

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

TRANSCRIÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Ricardo Perecin Nociti
Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

TRANSCRIÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Discente: Ricardo Perecin Nociti.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Coorientador: Prof. Dr. Pablo Juan Ross

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal

2018

N631t Nociti, Ricardo Perecin
Transcrição em embriões bovinos produzidos *in vitro* / Ricardo
Perecin Nociti. -- Jaboticabal, 2018
xviii, 100 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Coorientador: Pablo Juan Ross

Banca examinadora: Flávio Vieira Meirelles, Nedenia Bonvino
Stafuzza, Rafael Vilar Sampaio, Lindsay Unno Gimenes

Bibliografia

1. Transcriptoma. 2. Embriões. 3. Bovinos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de
Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TRANSCRIÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*


AUTOR: RICARDO PERECIN NOCITI


ORIENTADORA: VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

COORIENTADOR: PABLO JUAN ROSS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP


Pós-doutoranda NEDENIA BONVINO STAFUZZA
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RAFAEL VILAR SAMPAIO
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP


Prof. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ricardo Perecin Nociti – Nascido na cidade de Jaboticabal no Estado de São Paulo, em 21 de Julho de 1985, filho de Batista Nociti Junior e Darci Lara Perecin Nociti. Ingressou em Fevereiro de 2006 no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Foi bolsista de iniciação científica da FAPESP no período de Outubro de 2008 a Setembro de 2009 no laboratório de apoio a pesquisa do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária sob orientação do Professor Dr. José Jurandir Fagliari, em 2010 foi bolsista de monitoria da disciplina de Semiologia Veterinária, em 2010 cursou o estágio obrigatório de conclusão de curso na Universidade Estadual de Ohio, EUA, sob supervisão do Professor Dr. Carlos Roberto Fontes Pinto no setor de Clínica, Cirurgia e Reprodução de Animais de Produção, graduando-se em Medicina Veterinária em Fevereiro de 2011. Em Julho de 2012 completou a Especialização em Gestão de Sistemas de Produção Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP. Em Julho de 2014 completou o Mestrado em Medicina Veterinária com ênfase em Reprodução Animal (Bolsista FAPESP) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal sob orientação da Professora Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e coorientação do Professor Dr. José Jurandir Fagliari e da Professora Dra. Maria Emília Franco Oliveira. Em Agosto de 2014 ingressou o curso de doutorado em Genética e Melhoramento Animal (Bolsista CAPES) nesta mesma instituição sob orientação da Professora Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e coorientação do Professor Dr. Pablo Juan Ross, no período de Fevereiro de 2016 a Fevereiro de 2017 foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Programa de Doutorado Sanduíche do CNPq na Universidade da Califórnia em Davis no Departamento de Ciência Animal.

“Paixão é o que te faz superar os momentos difíceis que de outra maneira transformariam homens fortes em fracos ou lhe fazer desistir”
Neil Degrasse Tyson

Dedico
A minha família e amigos, sem vocês eu nada seria

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus Pais pela paciência, amor, dedicação, confiança e por nunca terem desistido de mim.

Aos meus irmãos Rafael (*in memoriam*), Rodolfo e Tatiana por serem os melhores irmãos do mundo.

À Sabrina Ramos de Carvalho Nociti, pelo otimismo, por ser esposa, companheira, melhor amiga e por me dar o melhor presente que um homen pode ter.

À Antonio de Carvalho Nociti por me mostrar o que importa na vida.

À Minha avó e madrinha Jenny e a minha avó Elza (*in memoriam*), por todos os conselhos, carinho e amor durante toda a minha vida.

Aos meus Tios Marcos e Teresinha, Plínio e Jacyrá, Paulo e Eunice e Jeremias e Célia por estarem presentes me ajudando e orientando todas as vezes que precisei, sempre com muita paciência, carinho e amor.

Aos meus Primos pela amizade e amor fraternal durante todos esses anos.

Ao meu sogro Sérgio de Carvalho e a minha sogra Sandra Regina Ramos de Carvalho, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus cunhados Fran, Serginho e Claudio.

À república Cana Brava, por sempre me receberem, de braços abertos.

Aos meus amigos Ana Carolina, Douglas, Diego, Luciana, Gabriel Guilherme, Paulo, Priscila, Roberta e Walter, pela manutenção da união da Vet 06.

À Ana Crestani e Rafael Villar Sampaio, por todo apoio, amizade, carinho e pelos Churrascos californianos.

À Ana Silva e Andre Boik por nos acolher como irmãos.

À Amanada Nonato, pela paciência, pela paciência, pela paciência, pela paciência e amizade.

À Professora Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, pela persistência, confiança e orientação.

Ao Professor Pablo Juan Ross, por me receber, orientar, guiar, confiar, ensinar e exigir nada menos que o melhor.

Aos Professores Lindsay Unno Gimenes, Nedenia Bonvino Stafuzza, Flávio Vieira Meirelles, Danísio Prado Munari e Daniel Guariz Pinheiro pelas sugestões, colaboração, participação e compreensão na banca avaliadora.

Ao Professor Wilson Araújo da Silva Junior, por toda ajuda, suporte, orientação e por ter aberto as portas do BIT.

A todos os membros do BIT, especialmente à Raul, Érico, Carlos de Biagi, Marcelo, Rafael, Josane e Jéssica, por toda ajuda e socorros prestados.

Aos amigos de Pós-Graduação:

Professor Wilter Ricardo Russiano Vicente, Maria Emilia Franco Oliveira, Luciana Cristina Padilha Nakaghi, Luciana Diniz Rola, Felipe Farias Pereira da Câmara Barros, Guilherme Augusto Motta, Renata Sitta Mariano, Ricardo Andrés Ramirez Uscategui, Leandro Coutinho, Victor Santos.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal especialmente ao Seu Edson, por toda presteza, atenção, esforço e principalmente pelas conversas durante o café.

Obrigado por serem parte da minha vida e tornando-a tão divertida.

À todos os funcionários da pós graduação pelas orientações nas etapas burocráticas durante o curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq e ao Programa de Ciência sem Fronteiras (Processo número 201810/2015-8) pela bolsa, suporte e pelo financiamento à pesquisa, tornando este trabalho e o meu doutoramento possível. Em tempos de recursos tão escassos foi uma honra poder contar com este apoio, farei jus ao apoio e faço votos de tempos melhores.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
Introdução.....	1
Objetivos.....	2
Revisão de literatura.....	2
Os eventos transcripcionais durante desenvolvimento embrionário bovino.....	2
Diferenciação da massa celular interna e o trofotoderma bovino.....	3
O sequenciamento de RNA por novíssima geração (RNA-Seq).....	4
Referências.....	8
CAPÍTULO 2 - A ativação do genoma embrionário menor é essencial para o desenvolvimento embrionário bovino.....	13
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Material e métodos.....	16
Produção in vitro de embriões.....	16
Maturação in vitro (MIV).....	17
Fecundação in vitro (FIV).....	17
Cultivo in vitro (CIV).....	18
Determinação de sensibilidade de detecção de transcrição.....	18
Bloqueio da transcrição permanente.....	19
Bloqueio intermitente da transcrição (RNA polimerase II).....	19
Análise Estatística.....	21
Resultados.....	21
Determinação de sensibilidade de detecção de transcrição e bloqueio da permanente da transcrição.....	21
Bloqueio intermitente da transcrição durante as fases do desenvolvimento embrionário.....	22
Discussão.....	26
Conclusão.....	28
Referências.....	29
CAPÍTULO 3 - Transcriptoma de embriões bovinos de oócito ao dia 19 do desenvolvimento embrionário obtidos a partir de banco de dados públicos.....	32
Resumo.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos.....	35
Coleta dos dados.....	35
Processamento dos dados e bioinformática.....	35
RESULTADOS.....	37
Sequenciamento e análise de expressão gênica.....	37
Análise de co-expressão gênica e identificação de grupos de genes e vias específicas dos estágios do desenvolvimento.....	38

Discussão.....	46
Dados utilizados e replicabilidade dos estudos de RNA-seq.....	46
Análise de diferença de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário.....	48
Análise de coexpressão gênica.....	49
Conclusão.....	50
Referências.....	50
CAPÍTULO 4 - Transcriptoma da massa celular interna e do trofotoderma de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> com espermatozoides sexados por citometria de fluxo.....	55
Resumo.....	55
Introdução.....	56
Material e métodos.....	59
Experimento 1 - Isolamento da Massa celular interna e do Trofotoderma.....	59
Obtenção dos espermatozoides e formação dos grupos experimentais.....	59
Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	59
Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	60
Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	61
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	62
Obtenção de isolados celulares.....	63
Imuno coloração dos embriões e dos isolados celulares.....	66
Cultivo e confirmação da viabilidade dos isolados celulares.....	68
Análise Estatística.....	69
Experimento 2 - Transcriptoma da massa celular interna e do trofotoderma.....	69
Produção da biblioteca de sequenciamento.....	69
Processamento dos dados e bioinformática.....	70
Análise de diferença de expressão gênica.....	70
Resultados.....	71
Experimento1.....	71
Produção de embriões <i>in vitro</i>	71
Confirmação da viabilidade e da qualidade dos isolados celulares.....	72
Experimento2.....	76
Resultado do sequenciamento.....	76
Análise de diferença de expressão gênica.....	77
Discussão.....	82
Experimento1.....	82
Produção de embriões <i>in vitro</i>	82
Confirmação da viabilidade e da qualidade dos isolados celulares.....	83
Experimento2.....	83
Genes da Massa celular interna.....	83
Genes da Trofotoderma.....	85
Genes imprinting.....	86
Genes ligados ao sexo.....	87
Conclusões.....	88
REFERÊNCIAS.....	Error! Bookmark not defined.
ANEXOS.....	100

RESUMO

O processo transcripcional em embriões extremamente complexo, nosso trabalho estimou o impacto de perturbações nos processos de transcripcionais, durante as fases de ativação do genoma embrionário sobre o desenvolvimento embrionário in vitro de embriões; analisamos dados de sequenciamento de rna (RNA-seq) depositados nos bancos públicos (GEO) desde o estágio de oócito até o dia 19 do desenvolvimento embrionário; Isolamos e caracterizamos a massa celular interna (ICM) e a trofotoderma (TE) do sexo masculino e feminino, oriundos de um mesmo blastocisto produzido in vitro com espermatozoides sexados (X e Y) e com sêmen convencional e caracterizamos e exploramos o transcriptoma desses isolados celulares. Concluimos então que a EGA menor é essencial para o desenvolvimento embrionário bovino, blastocistos possuem a maior atividade transcripcional de um total de 6457 genes diferentemente expressos entre os contrastes avaliado encontramos; 2065 genes diferencialmente expressos entre a ICM e a TE, enquanto a ICM está voltada para a manutenção da pluripotência, a TE está voltada ao metabolismo energético. Os nossos dados sugerem que os embriões fêmeas são mais sensíveis ao cultivo in vitro.

Palavras chave: Transcriptoma, Embriões, Bovinos.

