modelo, denominado inside-outside (Tarkowski e Wróblewska, 1967), propõe que a posição da célula no embrião é o fator que definirá o tipo de célula em que será diferenciada. O segundo modelo, que não exclui o primeiro, se baseia no conceito de que a polarização celular define a linhagem de destino da célula (Johnson e Ziomek, 1981). De acordo com esse modelo, a polarização e o início das divisões celulares assimétricas são eventos cruciais para que o processo de especificação das linhagens celulares seja iniciado (Graham e Deussen, 1978; Johnson e Ziomek, 1981; Fleming, 1987).

Apesar dos modelos propostos, não há um consenso sobre o exato momento em que os blastômeros determinam a linhagem celular de destino (Posfai et al., 2017). Em camundongos, momentos antes da diferenciação destas duas linhagens, é observada uma mudança no padrão de expressão genética entre as células internas e externas, a partir do estágio de 8 células. Desta forma, genes que inicialmente eram expressos em todos os blastômeros, começam a ter suas expressões reguladas de acordo com a localização celular (Pesce e Scholer, 2001).

A compactação embrionária dá início ao aumento das interações célula-célula e da presença de proteínas de adesão celular, promovendo a polarização celular (Chen e Zhang, 2013). No estágio de mórula de camundongos, é observado o aparecimento de proteínas relacionadas à polaridade, como PARD3, PARD6 e PKCs (Plusa et al., 2005). Essas proteínas se organizam durante a compactação promovendo a formação de um domínio apical. Uma vez que são expressos nas células dois complexos distintos de junções intercelulares, estreitas e aderentes,

serão originadas uma região apical e uma região basolateral, estabelecendo uma polaridade celular (Plusa et al., 2005; Vinot et al., 2005; Ralston e Rossant, 2008).

As divisões celulares assimétricas que têm início neste estágio do desenvolvimento são responsáveis por gerar dois tipos de células-filhas: uma polar, localizada mais externamente, que herdará os domínios apical e basolateral da célula-mãe, e a outra, que estará posicionada mais internamente, que irá herdar apenas as proteínas relacionadas ao domínio basolateral, distribuídas de forma homogênea, se tornando então, apolar (Figura 2A). Em embriões bovinos, estudos recentes evidenciaram um padrão de polaridade celular semelhante ao de embriões murinos, essencial para o início da diferenciação de TE; no entanto, a inibição da polarização em bovinos não provocou efeitos graves como observado em camundongos (Gerri et al., 2020) e outro estudo mostrou que o uso de *blebbistatin* para a inibição da formação do domínio apical em bovinos não impediu a formação de blastocistos (dos Anjos et al., 2021), sugerindo que a polarização não é o único mecanismo envolvido na primeira diferenciação celular em embriões bovinos.

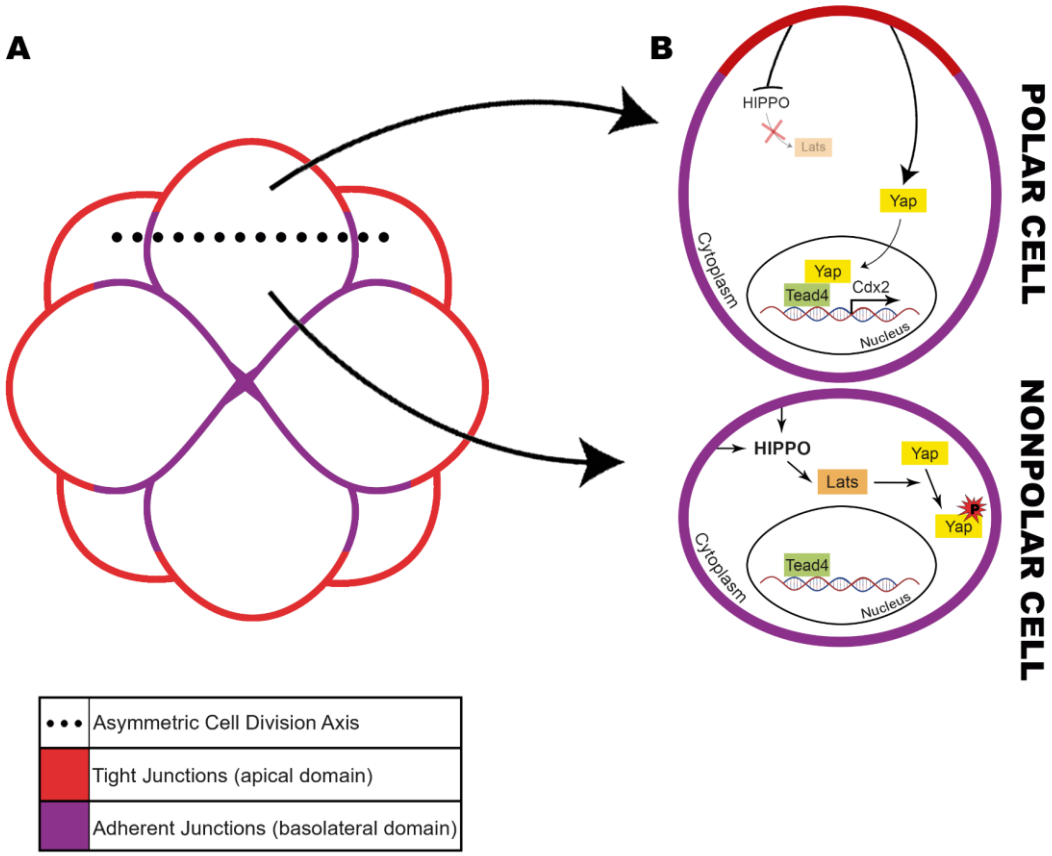

Figura 2: Influência da polaridade celular e da via de sinalização Hippo na diferenciação celular TE e ICM em embriões de camundongos (Carreiro et al., 2022).

(A) No estágio de 8 células, as junções estreitas (vermelho) e as junções aderentes (roxo) estabelecem um padrão de polarização no embrião. O eixo da divisão celular assimétrica (linha pontilhada) é responsável por gerar dois tipos de células filhas. (B) A primeira, uma célula polar localizada externamente, que herdará os domínios apical e basolateral, e a segunda, posicionada internamente, que adquirirá apenas as proteínas do domínio basolateral, distribuídas homogeneamente, tornando-se então células apolares. O domínio apical bloqueia a ativação da via Hippo em células polares, permitindo a translocação de YAP1 para o núcleo, resultando na transcrição de *Cdx2*. Com a ausência de junções estreitas, a via Hippo é ativada em células apolares.

Em camundongos, a assimetria das divisões celulares também é responsável por gerar blastômeros com diferentes graus de contratilidade celular. As células polares mantêm uma baixa contratilidade no domínio apical, enquanto as células apolares, que têm um aumento na contratilidade celular, competem pelas posições internas (Maître et al., 2016).

Estudos indicam que diferenças na organização de proteínas do citoesqueleto ocorrem antes da organização espacial dessas células, de forma a contribuir com a especificação celular. Os blastômeros com domínio apical apresentam aumento de queratinas na superfície celular, que impede a internalização destas células e,

consequentemente, antecede o início da expressão de marcadores de TE (Lim et al., 2020).

O estabelecimento da polaridade e o início das divisões celulares assimétricas são mecanismos que influenciam a atividade da via Hippo, a qual se comporta de formas distintas nas células polares e apolares, controlando o destino celular (Yamanaka et al., 2006; Nishioka et al., 2009). As células que são posicionadas externamente adquirem um domínio apical, que influencia a via Hippo, dando origem ao TE em embriões murinos (Korotkevich et al., 2017).

A ativação da via Hippo nas células apolares internas faz com que as serina/treonina quinases LATS1/2 promovam a fosforilação da proteína YAP1, o que impede seu transporte para o núcleo. Fosforilada, YAP não é capaz de atuar como co-fator de transcrição, juntamente com TEAD4. Já nas células apicais polares, a via Hippo permanece inativa, e YAP1 é transportado para o núcleo, onde funcionará como um coativador de TEAD4 (Figura 2B). Em murinos, TEAD4 é um fator de transcrição membro da família TEA domain, que é essencial para a manutenção e/ou regulação positiva de *Cdx2*, cuja expressão tem relação com o desenvolvimento do TE (Yagi et al., 2007; Nishioka et al., 2008; Nishioka et al., 2009; Misra e Irvine, 2018).

A deleção de *Tead4* em embriões murinos aumentou a expressão de fatores específicos de MCI, como *Oct4*, *Nanog* e *Sox2*, indicando que *Tead4* não é essencial para a formação da MCI (Nishioka et al., 2008). Embriões bovinos apresentam níveis baixos de RNA mensageiro (RNAm) para *TEAD4* nos primeiros momentos do desenvolvimento, aumentando a expressão da proteína a partir do estágio de 16 células. Durante o estágio de 8 a 16 células, TEAD4 é detectada no citoplasma, enquanto na mórula e no blastocisto é observada no núcleo da maioria dos blastômeros. O knockdown de *TEAD4* com uso de RNA de interferência (siRNA) em embriões bovinos não impede a formação de blastocisto e apresenta diferenciação e expansão normais das células do TE. Ao contrário do que se observa em camundongos, a deleção de *TEAD4* não influenciou a expressão de genes como *OCT4, NANOG, CDX2* e *GATA3*, sugerindo que TEAD4 não é essencial para a formação de TE ou para o desenvolvimento do embrião bovino (Sakurai et al., 2017).

Embriões de camundongo com deleção de *Yap1* e *Wwtr1* (TAZ), um homólogo funcional de YAP1, morreram antes de atingirem o estágio de mórula. Em contrapartida, a superexpressão de *Yap1* e *Taz* é capaz de promover a expressão de

Cdx2, confirmando que YAP1 em conjunto com TAZ e TEAD4 regulam a expressão de *Cdx2* (Nishioka et al., 2009).

Recentemente, foram descritas diferenças nos padrões de YAP1 e TAZ em embriões bovinos, sugerindo que nestes animais, a sinalização Hippo pode se estabelecer com mecanismos diferentes. Em contraste ao que se observa em embriões murinos, a YAP1 fosforilada é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma de embriões bovinos, desde 2 células ao estágio de 16 células, tornando-se majoritariamente nuclear a partir da mórula (Sharma et al., 2020). O coativador TAZ apresenta localização nuclear nas células externas do blastocisto, enquanto em camundongos a expressão de TAZ torna-se exclusivamente nuclear a partir do estágio de mórula (Sharma et al., 2020).

A via de sinalização Hippo também está relacionada com o metabolismo de glicose, que por sua vez pode estar relacionado com este primeiro evento de diferenciação celular. Nos camundongos, foi demonstrado que o fator de transcrição TEAD4 não era necessário para a formação da blastocele, em embriões cultivados em baixa concentração de oxigênio. Porém, o *knockout* de *Tead4* em embriões cultivados em privação de glicose impediu a formação de blastocistos, sugerindo que o papel de TEAD4 durante o desenvolvimento pré-implantacional é estabelecer uma homeostase energética essencial para a transição de mórula para blastocisto (Kaneko e DePamphilis, 2013).

A relação entre o metabolismo de glicose e a formação de blastocistos é estudada há algum tempo. Pouco antes da formação da blastocele, o embrião murino muda sua fonte de energia abruptamente, de piruvato e lactato para glicose, conjuntamente com um aumento de 2,7 vezes no consumo de oxigênio (Gardner, 1998; Johnson et al., 2003).

Brown e Whittingham (1991) descreveram um requerimento específico de glicose durante a transição da mórula para o blastocisto, e diferentemente dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário do camundongo em que o lactato e o piruvato atendem às necessidades do embrião, a glicose é necessária durante a primeira diferenciação celular.

Em embriões de camundongos cultivados em meios sem glicose, houve um bloqueio do desenvolvimento no estágio de 8 células e não foi observada a expressão do fator de transcrição *Cdx2,* sendo apenas expressos fatores de transcrição relacionados à MCI (Chi et al., 2020). Também foi demonstrado que a expressão de

Cdx2 foi influenciada pela modulação da via biossintética da hexosamina e via da pentose fosfato (Chi et al. 2020).

Essas vias estariam envolvidas na O-glicosilação de YAP1, permitindo a translocação nuclear de YAP1, interferindo diretamente no primeiro processo de diferenciação celular e desempenhando um papel decisivo na especificação do trofectoderma (Chi et al, 2020). Mais especificamente, a modulação farmacológica do processo de O-glicosilação nas fases pré-implantação mostrou-se importante para a futura diferenciação das células trofoblásticas, interferindo na expressão de fatores de transcrição como CDX2 e GATA3 (Ruane et al. 2020).

Sabe-se que o fator de transcrição *Cdx2* é um importante regulador e está presente de forma abundante em células do TE (Beck et al., 1995). Em embriões de camundongos, rastros do mRNA de Cdx2 já são identificados no estágio de 8 células, e a expressão de Cdx2 é observada no estágio de mórula (aproximadamente a partir de 16 células) tanto no núcleo como no citoplasma das células externas. No estágio de blastocisto expandido, Cdx2 se encontra restrita ao núcleo dessas células (Strumpf et al., 2005; Ralston e Rossant, 2005).

Nos embriões bovinos, CDX2 está presente apenas no estágio de blastocisto (Madeja et al., 2013; Goissis e Cibelli, 2014b). A deleção de *Cdx2* em embriões murinos e bovinos influencia na integridade do epitélio, que se torna mais permeável com o silenciamento de CDX2, porém não impede a formação de TE ou de blastocisto, reforçando que a diferenciação do TE é regulada por fatores ou vias hierarquicamente superiores ao CDX2 (Strumpf et al., 2005; Wu et al., 2010; Goissis e Cibelli, 2014b).

Já nas células apolares internas, inicialmente são expressos fatores de transcrição como *Oct4* (também denominado Pou5f1), *Sox2* e *Nanog*, relacionados à manutenção da pluripotência da MCI (Schöler et al., 1990; Niwa et al., 2000; Chambers et al., 2003; Nishioka et al., 2008). Nos estágios iniciais da mórula de camundongos, Cdx2 e Oct4 são coexpressos nos blastômeros, mas gradualmente esses fatores desenvolvem uma regulação mútua onde são capazes de ativarem suas transcrições enquanto um bloqueia a expressão do outro nas células. A expressão exclusiva de *Cdx2* ou *Oct4* é essencial para o estabelecimento das linhagens de TE e MCI, respectivamente. (Niwa et al., 2005; Ralston e Rossant, 2005; Strumpf et al., 2005; Guo et al., 2010). Esse mecanismo de supressão mutual também já foi observado entre *Nanog* e *Cdx2*, indicando o papel de *Cdx2* na restrição desses fatores à MCI (Chen et al., 2009).

Em bovinos, entretanto, OCT4 é detectado nas células do TE e na MCI, mesmo no estágio de blastocisto (Kirchhof et al., 2000; Kuijk et al., 2008), sugerindo que, nestes animais, OCT4 pode participar de outros mecanismos regulatórios. Há indícios de que, em contrapartida ao que já foi descrito em camundongos, CDX2 não regula negativamente a transcrição de *OCT4* nos embriões bovinos, devido a diferenças na região promotora do gene *OCT4* em bovinos e outras espécies, incluindo humanos, quando comparados à camundongos (Berg et al., 2011). Ainda, outros estudos demonstraram que a detecção de OCT4 não é afetada pelo silenciamento de CDX2 (Goissis e Cibelli, 2014b; SAKURAI et al., 2016).

Embriões murinos apresentando *knockout* de *Oct4* são capazes de formar blastocistos, porém a MCI destes embriões não é pluripotente, sendo as células apenas diferenciadas em linhagens trofoblásticas extraembrionárias (Nichols et al., 1998), sugerindo a necessidade de OCT4 para o desenvolvimento da MCI nestes animais (Niwa et al., 2000). Já a deleção de *OCT4* em embriões bovinos, através da técnica de CRISPR/Cas9, demonstrou que a formação inicial dos blastocistos bovinos é dependente de OCT4, uma vez que os embriões *knockout* ficaram retidos no estágio de mórula, anteriormente à primeira especificação celular, de maneira semelhante aos embriões humanos (Fogarty et al., 2017; Daigneault et al., 2018). Os estudos indicaram também que possivelmente OCT4 possui papel regulatório na diferenciação de TE em bovinos, provavelmente através da regulação de CDX2 (Daigneault et al., 2018).