ABSTRACT

Transcription process in embryos is a complex process, our work estimated the impact of perturbations in the transcriptional processes during genome activation of vitro produced bovine embryos on their development; we analyzed public data (GEO) from rna sequencing data (RNA-seq) of oocyte up to the 19th day of embryonic development; We'd performed isolation and characterization of male and female inner cell mass (ICM) and trophoblast (TE) from the same blastocyst produced in vitro with sorted semen (X and Y) and with conventional semen. We did the characterization and exploratory analysis of the transcriptome of these cells. We conclude that minor EGA is essential for bovine embryonic development. Blastocysts possess the highest transcriptional activity of 6457 differentially expressed genes among analyzed contrasts. We found 2065 genes differentially expressed between ICM and TE, while ICM is maintaining pluripotency, TE is focused on energy metabolism. Our data suggest that female embryos are more sensitive to in vitro culture.

Key words: Transcriptome, Embryos, Bovine.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

Tabela1 - Número de artigos publicados encontrados utilizando as palavras-chaves nas colunas durante os anos de janeiro 2008 até agosto de 2018..... 5

CAPÍTULO 2 - A ativação do genoma embrionário menor é essencial para o desenvolvimento embrionário bovino

Figura 1 - Descrição do teste de sensibilidade de transcrição pela Eu e do teste de comparação das drogas para bloqueio de transcrição em embriões bovinos. A- Comparação da intensidade de fluorescência entre os estágios de desenvolvimento embrionário bovino; B- Quantificação da intensidade de fluorescência dos estágios de zigoto a 16 células, em 3 rotinas e 300 embriões; C- Comparação da intensidade de fluorescência das drogas no bloqueio de transcrição permanente durante os estágios de 4, 8 e 16 células, em 4 rotinas e 560 embriões; D - determinação da menor dose efetiva de DRB para bloqueio da transcrição em 4 rotinas e 391 embriões, a linha tracejada na horizontal indica a média de todos os grupos.....23

Figura 2 - Resultado do bloqueio transcrição intermitente durante as fases de desenvolvimento embrionário bovino. A - Primeira fase do bloqueio intermitente abrangendo duas fases, a cada 28 horas, do desenvolvimento embrionário. B- Segunda fase bloqueio intermitente abrangendo uma única fase, a cada 14 horas, do desenvolvimento embrionário, a linha tracejada na horizontal dos gráficos de barra indica a média de todos os grupos.....24

Figura 3 - Dinâmica do desenvolvimento embrionário de embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio da RNA plimerase II intermitente, mostrando a porcentagem de embriões de 2,4 e 8 células avaliados as 30, 44, 58 e 72 horas após a FIV. A - Acompanhamento da dinâmica de clivagem dos embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio intermitente por 28 horas; B - acompanhamento da dinâmica de clivagem dos embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio intermitente por 14 horas, a linha tracejada na horizontal indica a média de todos os grupos. Letras minúsculas diferentes, dentro do gráfico de barras, denota significância na avaliação ao longo do tempo..... 25

CAPÍTULO 3 - Transcriptoma de embriões bovinos de oócito ao dia 19 do desenvolvimento embrionário obtidos a partir de banco de dados públicos

Tabela 1. Contendo a descrição dos dados obtidos que foram utilizados..... 40

Figura 1. Análise de componentes principais: (A) cores indicam as fases do desenvolvimento embrionário;(B) cores indicam a origem dos dados; (C) as cores indicam o período do desenvolvimento embrionário; (D) as cores indicam como o material foi processado para a produção da biblioteca de sequenciamento..... 41

Tabela 2. Diferença de expressão de cada contraste, em vermelho se encontram os valores do total genes “up regulated” e em azul os “down regulated”, em destaque na diagonal os contrastes usados para análise de co-expressão..... 42

Figura 2. Volcano plots dos contrastes escolhidos para serem explorados, no eixo Y temos o valor de \log_{10} do p_{adj} e no eixo x temos o valor de “ \log_2 fold change”, os genes diferentemente expressos estão representados pela cor azul, expressão reprimida (“down regulated”), e pela cor vermelha, expressão aumentada (“up regulated”)..... 43

Figura 3. Heatmap gerado com a média de expressão por período do desenvolvimento e com os genes diferentemente expressos mais relevantes do contraste “Morula vs Blastocyst” 45

Figura 4. Heatmap gerado com todas as amostras e todos os 6457 genes considerados diferentemente expressos em algum dos contrastes explorados ao longo do desenvolvimento embrionário bovino.....45

Figura 5. Análise de enriquecimento de vias para processo biológico contendo as vias mais enriquecidas para os grupos de genes obtidos da análise de co-expressão gênica dos 6457 genes diferentemente expressos.....46

CAPÍTULO 4 - Transcriptoma da massa celular interna e do trofotoderma de embriões bovinos produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por citometria de fluxo

Figura 1. Esquema do desenho experimental para isolamento e sexagem da massa celular interna (ICM) e do trofotoderma de embriões bovinos produzidos *in vitro* com a utilização ou não do sêmen sexado por citometria de fluxo..... 65

Figura 2. Etapas da produção de embriões *in vitro* e do isolamento da massa celular interna (ICM) e do trofotoderma de embriões bovinos por micro cirurgia seguida de

imuno cirurgia: (A) chegada dos ovários ao laboratório (aproximadamente 400 ovários na foto); (B) oócitos maduros; (C) embriões bovinos no dia 7,5, a seta vermelha indica os embriões que eram selecionados para o procedimento; (D) resultado da microcirurgia, a seta amarela indica a ICM ainda com a TE e a seta vermelha apenas a TE; (E) ICM isolada após a imuno cirurgia (seta amarela), é possível observar as células remanescentes (seta vermelha) que foram utilizadas para a identificação do sexo dos embriões..... 66

Figura 3. (A)-Taxa de Fertilização, (B)- Taxa de clivagem, (C)- Estagio de desenvolvimento embrionário ; (D)- Taxa de produção de Blastocistos por embriões clivados; (E)- Taxa produção de Blastocisto; (F)- Exemplo de resultado da imunofluorescência dos embriões; (G)- Exemplo do Gel de PCR para determinação do Sexo; H- Taxa de Sexagem embrionária por grupo..... 73

Figura 4. Número de células para os diferentes tipos de Imuno coloração: (A) CDX2 para a identificação do número de células oriundas do Trofotoderma e (B) SOX2 para a identificação de células pertencentes a massa celular interna.....74

Figura 5. Exemplo dos resultados obtidos na Imuno coloração nos diferentes grupos avaliados nas diferentes colorações e na versão fundida ou “merged”. (A) - Blastocisto; (B) - Massa celular interna isolada apenas com a microcirurgia; (C) - Massa celular interna isolada por microcirurgia seguida de imunocirurgia; (D) - Trofotoderma isolada com microcirurgia.....75

Figura 6. Exemplo do resultado do cultivo por 7 dias, no meio TeSR1 modificado, dos embriões bovinos (Blastocyst) e da massa celular interna (ICM) obtida por microcirurgia seguida de imunocirurgia.....76

Figura 7. Resumo gráfico do software MULTIQC das análises de qualidade; A - Resultado do software FASTQC da qualidade das reads das amostras após a “trimagem” com o software TRIMMOMATIC; B - Resultado da Análise da qualidade de alinhamento do software STAR..... 77

Figura 8. Resumo do resultado da análise de Diferença de expressão com DESEQ2; A - Heatmap com todos os 2065 genes diferencialmente expressos; B - Análise de componentes principais do contraste ICM vs TE; C - Volcanoplot do contraste ICM vs TE; D - Análise de componentes principais do contraste Male vs Female; E - Volcanoplot do contraste Male vs Female.....79

Figura 9. Representação gráfica dos genes específicos e análise de Enriquecimento de vias ; A - Heatmap com todos os 33 genes mais expressos na ICM; B - Heatmap com todos os 33 genes mais expressos na TE; C - Comparação do enriquecimento de vias de processo biológico entre todos os genes mais expressos na ICM ou TE.80

Figura 10. Representação gráfica do contraste Male vs Female; A - os genes relacionados com o sexo de acordo com a metodologia proposta por CHITWOOD et. al.(2013); B - Heatmap com os 9 genes com valor de padj menor que 0,05..... 80

Tabela 1. Valores de expressão dos genes da ICM (33 genes) e TE (19 genes) do contraste ICM vs TE..... 81

Tabela 2. Valores de expressão dos genes específicos da ICM, específicos da TE, relativos a endoderma primitiva e os genes “imprinted” tidos como expressos obtidos do contraste ICM vs TE..... 82

LISTA DE ABREVIÇÕES

- BrUTP - sal de sódio 5-Bromouridina 5'-trifosfato
BSA - Albumina sérica bovina
COC - complexo cumulus oócito
DEGS - Genes diferencialmente expressos
DMSO - Dimetilsulfóxido
DRB - 5,6 diclorobenzimidazol 1-b-D-ribofuranosídeo
EGA - Ativação do genoma embrionário
EGA maior - Ativação do genoma embrionário maior
EGA menor - Ativação do genoma embrionário menor
EPI - Epiblasto
Eu - 5-etinil uridina
FIV - Fertilização *in vitro*
IA - Inseminação Artificial
MOTE - múltiplas ovulações e transferência de embriões
mRNA - RNA mensageiro
MZT - Transição materno zigoto
PBS - tampão fosfato-salino
PE - endoderma primitiva
PFA - paraformaldeído
PIVE - produção *in vitro* de embriões
PVA - Álcool polivinílico
qPCR - Real time quantitative PCR
SFB - soro fetal bovino

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é um procedimento para promover o melhoramento genético em animais de interesse zootécnico, sendo alternativa à técnica convencional de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE). Conforme revisado por Hasler (2014) e Moore e Hasler (2017) a produção *in vitro* de embriões bovinos associado a seleção genômica tem grande potencial para contribuir com o melhoramento do rebanho bovino, porém com grandes obstáculos a serem superados principalmente relacionados a qualidade embrionária. Assim, durante as últimas décadas, a produção de embriões *in vitro* vem sendo aperfeiçoada, principalmente, nos passos que visam imitar o sistema natural de desenvolvimento embrionário (Jiang et al., 2014).

A quantificação da expressão dos genes que regulam o desenvolvimento embrionário é parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (Farin et al., 2004; Smith et al., 2005; Dode et al., 2006, Huang e Khatibe, 2010; Chitwood et al., 2013; Graf et al., 2014; Jiang et al., 2014), podendo assim se identificar as diferenças metabólicas entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Mohan et al., 2004, Smith et al., 2009) e do padrão de diferenciação celular (Negrón-Pérez, et al., 2017) . Quando este padrão de expressão é alterado, pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário diminuindo o potencial para sustentarem a prenhes (Wrenzycki et al., 2005; Abe et al., 2018).