Também essencial para a manutenção da pluripotência (Avilion et al., 2003), a expressão de SOX2 é restrita à MCI no estágio de blastocisto em embriões murinos (Guo et al., 2010). Em camundongos, SOX2 de origem materna está presente no núcleo das células já no estágio de 2 células, enquanto a transcrição zigótica de *Sox2* terá início apenas no estágio de 16 células, nas células precursoras da MCI (Avilion et al., 2003; Guo et al., 2010). Em divergência ao padrão inicial de co-localização apresentado pelos fatores NANOG, OCT4 e CDX2, SOX2 não é observado nas células externas que expressam CDX2, sendo o primeiro marcador exclusivo das células que darão origem à MCI. Estudos demonstram que SOX2 é restrito à MCI por mecanismos independentes de CDX2, porém dependentes de Tead4 e Lats2 (Wicklow et al., 2014). A expressão de SOX2 é impedida diretamente por YAP1 e TAZ de origem materna e TEAD4 zigótico em estágios iniciais do desenvolvimento, mecanismo que é cessado a partir do estágio de 16 células, nas células que se

posicionaram internamente (Frum et al. 2019). Em contrapartida, foi descrito em embriões murinos que blastômeros que apresentaram ligação de SOX2 ao DNA durante mais tempo, ao estágio de 4 células, eram predispostos a compor a MCI (White et al., 2016).

O silenciamento de SOX2, de origem materna e zigótica, nos embriões de camundongo, impede a formação de blastocisto. A maioria destes embriões estaciona o desenvolvimento no estágio de mórula, falhando no processo de cavitação. Nestes embriões, a falta de SOX2 não afeta a expressão de *Oct4* e *Nanog*, mas resulta em uma grande redução de transcritos característicos de TE, como TEAD4, CDX2, Eomesodermin e YAP, mas não de GATA3 (Keramari et al., 2010). Outros estudos contraditórios sugerem que o *knockout* de Sox2 não impede a formação de blastocisto, mas a MCI é diferenciada em TE ou endoderma extraembrionário (Avilion et al., 2003).

Nos embriões bovinos, do estágio de 16 células até a mórula, a expressão de SOX2 é observada em todas as células, se restringindo à MCI no blastocisto. A deleção de *SOX2* nestes embriões implicou na redução da expressão de NANOG nos blastocistos, sugerindo uma relação regulatória entre esses fatores. Em contraste aos embriões murinos, a expressão de OCT4 não foi alterada, sugerindo que em bovinos, SOX2 e OCT4 podem não estabelecer uma relação regulatória direta (Goissis e Cibelli, 2014a; Xie et al., 2010).

2.4 Segundo Evento de Diferenciação Celular

Inicialmente, foi proposto que o fator decisivo para a diferenciação celular dentro da MCI de embriões murinos, seria a localização das células no blastocisto inicial. As células em contato com a blastocele seriam diferenciadas em PrE, enquanto as células mais internas da MCI se diferenciariam em EPI (Rossant, 1975). Essa hipótese, entretanto, foi contestada a partir da demonstração da expressão diferencial de fatores de transcrição, como *Nanog* e *Gata6*, nas células da MCI, sendo estes essenciais para o estabelecimento de um blastocisto composto por três linhagens celulares (Mitsui et al., 2003; Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008).

No blastocisto tardio, as células de EPI são caracterizadas pela expressão de fatores de pluripotência como *Nanog* (Mitsui et al., 2003 Chambers et al. 2003) e *Sox2* (Avilion et al., 2003), enquanto as células de PrE apresentam uma ativação sequencial

da expressão de *Gata6*, *Gata4* (Fujikura et al., 2002), *Sox17* e *Sox7* (Artus et al., 2011). Em camundongos, as proteínas NANOG (Mitsui et al., 2003) e GATA6 (Fujikura et al., 2002) são co-expressas em todas as células desde o estágio de 8 células até a formação de blastocistos. A partir do estágio de blastocisto, o padrão de expressão desses fatores se torna mutuamente exclusivo nas células da MCI, caracterizando o chamado “padrão sal e pimenta”, anteriormente ao estabelecimento de EPI e PrE (Rossant et al., 2003; Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008; Guo et al., 2010).

Em bovinos, a expressão de NANOG começou a ser observada na MCI no estágio de blastocisto inicial, com o aumento da expressão nos dias 7 e 8 do desenvolvimento (Kuijk et al., 2012), apesar de existirem evidências do início da expressão de NANOG já no estágio de 8 células (Canizo et al., 2019). A expressão de GATA6 foi detectada a partir do estágio de mórula em todas as células do embrião, tendo sua expressão restrita à MCI apenas após o dia 8 do desenvolvimento, já no estágio de blastocisto. Assim como nos embriões murinos, NANOG e GATA6 são co-expressos inicialmente nos blastômeros, e progressivamente se tornaram restritos às células precursoras de EPI e PrE (Kuijk et al., 2012).

A deleção de *Nanog* em embriões de camundongo não afetou a expressão de GATA6, indicando que o gatilho para a diferenciação de PrE nesses embriões é independente de *Nanog* (Frankenberg et al., 2011). Embriões com *knockdown* de *Nanog* a partir de siRNA mostraram blastocistos GATA6-positivos em toda a MCI, mas que apresentaram falhas na ativação do programa de diferenciação de PrE, evidenciadas pela ausência da expressão de Gata4 e Sox17 (Frankenberg et al., 2011). Ao contrário do que se observa em murinos, a deleção de NANOG em embriões bovinos reduziu a expressão de GATA6 (Ortega et al., 2019), sugerindo diferentes dinâmicas de diferenciação de PrE nestes embriões.

Uma das vias de sinalização envolvidas na segunda diferenciação é a via FGF/ERK, ativada a partir da ligação de FGF4 aos seus receptores (FGFRs) (Yamanaka et al., 2010; Kang et al., 2013; Molotkov et al., 2017; Soszynska et al., 2019). Nos embriões de camundongos, a expressão de *Fgf4* foi observada em células precursoras de EPI, sendo regulada diretamente por NANOG (Frankenberg et al., 2011) e, nas células vizinhas, FGF4 se liga aos seus receptores, ativando o programa de diferenciação do PrE (Yamanaka et al., 2010; Frankenberg et al., 2011) (Figura 3).

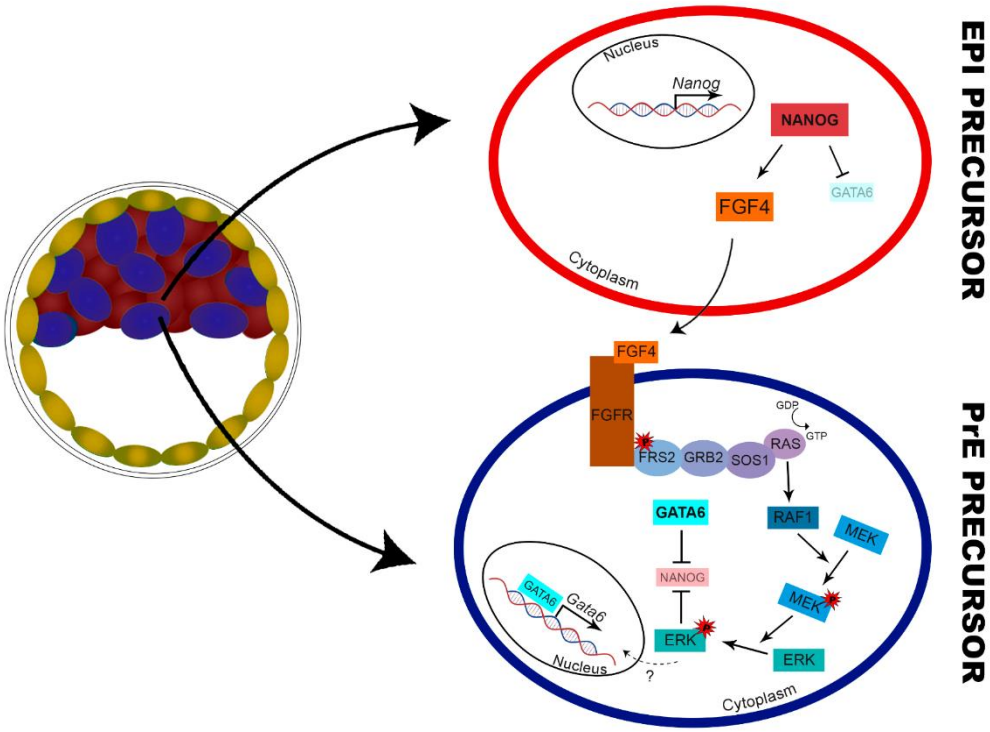

Figura 3: Papel da via FGF/ERK na especificação de células EPI e PrE em embriões de camundongos (Carreiro et al., 2022).

No estágio inicial do blastocisto, a expressão de NANOG regula diretamente a transcrição de *Fgf4*, enquanto diminui a expressão de GATA6 em células precursoras de EPI (vermelho). O FGF4, de forma parácrina, liga-se aos receptores (FGFRs) nas células vizinhas, ativando a cascata ERK nas células precursoras de PrE (azul), levando à expressão de GATA6 e posterior inibição de NANOG.

Embriões de camundongo com deleção de *Fgf4* apresentaram marcação para NANOG e GATA6 na maioria das células da MCI, desde o estágio de mórula até blastocisto inicial, sugerindo que a expressão inicial dessas proteínas não depende da sinalização desencadeada por FGF4. Porém, com o avanço do desenvolvimento dos blastocistos, esses embriões formaram uma MCI predominantemente NANOG-positiva, evidenciando que FGF4 é necessário para a manutenção da expressão de GATA6 na MCI. A expressão de fatores como GATA4 e SOX17 não foi detectada nestes embriões *Fgf4*$^{-/-}$, indicando sua necessidade para a ativação do programa de diferenciação celular de PrE (Kang et al., 2013).

Embriões bovinos tratados com FGF4 exógeno formaram blastocistos com MCI composta apenas de células GATA6-positivas, demonstrando que a presença de FGF4 e a via ativada por esse ligante podem induzir a expressão de precursores de PrE e bloquear a formação de células de EPI (Kuijk et al., 2012). Estudos mostraram

ainda que FGF2 exógeno também foi capaz de induzir formação e proliferação de PrE em células bovinas *in vitro*, indicando que, nesses animais, outros recursos podem ser utilizados para desencadear a ativação do programa de diferenciação celular (Yang et al., 2011).

Há estudos que indicam que a atividade da via FGF/ERK depende dos tipos de FGFRs que são expressos nas células. Estudos em murinos constataram que *Fgfr1* é expresso tanto nos precursores de EPI quanto de PrE, e *Fgfr2* é preferencialmente expresso apenas nas células precursoras de PrE. Os *knockouts* de *Fgfr1* ou *Fgfr2* demonstraram que FGFR1 teve um papel fundamental na diferenciação de PrE, enquanto *FGFR2* teve um papel secundário (Molotkov et al., 2017). Há relatos da presença da expressão de FGFR1 e FGFR3 na MCI de embriões bovinos, mas sem muitas informações acerca do efeito da ativação desses receptores (Ozawa et al., 2013). A localização de FGFR2 bovino levantou controvérsias, pois estudos indicaram sua presença restrita às células do TE (Ozawa et al., 2013), mas também já foi descrita a expressão na MCI (Akizawa et al., 2016), principalmente em células do PrE (Negrón-Pérez et al., 2018).

A ativação dos FGFRs provoca o recrutamento de proteínas adaptadoras que irão fazer a conexão entre a sinalização de FGF com a via das ERKs (Wang et al., 2004; Soszynska et al., 2019). A ativação das ERKs regula negativamente NANOG, uma vez que foi descrito que a fosforilação de NANOG, mediada por ERK1, posteriormente provocou a degradação de NANOG (Kim et al., 2014), gerando um desequilíbrio no padrão de coexpressão inicial de NANOG e GATA6 e contribuindo para a especificação celular (Plusa et al., 2008; Guo et al., 2010). Estudos que visaram manipular elementos *downstream* da via FGF/ERK evidenciaram sua importância para o sucesso do desenvolvimento inicial. A deleção de *Grb2* nos embriões de camundongo, por exemplo, não impediu a compactação da MCI, mas inibiu a expressão de Gata6 e outros marcadores de PrE, implicando na ausência da formação de PrE. Entretanto, esses embriões mantiveram a expressão de *Nanog* em todas as células da MCI, que se desenvolveram em EPI, sugerindo o papel da via FGF/ERK no desenvolvimento de PrE (Chazaud et al., 2006).

O tratamento dos embriões murinos com inibidores de FGFR ou inibidores de MEK, durante o estágio de blastocisto, provocou o mesmo fenótipo observado na deleção de *Grb2* e *Gata6*. Porém, quando o tratamento foi interrompido no estágio de 16 células, não foram observadas alterações no padrão de expressão de fatores na

MCI, sugerindo que a ativação da via de sinalização FGF/ERK se dá nos estágios iniciais de blastocisto (Yamanaka et al., 2010).

Embriões bovinos cultivados com inibidores farmacológicos de MEK tiveram uma diminuição no número de células do TE e da MCI (Canizo et al., 2019), apresentaram um aumento da expressão de NANOG e FGF4, e diminuição de GATA4 e SOX17, no estágio de blastocisto, indicando a influência direta da via FGF/ERK no processo de diferenciação celular da MCI. Entretanto, a expressão de GATA6 foi observada em alguns blastômeros, evidenciando que algumas células mantém a diferenciação de PrE independentemente da ativação da via FGF/ERK (Kuijk et al., 2012; Harris et al., 2013; McLean et al., 2014; Negrón-Pérez; Hansen, 2018; Canizo et al., 2019).

Em murinos, esse processo de diferenciação é essencialmente dependente de GATA6, uma vez que embriões *knockout* para *Gata6* não formaram a linhagem de PrE, expressando *Nanog* em todas as células da MCI (Schrode et al., 2014). A expressão de SOX17 e GATA4, fatores de transcrição tardios relacionados ao PrE, se mostrou dependente de Gata6 e da sinalização ativada por Fgf4 (Bessonnard et al., 2014). Ainda, embriões murinos selvagens e knockdown para *Gata6,* tratados com FGF4 exógeno no estágio de 8 células, tiveram a expressão de NANOG inibida, evidenciando que a via FGF/ERK é capaz de inibir NANOG independentemente de *Gata6*. Porém, quando o tratamento foi realizado em estágios mais tardios, como no blastocisto inicial, a expressão de NANOG foi mantida (Bessonnard et al., 2014). Até o momento, nenhum estudo realizou a inibição ou deleção de GATA6 em embriões bovinos.

2.5 Conclusão

Os principais conhecimentos acerca do desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos derivam principalmente de estudos em modelos de camundongos. Pesquisas em embriões bovinos mostram que os processos biológicos envolvidos na diferenciação celular precoce não são tão conservados (resumidos na Tabela 1), por exemplo, o momento cronológico e controle molecular da expressão de CDX2, ou o controle molecular de genes relacionados à segunda diferenciação celular. Ainda existem lacunas significativas de informação na literatura sobre eventos de diferenciação celular pré-implantação em humanos e evidências apresentadas

anteriormente indicam que embriões humanos possuem alguns padrões e mecanismos regulatórios mais semelhantes aos embriões bovinos. Assim, sugerimos que modelos bovinos e camundongos sejam estudados em paralelo para melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos nos eventos morfológicos embrionários iniciais.

Tabela 1. Resumo dos principais eventos e mecanismos biológicos que ocorrem nos embriões de camundongos e bovinos.

Observação	Embrião Murino	Embrião Bovino	Referências
Estágio em que ocorre a compactação embrionária	8 células	32 células	(Lo and Gilula, 1979; Becker and Davies, 1995; van Soom et al., 1997)
Estágio em que ocorre a cavitação embrionária	Entre 16 e 32 células	Entre 32 e 64 células	(van Soom et al., 1992; van Soom et al., 1997; Kidder and Watson, 2005)
TEAD4 é essencial para a formação do TE?	Sim	Não	(Kaneko and Depamphilis, 2013; Sakurai et al., 2017)
CDX2 exerce algum papel na integridade do epitélio?	Sim	Sim	(Strumpf et al., 2005; Goissis and Cibelli, 2014b)
A deleção de *CDX2* impede a formação de TE ou de blastocistos?	Não	Não	(Strumpf et al., 2005; Wu et al., 2010; Goissis and Cibelli, 2014b)
Localização de OCT4 após a primeira diferenciação	Células da MCI	Células da MCI e TE	(Ralston and Rossant, 2005; Strumpf et al., 2005; Kuijk et al., 2008)
CDX2 regula negativamente a transcrição de OCT4?	Sim	Não	(Berg et al., 2011; Goissis and Cibelli, 2014b; Sakurai et al., 2017)
Deleção de *OCT4* impede a diferenciação de TE?	Não	Sim (bloqueio em mórula)	(Nichols et al., 1998; Daigneault et al., 2018)
SOX2 e *OCT4* estabelecem uma relação regulatória direta?	Sim	Não	(Goissis and Cibelli, 2014a; Xie et al., 2010)

Observação	Embrião Murino	Embrião Bovino	Referências
Deleção de *NANOG* na diferenciação da MCI	Mantém-se a expressão inicial de GATA6, mas impede a formação de EPI e PrE	Reduz a expressão de GATA6 e impede a diferenciação de EPI	(Frankenberg et al., 2011; Ortega et al., 2020)
FGF4 é necessário para manter a expressão de GATA6 na MCI?	Sim	Sim	(Kuijk et al., 2012; Kang et al., 2013)
Efeitos da inibição de *FGFR*	Elimina GATA6 e aumenta o número de células NANOG+ na MCI	Não altera a distribuição de NANOG e GATA6 nas células da MCI	(Yamanaka et al., 2010; Kujik et al., 2012)
Efeitos da inibição de MEK	Elimina GATA6 e aumenta o número de células NANOG+ na MCI	Reduz GATA6 e aumenta o número de células NANOG+ na MCI	(Yamanaka et al., 2010; Kujik et al., 2012; Canizo et al., 2019)
Tipos de FGFR identificados na MCI	Fgfr1 e Fgfr2	Fgfr1 e Fgfr3, possivelmente Fgfr2	(Ozawa et al., 2013; Akizawa et al., 2016; Molotkov et al., 2017; Negrón-Pérez and Hansen, 2018)

Legenda: EPI: Epiblasto; FGFR: Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos; MCI: Massa Interna Celular; PrE: Endoderma Primitivo; TE: Trofectoderma.

3. CAPÍTULO III - Avaliação funcional do gene *NANOG* em bovinos

3.1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o desenvolvimento embrionário pré-implantacional depende do sucesso dos eventos iniciais de diferenciação celular. O primeiro momento de decisão do destino celular consiste na segregação entre a MCI e o TE, enquanto a segunda diferenciação ocorre dentro da MCI, com separação entre EPI e PrE.

Em camundongos, os fatores de transcrição NANOG e GATA6 são detectados na MCI dos blastocistos iniciais mesmo antes da diferenciação das linhagens celulares de EPI e PrE, apresentando um padrão de expressão mutuamente exclusiva, chamado de “sal e pimenta” (Chazaud et al., 2006; Artus, Chazaud 2014). Há estudos que propõem que o momento da divisão e o posicionamento celular durante a formação da MCI determinam a linhagem celular no segundo evento de diferenciação (Morris et al., 2010).

Outros modelos murinos apontam que a segregação celular de EPI e PrE acontece de forma gradual durante o desenvolvimento do blastocisto, sob influência de vias regulatórias de sinalização (Yamanaka et al., 2006; Chazaud et al., 2006; Frankenberg et al., 2011; Kang et al., 2013; Bessonnard et al., 2014; Schrode et al., 2014). A deleção de *Nanog* em embriões de camundongo não afeta a expressão de GATA6, indicando que a diferenciação inicial de PrE se dá por maneiras independentes de *Nanog* (Frankenberg et al., 2011).

Em bovinos, mantém-se o padrão inicial de expressão de *NANOG* e *GATA6* descrito em camundongos (Kuijk et al., 2012) e destaca-se a importância da via de sinalização FGF/ERK na segunda diferenciação celular. Há indícios de que a inibição de MEK pode impedir a expressão de SOX17 e, como consequência, impedir a formação do PrE sem afetar a expressão de *NANOG* (Canizo et al., 2019). Entretanto, estudos divergentes mostram que o tratamento com inibidores de MEK apenas reduz a expressão de SOX17 e GATA6 em embriões bovinos, e que a expressão de SOX17 mediada por FGF4 é dependente de NANOG (Springer et al., 2021). A deleção de *NANOG* nos embriões bovinos não parece afetar a expressão de SOX17 (Springer et al., 2021), porém reduz a expressão de GATA6 e prejudica a formação do epiblasto (Ortega et al., 2019).

Analisando o padrão anteriormente descrito de expressão mutuamente exclusivo dos genes *NANOG* e *GATA6*, testou-se a hipótese de que a deleção de

NANOG em embriões bovinos interferiria no segundo evento de diferenciação celular, modificando o padrão de expressão dos fatores de transcrição relacionados e possivelmente prejudicando a formação do epiblasto.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é compreender os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação celular de epiblasto e endoderma primitivo em embriões bovinos. Para tal, é almejado estabelecer um modelo de deleção gênica mediado pelo sistema CRISPR/Cas9 em zigotos bovinos produzidos *in vitro,* a fim de caracterizar e avaliar a atuação do gene *NANOG* tanto no desenvolvimento de blastocistos, quanto na segregação entre células do epiblasto e endoderma primitivo.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado de acordo com os compromissos éticos de experimentação animal determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), protocolo número 2133201219.

3.3.1 Local do experimento e período de execução

A pesquisa foi desenvolvida nas dependências do Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, localizado no departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, Campus da Capital. O projeto foi realizado durante o período de outubro/2019 a abril/2022.

3.3.2 Delineamento experimental

Visando a deleção gênica de *NANOG,* foram elaborados sistemas de CRISPR/Cas9, que foram microinjetados em zigotos bovinos produzidos in vitro 8 ou 16 horas após a FIV. Os embriões foram cultivados in vitro até o nono dia após a fertilização (D9), conjuntamente com embriões controles, que foram injetados apenas com os RNA guias (gRNAs) ou não foram microinjetados. Foram avaliadas as taxas de clivagem no dia 4 após a fertilização (D4), juntamente com o *feeding*, no qual 30%

do meio de cultivo KSOM foi removido e renovado com meio fresco, e no D9 as taxas de formação de blastocistos. Os blastocistos foram armazenados em paraformaldeído 4% para realização de experimentos de imunocitoquímica, extração de DNA e genotipagem.

3.3.3 Construções moleculares

A formulação dos componentes genéticos do sistema CRISPR/Cas9 foi realizada a partir da sequência específica do gene a ser editado, o *NANOG* (GenBank *accession number* XM_024992001.1). Duas sequências de RNA guia (gRNA1e gRNA2) foram desenhadas, utilizando o *software online* CRISPR RGEN *Tools* (disponível em: http://www.rgenome.net/cas-designer) e com auxílio do *software online* Blastx (disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para remover o trecho do genoma contendo o domínio de reconhecimento do DNA do fator de transcrição NANOG As sequências de oligonucleotídeos complementares *Forward* (5' 3' – F) e *Reverse* (3' 5' – R) utilizadas nesse estudo foram sintetizadas comercialmente e suas informações estão detalhadas a seguir (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos para clonagem dos gRNAs. Em letras minúsculas as sequências adaptadoras para clonagem molecular.

Oligonucleotídeo	**Sequência (5'-3')**
NANOG gRNA1 - F	caccGAAACCACTGTCCCCGTCTG
NANOG gRNA1 - R	aaacCAGACGGGGACAGTGGTTTC
NANOG gRNA2 - F	caccGTCATTGAGCACACACAGCT
NANOG gRNA2 - R	aaacGTCATTGAGCACACACAGCT
Primer Promotor U6 - F	CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA

3.3.4 Síntese in vitro dos gRNAs

Após a aquisição dos oligonucleotídeos correspondentes aos gRNA para visando deleção de NANOG, foi realizada uma série de procedimentos para realizar a síntese *in vitro* destas sequências. As reações descritas a seguir foram realizadas separadamente para os oligonucleotídeos das sequências de cada gRNA.

3.3.4.1 Anelamento e Fosforilação

O anelamento das fitas simples foi realizado através da adição dos oligonucleotídeos (F e R), H_2O ultrapura e tampão CutSmart (New England Biolabs) a um microtubo de reação em cadeia da polimerase (PCR) e submetido ao seguinte programa de anelamento no termociclador: 95ºC – 10 min.; 95ºC a 85ºC – 2ºC/seg.; 85ºC – 1 min.; 85ºC a 75ºC – 3ºC/seg.; 75ºC – 1 min.; 75ºC a 65ºC – 3ºC/seg.; 65ºC – 1 min.; 65ºC a 55ºC – 3ºC/seg.; 55ºC – 1 min.; 55ºC a 45ºC – 3ºC/seg.; 45ºC – 1 min.; 45ºC a 35ºC – 3ºC/seg.; 35ºC – 1 min.; 35ºC a 25ºC – 3ºC/ seg.; 25ºC – 1 min.; 4ºC *hold*.

O produto do anelamento foi utilizado na reação de fosforilação, onde o oligonucleotídeo anelado, a enzima T4 PNK (New England Biolabs), ATP (10mM) (New England Biolabs), e o tampão 10X PNK (New England Biolabs) são adicionados a um novo tubo de PCR, que foi incubado no termociclador à temperatura de 37ºC durante 30 minutos, seguido de inativação à 75ºC durante 10 minutos.

3.3.4.2 Clonagem Molecular

O produto da fosforilação foi submetido à clonagem molecular em vetor pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (pX330-Cas9, Cong et al., 2013; Addgene, Watertown, MA, EUA, doado gentilmente por Janet Rossant e Bin Gu, *The Hospital for Sick Children Research Institute,* Toronto, Canadá). Inicialmente, o plasmídeo pX330-Cas9 foi submetido ao protocolo de digestão com a endonuclease Bbs1. A digestão de 5µg do plasmídeo ocorreu a 37ºC em banho seco, durante 4 horas. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose com produto final da digestão e, após a confirmação da presença de uma banda linear, foi realizada a extração do DNA presente no gel com o uso do QIAQuick PCR & Gel CleanUp Kit (QIAGEN). Logo em seguida, a amostra de material genético foi quantificada através de espectrofotômetro e *software* Nanodrop (ND-1000 V3 5.2).

A ligação entre o plasmídeo digerido pX330-Cas9-Bbs1 e o produto fosforilado dos oligonucleotídeos foi realizada pela adição destes à enzima T4 DNA Ligase, água ultrapura e ao Buffer 10X T4 DNA (Takara Bio Inc) e posterior incubação no termociclador a 16ºC, durante 30 minutos.

O produto da reação de ligação foi então utilizado para a transformação em bactérias competentes *E. Coli* DH5α. As bactérias, com volume total de 200µL, que estavam armazenadas a -80ºC em um tubo tipo Eppendorf, foram colocadas no gelo durante 5 minutos. Ao final desse tempo, foram adicionados 2µL do produto da ligação ao tubo e essa mistura foi incubada no gelo durante 20 minutos. Após essa etapa, para induzir o choque térmico das bactérias, o tubo foi inserido durante 1 minuto e 30 segundos no banho seco pré-aquecido a 42ºC e em seguida, o tubo Eppendorf foi recolocado no gelo por mais 5 minutos.

O material obtido foi ressuspendido em 100µL de meio LB Broth (Sigma-Aldrich) e a amostra final foi plaqueada em LB Ágar contendo 100µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e as placas foram mantidas na estufa à 37ºC durante 12-16 horas (*overnight*) para crescimento das colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo de interesse. Selecionou-se colônias para cultivo em meio LB Broth (a 37ºC, sob agitação de 240 rpm, *overnight*). As bactérias foram então submetidas ao protocolo de extração de DNA, realizado com o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. O DNA plasmidial então foi quantificado com espectrofotômetro e *software* Nanodrop (ND-1000 V3 5.2).

Após a quantificação do DNA, foi montada uma reação de PCR contendo em um tubo: 300 µg de DNA plasmidial, um oligonucleotídeo homólogo à região promotora U6 do Px330, o *primer Reverse* do gRNA (1 ou 2) (Tabela 2), tampão 10X Taq DNA Polimerase (Cellco), água ultrapura e a enzima Taq DNA Polimerase (Cellco). Essa reação foi submetida ao seguinte programa no termociclador: 95ºC – 10 min.; 40 ciclos de 95ºC – 12 s., 60ºC – 15 s., 72ºC – 1 min.; 72ºC – 2 min.; 4ºC *hold*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação e os produtos esperados eram de 225 pares de base (pb) (Figura 4). As amostras de DNA plasmidial contendo o gRNA 1 e gRNA 2 para o gene NANOG foram preparadas para sequenciamento pelo método Sanger, e enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da USP. Os resultados obtidos no sequenciamento Sanger das amostras confirmaram uma correta inserção dos RNA guias.

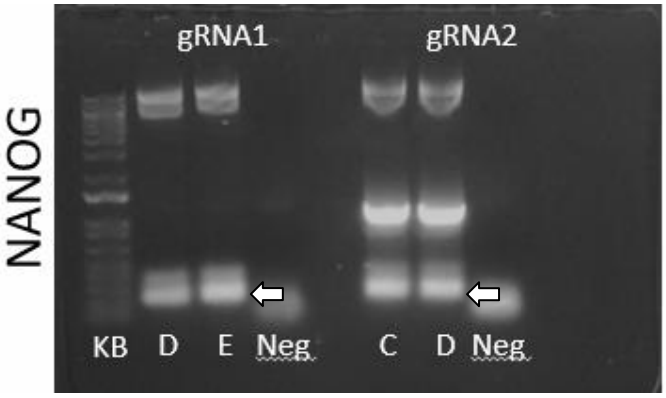

Figura 4: Confirmação da clonagem da sequência dos gRNAs no plasmídeo pX330-Cas9-Bbs1. O tamanho esperado era de 225 pb (setas).

3.3.4.3 Síntese *in vitro* dos gRNAs

A síntese *in vitro* dos gRNAs, a partir dos vetores clonados, foi realizada através do kit MEGAshortscript™ T7 Transcription (ThermoFisher). Sequências de oligonucleotídeos foram confeccionadas para a amplificação por PCR do fragmento a ser transcrito (NANOG IVT GRNA1 - F, NANOG IVT GRNA2 - F e PX330 IVT GRNA - R, Tabela 3), e as reações foram realizadas com a polimerase de alta fidelidade CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara Bio) nas seguintes condições de temperatura: 98ºC – 2 minutos; 98ºC – 10 segundos, 60ºC – 15 segundos e 72ºC – 10 segundos (40 ciclos) e 72ºC – 10 segundos.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na síntese das guias de gRNAs.

Oligonucleotídeo	**Sequência**
NANOG IVT GRNA1 - F	TAATACGACTCACTATAGGGAAACCACTGTCCCCGTCTG
NANOG IVT GRNA2 - F	TAATACGACTCACTATAGGGTCATTGAGCACACACAGCT
PX330 IVT GRNA - R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC

O produto desta reação de PCR foi submetido ao protocolo de transcrição, onde as etapas foram realizadas de acordo com as diretrizes do fabricante. Os reagentes do kit foram misturados aos vetores clonados e incubados a 37ºC durante 2 horas. Então, foi adicionada DNAse e essa mistura foi incubada por mais 15 minutos. Após esse período, foram adicionados H_2O ultrapura, acetato de sódio 3M, etanol 100% e a amostra foi resfriada por 15 minutos a -20ºC. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g, durante 15 minutos a 4ºC e os pellets obtidos foram ressuspensos em H_2O ultrapura. Os gRNAs foram quantificados com uso de espectrofotômetro e *software* Nanodrop (ND-1000 V3 5.2) e armazenados a -80ºC, em alíquotas de 125 ng/mL e 500 ng/mL.

3.3.5 Produção in vitro de embriões bovinos

Foram obtidos oócitos bovinos através da aspiração de ovários comprados de matadouros comerciais. Os complexos cumulus-oócitos selecionados de acordo com sua qualidade foram submetidos à maturação in vitro (MIV), em incubadora a 38,5°C e 5% de CO_2 em alta umidade. A MIV foi realizada em uma placa de petri contendo gotas de 90 µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 3 µg/mL de hormônio luteinizante (Vetecor Laboratories), 3 µg/mL de hormônio folículo

estimulante (Folltropin-V, Vetrepharm, Inc.), 1 mg/mL estradiol (Sigma), 22 µg/mL de piruvato de sódio (Sigma) e 25 µg/mL de gentamicina (Thermo Fisher).

Após 22h de MIV, os oócitos maduros foram submetidos à fertilização in vitro (FIV), realizada em placa de petri com gotas de 90 µL de meio à base de piruvato de lactato de Tyrode (TALP) suplementado com 20 µg/mL de heparina. Após o descongelamento das palhetas de sêmen de touro único, a 37ºC, foram selecionados pelo gradiente de Percoll® os espermatozóides vivos, que foram então adicionados à placa da FIV com os oócitos, em uma concentração de 1 x 10^6 espermatozóides/mL. A fertilização ocorreu durante os períodos de 8 ou 16 horas, em incubadora a 38,5°C e 5% de CO_2 em alta umidade, e em seguida foram devidamente preparados para o protocolo de microinjeção, como será descrito no item a seguir.

Após as micromanipulações, os embriões foram lavados em meio comercial de cultura de embrião Hamster-Hepes (HH) antes de serem dispostos em gotas de 90µL de meio KSOM suplementado com 3 mg/ml de albumina sérica bovino (BSA) e com aminoácidos essenciais e não-essenciais (Sigma), para cultivo in vitro (CIV) pelos próximos dias. Todas as gotas das placas de MIV, FIV e CIV foram completamente cobertas por óleo mineral (Sigma). No quarto dia após a FIV (D4), 30% do volume do meio foi removido e substituído por meio KSOM fresco com aminoácidos.