Mesmo que sabidamente haja diferenças adquiridas durante o processo de produção embrionária (Sirard et al., 2017), a produção *in vitro* de embriões ainda é a forma mais fácil de se obter informações biológicas durante o desenvolvimento embrionário (Graf et al., 2014). Portanto, o uso de embriões bovinos, produzidos *in vitro*, para a obtenção de dados sobre os eventos transcricionais durante o desenvolvimento embrionário é essencial para o entendimento dos fenômenos biológicos e conseqüentemente no desenvolvimento de metodologias para o aprimoramento da técnica.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: (1) estimar o impacto de perturbações nos processos de transcrpcionais, por meio de bloqueios intermitentes, durante as fases de ativação menor e maior do genoma embrionário sobre o desenvolvimento embrionário in vitro de embriões bovinos, apontar a importância do período de ativação do genoma menor; (2) identificar nos bancos de dados públicos experimentos que utilizaram embriões bovinos em diferentes estágios do desenvolvimento e que podem ser comparados; (3) avaliar e identificar as diferenças transcrpcionais e por análise de co-expressão encontrar padrões nas diferenças transcrpcionais específicas de cada estágio do desenvolvimento e por análise de enriquecimento de vias identificar as principais vias metabólicas de cada estágio; (4) Isolar e caracterizar a massa celular interna (ICM) e a trofotoderma (TE) do sexo masculino e feminino, oriundos de um mesmo blastocisto produzido in vitro com espermatozoides sexados (X e Y) e com sêmen convencional; (5) Identificar os genes diferentemente expressos na ICM e na TE e entre a ICM e a TE dos sexos masculino e feminino, de blastocistos produzidos in vitro com espermatozoides sexados (X e Y) e com sêmen convencional por meio da análise do conjunto de dados obtidos pelo transcriptoma por RNA-seq utilizando RNA extraído da ICM e TE de embriões isolados individualmente.

Revisão de literatura

Os eventos transcrpcionais durante desenvolvimento embrionário bovino

O desenvolvimento embrionário é, primeiramente, dependente dos estoques de RNA mensageiro presentes nos oócitos, os quais são gradualmente exauridos até que o embrião produza os seus próprios transcritos, pois os oócitos paralisam os processos transcrpcionais a partir do estágio de vesícula germinativa, e assim regulados por processos pós transcrpcionais (Paynton et al., 1988; Vassalli et al., 1989). A expressão de genes paternos e a estabilidade do RNA em oócitos e em embriões em estadios iniciais de desenvolvimento são consideradas prioridades para a ativação da transcrição gênica embrionária (EGA) (Niemann et al., 2010). O início da transcrição do genoma de embriões ocorre em um tempo espécie-

específico, em camundongos, a ativação tem início em embriões com duas células; em suínos, em embriões com quatro células; em humanos e em bovinos, de 4 a 8 células (Jiang et al., 2014; Abe et al., 2018).

Conforme revisado por Gòdia et al., (2018) têm-se mostrado que a contribuição do espermatozoide é maior do que apenas o DNA, assim o espermatozoide apto a fecundação é essencial para contribuição de pelo menos três componentes: o genoma haploide paterno, a sinalização para iniciar a ativação metabólica do oócito (incluindo a tradução do mRNA), e o centríolo, que direciona a montagem dos microtúbulos conduzindo a formação do fuso mitótico durante o desenvolvimento inicial do zigoto. O espermatozoide danificado pode ser capaz de fertilizar um oócito, mas acaba resultando em embrião de baixa qualidade (Fernández-Gonzales et al., 2008). Como demonstraram Fatehi et al. (2006), investigando os efeitos de espermatozoides com danos no DNA no desenvolvimento embrionário, sugerem que no início da expressão gênica embrionária (EGA) em estádios iniciais de desenvolvimento (estádio de 4 a 8 células) os danos no DNA paterno tornam-se sensíveis ao mecanismo da apoptose do embrião, e pelo bloqueio da mitose, interrompendo o avanço no desenvolvimento embrionário. Isto é evidenciado pela falha na formação de blastocisto, fragmentação nuclear em corpos apoptóticos e falhas na formação do fuso mitótico. Após a EGA o genoma paterno ganha um papel significativo na formação do embrião (Graf et al., 2014), culminando na fase de blastocisto com a atividade transcricional mais alta do período pré-implantacional (Jiang et al., 2014).

Diferenciação da massa celular interna e o trofotoderma bovino

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de bovinos ocorre a diferenciação do trofotoderma (TE), que mais tarde contribuirá com a formação da placenta, órgão essencial para nutrição e manutenção da vida embrionária intrauterina, e a diferenciação das células da massa celular interna (ICM) que originará o concepto (Hyttel et al., 2010). Uma vez que essas células se diferenciam a partir do estágio de blastocisto expandido, as células da ICM perdem a capacidade de se transformar em células da TE e vice versa, a restrição dos destinos das células da TE e da ICM é mediado pelos fatores de transcrição CDX2, maior nas células da TE, e OCT4 (POU5F1), maior nas células da ICM (Berg et al., 2011).

Assim estudos de engenharia reversa tem comprovado o papel de marcadores como CDX2 para a diferenciação das células da TE bovina (Goissis e Cibele, 2014), e do OCT4 para a o desenvolvimento das células da ICM bovina (Simmet et al.,2014; Daigneault et al., 2018). Porém os mecanismos ativados nessas duas populações celulares se mostram muito complexos, sendo já relatados 870, 3600 e 4689 genes diferencialmente expressos entre ICM e TE (Ozawa et al.,2012; Nagatomo et al.;2013 e Housseini et al.; 2015 respectivamente). Apesar de excelente fonte de informação muito ainda pode ser feito, pois com o avanço as técnicas de novíssima geração se tornam possível isolar e sequenciar o transcriptoma de células isoladas de um mesmo embrião, e explorar por exemplo diferenças decorrentes do dimorfismo celular.

O sequenciamento de RNA por novíssima geração (RNA-Seq)

O RNA-Seq não tem um limite para quantificação relacionado ao número de sequências obtidas. Conseqüentemente, essa tecnologia apresenta uma grande variação na dinâmica dos níveis de expressão em que os transcritos podem ser detectados. A característica ímpar do sequenciamento de alto rendimento de transcriptomas e a versatilidade do resultado gerado, que pode ser analisado de forma a esclarecer simultaneamente dados de níveis de expressão gênica, de estrutura do *locus* genômico e variações de sequência presentes em um determinado *locus*, e assim demonstra ter acuidade e repetibilidade para quantificar níveis de expressão gênica, como determinado por PCR quantitativo (qPCR) e requer menor quantidade de RNA nas amostras. Além disso, o RNA-Seq é o primeiro método de sequenciamento que permite sequenciar o transcriptoma inteiro em alto rendimento e de maneira quantitativa (Martin e Wang, 2011).

Até o surgimento do RNA-seq os estudos com microarranjos ofereciam as melhores informações sobre o transcriptoma no início do desenvolvimento embrionário, no entanto o RNA-seq possui várias vantagens sobre a técnica de microarranjos, permite a determinação direta dos pares de bases da sequencia do cDNA, com resolução a partir de um único nucleotídeo, maior alcance, menos ruído e maior sensibilidade além de permitir a discriminação dos transcritos de origem materna e paterna através da análise de polimorfismos de nucleotídeo únicos (SNPs) específicos ou através de outros marcadores genéticos (Chitwood et al.,2013, Graf et al., 2014, Jiang et al.,2014).

Na Tabela 1, podemos ver os dados obtidos do pubmed quando procuramos as palavras chaves (“bovine embryo”, “microarray”, “RNA-seq”, “Microarray bovine embryo”, “RNAseq bovine embryo”) mostrando a evolução do interesse científico pelo assunto. E 2008 foram publicados apenas 6 artigos com a palavra-chave RNA-seq e até agosto de 2018 foram publicados 3232 artigos. Quando comparamos o número de artigos publicados com as palavras chave “Microarray bovine embryo” e com as palavras chave “RNAseq bovine embryo”, em 2011 foram publicados 13 artigos contra 1, até agosto de 2018 notamos que encontramos números muito mais próximos 12 contra 10 em 2017 e 4 contra 3 em 2018. Demonstrando a aceitação da técnica pela comunidade científica.

Tabela1 - Número de artigos publicados encontrados utilizando as palavras-chaves nas colunas durante os anos de janeiro 2008 até agosto de 2018

Ano	bovine embryo	Microarray	RNAseq	Microarray bovine embryo	RNAseq bovine embryo
2018	260	4596	3232	4	3
2017	434	5422	3258	12	10
2016	432	5599	2537	13	4
2015	405	6255	2075	12	8
2014	457	6335	1546	13	4
2013	408	6278	983	8	4
2012	442	6290	544	20	2
2011	441	6142	311	13	1
2010	437	5868	131	11	0
2009	396	5507	22	14	0
2008	381	5436	6	10	0

De fato, embora a função deste RNA não tenha sido totalmente esclarecida, a identificação de moléculas de RNA no espermatozoide maduro pode ser de grande importância para o melhor entendimento dos processos de espermatogênese e fertilização (Lalancette et al., 2008). Mais ainda, o perfil de expressão gênica dos espermatozoides pode servir tanto para a determinação da fertilidade de machos como possuir um valor prognóstico para fecundação e desenvolvimento embrionário (Feugang et al., 2010). Assim o RNA-seq tem demonstrado ser muito eficiente até mesmo com amostras desafiadoras, como o semen, em 2013 foi publicado o primeiro resultado de análise de transcriptoma espermático bovino por sequenciamento (RNA-seq) (Card et al., 2013). Uma análise do transcriptoma espermático bovino de amostras de sêmen criopreservadas demonstrou a existência de mais de 6000 transcritos, codificados tanto pelo núcleo como pelas mitocôndrias; estes transcritos formam uma população heterogênea de mRNAs degradados e intactos. Transcritos não descritos por trabalhos anteriores, que utilizaram técnicas de hibridização, puderam ser identificados por RNA-seq, entre eles HMGB4, GTSF1 e CKS2. Segundo os autores, uma análise de ontologia gênica demonstrou que o processo biológico mais representado por estes transcritos contribuem para os processos de capacitação e início da embriogênese. Os dados apresentados por Card et al. (2013) demonstram que o RNA-seq possui uma maior capacidade de varredura e acurácia em caracterizar transcriptomas ainda não totalmente conhecidos do que as técnicas de hibridização. Selvaraju *et al.* (2017) sugeriram que a utilização de duas plataformas diferentes (Illumina e Ion Proton) seria útil para diagnosticar e predizer a fertilidade de touros, Card *et al.*, (2017) conseguiram identificar possíveis alvos para predição de fertilidade em touros no semen. No entanto ainda não foi possível predizer a taxa de concepção de um touro pela análise do transcriptoma de embriões, devido a alta complexidade da interação dos genomas materno e paterno (Ortega et al., 2018).