Ao nono dia após a FIV (D9), os blastocistos foram destinados à fixação para imunofluorescência ou para extração de RNA. Os embriões tiveram a zona pelúcida removida com solução 0,1% protease (Sigma) em meio HH e foram fixados em solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) 4% em PBS suplementado com polivinilpirrolidona (PBS-PVP 1 mg/mL), durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, os blastocistos foram lavados e armazenados em PBS-PVP a 4ºC.

3.3.6 Microinjeção em zigotos bovinos

Oito horas após a fertilização (8 hpf), os presumíveis zigotos foram lavados em meio HH e colocados durante 2 minutos em um tubo com solução de 1 mg/mL de hialuronidase em meio HH pré-aquecido a 37ºC. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e permaneceu em agitação durante 3 minutos para facilitar a denudação química. Após essa etapa, os zigotos foram lavados novamente em HH e levados até o micromanipulador em uma placa contendo meio de cultivo KSOM.

Os zigotos foram divididos inicialmente nos seguintes grupos: O grupo “Controle”, que não foi microinjetado, grupo “Controle gRNAs”, microinjetado apenas com os gRNAs (12,5 ng/µL), diluídos em H_2O ultrapura, funcionando como um controle do procedimento da micromanipulação, e o grupo “Cas9-12,5”, microinjetado com TrueCut™ Cas9 Protein v2 (ThermoFisher) (70 ng/µL) juntamente com os gRNAs (12,5 ng/µL), também diluídos em H_2O ultrapura (Tabela 4).

No entanto, verificamos uma ineficiência na edição gênica no grupo “Cas9-12,5” em tais condições. Decidiu-se então pelo estabelecimento de novos grupos experimentais, onde houve a modificação da concentração dos gRNAs injetados. Assim, foram estabelecidos os grupos controle, não injetado, e Cas9-80, com 80ng/µL de gRNAs. Estas novas replicatas de microinjeções ocorreram 16 hpf (Tabela 4), e os zigotos foram manipulados conforme descrito acima. Essa mudança de horário ocorreu devido ao resultado obtido em experimento paralelo do laboratório no qual não se observou diferença de eficiência de edição gênica às 8 hpf ou 16 hpf (Luedke et al., manuscrito em preparação).

Tabela 4: Grupos e condições de microinjeção gRNA/Cas9 - *NANOG*.

Grupos	**Injeção (hpf)**	**Concentração dos Materiais Injetados (ng/µL)**	
		gRNA1 e gRNA2	**Cas9**
Controle	8 ou 16	N/A	N/A
Controle gRNA	8	12,5	0
Cas9-12,5	8	12,5	70
Cas9-80	16	80	70

3.3.7 Imunofluorescência e aquisição de imagens

Os blastocistos tiveram a zona pelúcida removida com solução 0,1% protease (Sigma) em meio HH durante até 2 minutos e foram fixados no D9 em solução de PBS suplementado com 1 mg/mL polivinilpirrolidona (PBS-PVP) 4% paraformaldeído (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, foram lavados três vezes e armazenados em PBS-PVP a 4ºC até o início do protocolo.

O protocolo de imunofluorescência foi realizado para verificar a expressão proteica de SOX17, que é um marcador de PrE. O início se dá pela lavagem dos blastocistos fixados em solução de lavagem (PBS + 0,1% Triton X-100 + Glicina 7,5mg/mL) e permeabilização durante 15 minutos, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente, em solução de PBS com 0,5% Triton X-100. Após a permeabilização, os embriões foram lavados e em seguida incubados em solução de bloqueio (solução de lavagem suplementada com 10% de soro fetal de jumento e 1% BSA) durante 1 hora, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente. Logo em seguida, foram incubados *overnight,* em agitação (80 rpm), à 4ºC, com o anticorpo primário (Novus, AF1924), diluído 1:100 em solução de anticorpo (solução de lavagem suplementada com 1% BSA). Os embriões utilizados como controle negativo não foram incubados com anticorpo primário.

Após a incubação do anticorpo primário, os embriões foram submetidos a três lavagens de 15 minutos de duração, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente e depois foram incubados com o anticorpo secundário (Donkey Anti-Goat IgG NorthernLights™ NL 557-*conjugated* - R&D) diluído 1:100 em solução de anticorpo, por 1 hora, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente. Esta e as etapas seguintes foram realizadas sob proteção de luminosidade.

Em seguida, os embriões foram submetidos novamente a três lavagens de 15 minutos de duração cada, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente e então incubados em Hoechst 33342 100 µg/mL (Thermo Fisher) durante 15 minutos, em agitação (80 rpm), à temperatura ambiente. Por fim, foram lavados três vezes em PBS-PVP. Os embriões foram montados entre lamínulas, com auxílio de adesivo espaçador de 0,12mm de altura e analisados em microscópio confocal Zeiss LSM-780 NLO (Zeiss) no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) da Universidade de São Paulo. A excitação do fluoróforo foi induzida pelo laser de neon-helium 546nm e laser diodo 405nm. Foram adquiridas imagens a cada 8µm, utilizando o software InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare).

3.3.8. Extração de DNA

Os blastocistos produzidos nos grupos Cas9, além de alguns embriões dos grupos Controle e Controle gRNA, foram armazenados para extração de material genético com kit comercial Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich). Os volumes de reação sugeridos no protocolo foram readequados para a extração de DNA de embriões, que contém um número restrito de células. Cada embrião foi colocado individualmente em um tubo de 1,5 mL contendo 4,4µL de tampão de extração acrescido de 1,1µL de tampão de preparação de tecido. Foram incubadas as reações pelo período de 10 minutos a 55ºC e em seguida, incubadas a uma temperatura de 95ºC durante 3 minutos. Após o resfriamento dos tubos, as amostras foram neutralizadas com 4,4 µL de tampão de neutralização e armazenadas a -20ºC para uso posterior.

3.3.9 Genotipagem

Foram realizadas reações de PCR com os DNAs extraídos dos embriões para a verificação da edição gênica de *NANOG* (Figura 5), utilizando o kit GoTaq® G2 Master Mix (Promega). Foi montada uma reação para cada embrião com 12,5µL do reagente GoTaq® G2 Green 2X, 125 nM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 2µL de DNA embrionário e 6,25µL de H_2O livre de nucleases. As reações de PCR foram submetidas ao termociclador sob as seguintes temperaturas: 95ºC – 2 min.; 40 ciclos de 95ºC – 30 s., 60ºC – 40 s., 72ºC – 95 s.; 72ºC – 5 min.; 4ºC *hold*. As reações foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1% ou 2%.

O alvo das construções moleculares do sistema CRISPR/Cas9 para a deleção de interesse foi o exon 2 (263 pb), onde está localizado o domínio de reconhecimento do DNA de *NANOG* (Figura 5A). Espera-se que toda a sequência situada entre o gRNA1 e gRNA2 (115 pb) seja deletada ou modificada para que a expressão de NANOG seja impedida nestes embriões (Figura 5B). Caso haja a deleção sítio-específica da sequência desejada, espera-se um produto de PCR no tamanho de 102 pb, com a sequência localizada entre os primers *Forward* e *Reverse* (Figura 5C). As sequências foram alinhadas usando software online gratuito de alinhamento múltiplo T-coffee (disponível em: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/, Madeira et al. 2019).

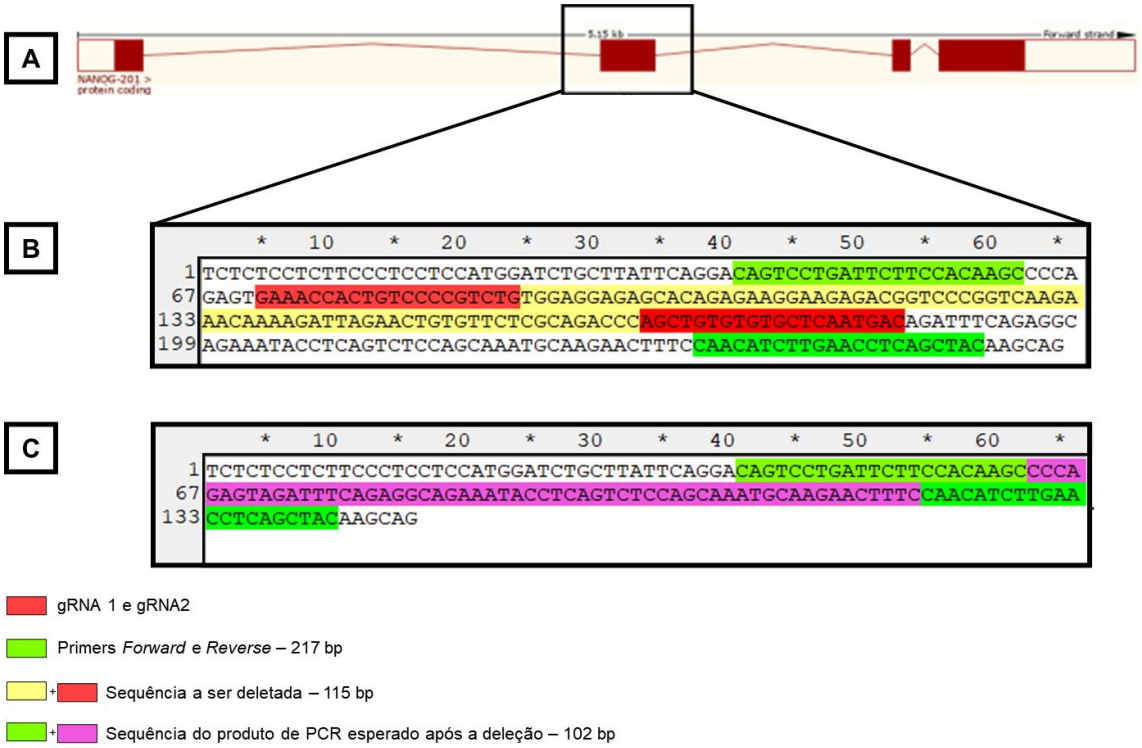

Figura 5: Representação gráfica da sequência do gene *NANOG* em bovinos.

(A) O domínio de reconhecimento do DNA de *NANOG* está localizado no Exon 2 (destacado). Em (B), a representação gráfica da sequência original (*wild-type*) de 263 bases do Exon 2, onde destacam-se as sequências do gRNA1 e gRNA2 (vermelho), dos primers de PCR *Forward* e *Reverse* (verde) e a sequência que, junto com os gRNAs, será deletada após os cortes realizados pela enzima Cas9 (amarelo). (C) Representação gráfica da sequência do Exon 2 esperada após a deleção, onde destacam-se os primers *Forward* e *Reverse* (verde) e todas as bases localizadas entre estes (lilás), que formam o produto de PCR previsto após a deleção.

3.3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA

No D9 do cultivo, blastocistos de cada grupo foram coletados e armazenados individualmente em *Extraction Buffer* para posterior extração de RNA, realizada com o kit Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit (Thermo Fisher). Seguindo as instruções do fabricante, o RNA dos embriões foi devidamente isolado individualmente e, em seguida, deu-se início ao protocolo de síntese de cDNA, com auxílio do kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit. Foram montadas as reações contendo, por tubo: 4µL do reagente 5X VILO™ Reaction Mix, 2µL de 10X SuperScript™ Enzyme Mix e 14µL de RNA extraído dos embriões. Os tubos com as reações foram incubados em termociclador inicialmente a 25ºC por 10 minutos, seguido de 1 hora de incubação a 45ºC. Por fim, as reações foram incubadas a 85ºC por 5 minutos e, em seguida, armazenadas a -20ºC para a realização do q-RT-PCR.

3.3.11. Análise da expressão gênica q-RT-PCR

A avaliação quantitativa da expressão gênica foi feita por q-RT-PCR absoluto. Inicialmente, o RNA foi isolado como descrito acima a partir de amostras de 5 embriões para validação dos *primers* e confecção das curvas padrão. Foram realizadas reações de PCR com GoTaq® G2 Master Mix (Promega) e os produtos foram purificados com PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification (Thermo Fisher) e submetidos à clonagem em vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), conforme instruções do fabricante. Os plasmídeos contendo os produtos de PCR foram diluídos na concentração de 10 ng/µL e a partir dessa diluição foi feita uma diluição seriada 1:10 com 9 pontos. Essa diluição seriada foi usada como curva padrão para os respectivos genes-alvo.

As reações de q-RT-PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf Realplex2, com uso do kit SYBR GreenER Universal Mix (Thermo Fisher), conforme instruções do fabricante e uso de 2,5µL de cDNA das amostras de embriões individuais por reação. O programa de temperaturas da PCR foi: 50ºC – 2 min.; 95ºC – 10 min.; 40 ciclos de 95ºC – 15 s., 60ºC – 1 min.; 95ºC – 15 s.; 60ºC – 1 min.; 95ºC – 15 s.; 60ºC – 15 s.; 95ºC – 15 s.; 4ºC *hold*.

O cálculo do número de cópias por µL foi feito com auxílio de software online (https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html), levando em conta o tamanho final do plasmídeo com o inserto do produto de PCR. Logo, o número de cópias em cada ponto da curva foi obtido pela multiplicação do número de cópias por µL, pelo volume (em µL) utilizado em cada reação. Os resultados fornecidos pelo software Realplex (Eppendorf) foram então normalizados pela quantidade de cDNA (ng) que foi utilizada em cada reação, fornecendo o resultado final em número de cópias do gene alvo por ng de cDNA.

3.3.12. Análise Estatística

As análises estatísticas foram executadas com auxílio do software SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Para análise das taxas e expressão gênica, os diferentes grupos foram considerados como variáveis independentes, enquanto taxa de clivagem, taxa de blastocisto, taxa de desenvolvimento e número de cópias por ng

de cDNA foram consideradas variáveis dependentes. Foi realizado teste de normalidade de distribuição dos resíduos com o PROC UNIVARIATE. Quando necessário, os dados foram transformados para atingirem distribuição normal e *outliers* foram removidos após uso do Guided Data Analysis quando necessário. Os dados transformados foram re-transformados para apresentação. As variáveis foram analisadas por ANOVA, com uso do PROC GLM e a comparação de médias foi feita com teste de Tukey. O nível de significância considerado foi 5%.

3.4. RESULTADOS

Ao total foram realizadas 6 replicatas de microinjeções embrionárias com FIV de 8h e 5 replicatas com FIV de 16h de duração, sendo nelas testadas 3 condições de concentração de materiais injetados. No total, foram obtidos 140 blastocistos, sendo 73 do grupo Controle, 17 do grupo Controle gRNAs, 26 do grupo Cas9-12,5 e 24 do grupo Cas9-80.

3.4.1. Desempenho das microinjeções de gRNA/Cas9 NANOG

Durante o cultivo, no D4 foi realizada a avaliação da taxa de clivagem dos embriões (número de clivados dividido pelo número total de zigotos, em %) e no D9, foi avaliada a taxa de formação de blastocistos (quantidade de blastocistos formados dividido pelo número total de zigotos, em %), bem como a taxa de desenvolvimento (total de blastocistos formados dividido pelo número de clivados, em %). A média das taxas obtidas nas micromanipulações realizadas, bem como o número total de zigotos estão detalhados na Tabela 5:

Tabela 5: Média das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento obtidas nas microinjeções de gRNA/Cas9 NANOG.