A análise global de expressão de genes em embriões pré-implantação são escassos, principalmente devido às dificuldades técnicas na obtenção de quantidades significativa de RNA por embrião para as análises e do grande número de embriões necessários por grupo (Kobayashi et al., 2006), ver Tabela 1. Drive *et al.* (2012) e Peñagaricano *et al.* (2013) utilizaram o RNA-seq para descrever o transcriptoma de embriões bovinos denotando, respectivamente, diferenças entre

vários transcritos de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* e a influência da dieta materna sobre o embrião, no entanto esses autores utilizaram RNA extraído de um pool de embriões, cerca de 5 embriões/pool, o que pode encobrir as diferenças entre os sexos. Chitwood et al.(2013) desenvolveram uma metodologia para realizar o estudo transcricional a partir de um único blastocisto bovino, aumentando o poder estatístico das análises e que possibilita agora determinar o sexo de cada embrião utilizado, através da análise de expressão diferencial dos genes relacionados ao sexo (SRY) e ao cromossomo Y (EIF1AY e DDX3Y), obtidos do sequenciamento do RNA. Esse mesmo grupo identificou que 168 genes são diferentemente expressos entre machos e fêmeas, sendo destes 144 genes mais expressos nos embriões femininos estando estes relacionados principalmente a adesão celular (HAPLN4, PGM5, PCDHB6, CLSTN3, CTGF, ICAM5 e IZUMO1), metabolismo da Glicose (PPP1R3C, LDHA, PGM5 e PGK1) e motilidade celular (CTGF, ARID5B, ATP1A3, TNP1 e PRKG1). IQBAL et al.(2014) desenvolveram uma técnica de separação da massa celular interna (MCI) por imunocirurgia e trofoblasto (TE) por microcirurgia de embriões equinos com posterior extração de RNA individualmente de cada parte, sendo o suficiente para produção de bibliotecas de cDNA e sequenciamento do transcriptoma individual, ademais os autores julgaram que o sexo é um fator relevante quando se procura por diferenças transcricionais em nível global. Zhao et al. (2016) publicaram o transcriptoma da massa celular interna e da trofoblasto de embriões bovinos, os autores utilizaram um pool de 25 a 30 embriões e separaram as células de cada parte por ativação magnética. Ao utilizarem essa técnica os autores não puderam explorar as diferenças sexuais assim, o sêmen sexado pode ser uma ferramenta eficiente nesse tipo de estudo, uma vez que pode fornecer um grande número de embriões do sexo desejado (Bermejo-Alvarez et al., 2010). Como há fortes evidências que o DNA espermático, que o sexo e as alterações do genoma paterno afetam as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, se justifica o presente estudo pelo auxílio no entendimento das variações no desenvolvimento embrionário, aumento do esclarecimento das vias metabólicas afetadas pelo processo de sexagem espermática e pela diferença sexual. Além de contribuir com informações sobre as diferenças sexuais encontradas nas fases de blastocisto na massa celular interna e trofoblasto.

Referências

Abe K, Funaya S, Tsukioka D, et al. (2018) Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci** 1–9.

Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A (2010) Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proc Natl Acad Sci** 107:3394–3399.

Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, et al. (2011) Trophectoderm Lineage Determination in Cattle. **Dev Cell** 20:244–255.

Card CJ, Anderson EJ, Zamberlan S, Krieger KE, Kaproth M, Sartini BL (2013) Cryopreserved Bovine Spermatozoal Transcript Profile as Revealed by High-Throughput Ribonucleic Acid Sequencing. **Biol Reprod** 88:1–9.

Card CJ, Krieger KE, Kaproth M, Sartini BL (2017) Oligo-dT selected spermatozoal transcript profiles differ among higher and lower fertility dairy sires. **Anim Reprod Sci** 177:105–123 10.1016/j.anireprosci.2016.12.011.

Chitwood JL, Rincon G, Kaiser GG, Medrano JF, Ross PJ (2013) RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. **BMC Genomics** 14:350.

Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, Ross PJ (2018) Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Sci Rep** 8:1–11.

Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA (2006) Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Mol Reprod Dev** 73:288–297.

Driver AM, Peñagaricano F, Huang W, et al. (2012) RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics** 13:118.

Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA (2004) Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **J Anim Sci** 82 E-Suppl:53–62.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM (2006) DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J Androl** 27:176–188.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, et al. (2008) Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring. **Biol Reprod** 78:761–772.

Feugang JM, Rodriguez-Osorio N, Kaya A, et al. (2010) Transcriptome analysis of bull spermatozoa: Implications for male fertility. **Reprod Biomed Online** 21:312–324.

Gòdia M, Swanson G, Krawetz SA (2018) A History of Why Fathers' RNA. **Biol Reprod** 99:147–159.

Goissis MD, Cibelli JB (2014) Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. **Biol Reprod** 90:1–10.

Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E (2014) Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 111:4139–4144.

Hasler JF (2014) Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology** 81:152–169.

Hosseini SM, Dufort I, Caballero J, Moulavi F, Ghanaei HR, Sirard MA (2015) Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. **BMC Dev Biol** 15:1–13.

Huang W, Long N, Khatib H (2012) Genome-wide identification and initial characterization of bovine long non-coding RNAs from EST data. **Anim Genet** 43:674–682.

Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M (2010) *Essentials of Domestic Animal Embryology*. **Saunders Ltd. Title** 472p.

Jiang Z, Sun J, Dong H, et al. (2014) Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics** 15:1–15.

Kobayashi S, Isotani A, Mise N, et al. (2006) Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. **Curr Biol** 16:166–172.

Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA (2008) Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. **J Cell Biochem** 104:1570–1579.

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I (1994) Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev** 37:48–53.

Martin JA, Wang Z (2011) Next-generation transcriptome assembly. **Nat Rev Genet** 12:671–682 10.1038.

Moore SG, Hasler JF (2017) A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **J Dairy Sci** 100:10314–10331.

Mohan M, Hurst AG, Malayer JR (2004) Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on Day 7 or produced in vitro. **Mol Reprod Dev** 68:288–298.

Nagatomo H, Kagawa S, Kishi Y, et al. (2013) Transcriptional Wiring for Establishing Cell Lineage Specification at the Blastocyst Stage in Cattle. **Biol Reprod** 88:158–158.

Negrón-Pérez V., Zhang Y, Hansen PJ (2017) Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. **Reproduction** 154:627–644.

Niemann H, Carnwath JW, Herrmann D, et al. (2010) DNA Methylation Patterns Reflect Epigenetic Reprogramming in Bovine Embryos. **Cell Reprogramming** 12:33–42.

Ortega MS, Moraes JGN, Patterson DJ, et al. (2018) Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. **Biol Reprod** 0:1–11.

Ozawa M, Sakatani M, Yao J, et al. (2012) Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. **BMC Dev Biol** 12:1–13 10.1186/1471-213X-12-33.

Paynton B V., Rempel R, Bachvarova R (1988) Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. **Dev Biol** 129:304–314.

Peñagaricano, F.; Souza, A.H.; Carvalho, P.D.; Driver, A.M.; Gamba, R.; Kropp, J.; Hackbart, K.S.; Luchini, D.; Shaver, R.D.; Wiltbank, M.C.; Khatib, H. Effect of Maternal Methionine Supplementation on the Transcriptome of Bovine Preimplantation Embryos. **PLoS ONE**, v. 8(8), p. 1-10, 2013.

Selvaraju S, Parthipan S, Somashekar L, et al. (2017) Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Sci Rep* 7:1–14.

Sirard MA (2017) The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *J Dev Orig Health Dis* 8:411–417.

Smith SL, Everts RE, Sung LY, et al. (2009) Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of in vitro maturation, fertilization and culture. *Mol Reprod Dev* 76:38–47.

Smith SL, Everts RE, Tian XC, et al. (2005) Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc Natl Acad Sci* 102:17582–17587.

Simmet K, Zakhartchenko V, Philippou-Massier J, Blum H, Klymiuk N, Wolf E (2018) OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci* 115:2770–2775.

Sugimura S, Akai T, Somfai T, et al. (2010) Time-Lapse Cinematography-Compatible Polystyrene-Based Microwell Culture System: A Novel Tool for Tracking the Development of Individual Bovine Embryos. *Biol Reprod* 83:970–978.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, et al. (2012) Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One* 7:1–7.

Sugimura S, Akai T, Imai K (2017) Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J Reprod Dev* 63:353–357.

Vassalli JD, Huarte J, Belin D, et al. (1989) Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes Dev* 3:2163–2171.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H (2005) Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 17:23–35
10.1071/RD04109.

Zhao XM, Cui LS, Hao HS, et al. (2016) Transcriptome analyses of inner cell mass and trophectoderm cells isolated by magnetic-activated cell sorting from bovine blastocysts using single cell RNA-seq. *Reprod Domest Anim* 51:726–735.

CAPÍTULO 2 - A ativação do genoma embrionário menor é essencial para o desenvolvimento embrionário bovino

Resumo

Os embriões bovinos pré-implantação podem se desenvolver na ausência de expressão gênica até o estágio de 8 para 16 células, período que ocorre a ativação do genoma embrionário (EGA) maior. Alguns genes embrionários, no entanto, são transcritos antes EGA menor. Este estudo utilizou um inibidor reversível de RNA Polimerase II (5,6 diclorobenzimidazol 1-b-D-ribofuranosídeo; DRB) para avaliar a importância da EGA menor no desenvolvimento embrionário bovino. Os oócitos foram maturados e inseminados in vitro, e os zigotos foram cultivados em KSOMaa suplementado e alocados para diferentes tratamentos em 16 horas pós-inseminação (hpi). O desenvolvimento foi registrado com 44 e 72 hpi, e a taxa de formação de blastocisto no dia 7 (FIV Dia 0). Primeiro, testamos diferentes concentrações de DRB [50 mM (D50), 75 mM (D75), 100 mM (D100) e um controle com dimetilsulfóxido (Control)]. Somente embriões no Control produziram blastocistos ($45,0 \pm 5,8\%$; 4 repetições com um total de 391 oócitos examinados). Nenhuma diferença no desenvolvimento foi observada às 44 h ($57,9 \pm 16,5$, $53,3 \pm 10,5$, $60,5 \pm 19,0$ e $52,3 \pm 5,8\%$ para D50, D75, D100 e Control, respectivamente) e 72 h ($78,9 \pm 8,8$, $66,1 \pm 11,7\%$, $71,5 \pm 16,5\%$ e $70,8 \pm 5,6\%$ para D50, D75, D100 e Control, respectivamente). Em seguida, em 7 réplicas (751 oócitos), determinamos o efeito e o bloqueio da transcrição com 50 mM DRB atingindo 2 estágios embrionários (períodos de 28 h), iniciada às 16 hpi (1-2C), 30 hpi (2-4C) e 44 hpi (4-8C). Os controles incluíram tratamento DRB de 16 a 72 hpi (1-8C) e Control. Não houve diferença no desenvolvimento com 44 e 72 h. A incidência de formação de blastocisto, no entanto, foi significativamente diminuída em todos os grupos tratados em comparação com Control ($27,7 \pm 4,7$; $15,1 \pm 3,5$; $23,3 \pm 3,1$; $20,5 \pm 1,9$; e $42,1 \pm 3,2\%$ para 1 e 2C, 2 e 4C, 4 e 8C, 1-8C e Control, respectivamente). Finalmente, em 12 réplicas (1499 oócitos), avaliamos o efeito do bloqueio da transcrição por períodos de 14 horas, abrangendo um único estágio de clivagem. O tratamento DRB

(50 mM) começou às 16 hpi (1C), 30 hpi (2C), 44 hpi (4C) e 58 hpi (8C). Além disso, os tratamentos 1-8C e Control foram mantidos. Nenhuma diferença no desenvolvimento com 44 e 72 h foi observado. O desenvolvimento para o blastocisto foi significativamente menor do Control ($46.0 \pm 3.2\%$) em 2C, 4C, 8C e 1-16C (28.9 ± 3.9 , 26.1 ± 4.2 , 30.1 ± 4.8 e $18.9 \pm 3.2\%$, respectivamente), mas não em 1C ($34.7 \pm 4.4\%$). Em resumo, a inibição transcricional contínua usando DRB resultou em bloqueio do desenvolvimento no momento da EGA maior, semelhante ao tratamento com α -amanita a (um inibidor irreversível da RNA polimerase II). A inibição transcricional durante os estágios de clivagem única foi suficiente para diminuir o potencial de desenvolvimento do embrião. Concluímos que a EGA menor tem um papel essencial no desenvolvimento embrionário bovino.

Palavras chave: Embriões, transição materno zigoto, RNA polimerase II, transcrição.

Introdução

O processo pelo qual um organismo expressa seu genoma, transcrição, é mais alta no blastocisto do que a detectada no estágio inicial de pré-implantação. A maneira como se forma esse padrão transcricional é essencial para o desenvolvimento embrionário. Após a fertilização o genoma embrionário é inativo até que se inicie a transição materno-zigoto (MZT) (Pálffy et.al.,2017). Pois durante a oogênese é acumulado RNAs e proteínas maternas que serão utilizados durante a maturação oocitária e as primeiras fases do desenvolvimento embrionário (Dworkin e Dworkin-Rastl, 1990 e revisado por Schultz et.al.; 2018). Inicialmente se propôs que a ativação do genoma embrionário (EGA) durante a MZT ocorreria nos estágios de 8 células (Kopečný et al., 1989), no final do estágio de 4 células (Barnes & First, 1991) e até 2 células (Memili et al., 1998a). Porém, tudo leva a crer que a maior atividade transcricional ocorra nos estágios de 4 para 8 células, sendo assim

conhecida como ativação do genoma maior (EGA maior) e a ativação do genoma menor (EGA menor) caracterizada como uma menor atividade transcricional durante o estágio de 2 células (Graf et.al.2014a; Jiang et.al.,2014).

Conforme revisado por Viktorovskaya e Schneider (2015), o processo transcricional é regulado por enzimas (RNA polimerases dependentes de DNA) que convertem a informação genética guardada no DNA para o RNA. Os eucariotos utilizam ao menos 3 RNA polimerases; RNA polimerase I (RNA POL I), RNA polimerase II (RNA POL II) e RNA polimerase III (RNA POL III). RNA POL I transcreve DNA ribossomal (rDNA), RNA POL II sintetiza todos os RNAs mensageiros (mRNA) e a maioria dos RNAs não codificadores; RNA POL III produz primariamente tRNA e 5s rRNA. Portanto para que haja transcrição nos embriões bovinos é necessário a presença de RNA POL II, conforme demonstrado por Jones e First (1995) e MEMILI et al.(1998a). Memili et al.(1998b) demonstraram que ao bloquear irreversivelmente a RNA POL II com α -Amanitina, uma droga bloqueadora de RNA POL II e RNA POL III (400 a 1000 vezes menos efetiva), impede o desenvolvimento embrionário além do estágio de 8 células, logo a EGA é essencial para o desenvolvimento embrionário bovino. Outras drogas também podem ser usadas como a Actinomicina D que bloqueia irreversivelmente as RNA polimerases (Sobell, 1985) e 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosilbenzimidazole (DRB) que bloqueia de forma reversível a RNA POL II (Zandomeni et.al.,1983).

O padrão que regula o desenvolvimento embrionário é um parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (Farin et al., 2004; Dode et al., 2006). Quando este padrão de expressão é alterado pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário e a ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos in vitro estejam desprovidos do potencial

para sustentarem a implantação e a prenhez (Wrenzycki et al., 2005). Com a hipótese que ativação menor no genoma embrionário é importante para o desenvolvimento do embrião bovino até a fase blastocistos. Objetivamos então, estimar o impacto de perturbações nos processos transcricionais, por meio de bloqueios intermitentes, durante as fases de ativação menor e maior do genoma embrionário sobre o desenvolvimento embrionário in vitro de embriões bovinos, apontando a importância da EGA menor.

Material e métodos

Produção in vitro de embriões

Foram utilizadas doses de sêmen congelado convencional de um único touro da raça Holandesa, da mesma partida, adquiridas de empresa especializada, com eficiência comprovada na produção in vitro. Um total de 30 rotinas de produção in vitro de embriões bovinos foram realizadas segundo o protocolo Chitwood et al. (2013). Foram utilizados ovários fornecidos por abatedouro, coletados e transportados para o laboratório em solução salina a 30-33°C. A aspiração dos folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foi feita com uma agulha de 19-g acoplada a uma seringa de 20 mL. O fluido folicular obtido pela aspiração foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e após 15 minutos o sedimento foi transferido para uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro e realizada uma avaliação em microscópio estereoscópico. Utilizamos os COCs (complexo oócito cumulus) que apresentaram no mínimo 4 camadas de células e ooplasma de coloração uniforme, ou seja, somente graus 1 e 2. Os oócitos considerados atrésicos e desnudos foram descartados.

Maturação in vitro (MIV)

Os COCs foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL) e então lavados uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µM de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB . Após as lavagens os COCs foram transferidos para as placas de maturação (4 poços) contendo gotas de 400µL, sendo 50 oócitos por gota, de meio de maturação, cobertas com óleo mineral. Cultivados durante 22 horas em estufa a 38,5°C, 100 % de umidade e atmosfera de 5% de CO₂.

Fecundação in vitro (FIV)

A fecundação foi realizada 16 horas após o início do cultivo de maturação. Uma dose de sêmen convencional congelada que contém de 15 a 20 milhões de espermatozoides, foi descongelada a 35°C, por 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre 4 mL de gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ (45% e 90%) à temperatura ambiente e centrifugado a uma força de 900 × g durante 15 minutos, a fim de sedimentar os espermatozoides viáveis. O sedimento espermático resultante (100µL) foram transferidos para 4 mL de meio TALP-Sêmen e centrifugado a 500 x g durante 5 minutos. Foram retiradas uma amostra de 5µL para determinar a concentração/µL. Aproximadamente 100 × 10³ espermatozoides foram adicionados a cada gota de 50 µL de meio SOF-FIV.

Foi adicionado 20 a 25 oócitos por gota de FIV e incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, na temperatura de 38,5°C.

Cultivo in vitro (CIV)

Após 16 horas do início da FIV, os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em SOF-HEPES e lavados uma última vez e cultivados em meio KSOM[®] suplementado com 4 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 5% de soro fetal bovino (SFB) e transferidos para placas (35mm) em gotas de 50µL sob óleo mineral. Foram cultivados de 20-25 zigotos por poço, em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C. A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada 7 dias após a fecundação, considerando o dia da FIV como dia 0 (D0) e hora 0 (0H).

Determinação de sensibilidade de detecção de transcrição

Para a detecção de transcrição foi utilizado o kit marcação de síntese de RNA com inclusão de uridina fluorescente (5-etinil uridina - Eu) ("Click-iT[™] RNA Alexa Fluor[™] 594 Imaging Kit") com protocolo adaptado conforme Anexo 1. A marcação foi feita com Solução de 2mM de Eu diluída em KSOM e BSA por 1 hora em condições de cultivo. Em ambiente escuro os embriões foram fixados em 4% de Paraformaldeído (PFA) durante 15 minutos e lavados em tampão fosfato-salino (PBS) com álcool polivinílico (PVA). O processo de permeabilização foi feito com Triton x100 a 0,5% em PBS e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Adicionamos o tampão de reação click-it aditivo fornecido pelo fabricante conforme indicado nas instruções de fábrica. Os embriões foram transferidos para 100µL de solução e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos (protegidos da luz). Os embriões nas fases de zigoto até blastocisto foram lavados com solução de lavagem do kit Click-it (componente F). O DNA foi corado com 1µL de hoescht em 100µL de PBS com PVA e depois lavados em solução de 1mg/mL de PVA em PBS e montados entre lâmina e lamínula sob solução anti clareamento ("anti-fade")

(ProLong Gold; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), vedados com esmalte, armazenados a 4°C. Em no máximo 7 dias foram levados e avaliados ao microscópio confocal. A avaliação de intensidade de fluorescência foi feita com auxílio do software ImageJ version 1.40, os núcleos foram marcados e para cada núcleo foi obtido um valor de fluorescência subtraindo o a fluorescência do citoplasma adjacente; para comparação foi calculada uma média de intensidade de fluorescência por embrião.

Bloqueio da transcrição permanente

Inicialmente fizemos uma comparação entre as drogas bloqueadoras permanentes e o DRB, avaliamos as seguintes drogas:

5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosilbenzimidazole (DRB) nas doses 50, 75, e 100 μ M;

α -Amanitina na dose de 25 μ g/mL;

Actinomicina D na dose de 500 μ g/mL.

Todas as drogas foram diluídas em DMSO e avaliadas quanto a intensidade de fluorescência (nos estágios de 4,8 e 16 células) e de impacto durante o desenvolvimento embrionário (redução na taxa de blastocisto).

Bloqueio intermitente da transcrição (RNA polimerase II)

Para o bloqueio de transcrição foi utilizada somente DRB, primeiro verificamos a eficácia do DRB nas doses de 50, 75, e 100 μ M e DMSO, para determinação da menor dose efetiva no bloqueio intermitente.

Após a determinação fizemos o cultivo dos embriões sobre influência da droga e comparamos com o controle (DMSO) e avaliamos o desenvolvimento embrionário e a intensidade de fluorescência conforme os grupos a seguir.

Primeira fase:

1C-2C, bloqueio com DRB a partir das 16 horas até 44 horas após a FIV;

2C-4C, bloqueio com DRB a partir das 30 horas até 58 horas após a FIV;
4C-8C, bloqueio com DRB a partir das 58 horas até 72 horas após a FIV;
1C-8C, bloqueio com DRB a partir das 16 horas até 72 horas após a FIV;
CONTROL, exposição somente ao DMSO a partir das 16 horas até 72 horas após a FIV.

Segunda fase:

1C, bloqueio com DRB a partir das 16 horas até 30 horas após a FIV;
2C, bloqueio com DRB a partir das 30 horas até 44 horas após a FIV;
4C, bloqueio com DRB a partir das 44 horas até 58 horas após a FIV;
8C, bloqueio com DRB a partir das 58 horas até 72 horas após a FIV;
1C-8C, bloqueio com DRB a partir das 16 horas até 72 horas após a FIV;
CONTROL, exposição somente ao DMSO a partir das 16 horas até 72 horas após a FIV.

Para o bloqueio intermitente os embriões foram cultivados em ksom adicionado de BSA e DRB (na dose determinada). Foram feitas duas placas para cada rotina, uma placa para cultivo convencional e uma placa de bloqueio. O grupo CONTROL ficou o desenvolvimento todo apenas na placa de cultivo convencional. Para a passagem do cultivo tradicional para o bloqueio, ou do bloqueio para o cultivo, os embriões eram lavados em 5 gotas em meio ao qual seriam destinados, sempre trocando-se as ponteiros da pipeta de manipulação entre as gotas. Adicionalmente, antes da passagem para a placa destino, os embriões eram depositados em uma gota adjacente a gota de cultivo/bloqueio e depois transferidos para a gota aonde seria feito o cultivo/bloqueio. Em cada passagem eram contabilizados os embriões clivados e o estágio de desenvolvimento afim de se determinar a dinâmica de clivagem entre os grupos.