Grupo	**Injeção (hpf)**	**Zigotos**	**Taxas (%)**		
			Clivagem	Blastocisto	Desenvolvimento
Controle	8	343	50,84 ± 6,03	14,87 ± 4,72	25,30 ± 7,20
Controle gRNAs	8	118	62,65 ± 6,03	22,06 ± 5,85	31,17 ± 8,93
Cas9-12,5	8	265	49,93 ± 6,03	10,26 ± 4,72	19,52 ± 7,20
Controle	16	105	73,87 ± 2,938*	19,63 ± 2,92**	26,88 ± 4,84
Cas9-80	16	310	44,40 ± 2,938*	7,95 ± 2,92**	17,71 ± 4,84

Os zigotos foram injetados 8 ou 16 horas após a FIV (hpf) (grupos Cas9-12,5 e Cas9-80). Os embriões dos grupos Controle não foram injetados. *p = 0,0002. **p = 0,0256

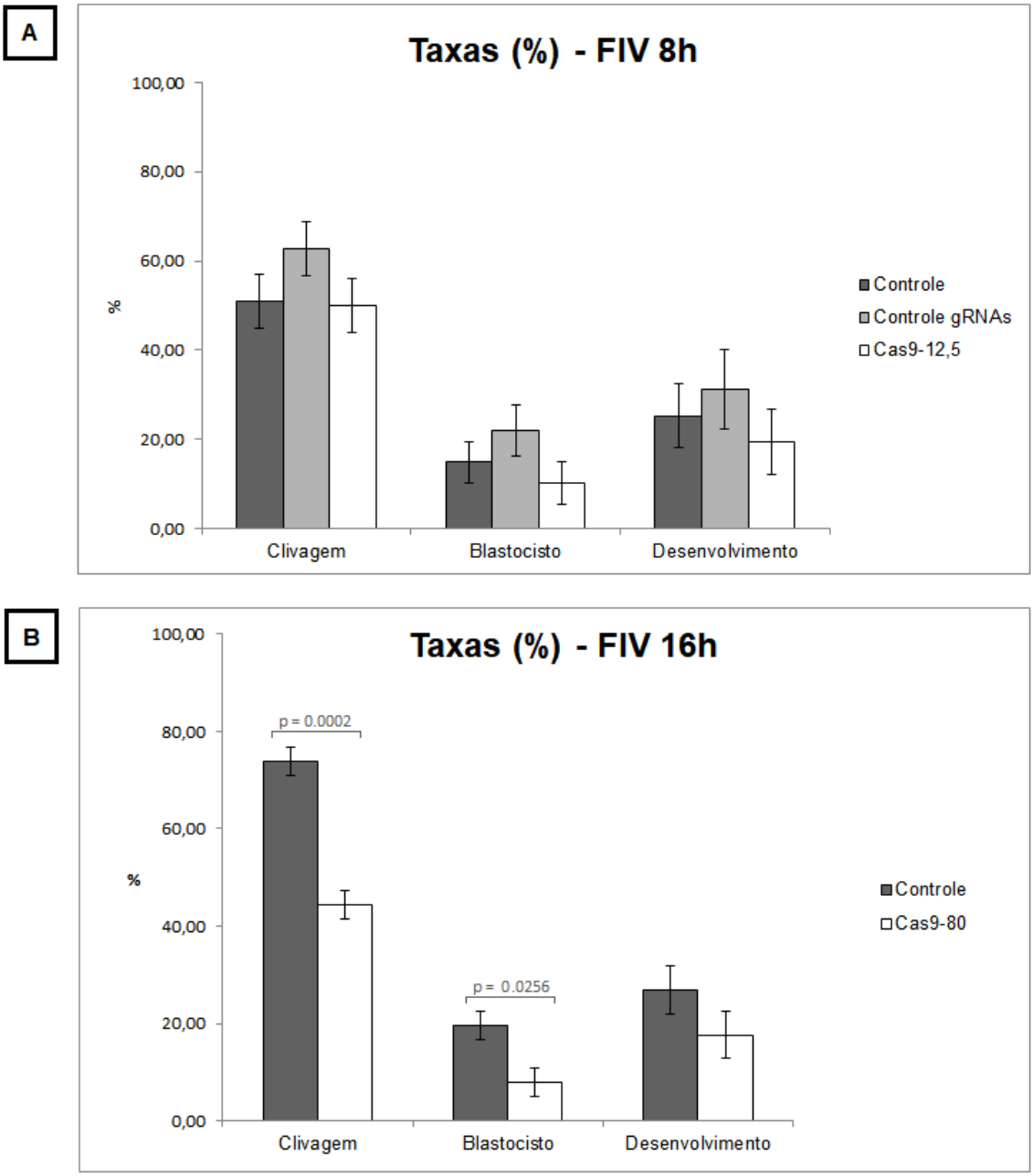

Figura 6: Gráficos apresentando média e erro padrão das médias das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento obtidas nos experimentos de micromanipulação.

Avaliação do desempenho dos grupos após as microinjeções realizadas (A) às 8 hpi ou (B) 16 hpi, em porcentagem (%).

Nos experimentos com 8 horas de duração de FIV (Figura 6A), não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais, em nenhuma das taxas analisadas. Este resultado indica que o protocolo de microinjeção dos grupos

Controle gRNAs e Cas9-12,5 (12,5 ng/µL de gRNAs + 70 ng/µL de Cas9) não prejudicou as etapas do desenvolvimento embrionário e a produção de blastocistos, quando comparados ao grupo Controle, que não foi microinjetado. Devido a esse resultado, o grupo Controle gRNA foi suprimido nos experimentos seguintes.

Já nos experimentos realizados com 16 horas de duração de FIV (Figura 6B), uma diferença estatisticamente significativa foi percebida nas taxas de clivagem e blastocisto, mas não na taxa de desenvolvimento. Nestas condições foram microinjetados no grupo experimental 80 ng/µL de gRNAs conjuntamente com 70 ng/µL de Cas9 (Cas9-80). Esse resultado pode ser uma consequência do aumento de 6,4 vezes na concentração dos gRNAs injetados. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que variáveis no processo da microinjeção (qualidade das agulhas, manipulação, volume de material injetado) tenham influenciado neste resultado, uma vez que a análise da média das taxas de desenvolvimento (ou seja, o número de blastocistos formados sobre o número total de embriões clivados) não apresentou diferença estatística entre os grupos Controle e Cas9-80.

3.4.2 Imunofluorescência

Após a obtenção dos blastocistos, foram realizados experimentos de imunofluorescência com marcação fluorescente de Hoescht específica para o núcleo celular (Figura 7, em azul) e marcação para verificar a expressão da proteína SOX17 (Figura 7, em vermelho), marcador nuclear exclusivo de células do endoderma primitivo, a fim de avaliar se houve efeito do tratamento com os gRNAs/Cas9 NANOG nesta população de células.

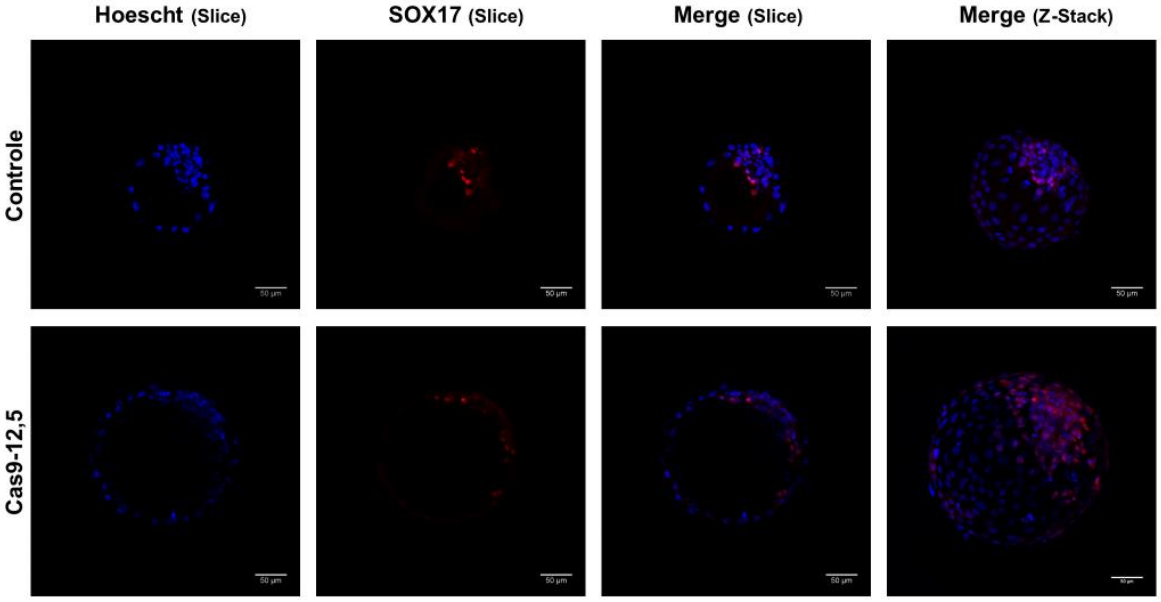

Figura 7: Aquisição de imagens de imunocitoquímica de embriões bovinos fixados com paraformaldeído 4% em D9, dos grupos Controle e Cas9-12,5.

Na 1ª coluna, em azul, é apresentada a marcação fluorescente de Hoescht, específico para o núcleo celular, em uma fatia (*slice*) de 8µm; Na 2ª coluna, em vermelho, o marcador associado à diferenciação de endoderma primitivo, SOX17, em uma fatia (*slice*) de 8µm; Na 3ª coluna, o Merge representa a sobreposição das marcações (Hoescht + SOX17), em uma fatia (*slice*) de 8µm. Finalmente, na 4ª coluna, o Merge apresenta a construção Z-Stack das marcações (Hoescht + SOX17). As imagens foram processadas em Software Image J.

Entretanto, os resultados obtidos na genotipagem desses blastocistos (Figura 8) apontaram a ineficiência da deleção gênica de *NANOG* nos embriões do grupo Cas9-12,5. Uma vez que o objetivo deste experimento era analisar o efeito da deleção de *NANOG*, os esforços do projeto foram imediatamente direcionados para a realização de novas replicatas de micromanipulação, e não foi realizada a análise anteriormente prevista de comparação do número de células SOX17-positivas entre os grupos experimentais.

Dos 24 blastocistos obtidos no grupo Cas9-80, 11 foram fixados e armazenados para a posterior realização dos experimentos de imunofluorescência e aquisição de imagens.

3.4.3 Genotipagem

Foram realizadas reações de PCR com os DNAs extraídos dos blastocistos D9 para a verificação da edição gênica de *NANOG.* A eletroforese das amostras deveria

evidenciar uma banda de 217 pb para a sequência inalterada (grupos Controle e Controle gRNAs) e 102 pb para a sequência com deleção de *NANOG* (grupos Cas9-12,5 e Cas9-80) (Figura 5). Como esperado, os blastocistos Controle e Controle gRNAs apresentaram banda à 217 pb. Entretanto, dos 13 embriões Cas9-12,5 testados, todos apresentaram apenas a banda correspondente ao peso 217 pb, indicando que não ocorreu a deleção de *NANOG* como esperado (Figura 8).

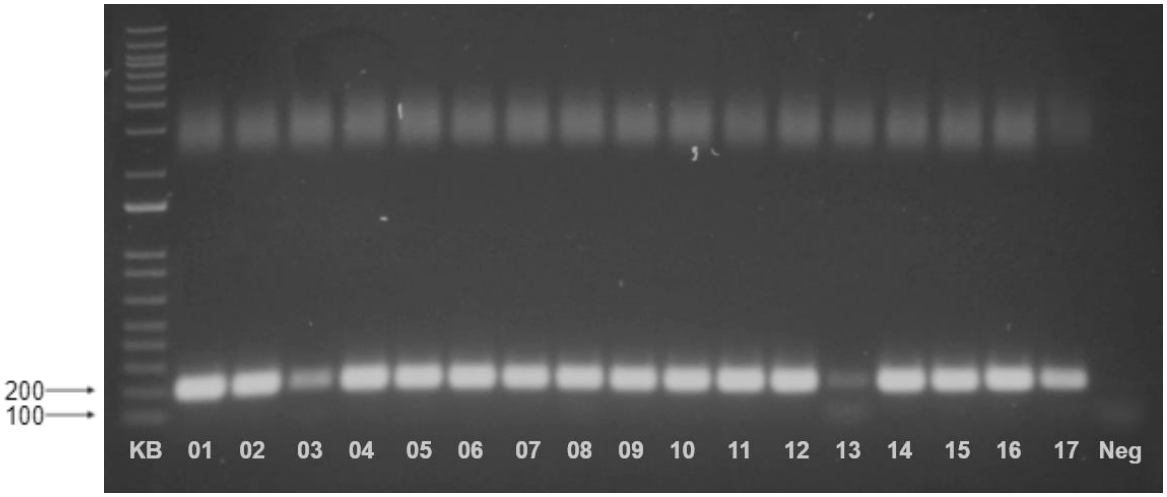

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA extraído de blastocistos D9 produzidos in vitro, com FIV de 8 horas de duração.

KB: Marcador de peso molecular DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher). 01 e 02: Embriões Controle; 03 e 04: Embriões Controle gRNA; 05 a 17: Embriões Cas9-12,5; Neg: Controle negativo da reação (sem DNA embrionário).

Após deliberar sobre as possíveis causas da baixa eficiência da edição genética nos embriões do grupo Cas9-12,5, seguimos com a hipótese de que as concentrações dos gRNAs foram insuficientes para a deleção de *NANOG*. Foram então testadas maiores concentrações dos gRNAs utilizados na injeção (80 ng/µL), conjuntamente com a enzima Cas9 (70 ng/µL), sendo este grupo denominado Cas9-80. O primeiro teste envolveu a injeção de 60 zigotos, que foram cultivados até o estágio de 8 células, no D4, quando foram submetidos à extração de DNA para que fosse detectada precocemente a eficiência de edição gênica nestas condições (Figura 9).

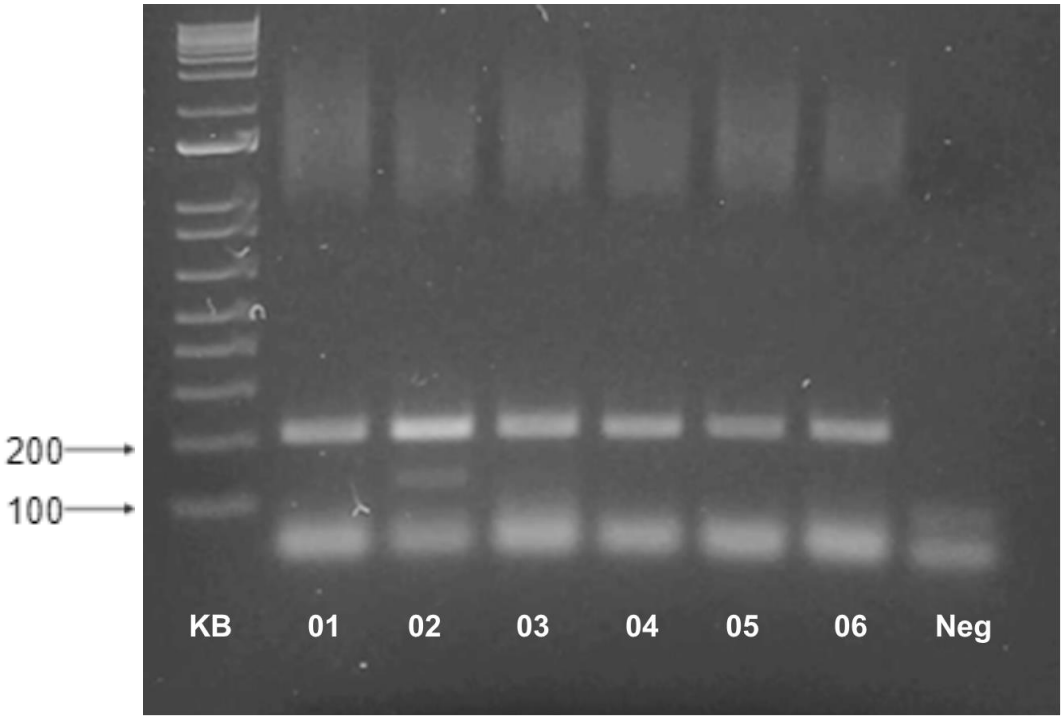

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% de DNA extraído de embriões 8-células produzidos in vitro, com FIV de 16 horas de duração.

KB: Marcador de peso molecular DNA Ladder (Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific). 01 a 06: Embriões Cas9-80; Neg: Controle negativo da reação (sem DNA embrionário). Embrião 02: banda esperada à altura de 102bp.

Dos 6 embriões Cas9-80 selecionados e testados, todos apresentaram apenas a banda correspondente ao peso controle (217 pb), exceto pelo embrião de número 2, que além da banda em 217 pb, também apresentou uma discreta banda à altura esperada de 102 pb, evidenciando a deleção heterozigótica de *NANOG* ou sugerindo mosaicismo, ou seja, que apenas algumas células sofreram a alteração genética, enquanto outras permaneceram inalteradas.

Todas as bandas foram excisadas dos géis apresentados acima (Figura 8 e Figura 9), e tiveram o DNA purificado com kit QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Algumas amostras foram submetidas ao Sequenciamento Sanger, na empresa Exxtend, para a verificação das sequências de DNA. Os resultados do sequenciamento permitiram o alinhamento das sequências e observa-se que as bandas do tamanho esperado do gene *wild-type* (217 pb) apresentaram a sequência idêntica àquela do Exon 2 do *NANOG* do GenBank. A sequência da banda esperada após deleção (102 pb) não apresentou alinhamento com as demais (Figura 10).

```
1 NANOG Exon 2     AGTCCTGATTCTTCCACAAGCCCCAGAGTGAAACCACTGTCCCCGTCTGTGGAGGAGAGCACAGAGAAGGAAG
2 Controle         AGTCCTGATTCTTCCACAAGCCCCAGAGTGAAACCACTGTCCCCGTCTGTGGAGGAGAGCACAGAGAAGGAAG
3 Cas9-80 2 217bp  AGTCCTGATTCTTCCACAAGCCCCAGAGTGAAACCACTGTCCCCGTCTGTGGAGGAGAGCACAGAGAAGGAAG
4 Cas9-80 2 102bp  GT-CCTGATTCTTCCACAAGCTTCCGAAGGAA-C-GCT----------G---AA----GC-------GGGAA-
5 Cas9-80 1 217bp  AGTCCTGATTCTTCCACAAGCCCCAGAGTGAAACCACTGTCCCCGTCTGTGGAGGAGAGCACAGAGAAGGAAG

1 NANOG Exon 2     AGACGGTCCCGGTCAAGAAACAAAAGATTAGAACTGTGTTCTCGCAGACCCAGCTGTGTGTGCTCAATGACAG
2 Controle         AGACGGTCCCGGTCAAGAAACAAAAGATTAGAACTGTGTTCTCGCAGACCCAGCTGTGTGTGCTCAATGACAG
3 Cas9-80 2 217bp  AGACGGTCCCGGTCAAGAAACAAAAGATTAGAACTGTGTTCTCGCAGACCCAGCTGTGTGTGCTCAATGACAG
4 Cas9-80 2 102bp  -------CTGGATTTACAAA-----CATT----------------------------G--GGCCCT------T
5 Cas9-80 1 217bp  AGACGGTCCCGGTCAAGAAACAAAAGATTAGAACTGTGTTCTCGCAGACCCAGCTGTGTGTGCTCAATGACAG
```

Figura 10: Alinhamento das sequências de DNA dos grupos Controle e Cas9-80 obtidas através de Sequenciamento Sanger.