Análise Estatística

Para os dados relativos ao desenvolvimento embrionário incorporação da Eu utilizamos o software R de acordo com as recomendações de Chen & Peace (2010); Baguley (2012) e de Avriva & Watson (2013). Foi utilizado o dia da obtenção dos oócitos como bloco e a placa de cultivo/bloqueio foi utilizada como fator aleatório. Após a confirmação da homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene e normalidade dos dados pelo teste de Cramér-Von Mises caso necessário foi feita a transformação por ranque de acordo com Canover & Iman (1981), e então a análise de variância com a aproximação dos graus de liberdade de Satterthwaite, para tal foi utilizado o pacote lmerTest (KUZNETSOVA et al., 2016). A comparação mínima significativa das médias foi obtida pelo teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$. Os gráficos para representação dos resultados foram gerados com o pacote do R ggplot2 (Wickham, H.; 2009).

Resultados

Determinação de sensibilidade de detecção de transcrição e bloqueio da permanente da transcrição

Os resultados da detecção e sensibilidade de transcrição e a comparação das drogas para bloqueio da transcrição embrionária permanente estão resumidos na Figura 1. A incorporação da Eu durante uma hora aliada com a avaliação por microscopia confocal, nas fases do desenvolvimento embrionário bovino, foi suficientemente sensível para detectar atividade transcripcional a partir do estágio de 2 células (Figura 1 - A e B). O DRB se mostrou tão eficaz quanto o α -Amanitina e a Actinomicina-D no bloqueio da transcrição embrionária, conforme mostrado na Figura 1 - C. Não houve diferença na taxa de clivagem nos embriões tratados com DRB nas diferentes doses utilizadas, além disso os embriões quando mantidos sob

bloqueio não desenvolveram até o estágio de blastocisto, o bloqueio barrou o desenvolvimento embrionário bovino na dose de 50uM, 75uM e 100uM (Figura1-D). Sendo 50uM, então, a dose selecionada para a realização do bloqueio da RNA POL II de forma intermitentemente.

Bloqueio intermitente da transcrição durante as fases do desenvolvimento embrionário

O resultado do bloqueio intermitente com DRB está resumido nas figuras 2 e 3. O bloqueio nos estágios de zigoto até embrião de 2 células (1C-2C, figura 2 A) foi o suficiente para reduzir a taxa de blastocistos, porém pudemos notar que o bloqueio a partir dos estágios de 2 células reduziu mais a taxa de blastocisto aos 7 dias de desenvolvimento. No bloqueio a cada 14 horas (figura 4 B), notamos que a partir do estágio de zigoto (1C) já pode comprometer o desenvolvimento embrionário, porém apenas a partir do estágio de embrião de 2 células (2C) que se obtêm um resultado similar ao bloqueio permanente (1C-8C). Ademais podemos notar que a clivagem embrionária não é afetada pelo bloqueio da RNA POL II (figura 3). Não houve interação entre os grupos de bloqueio intermitente ao longo do tempo, o único fator significativo durante a clivagem embrionária foi o tempo. A clivagem ocorre normalmente independente de ocorrer uma interferência ou não, mostrando assim que os impactos das perturbações nessas fases podem se manifestar apenas na fase de blastocisto.

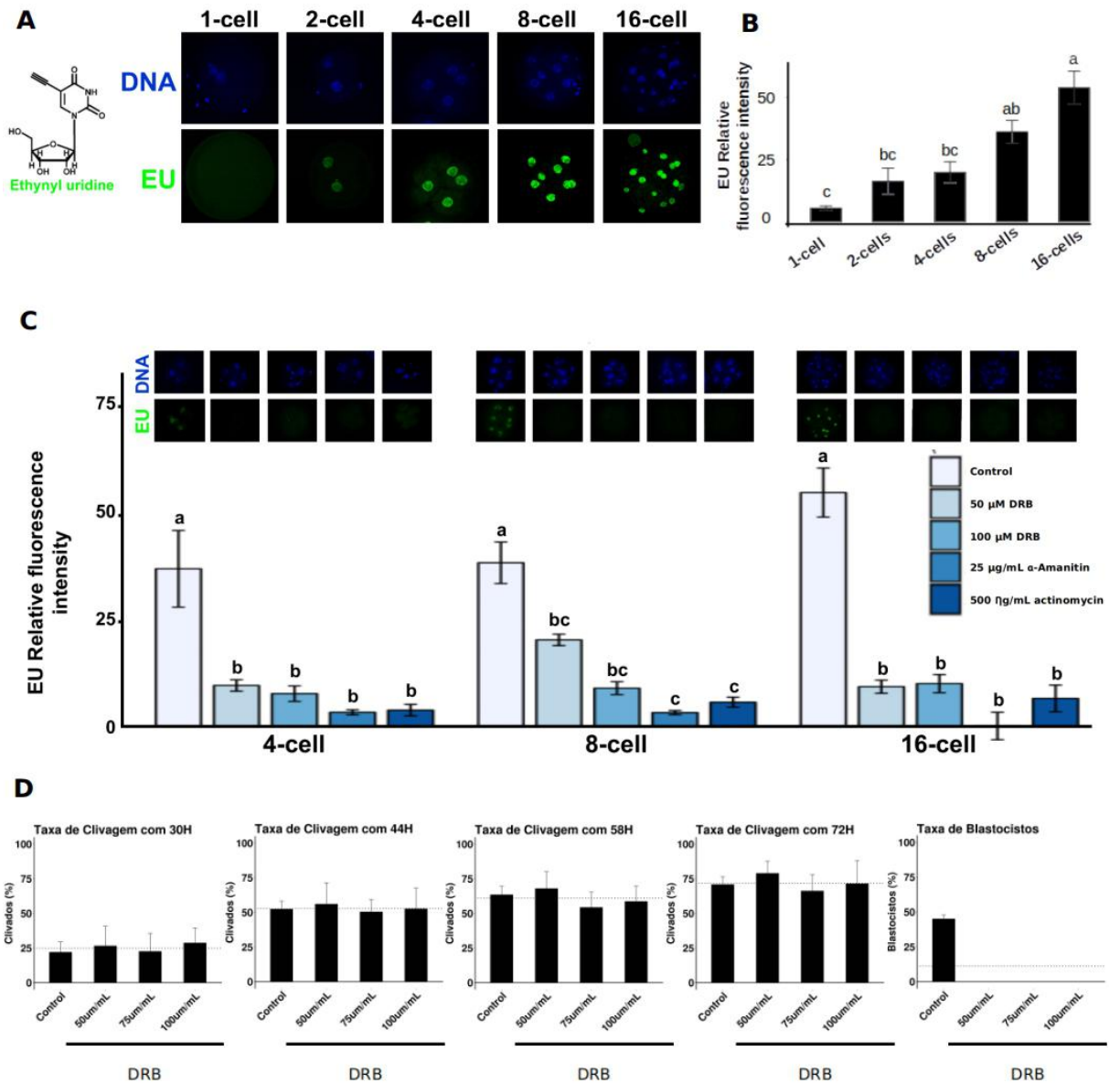


Figura 1 - Descrição do teste de sensibilidade de transcrição pela Eu e do teste de comparação das drogas para bloqueio de transcrição em embriões bovinos. A- Comparação da intensidade de fluorescência entre os estágios de desenvolvimento embrionário bovino; B- Quantificação da intensidade de fluorescência dos estágios de zigoto a 16 células, em 3 rotinas e 300 embriões; C- Comparação da intensidade de fluorescência das drogas no bloqueio de transcrição permanente durante os estágios de 4, 8 e 16 células, em 4 rotinas e 560 embriões; D - determinação da menor dose

efetiva de DRB para bloqueio da transcrição em 4 rotinas e 391 embriões, a linha tracejada na horizontal indica a média de todos os grupos.

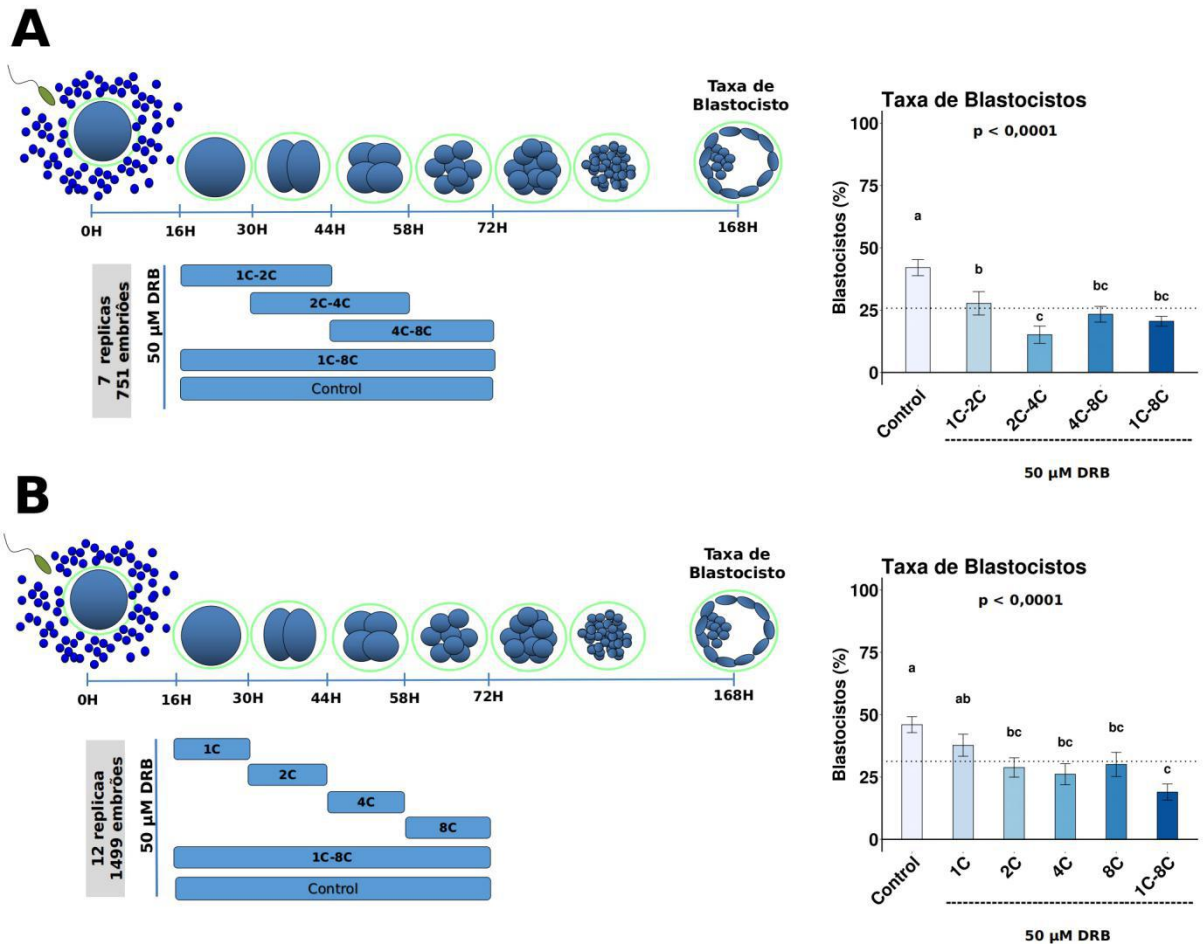


Figura 2 - Resultado do bloqueio transcrição intermitente durante as fases de desenvolvimento embrionário bovino. A - Primeira fase do bloqueio intermitente abrangendo duas fases, a cada 28 horas, do desenvolvimento embrionário. B- Segunda fase bloqueio intermitente abrangendo uma única fase, a cada 14 horas, do desenvolvimento embrionário, a linha tracejada na horizontal dos gráficos de barra indica a média de todos os grupos.

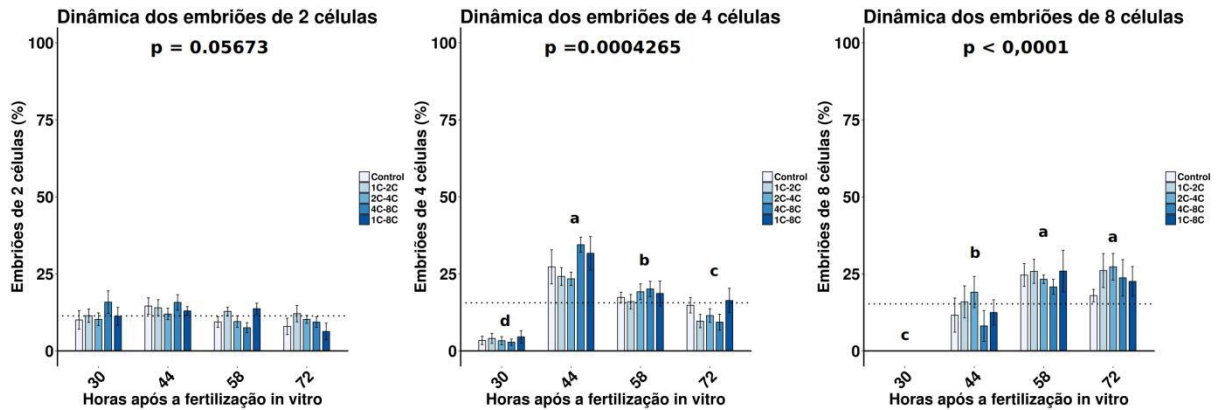
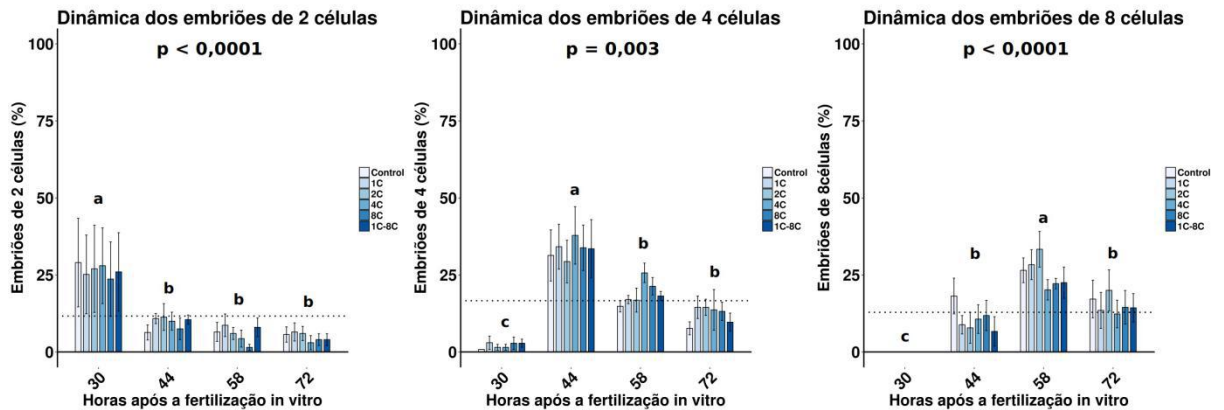
A**B**

Figura 3 - Dinâmica do desenvolvimento embrionário de embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio da RNA plimerase II intermitente, mostrando a percentagem de embriões de 2,4 e 8 células avaliados as 30, 44, 58 e 72 horas após a FIV. A - Acompanhamento da dinâmica de clivagem dos embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio intermitente por 28 horas; B - acompanhamento da dinâmica de clivagem dos embriões bovinos durante o ensaio de bloqueio intermitente por 14 horas, a linha tracejada na horizontal indica a média de todos os grupos. Letras minúsculas diferentes, dentro do gráfico de barras, denota significância na avaliação ao longo do tempo.

Discussão

Neste experimento demonstramos a eficácia de bloqueadores de transcrição de forma permanente e de forma transitória. Sobre a prova da intensidade de fluorescência com a incorporação de Eu. É de notório saber que o bloqueio permanente da RNA polimerase II durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário impede o desenvolvimento além do estágio de 8 células (Memili e First; 1998). Assim como a eficácia das drogas utilizadas (Memili e First; 1998, Chandolia et al.;1999). Porém neste trabalho foi explorado, após a comprovação da eficácia, o efeito do bloqueio reversível da RNA polimerase II, de forma intermitente, isoladamente nos estágios do desenvolvimento embrionário. Assim há a possibilidade de se desenvolver novos ensaios utilizando essa metodologia auxiliar na determinação exata do início de transcrição de um gene. No nosso trabalho definimos a dose mínima de DRB em 50uM, enquanto que para camundongos foi definida em 80uM (Abe et. al.; 2018). Doses mais altas de DRB podem bloquear a ação da RNA POL I, que coordena a transcrição de rRNA. A transcrição de rRNA, em bovinos, é retomada no estágio de 4 para 8 células (Kopečný et al., 1989; Laurincik et al., 2000), o que corrobora com os resultados da intensidade de transcrição expostos na Figura 1-C. Portanto, se a Eu pode indicar a transcrição de rRNA e os resultados da DRB são semelhantes aos da Actinomicina D, a dose que utilizamos bloqueia RNA POL II, mas não bloqueia RNA POL I e nem RNA POL III. A diferença, então, entre dose encontrada em nosso trabalho e o de Abe et a. (2018) pode ser devido a questões espécie específicas e a metodologia de detecção de transcrição, uma vez que utilizamos Eu ao invés de BrUTP.

Entre os estágios de oócito maduro e embrião de 2 células há 324 DEGS, entre embriões de 2 células e 4 células há 97 DEGS, entre embriões de 4 células e 8

células há 2031 DEGS e entre os de 8 células e 16 células há 236 DEGS (Jiang et al.;2014). Segundo Graf et al.(2014a) cerca de 95 novos transcritos são expressos entre as fases de oócito maturo e embrião de 4 células, 980 novos transcritos entre embriões de 4 e 8 células e 1325 entre embriões de 8 e 16 células. Corroborando com os resultados da intensidade de fluorescência (Figura 1-B).

De acordo com Jiang et al.(2014) e revisado por Graf et al.(2014b) os transcritos entre as fases de oócito e embrião de 2 células estão envolvidos com ciclo celular e mitose. Segundo Rodriguez e Farin (2003), oócitos submetidos ao bloqueio com DRB durante a maturação in vitro conseguem maturar e desenvolver até o estágio de blastocisto, porém com menor competência, similarmente zigotos quando bloqueados com DRB já desenvolvem com menor competência (Figura 2-B). Esperávamos que o bloqueio nas fases de 4 para 8 células seria o mais dramático ao desenvolvimento embrionário, uma vez que, como sugerido por (Kues et al.; 2008) e confirmado por Graf et al.(2014a) e Jiang et al. (2014) é o momento de ativação do genoma embrionário maior. O que nossos dados mostram (Figura 2 A e B) que um bloqueio entre as fases de 2 para 4 células, período de ativação do genoma embrionário menor, tem um efeito similar ao bloqueio entre as fases de 4 e 8 células. Tais genes estão relacionados principalmente com processamento de RNA, translação e transporte, conforme revisado por Graf et al.(2014b). Esses genes são relacionados diretamente ou indiretamente aos genes que serão transcritos a partir dos estágios de 8 células, importantes para a manutenção da pluripotência, viabilidade embrionária (Goissis & Cibelli; 2014), desenvolvimento embrionário e renovação celular (Daigneault et al.; 2018; Simmet et al.; 2018).

O bloqueio durante a fase de EGA menor, compromete o desenvolvimento, o embrião pode conseguir retomar o desenvolvimento embrionário normal, haja vista

que não há diferença no tempo de clivagem (Figura 3 - A e B) e alguns embriões conseguem chegar a fase de blastocisto (Figura 2 - A e B). A manutenção e a coordenação do desenvolvimento se deve aos transcritos herdados e têm-se sugerido que o tempo de clivagem é essencial para a viabilidade seleção dos embriões, sendo os embriões clivados com 2 células às 27 horas os embriões com maior viabilidade (Sugimura et al. 2010, Sugimura et al. 2012 e revisado por Sugimura et al. 2017), mostrando que essas etapas de EGA menor, mesmo tendo menos genes e transcritos envolvidos, são tão importantes quanto as demais.

Em camundongos também foi demonstrado que a EGA menor é essencial ao desenvolvimento embrionário, a EGA ocorrendo em um processo passo a passo dependente, em que a EGA menor é caracterizada por transcrições “promiscuas” produzindo transcritos não funcionais, com exceção dos transcritos sem introns, de tal forma que esse processo permite a reestruturação e o amadurecimento da cromatina possibilitando a expressão dos genes necessários a EGA maior e o desenvolvimento embrionário futuro (Abe et al. 2018). Em bovinos estudos semelhantes são necessários para se elucidar os mecanismos por traz deste processo.

Conclusão

Os ensaios com Eu associados a microscopia confocal permitem a detecção da transcrição durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário bovino. A DRB na dose de 50uM bloqueia a atividade da RNA POL II em embriões bovinos. A RNA POL II quando bloqueada durante fase de ativação menor do genoma embrionário bovino pode acarretar em redução na taxa de blastocisto bovino produzidos in vitro similarmente com o que ocorre durante ativação maior do

genoma embrionário, portanto a EGA menor é essencial ao desenvolvimento embrionário bovino.

Referências

Abe, K., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y (2018) Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci** 115:1–9.

Barnes, F.L., First, N.L. (1991) Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. **Mol Reprod Dev** 29:117-123.

Chandolia RK, Peltier MR, Tian W, Hansen PJ (1999) Transcriptional Control of Development, Protein Synthesis, and Heat-Induced Heat Shock Protein 70 Synthesis in 2-Cell Bovine Embryos. **BIOLOGY OF REPRODUCTION** 61:1644–1648.

Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, Ross PJ (2018) Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Scientific Reports** 8:1–11.

Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA (2006) Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular, Reproduction and Development** 73:288–297.

Dworkin, M.B., Dworkin-Rastl, E. Functions of maternal mRNA in early development. **Mol Reprod Dev.** v..26, p.261–297, 1990.

Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA (2004) Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science** 82 E-Suppl:53–62.

Goissis MD, Cibelli JB (2014) Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos1. **Biol Reprod** 90:1–10.

Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E (2014) Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 111:4139–4144.

Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E (2014) Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Anim Reprod Sci** 149:46–58.

Kopecny, V., Flechon, J.E., Camous, S., Fulka J, Jr (1989). Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine- structural autoradiographic study. **Molecular Reproduction and Development** 1:79–90.

Kues WA, Sudheer S, Herrmann D, Carnwath JW, Havlicek V, Besenfelder U, Lehrach H, Adjaye J, Niemann H (2008) Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proc Natl Acad Sci** 105(50):19768–19773.

Jiang Z, Sun J, Dong H, et al. (2014) Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics** 15:1–15.