(1) Sequência de DNA de referência do Exon 2 de NANOG do GenBank; (2) Sequenciamento de um embrião do grupo Controle; (3) Sequenciamento da banda de 217 pb do embrião 2 do grupo Cas9-80 (Figura 9); (4) Sequência de DNA extraída da banda de 102 pb do embrião 2 do grupo Cas9-80 (Figura 9); (5) Sequência de DNA extraída da banda de 217 pb do embrião 1 do grupo Cas9-80 (Figura 9).

3.4.4 Análise da expressão gênica por q-RT-PCR

Experimentos de q-RT-PCR foram realizados com os cDNAs sintetizados dos blastocistos “Controle” e “Cas9-80”, a fim de verificar a expressão dos fatores de transcrição NANOG e GATA6 em ambos os grupos. Foram analisados 5 embriões do grupo Controle e 12 embriões do grupo Cas9-80.

Uma vez que os embriões podem responder de maneira particular à micromanipulação e aos materiais injetados, foi considerada a possibilidade de haver deleções totais (homozigóticas) ou parciais (heterozigóticas) de *NANOG*. Os embriões estão sujeitos ainda a diferentes graus de mosaicismo, ou seja, podem apresentar variações na quantidade de células que sofreram edição gênica e células com perfil *wild-type.* Portanto, foi realizada inicialmente uma verificação individual da expressão proteica de NANOG e GATA6 nos blastocistos D9 dos grupos Controle e Cas9-80 (Figura 10). Não foi observada a ausência de expressão de *NANOG* em nenhum dos embriões, sugerindo que não há embriões homozigotos para a deleção de NANOG.

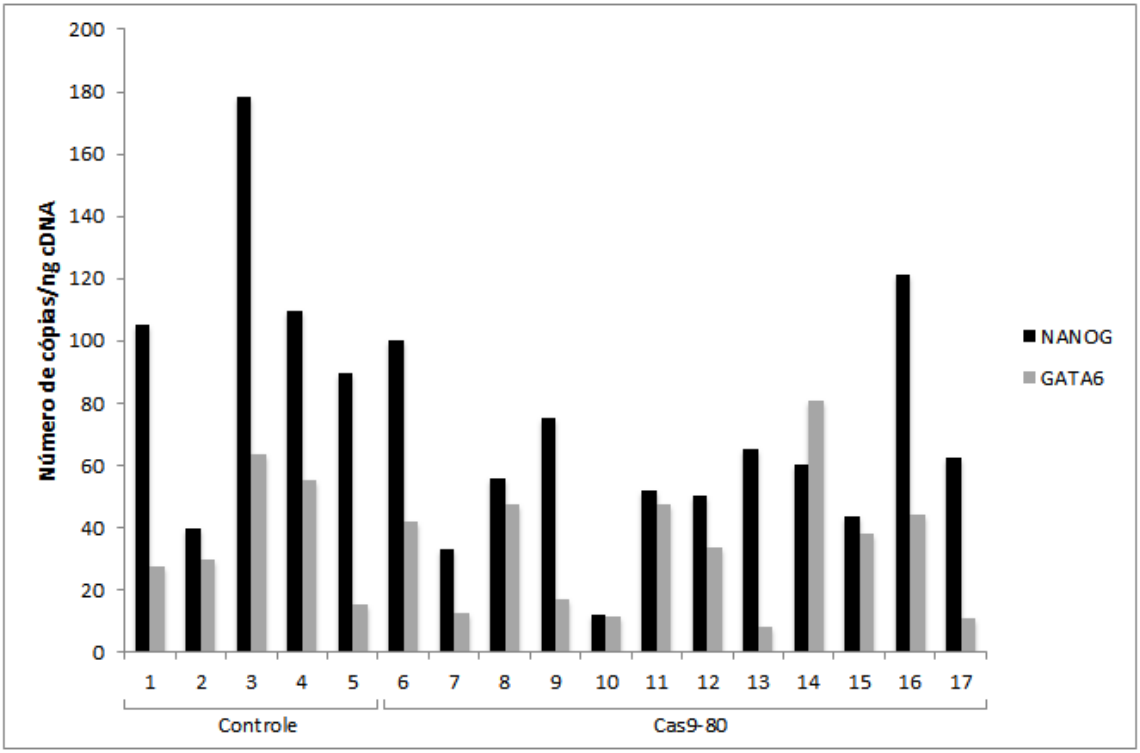

Figura 11: Gráficos da quantificação dos fatores de transcrição NANOG e GATA6 de embriões bovinos D9, em número de cópias por ng de cDNA de cada embrião avaliado.

Os dados obtidos por q-RT-PCR foram normalizados com o uso do software Realplex (Eppendorf) para a quantidade de cDNA (ng) que foi utilizada em cada reação, fornecendo o resultado final em número de cópias de NANOG (preto) ou GATA6 (cinza) por ng de cDNA. 1 a 5: Embriões do grupo Controle, não microinjetados. 6 a 17: Embriões do grupo Cas9-80, injetados com 80 ng/µL de gRNAs e 70 ng/µL de Cas9.

Foi feita então uma análise levando-se em consideração a média do número de cópias de NANOG ou GATA6 por ng de cDNA de cada grupo experimental, Controle e Cas9-80, considerando cada embrião como unidade experimental (Figura 11). Foi observada uma redução significativa (p=0.0360) da média do número de cópias por ng de cDNA de NANOG no grupo Cas9-80 (60,90 ± 10,27) em relação ao grupo Controle (104,54 ± 15,92). Estes resultados indicam que, apesar de não haver um bloqueio completo da transcrição gênica de NANOG no grupo Cas9-80, houve uma perturbação dos níveis de expressão de *NANOG* nestes embriões.

Curiosamente, a média do número de cópias por ng de cDNA de GATA6 do grupo Cas9-80 (26,48 ± 7,40) não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo Controle (41,70 ± 10,90) (p=0.1733).

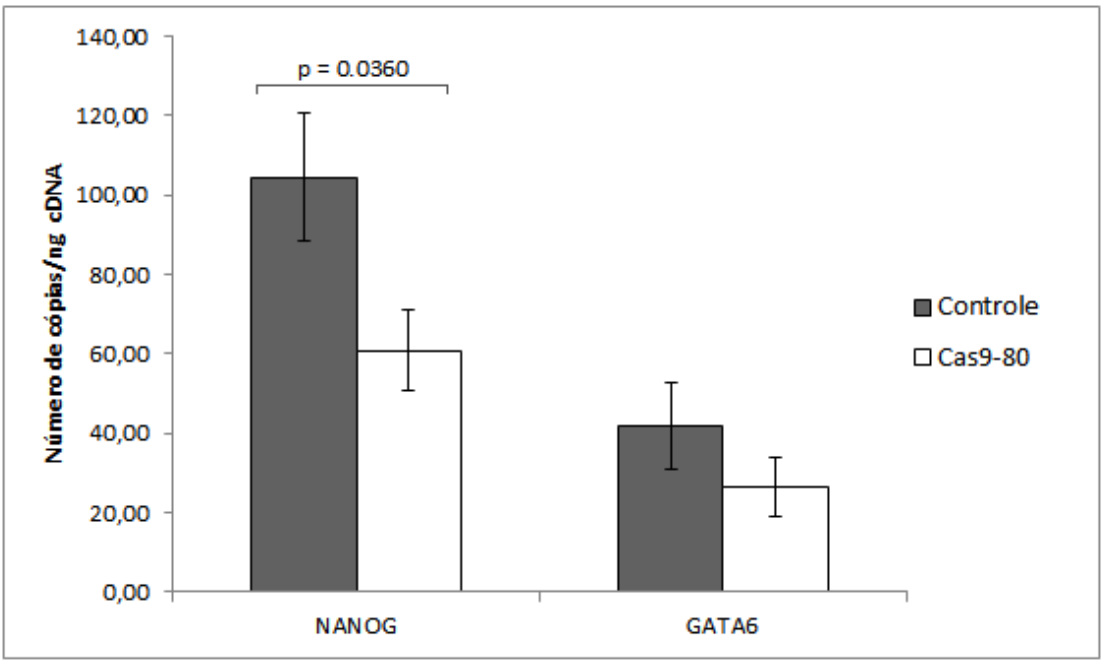

Figura 12: Média da quantificação do número de cópias dos fatores de transcrição NANOG e GATA6 por ng de cDNA dos grupos experimentais Controle (cinza) e Cas9-80 (branco).

3.5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos, apesar do padrão morfológico, apresenta variações genéticas e moleculares entre as espécies. Ainda que a grande maioria dos estudos em embriologia sejam realizados em modelos murinos, importantes semelhanças foram observadas entre bovinos e humanos (Kuijk et al., 2008; Kuijk et al., 2012). Por isso, um dos objetivos do presente estudo foi contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na segunda diferenciação celular em embriões bovinos pré-implantacionais.

Neste trabalho, o tratamento dos zigotos bovinos com a Cas9 e os gRNAs para *NANOG*, quando realizado em 8 hpi (Cas9-12,5), apresentou taxas de desempenho semelhantes ao grupo controle, sugerindo que o protocolo de micromanipulação nestes embriões não prejudicou o desenvolvimento embrionário e a formação de blastocistos. Entretanto, ao realizar o tratamento à 16 hpi e aumentar em 6,4 vezes a concentração dos gRNAs injetados (Cas9-80), houve uma redução significativa nas taxas de clivagem e de formação de blastocistos, quando comparados ao grupo controle.

Apesar deste resultado em 16 hpi, não houve redução significativa nas taxas de desenvolvimento embrionário em ambas as condições experimentais, o que indica que a possível redução dos níveis de NANOG nos embriões tratados com a enzima Cas9 não impediu o desenvolvimento de blastocistos. Esse achado corrobora com estudos anteriores que indicaram que a deleção de *NANOG* não prejudicou eventos embrionários como a compactação ou a formação da MCI (Artus, Chazaud, 2014; Ortega et al., 2019; Springer et al., 2021).

A eficiência do sistema de edição genética de *NANOG* foi verificada através do PCR com o DNA extraído dos blastocistos obtidos ao D9. A genotipagem dos embriões obtidos no grupo Cas9-12,5, cuja concentração de gRNAs injetados era de 12,5 ng/µL, evidenciou que diferentemente do resultado de Chu et al. (2016), tal concentração foi insuficiente para provocar uma disrupção na expressão de *NANOG* nos treze embriões testados. Após esse resultado, um aumento de 6,4 vezes na concentração dos gRNAs foi testado para as seguintes replicatas (grupo Cas9-80).

O PCR-teste para a verificação da eficiência de deleção na nova condição experimental foi realizado com seis embriões 8-células obtidos em D4, onde apenas o embrião 2 apresentou uma alteração bi-alélica para o gene alvo (16,67%). A deleção dos pares de base deste embrião foi confirmada através do sequenciamento pelo método Sanger. Outros estudos que provocaram deleções gênicas em embriões bovinos com o uso do sistema CRISPR/Cas9 obtiveram maiores eficiências de deleção (acima de 60%), considerando o número total de embriões avaliados (29 em Daigneault et al., 2018; 255 em Ortega et al., 2019). Ortega et al. testaram 3 diferentes combinações de gRNAs para o gene *NANOG,* verificando em uma delas a total ineficiência de deleção. Desta maneira, é possível também atribuir a baixa eficiência do sistema de deleção genética observada neste trabalho às sequências dos RNA guias ou possíveis *off-targets* (Fu et al., 2013; Ortega et al., 2019).

A análise da expressão gênica por q-RT-PCR permitiu uma avaliação mais robusta dos desdobramentos moleculares provocados pelo tratamento realizado no grupo experimental. Em relação ao grupo controle, foi verificada a redução do número de cópias de *NANOG* nos embriões do grupo Cas9-80, mas não um silenciamento total do gene. Apesar dos grupos não serem homogêneos, não é possível determinar com precisão a eficiência de perturbação da expressão do gene a nível individual nos embriões. Isso se deve ao fato de que cada embrião pode responder de uma maneira diferente ao tratamento com os gRNAs e Cas9, podendo haver dentro de um mesmo

grupo, embriões mosaicos com mais ou menos células editadas, diferentes quantidades de pares de bases deletados e, consequentemente, diferentes graus de perturbação da expressão gênica de *NANOG.* O mosaicismo é frequentemente relatado em trabalhos onde o sistema CRISPR é injetado diretamente em zigotos de diversas espécies (Hai et al., 2014; Crispo et al., 2015; Bevacqua et al., 2016; Noda et al., 2017), prejudicando estudos onde o objetivo é o *knock-out*, uma vez que os alelos *wild-type* podem interferir nos resultados e fenótipos obtidos. Em embriões bovinos, onde a replicação do DNA ocorre logo após a fertilização, a microinjeção do sistema CRISPR às 0hpi e 10hpi provocou uma importante redução das taxas de mosaicismo em relação ao protocolo de 20hpi (Lamas-Toranzo et al., 2019), mas ainda não foi o suficiente para prevenir completamente a formação de embriões mosaicos, um dos maiores desafios enfrentados atualmente no uso do CRISPR/Cas9 em zigotos.

A redução de *NANOG* no grupo Cas9-80 não resultou em alterações significativas na expressão de *GATA6,* sugerindo que a regulação de *GATA6* pode se dar de maneira independente de *NANOG* em embriões bovinos, como ocorre em camundongos (Frankenberg et al. 2011). Esse resultado confronta os achados de Ortega et al., onde a deleção de *NANOG* em bovinos provoca a redução de *GATA6* (Ortega et al., 2019).

É necessário considerar também que: (a) a redução da expressão de NANOG pode não ter sido suficiente para alterar a transcrição de *GATA6* nos embriões Cas9-80; (b) a presença de heterozigotos, em seus diferentes graus, pode influenciar na manutenção da expressão relativamente padrão de GATA6 nos embriões Cas9-80; (c) o mecanismo regulatório entre NANOG e GATA6 em embriões bovinos pode não ser mutuamente exclusivo (como observado em Kuijk et al., 2012; Canizo et al., 2019), de forma que a redução ou a ausência de NANOG não impacte positivamente ou negativamente a expressão de GATA6 e podendo haver outros gatilhos para a expressão de GATA6 nesses embriões.

Também em conflito com os resultados obtidos por Ortega et al. (2019), os achados de Springer et al. (2021) evidenciaram um aumento no número de células GATA6 positivas na MCI de embriões *knock-out* para *NANOG.* Estes resultados, bem como os resultados obtidos no presente estudo, evidenciam uma incerteza acerca das informações sobre a influência de *NANOG* na regulação de GATA6 e na formação do endoderma primitivo em embriões bovinos. Para sanar estas dúvidas e obter um

melhor entendimento do papel de GATA6 no desenvolvimento embrionário inicial, seria interessante também a realização de um estudo com foco na manipulação genética de *GATA6* em zigotos bovinos.

3.6. CONCLUSÃO

Foi possível realizar a edição gênica de *NANOG* em embriões bovinos com uso do sistema CRISPR/Cas9. Apesar da eficiência da edição esperada observada não ter sido alta, a técnica permitiu a redução da expressão gênica de *NANOG.* Diferentemente do esperado, não houve alteração na expressão de GATA6. Experimentos adicionais se fazem necessários, em especial a imunofluorescência para SOX17 nos embriões editados, para uma maior compreensão dos efeitos da deleção de *NANOG* no estabelecimento de populações celulares na MCI, bem como para promover o entendimento das vias envolvidas no segundo evento de diferenciação celular em embriões bovinos pré-implantacionais.

4. REFERÊNCIAS

ABERLE H., SCHWARTZ H., KEMLER R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. **J Cell Biochem**. 61(4):514–523. Jun 1996.

AKIZAWA H., NAGATOMO H., ODAGIRI H., KOHRI N., YAMAUCHI N., YANAGAWA Y., NAGANO M., TAKAHASHI M., KAWAHARA M. Conserved roles of fibroblast growth factor receptor 2 signaling in the regulation of inner cell mass development in bovine blastocysts. **Mol Reprod Dev.** 83(6):516–525. Jun 2016.

ALBERIO R. Regulation of cell fate decisions in early mammalian embryos. **Annu Rev Anim Biosci**. 8(1):377–393. Feb 2020.

ALEXANDRE H. A pioneer of experimental mammalian embryology: Jacques Mulnard. **Int J Dev Biol**. 36(1):25-7. Mar 1992.

ALEXANDRE H. A history of mammalian embryological research. **Int J Dev Biol**. 45(3):457-67. 2001.

ANJOS S. A. A., COSTA C. P., ASSUMPÇÃO M. E. O. A., VISINTIN J. A., GOISSIS M. D. Inhibition of apical domain formation does not block blastocyst development in bovine embryos. **Reprod Fertil Dev.** 33(10):665. Jun 2021.

ARTUS J., PILISZEK A., HADJANTONAKIS A. K. The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. **Dev Biol**. 15;350(2):393-404. Feb 2011.

ARTUS J., CHAZAUD C. A close look at the mammalian blastocyst: epiblast and primitive endoderm formation. **Cell Mol Life Sci.** 71(17):3327-38. Sep 2014.

AVILION A. A., NICOLIS S. K., PEVNY L. H., PEREZ L., VIVIAN N., LOVELL-BADGE R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev.** 17(1):126–140. Jan 2003.

BASSALERT C., VALVERDE-ESTRELLA L., CHAZAUD C. Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelialization. **Curr Top Dev Biol.** 128:81–104. Feb 2018.

BASSETT A. R., TIBBIT C., PONTING C. P., LIU J. L. Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system. **Cell Rep.** 11;4(1):220-8. Jul 2013.

BASSETT A., LIU J. L. CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in Drosophila. **Methods**. 69(2):128-36. Sep 2014.

BECK F., ERLER T., RUSSELL A., JAMES R. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. **Dev Dyn.** 204(3):219–227. Nov 1995.

BECKER D. L., DAVIES C. S. Role of gap junctions in the development of the preimplantation mouse embryo. **Microsc Res Tech.** 31(5):364–374. Aug 1995.

BERG D. K., SMITH C. S., PEARTON D. J., WELLS D. N., BROADHURST R., DONNISON M., PFEFFER P. L. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Dev Cell.** 20(2):244–255. Feb 2011.

BESSONNARD S., DE MOT L., GONZE D., BARRIOL M., DENNIS C., GOLDBETER A., DUPONT G., CHAZAUD C. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. **Development**. 141(19):3637-48. Oct 2014.

BEVACQUA R. J., FERNANDEZ-MARTÍN R., SAVY V., CANEL N. G., GISMONDI M. I., KUES W. A., CARLSON D. F., FAHRENKRUG S. C., NIEMANN H., TABOGA O. A., FERRARIS S., SALAMONE D. F. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. **Theriogenology**. 6(8):1886-1896.e1. Nov 2016.

BRACHET, J. Introduction to Molecular Embryology. **Springer New York, NY**. 1974

BRADLEY A., EVANS M., KAUFMAN M. H., ROBERTSON E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature.** 17-23;309(5965):255-6. May 1984.

BROWN J. J., WHITTINGHAM D. G. The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. **Development.** 112(1):99–105. May 1991.

CANIZO J. R., YNSAURRALDE RIVOLTA A. E., VAZQUEZ ECHEGARAY C., SUYÁ M., ALBERIO V., ALLER J. F., GUBERMAN A. S., SALAMONE D. F., ALBERIO R. H., ALBERIO R. A dose-dependent response to MEK inhibition determines hypoblast fate in bovine embryos. **BMC Dev Biol.** 19(1):13. Jul 2019.

CARLSON D. F., TAN W., LILLICO S. G., STVERAKOVA D., PROUDFOOT C., CHRISTIAN M., VOYTAS D. F., LONG C. R., WHITELAW C. B., & FAHRENKRUG S. C. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109: 17382-17387. Oct 2012.

CHAMBERS I., COLBY D., ROBERTSON M., NICHOLS J., LEE S., TWEEDIE S., SMITH A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell.** 113(5):643–655. May 2003.

CHANG M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature.** 184(Suppl 7):466-7. Aug 1959.

CHANG N., SUN C., GAO L., ZHU D., Xu X., ZHU X., XIONG J. W., XI J. J. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. **Cell Res**. 23(4):465-72. Apr 2013.

CHAZAUD C., YAMANAKA Y., PAWSON T., ROSSANT J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. **Dev Cell.** 10(5):615–624. May 2006.

CHEN A. E., EGLI D., NIAKAN K., DENG J., AKUTSU H., YAMAKI M., COWAN C., FITZ-GERALD C., ZHANG K., MELTON D. A., EGGAN K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. **Cell Stem Cell.** 4(2):103–106. Feb 2009.

CHEN J., ZHANG M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. **Exp Cell Res**. 319(10):1357–1364. Jun 2013.

CHEN L., YABUUCHI A., EMINLI S., TAKEUCHI A., LU C. W., HOCHEDLINGER K., DALEY G. Q. Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. **Cell Res**. 19(9):1052–1061. Sep 2009.

CHI F., SHARPLEY M. S., NAGARAJ R., Roy S. S., BANERJEE U. Glycolysis-independent glucose metabolism distinguishes TE from ICM fate during mammalian embryogenesis. **Dev Cell.** 53(1):9–26.e4. Apr 2020.

CHU V. T., WEBER T., GRAF R., SOMMERMANN T., PETSCH K., SACK U., VOLCHKOV P., RAJEWSKY K., KÜHN R. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. **BMC Biotechnol.** 16:4. Jan 2016.

COCKBURN K., ROSSANT J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **J Clin Invest.** 120(4):995–1003. Apr 2010.

CONG L., RAN F. A., COX D., LIN S., BARRETTO R., HABIB N., HSU P. D., WU X., JIANG W., MARRAFFINI L. A., ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science.** 339(6121):819-23. Feb 2013.

CRISPO M., MULET A. P., TESSON L., BARRERA N., CUADRO F., DOS SANTOS-NETO P. C., NGUYEN T. H., CRÉNÉGUY A., BRUSSELLE L., ANEGÓN I., MENCHACA A. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. **PLoS One.** 10, e0136690. Aug 2015.

DAIGNEAULT B. W., RAJPUT S., SMITH G. W., ROSS P. J. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Sci Rep**. 17;8(1):7753. May 2018.

DAIGNEAULT B. W., VILARINO M., RAJPUT S. K., FRUM T., SMITH G. W., ROSS P. J. CRISPR editing validation, immunostaining and DNA sequencing of individual fixed bovine embryos. **Biotechniques.** 65(5):281-283. Nov 2018.

DALCQ, A. M. Introduction to general embryology. **Oxford University Press.** London. 1957.

DOETSCHMAN T., GREGG R. G., MAEDA N., HOOPER M. L., MELTON D. W., THOMPSON S., SMITHIES O. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. **Nature.** 330(6148):576-8. Dec 1987.

EVANS M. J., KAUFMAN M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature.** 292(5819):154-6. Jul 1981.

FLEMING T. P., JOHNSON M. H. From egg to epithelium. **Annu Rev Cell Biol.** 4(1):459–485. Nov 1988.

FLEMING T. P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Dev Biol.** 119(2):520–531. Feb 1987.

FOGARTY N. M. E., MCCARTHY A, SNIJDERS K. E., POWELL B. E., KUBIKOVA N., BLAKELEY P., LEA R., ELDER K., WAMAITHA S. E., KIM D., MACIULYTE V., KLEINJUNG J., KIM J. S., WELLS D., VALLIER L., BERTERO A., TURNER J. M. A., NIAKAN K. K. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. **Nature.** 550(7674):67–73. Oct 2017.

FRANKENBERG S., GERBE F., BESSONNARD S., BELVILLE C., POUCHIN P., BARDOT O., CHAZAUD C. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. **Dev Cell**. 21(6):1005-13. Dec 2011.

FRUM T., HALBISEN M. A., WANG C., AMIRI H., ROBSON P., RALSTON A. Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. **Dev. Cell***.* 25, 610–622. Jun 2013.

FRUM T., WATTS J. L., RALSTON A. TEAD4, YAP1 and WWTR1 prevent the premature onset of pluripotency prior to the 16-cell stage. **Development.** 146(17):dev179861. Sep 2019.

FU Y., FODEN J. A., KHAYTER C., MAEDER M. L., REYON D., JOUNG J. K., SANDER J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nat Biotechnol**. 31(9):822-6. Sep 2013.

FUJIHARA Y., IKAWA M. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. **Methods Enzymol.** 546:319-36. 2014.

FUJII W., ONUMA A., SUGIURA K., NAITO K. One-step generation of phenotype-expressing triple-knockout mice with heritable mutated alleles by the CRISPR/Cas9 system. **J Reprod Dev.** 60(4):324-7. May 2014.

FUJIKURA J., YAMATO E., YONEMURA S., HOSODA K., MASUI S., NAKAO K., MIYAZAKI J., NIWA H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. **Genes Dev.** 16(7):784–789. Apr 2002.

GARDNER D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture**. Theriogenology.** 49(1):83–102. Jan 1998.

GERRI C., MCCARTHY A., ALANIS-LOBATO G., DEMTSCHENKO A., BRUNEAU A., LOUBERSAC S., FOGARTY N. M. E., HAMPSHIRE D., ELDER K., SNELL P., CHRISTIE L., DAVID L., VAN DE VELDE H., FOULADI-NASHTA A. A., NIAKAN K. K. Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. **Nature.** 587(7834):443–447. Nov 2020.

GIM G. M., KWON D. H., EOM K. H., MOON J., PARK J. H., LEE W. W., JUNG D. J., KIM D. H., YI J. K., HA J. J., LIM K. Y., KIM J. S., JANG G. Production of MSTN-mutated cattle without exogenous gene integration using CRISPR-Cas9. **Biotechnol J**. e2100198. Jul 2021.

GOISSIS M. D., CIBELLI J. B. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. **Biol Reprod.** 90(2):30. Feb 2014.

GOISSIS M. D., CIBELLI J. B. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. **Mol Reprod Dev**. 81(10):962–970. Oct 2014.

GRAHAM C. F., DEUSSEN Z. A. Features of cell lineage in preimplantation mouse development. **J Embryol Exp Morphol.** 48(1):53–72. Dec 1978.

GUO G., HUSS M., TONG G. Q., WANG C., LI SUN L., CLARKE N. D., ROBSON P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. **Dev Cell.** 18(4):675–685. Apr 2010.

HAI T., TENG F., GUO R., Li W., ZHOU Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. **Cell Res**. 24(3):372-5. Mar 2014.

HARRIS D., HUANG B., OBACK B. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors. **Biol Reprod.** 88(3):74. Mar 2013.

HAUSCHILD J., PETERSEN B., SANTIAGO Y., QUEISSER A. L., CARNWATH J. W., LUCAS-HAHN A., ZHANG L., MENG X., GREGORY P. D., SCHWINZER R.,

COST G. J., NIEMANN H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 108: 12013-12017. Jul 2011.

HENNIG S. L., OWEN J. R., LIN J. C., YOUNG A. E., ROSS P. J., VAN EENENNAAM A. L., MURRAY J. D. Evaluation of mutation rates, mosaicism and off target mutations when injecting Cas9 mRNA or protein for genome editing of bovine embryos. **Sci Rep**. 10(1):22309. Dec 2020.

HWANG W. Y., FU Y., REYON D., MAEDER M. L., TSAI S. Q., SANDER J. D., PETERSON R. T., YEH J. R., JOUNG J. K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nat Biotechnol.** 31(3):227-9. Mar 2013.

ISHINO Y., SHINAGAWA H., MAKINO K., AMEMURA M., NAKATA A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **J Bacteriol**. 169(12):5429-33. Dec 1987.

JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I., HAUER M., DOUDNA J. A., CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. 337(6096):816-21. Aug 2012.

JINEK M., EAST A., CHENG A., LIN S., MA E., DOUDNA J. RNA-programmed genome editing in human cells. **Elife**. 2:e00471. Jan 2013.

JOHNSON M. H., MCCONNELL J. M. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. **Semin Cell Dev Biol.** 15(5):583–597. Oct 2004.

JOHNSON M. H., ZIOMEK C. A. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. **Cell.** 24(1):71–80. Apr 1981.

JOHNSON M. H. From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 25(1):483–512. Jul 2009.

JOHNSON M. T., MAHMOOD S., PATEL M. S. Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis**. J Biol Chem**. 278(34):31457–31460. Aug 2003.

KANEKO K.J., DEPAMPHILIS M. L. TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. **Development**. 140(17):3680–3690. Sep 2013.

KANG M., PILISZEK A., ARTUS J., HADJANTONAKIS A. K. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. **Development.** 140(2):267–279. Jan 2013.

KERAMARI M., RAZAVI J., INGMAN K. A., PATSCH C., EDENHOFER F., WARD C. M., KIMBER S. J. Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. **PLoS One.** 5(11):e13952. Nov 2010.

KIDDER G. M., WATSON A. J. Roles of Na,K-ATPase in early development and trophectoderm differentiation. **Semin Nephrol.** 25(5):352–355. Sep 2005.

KIM S. H., KIM M. O., CHO Y. Y., YAO K., KIM D. J., JEONG C. H., YU D. H., BAE K. B., CHO E. J., JUNG S. K., LEE M. H., CHEN H., KIM J. Y., BODE A. M., DONG Z. ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. **Stem Cell Res.** 13(1):1–11. Jul 2014.

KIRCHHOF N., CARNWATH J. W., LEMME E., ANASTASSIADIS K., SCHÖLER H., NIEMANN H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biol Reprod**. 63(6):1698–1705. Dec 2000.

KOROTKEVICH E., NIWAYAMA R., COURTOIS A., FRIESE S., BERGER N., BUCHHOLZ F., HIIRAGI T. The apical domain is required and sufficient for the first lineage segregation in the mouse embryo. **Dev Cell**. 40(3):235–247.e7. Feb 2017.

KUIJK E. W., DU PUY L., VAN TOL H. T., OEI C. H., HAAGSMAN H. P., COLENBRANDER B., ROELEN B. A. Differences in early lineage segregation between mammals. **Dev Dyn.** 237(4):918-27. Apr 2008.

KUIJK E. W., VAN TOL L. T. A., VAN DE VELDE H., WUBBOLTS R., WELLING M., GEIJSEN N., ROELEN B. A. J. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. **Development.** 139(5):871–882. Mar 2012.

KWON J., NAMGOONG S., KIM N. H. CRISPR/Cas9 as tool for functional study of genes involved in preimplantation embryo development. **PLoS One**. 10(3):e0120501. Mar 2015.

LAMAS-TORANZO I., GALIANO-COGOLLUDO B., CORNUDELLA-ARDIACA F., COBOS-FIGUEROA J., OUSINDE O., BERMEJO-ÁLVAREZ P. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. **Sci Rep.** 9(1):14900. Oct 2019.

LAMAS-TORANZO I., MARTÍNEZ-MORO A., O CALLAGHAN E., MILLÁN-BLANCA G., SÁNCHEZ J. M., LONERGAN P., BERMEJO-ÁLVAREZ P. RS-1 enhances CRISPR-mediated targeted knock-in in bovine embryos. **Mol Reprod Dev.** 87(5):542-549. May 2020.

LE BIN G. C., MUÑOZ-DESCALZO S., KUROWSKI A., LEITCH H., LOU X., MANSFIELD W., ETIENNE-DUMEAU C., GRABOLE N., MULAS C., NIWA H., HADJANTONAKIS A. K., NICHOLS J. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. **Development.** 141(5):1001-10. Mar 2014.

LIM H. Y. G., ALVAREZ Y. D., GASNIER M., WANG Y., TETLAK P., BISSIERE S., WANG H., BIRO M., PLACHTA N. Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo. **Nature.** 585(7825):404–409. Sep 2020.

LO C. W., GILULA N. B. Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. **Cell.** 18(2):399–409. Oct 1979.

LOUVET S., AGHION J., SANTA-MARIA A., MANGEAT P., MARO B. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. **Dev Biol.** 177(2):568–579. Aug 1996.

MADEIRA F., PARK Y. M., LEE J., BUSO N., GUR T., MADHUSOODANAN N., BASUTKAR P., TIVEY A. R. N., POTTER S. C., FINN R. D., LOPEZ R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research.** V. 47, (W1):W636-W641. Jul 2019.

MADEJA Z. E., SOSNOWSKI J., HRYNIEWICZ K., WARZYCH E., PAWLAK P., ROZWADOWSKA N., PLUSA B., LECHNIAK D. Changes in sub-cellular localization of trophoblast and inner cell mass-specific transcription factors during bovine preimplantation development. **BMC Dev Biol.** 13(1):32. Aug 2013.

MAÎTRE J. L., TURLIER H., ILLUKKUMBURA R., EISMANN B., NIWAYAMA R., NÉDÉLEC F., HIIRAGI T. Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification**. Nature.** 536(7616):344–348. Aug 2016.

MALI P., YANG L., ESVELT K. M., AACH J., GUELL M., DICARLO J. E., NORVILLE J. E., CHURCH G. M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**. 15;339(6121):823-6. Feb 2013.

MARTIN G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 78(12):7634-8. Dec 1981.

MASHIKO D., YOUNG S. A., MUTO M., KATO H., NOZAWA K., OGAWA M., NODA T., KIM Y. J., SATOUH Y., FUJIHARA Y., IKAWA M. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. **Dev Growth Differ.** 56(1):122-9. Jan 2014.

MCLAREN A., BIGGERS J. D. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early as early embryos. **Nature**. 27;182(4639):877-8. Sep 1958.

MCLEAN Z., MENG F., HENDERSON H., TURNER P., OBACK B. Increased MAP kinase inhibition enhances epiblast-specific gene expression in bovine blastocysts. **Biol Reprod.** 91(2):49. Aug 2014.

MISRA J. R., IRVINE K. D. The hippo signaling network and its biological functions. **Annu Rev Genet.** 52(1):65–87. Nov 2018.

MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., SEGAWA K., MURAKAMI M., TAKAHASHI K., MARUYAMA M., MAEDA M., YAMANAKA S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell.** 113(5):631-42. May 2003.

MOLOTKOV A., MAZOT P., BREWER J. R., CINALLI R. M., SORIANO P. Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency. **Dev Cell**. 41(5):511–526.e4. Jun 2017.

MORRIS S. A., TEO R. T., LI H., ROBSON P., GLOVER D. M., ZERNICKA-GOETZ M. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107(14):6364-9. Apr 2010.

MÜLLER U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. **Mech Dev.** (1-2):3-21. Apr 1999.

MULNARD, J. Problèmes de structure et d'organisation morphogénétique de l'œuf de mammifères. **Symp. On Germ Cells and Develop. Pallanza**, pp. 639- 688. 1960.

MURILLO-GONZÁLEZ J. Evolution of embryology: a synthesis of classical, experimental, and molecular perspectives. **Clin Anat.** 14(2):158-63. 2001.

NAKATA A., AMEMURA M., MAKINO K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the Escherichia coli K-12 chromosome. **J Bacteriol**. 171(6):3553-6. Jun 1989.

NEGRÓN-PÉREZ V. M., HANSEN P. J. Role of yes-associated protein 1, angiomotin, and mitogen-activated kinase kinase 1/2 in development of the bovine blastocyst. **Biol Reprod.** 98(2):170–183. Feb 2018.

NIAKAN K. K., EGGAN K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. **Dev Biol.** 375(1):54–64. Mar 2013.

NICHOLS J., ZEVNIK B., ANASTASSIADIS K., NIWA H., KLEWE-NEBENIUS D., CHAMBERS I., SCHÖLER H., SMITH A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4**. Cell***.* 95, 379–391. Oct 1998.

NISHIOKA N., INOUE K., ADACHI K., KIYONARI H., OTA M., RALSTON A., YABUTA N., HIRAHARA S., STEPHENSON R. O., OGONUKI N., MAKITA R., KURIHARA H., MORIN-KENSICKI E. M., NOJIMA H., ROSSANT J., NAKAO K., NIWA H., SASAKI H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. **Dev Cell.** 16(3):398–410. Mar 2009.

NISHIOKA N., YAMAMOTO S., KIYONARI H., SATO H., SAWADA A., OTA M., NAKAO K., SASAKI H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. **Mech Dev**. 125(3-4):270-83. Mar 2008.

NIWA H., MIYAZAKI J., SMITH A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat Genet.** 24(4):372–376. Apr 2000.

NIWA H., TOYOOKA Y., SHIMOSATO D., STRUMPF D., TAKAHASHI K., YAGI R., ROSSANT J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. **Cell.** 123(5):917–929. Dec 2005.

NODA T., OJI A., IKAWA M. Genome editing in mouse zygotes and embryonic stem cells by introducing sgRNA/Cas9 expressing plasmids. **Methods Mol Biol.** 1630, 67–80. Jun 2017.

ORTEGA M. S., KELLEHER A. M., O'NEIL E., BENNE J., CECIL R., SPENCER T. E. NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. **Mol Reprod Dev**. 87(1):152-160. Jan 2020.

OWEN J. R., HENNIG S. L., MCNABB B. R., LIN J. C., YOUNG A. E., MURRAY J. D., ROSS P. J., VAN EENENNAAM A. L. Harnessing endogenous repair mechanisms for targeted gene knock-in of bovine embryos. **Sci Rep.** 10(1):16031. Sep 2020.

OWEN J. R., HENNIG S. L., MCNABB B. R., MANSOUR T. A., SMITH J. M., LIN J. C., YOUNG A. E., TROTT J. F., MURRAY J. D., DELANY M. E., ROSS P. J., VAN EENENNAAM A. L. One-step generation of a targeted knock-in calf using the CRISPR-Cas9 system in bovine zygotes. **BMC Genomics**. 22(1):118. Feb 2021.

OZAWA M., YANG Q. E., EALY A. D. The expression of fibroblast growth factor receptors during early bovine conceptus development and pharmacological analysis of their actions on trophoblast growth in vitro. **Reproduction.** 145(2):191–201. Jan 2013.

PESCE M., SCHÖLER H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**. 19(4):271–278. Jul 2001.

PLUSA B., FRANKENBERG S., CHALMERS A., HADJANTONAKIS A. K., MOORE C. A., PAPALOPULU N., PAPAIOANNOU V. E., GLOVER D. M., ZERNICKA-GOETZ M. Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. **J Cell Sci.** 118(Pt 3):505–515. Feb 2005.

PLUSA B., PILISZEK A., FRANKENBERG S., ARTUS J., HADJANTONAKIS A. K. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. **Development**. 135(18):3081–3091. Sep 2008.

POSFAI E., PETROPOULOS S., BARROS F. R. O., SCHELL J. P., JURISICA I., SANDBERG R., LANNER F., ROSSANT J. Position- and Hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early mouse embryo. **eLife.** 6:e22906. Feb 2017.

PROUDFOOT C., CARLSON D. F., HUDDART R., LONG C. R., PRYOR J. H., KING T. J., LILLICO S. G., MILEHAM A. J., MCLAREN D. G., WHITELAW C. B., FAHRENKRUG S. C. Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Res.** 24:147–53. Feb 2015.

RALSTON A., ROSSANT J. Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. **Clin Genet.** 68(2):106–112. Aug 2005.

RALSTON A., COX B. J., NISHIOKA N., SASAKI H., CHEA E., RUGG-GUNN P., GUO G., ROBSON P., DRAPER J. S, ROSSANT J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. **Development.** 137, 395–403. Feb 2010.

ROSSANT J. Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. **J Embryol Exp Morphol**. 33(4):991–1001. Jul 1975.

ROSSANT J., NAGY A. Genome engineering: the new mouse genetics. **Nat Med.** 1(6):592-4. Jun 1995.

ROSSANT J., CHAZAUD C., YAMANAKA Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 358(1436):1341–8, discussion 1349. Aug 2003.

RUANE P. T., TAN C. M. J., ADLAM D. J., KIMBER S. J., BRISON D. R., APLIN J. D., WESTWOOD M. Protein O-GlcNAcylation promotes trophoblast differentiation at implantation. **Cells.** 9(10):2246. Oct 2020.

SAKURAI N., TAKAHASHI K., EMURA N., HASHIZUME T., SAWAI K. Effects of downregulating TEAD4 transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos. **J Reprod Dev.** 63(2):135–142. Apr 2017.

SCHÖLER H. R., DRESSLER G. R., BALLING R., ROHDEWOHLD H., GRUSS P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. **EMBO J.** 9(7):2185–2195. Jul 1990.

SCHRODE N., SAIZ N., DI TALIA S., HADJANTONAKIS A. K. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. **Dev Cell.** 29(4):454–467. May 2014.

SEBO Z. L., LEE H. B., PENG Y., GUO Y. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for Drosophila genomic engineering. **Fly.** 8(1):52-57. Jan 2014.

SHARMA J., MADAN P. Characterisation of the Hippo signalling pathway during bovine preimplantation embryo development. **Reprod Fertil Dev**. 32(4):392–401. Feb 2020.

SHENG G. Epiblast morphogenesis before gastrulation. **Dev Biol.** 401(1):17–24. May 2015.

SOSZYNSKA A., KLIMCZEWSKA K., SUWINSKA A. FGF/ERK signaling pathway: how it operates in mammalian preimplantation embryos and embryo-derived stem cells. **Int J Dev Biol.** 63(3-5):171–186. 2019.

SPRINGER C., ZAKHARTCHENKO V., WOLF E., SIMMET K. Hypoblast Formation in Bovine Embryos Does Not Depend on NANOG. **Cells.** 28;10(9):2232. Aug 2021.

STRUMPF D., MAO C. A., YAMANAKA Y., RALSTON A., CHAWENGSAKSOPHAK K., BECK F., ROSSANT J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. **Development.** 132(9):2093-102. May 2005.

TAN M. H., AU K. F., LEONG D. E., FOYGEL K., WONG W. H., YAO M. W. An Oct4-Sall4-Nanog network controls developmental progression in the pre-implantation mouse embryo. **Mol Syst Biol.** 9:632. Jan 2013.

TARKOWSKI A. K., WRÓBLEWSKA J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. **J Embryol Exp Morphol.** 18(1):155–180. Aug 1967.

THOMAS K. R., CAPECCHI M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell.** 51(3):503-12. Nov 1987.

THOMPSON S., CLARKE A. R., POW A. M., HOOPER M. L., MELTON D. W. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. **Cell.** 56(2):313-21. Jan 1989.

UNDERHILL L. A., ROBINS J. C. Trophoblast development in the murine preimplantation embryo. **Semin Reprod Med.** 34(1):57–62. Jan 2016.

VAN BENEDEN, E., JULIN, C. H. Observations sur la maturation, la fécondation et la segmentation de l'oeuf chez les Chéiroptères. **Arch. Biol.** 1: 551-571. 1880.

VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., MAHMOUDZADEH A. R., DELUYKER H., DE KRUIF A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**. 38(5):905–919. Nov 1992.

VAN SOOM A., BOERJAN M. L., BOLS P. E., VANROOSE G., LEIN A., CORYN M., DE KRUIF A. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. **Biol Reprod**. 57(5):1041–1049. Nov 1997.

VINOT S., LE T., OHNO S., PAWSON T., MARO B., LOUVET-VALLÉE S. Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. **Dev Biol.** 282(2):307–319. Jun 2005.

WANG H., YANG H., SHIVALILA C. S., DAWLATY M. M., CHENG A. W., ZHANG F., JAENISCH R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell.** 153(4):910-8. May 2013.

WANG S., YI F., QU J. Eliminate mitochondrial diseases by gene editing in germ-line cells and embryos. **Protein Cell**. 6(7):472-5. Jul 2015.

WANG X., ZHOU J., CAO C., HUANG J., HAI T., WANG Y., ZHENG Q., ZHANG H., QIN G., MIAO X., WANG H., CAO S., ZHOU Q., ZHAO J. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. **Sci Rep.** 5:13348. Aug 2015.

WANG Y., WANG F., SUN T., TROSTINSKAIA A., WYGLE D., PUSCHECK E., RAPPOLEE D. A. Entire mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway is present in preimplantation mouse embryos. **Dev Dyn.** 231(1):72–87. Sep 2004.

WANG Y., ZHENG X., CHENG R., HAN J., MA X., XU W., GAO L., LEI A., LIU J., QUAN F., ZHANG Y., LIU X. Asymmetric expression of maternal mRNA governs first cell-fate decision. **FASEB J.** 35(11):e22006. Nov 2021.

WATSON A. J., WESTHUSIN M. E., DE SOUSA P. A., BETTS D. H., BARCROFT L. C. Gene expression regulating blastocyst formation. **Theriogenology.** 51(1):117–133. Jan 1999.

WEI J., WAGNER S., LU D., MACLEAN, P., CARLSON, D. F., FAHRENKRUG, S. C., LAIBLE, G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. **Sci Rep.** 5:11735. Jul 2015.

WEI Q., ZHONG L., ZHANG S., MU H., XIANG J., YUE L., DAI Y., HAN J. Bovine lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. **Biol Reprod.** 97(1):5–17. Jul 2017.

WHITE M. D., ANGIOLINI J. F., ALVAREZ Y. D., KAUR G., ZHAO Z. W., MOCSKOS E., BRUNO L., BISSIERE S., LEVI V., PLACHTA N. LONG-lived binding of Sox2 to DNA predicts cell fate in the four-cell mouse embryo. **Cell.** 165(1):75–87. Mar 2016.

WHITWORTH K. M., LEE K., BENNE J. A., BEATON B. P., SPATE L. D., MURPHY S. L., SAMUEL M. S., MAO J., O'GORMAN C., WALTERS E. M., MURPHY C. N., DRIVER J., MILEHAM A., MCLAREN D., WELLS K. D., PRATHER R. S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. **Biol Reprod.** 91(3):78. Sep 2014.

WICKLOW E., BLIJ S., FRUM T., HIRATE Y., LANG R. A., SASAKI H., RALSTON A. HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. **PLoS Genet.** 10(10):e1004618. Oct 2014.

WRENZYCKI C. Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: past highlights, present concepts and future prospects. **Reprod Domest Anim.** 53(Suppl 2):14–19. Sep 2018.

WU G., GENTILE L., FUCHIKAMI T., SUTTER J., PSATHAKI K., ESTEVES T. C., ARAÚZO-BRAVO M. J., ORTMEIER C., VERBERK G., ABE K., SCHÖLER H. R. Initiation of trophectoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. **Development.** 137(24):4159–4169. Dec 2010.

XIAO Y., UH K., NEGRÓN-PÉREZ V. M., HAINES H., LEE K., HANSEN P. J. Regulation of gene expression in the bovine blastocyst by colony-stimulating factor 2 is disrupted by CRISPR/Cas9-mediated deletion of CSF2RA. **Biol Reprod.** 104(5):995-1007. May 2021.

XIE D., CHEN C. C., PTASZEK L. M., XIAO S., CAO X., FANG F., NG H. H., LEWIN H. A., COWAN C., ZHONG S. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. **Genome Res**. 20(6):804–815. Jun 2010.

YAGI R., KOHN M. J., KARAVANOVA I., KANEKO K. J., VULLHORST D., DEPAMPHILIS M. L., BUONANNO A. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. **Development.** 134(21):3827–3836. Nov 2007.

YAMANAKA Y., LANNER F., ROSSANT J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. **Development**. 137(5):715–724. Mar 2010.

YAMANAKA Y., RALSTON A., STEPHENSON R. O., ROSSANT J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. **Dev Dyn.** 235(9):2301–2314. Sep 2006.

YANG Q. E., Fields S. D., ZHANG K., OZAWA M., JOHNSON S. E., EALY A. D. Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocyst outgrowths. **Biol Reprod.** 85(5):946–953. Nov 2011.

YU S., LUO J., SONG Z., DING F., DAI Y., LI N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. **Cell Res.** 21(11):1638-40. Nov 2011.

YUAN H., CORBI N., BASILICO C., DAILEY L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. **Genes Dev**. 9(21):2635-45. Nov 1995.

YUM S. Y., YOUN K. Y., CHOI W. J., JANG G. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific. **J Anim Sci Biotechnol.** 9:16. Jan 2018.

ZHOU J., SHEN B., ZHANG W., WANG J., YANG J., CHEN L., ZHANG N., ZHU K., XU J., HU B., LENG Q., HUANG X. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. **Int J Biochem Cell Biol**. 46:49-55. Jan 2014.

ANEXOS

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,Departamento de Reprodução Animal, São Paulo – SP

DECLARAÇÃO DE USO – CONTEÚDO CIENTÍFICO

São Paulo, 25 de abril de 2022.

Declaramos para os devidos fins, que o artigo de revisão intitulado "**Eventos de diferenciação celular em embriões bovinos e murinos pré-implantacionais**" (*Cell differentiation events in pre-implantation mouse and bovine embryos*), publicado na revista *Animal Reproduction* em 7 de janeiro de 2022 (PMID: 35035540 PMCID: PMC8747937 DOI: 10.1590/1984-3143-AR2021-0054), durante o período do curso de mestrado da aluna Letícia Escobar Carreiro (Nº USP 11521965), não será utilizado em outra dissertação ou tese, sendo de uso exclusivo para a presente dissertação de mestrado.

Declaramos ainda que a primeira autora do artigo de revisão é a aluna responsável por esta dissertação.

Cientes e de acordo com o exposto acima:

Letícia Escobar Carreiro – 1ª Autora

Gabriel Siqueira dos Santos – 2º Autor

Felipe Eduardo Luedke – 3º Autor

Marcelo Demarchi Goissis – 4º Autor