Laurincik, J.; Thomsen, P.D., Hay-Schmidt, A., Avery, B., Greve, T., Ochs, R.L., Hyttel, P (2000) Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in pre- implantation bovine embryos produced in vitro. **Biology of Reproduction** 62:1024–1032.

Memili, E., Dominko, T., First, N.L (1998a) Onset of transcription in bovine oocytes, 2-, 4- and 8-cell embryos. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT** 51:36–41.

Memili, E., First, N.L (1998b) Developmental Changes in RNA Polymerase II in Bovine Oocytes, Early Embryos, and Effect of α -Amanitin on Embryo Development. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT** 51:381–389..

Pálffy, M., Joseph, S.R., Vastenhouw, N.L (2017) The timing of zygotic genome activation. **Current Opinion in Genetics and Development** 43:53-60.

Reyes JM, Chitwood JL, Ross PJ (2015) RNA-Seq profiling of single bovine oocyte transcript abundance and its modulation by cytoplasmic polyadenylation. **Mol Reprod Dev** 82:103–114.

Rodriguez KF, Farin CE (2004) Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology** 61:1499–1511.

Simmet K, Zakhartchenko V, Philippou-Massier J, Blum H, Klymiuk N, Wolf E (2018) OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci* 115:2770–2775.

Schultz, R.M., Stein, P., Svoboda, P (2018) The oocyte-to-embryo transition in mouse: past, present, and future. **Biology of Reproduction** 99:160-174.

Sobell HM (1985) Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci** 82:5328–31.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H (2005) Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development** 17:23–35 10.1071/RD04109.

Viktorovskaya, O.V., Schneider, D.A (2015) Functional Divergence of Eukaryotic RNA Polymerases: Unique Properties of RNA Polymerase I Suit its Cellular Role. **Gene** 556:19–26.

Zandomeni, R., Bunick, D., Ackerman, S., Mittleman, B., Weinmann, R (1983) Mechanism of action of DRB. III. Effect on specific in vitro initiation of transcription. **Journal of Molecular Biology** 167:561–574.

CAPÍTULO 3 - Transcriptoma de embriões bovinos de oócito ao dia 19 do desenvolvimento embrionário obtidos a partir de banco de dados públicos

Resumo

Até o surgimento do RNA-seq os estudos com microarranjos ofereciam as melhores informações sobre o transcriptoma no início do desenvolvimento embrionário, no entanto o RNA-seq possui várias vantagens sobre a técnica de microarranjos, permite a determinação direta dos pares de bases da sequência do cDNA, com resolução a partir de um único nucleotídeo, maior alcance, menos ruído e maior sensibilidade. O estudo do transcriptoma de embriões pode contribuir de forma significativa para o esclarecimento de questões biológicas do desenvolvimento embrionário. Através dessa metanálise de dados depositados no “Gene Expression Omnibus” (GEO), 9 experimentos e 112 amostras, avaliamos e identificamos padrões das diferenças transcricionais entre os estágios de oócito até o dia 19 desenvolvimento embrionário bovino. Encontramos 6457 genes diferentemente expressos entre os contrastes avaliados, sendo a fase de blastocisto a fase com maior diferença entre os estágios anterior e posterior. Através da análise de coexpressão gênica identificamos 62 genes com nível de expressão mais alto durante as fases de transição materno zigoto que enriqueciam as vias de reprodução sexuada, modificação, alquilação, metilação e demetilação do DNA. 33 genes que apresentaram os níveis médios de expressão mais baixos apenas durante a estágio de blastocisto, enriquecendo a via de organização de lamelipodium. 189 genes apresentaram os níveis médios de expressão mais altos durante o período de implantação, enriquecendo assim as vias de metabolismo

lipídico, efluxo de colesterol, organização a estímulos externos e migração celular. Concluímos que os dados públicos de sequenciamento de embriões bovinos podem ser utilizados para obtenção de informações das características transcricionais e as principais vias metabólicas do período de transição materno zigoto, da fase de blastocisto e do período de implantação embrionária.

Palavras chave: Desenvolvimento embrionário, bovinos, Transcriptoma, RNA-seq.

Introdução

O transcriptoma de embriões bovinos foi investigado de varias maneiras e por diferentes técnicas, as técnicas com maior poder de descrição até o momento são as técnicas de hibridação (Microarranjos) e as técnicas baseadas nas tecnologias de sequenciamento de nova geração (RNA-seq). As técnicas de Microarranjo foram utilizadas para comparar o transcriptoma de embriões bovinos produzidos in vitro e in vivo (Mohan et al., 2004, Smith et al., 2009), por transferência nuclear e produzidos in vitro e oriundos de inseminação artificial (Smith et al., 2005, Betscha et al., 2013), explorar o período de transição materno zigoto, ativação do genoma embrionário, bovino (Kues et al.,2009), o período de pré implantação e implantação embrionária (Clemente et al., 2011). Investigação dos efeitos da estimulação hormonal (Gad et al., 2011,Labrecque et al., 2014), da Puberdade (Dorji et al., 2012), a viabilidade e a competência (Held et al., 2012, Orozco-Lucero et al., 2014, Gupta et al., 2017), do metabolismo lipídico (Valour et al., 2014, Salehi et al., 2016), o dimorfismo sexual (Dobbs et al., 2014, Forde et al.; 2016), a suplementação de Metionina (Saadi et al., 2016) e da hiperinsulinemia (Laskowski et al., 2017).

Contudo, apesar da alta correlação encontrada (Su et al., 2011; Wang et al., 2014; Zhao et al., 2014; Nault et al., 2015) e a possibilidade de integração de dados

entre os estudos de microarranjo e RNA-seq (Zuo et al., 2016), o RNA-Seq demonstra ter acuidade e repetibilidade para quantificar níveis de expressão gênica, com menor quantidade de RNA nas amostras permitindo sequenciar o transcriptoma inteiro em alto rendimento e de maneira quantitativa podendo ainda identificar SNPs e alterações gênicas não identificadas previamente (Huang e Khatibe, 2010; Chitwood et al.,2013).

O primeiro transcriptoma de embriões bovinos por técnicas de RNA-seq foi feito por Huang e Khatibe (2010) utilizando a 20 embriões por amostra (“pool”), em seguida Chitwood et al.(2013) demonstrou ser possível sequenciar o transcriptoma de um único embrião (“single”) e assim revolucionando a forma de se avaliar o o transcriptoma de embriões bovinos. Criamos, então, a hipótese que o sequenciamento de RNA completo (transcriptoma por RNA-seq) de embriões bovinos pelas técnicas de “novíssima geração” é comparável entre experimentos e os dados depositados nos bancos de dados públicos podem ser usados para avaliar e identificar padrões das diferenças transcricionais entre os estágios do desenvolvimento embrionário bovino.

Para isso objetivamos:

1. Identificar nos bancos de dados públicos experimentos que utilizaram embriões bovinos em diferentes estágios do desenvolvimento e que podem ser comparados.
2. Avaliar e identificar as diferenças transcricionais e por análise de co-expressão encontrar padrões nas diferenças transcricionais específicas de cada estágio do desenvolvimento e por análise de enriquecimento de vias identificar as principais vias metabólicas de cada estágio.

Material e métodos

Coleta dos dados

Os arquivos contendo os dados de expressão gênica global (transcriptoma) por RNA-seq foram obtidos do Gene Expression Omnibus do NCBI (GEO) com amostras contendo as fases do desenvolvimento: oócitos imaturos (GV), oócitos maduros (MII), embrião de 2 células (2 cells), embrião de 4 células (4 cells), embrião de 8 células (8 cells), embrião de 16 células (16 cells), Mórulas (mórula), blastocisto (Blast) e botões embrionários dos dias 10 (D10), 13 (D13), 16 (D16) e 19 (D19) do desenvolvimento embrionário. As amostras foram também sub-divididas nos períodos de oócito (oocyte), ativação menor do genoma (minor EGA) contendo os períodos 2 cells e 4 cells, ativação maior (major EGA) contendo as fases 8 cells e 16 cells, pre implantação (pre implantation) contendo as fases Mórula e Blast e implantação (implantation) contendo as fases D10, D13, D16 e D19. Como critério para seleção dos dados adotou-se como critério a forma como foram produzidos os embriões, forma de identificação dos estágios de desenvolvimento, plataforma de sequenciamento utilizada, semelhança entre os do desenho experimentais, amostras controle sem utilização de drogas ou qualquer tipo de bloqueio que não fosse comum a todos os demais estudos, a disponibilidade dos dados “brutos” e por fim a qualidade das informações sobre os dados e dos próprios dados disponibilizados.

Processamento dos dados e bioinformática

Foram baixados os arquivos em formato SRA diretamente do GEO para o cluster do laboratório de Genética molecular e bioinformática da (LGMB) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Todos os dados tiveram a qualidade de sequenciamento verificada pelo

software FASTQC (Andrews S.;2010). e em seguida realizou-se a remoção das reads de acordo com a qualidade dos dados (“trimagem”) com o software TRIMMOMATIC (Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B.; 2014), utilizando os parâmetros “ -threads 24 LEADING:22 TRAILING:22 SLIDINGWINDOW:4:26 MINLEN:36 AVGQUAL:24”; ou seja qualidade mínima do início e fim da read de 22 phreds, qualidade média de 24 phreds e tamanho mínimo de 24 reads. Após feita a seleção for qualidade das “reads” repetiu-se a análise com o software FASTQC. As amostras que passaram pelo teste de qualidade foram então alinhadas com o genoma bovino Bos_taurus_UMD_3.1.1 com o software STAR (Dobin et. al.; 2013), utilizando os parâmetros padrões do software. A qualidade do alinhamento foi então verificada com o software QUALIMAP, um relatório final foi gerado usando o software MULTIQC (Ewels et al., 2016).

Análise de diferença de expressão gênica

A análise de diferença de expressão gênica foi realizada com o pacote DESEQ2 (Love, M.I., Huber, W., Anders, S.; 2014) do software R (R Core Team, 2018), foi realizada a análise de componentes principais (PCA, Figura1) e os contrastes entre as fases subsequentes do desenvolvimento embrionário bovino, para um gene ser considerado diferentemente expresso foi adotado um valor de p ajustado menor que 0,05 ($p_{adj} < 0,05$), pelo método de Benjamini-Hochberg (“BH”) e um “log2 fold change” maior que 2 ou menor que -2. Para a representação dos valores de expressão gênica foi utilizada a transformação de normalização da variância (função “varianceStabilizingTransformation” do pacote DESEQ2) e que foi utilizada para fornecer os dados para a análise de co-expressão gênica, feita utilizando o algoritmo SOTA (do inglês “Self-organizing Tree Algorithm”) do pacote cValid (Brock et. al.; 2008) do R, e definimos máximo 21 grupos de genes. Para a

análise de ontologia gênica e enriquecimento de vias foi utilizado o pacote ClusterProfiler (Yu et. Al.; 2012) do software R. Os grupos de genes obtidos da função SOTA foram então identificados quanto a sua ontogenia genética e a análise de enriquecimento de vias com a função “compareCluster” e a função “enrichGO”. Para visualização dos resultados foram utilizadas as funções Heatmap.2 do pacote gplots (Warnes et. Al. 2016) e pheatmap do pacote pheatmap (Kolde, 2015) ambos do software R.

RESULTADOS

Sequenciamento e análise de expressão gênica

A descrição dos dados utilizados encontra-se na Tabela 1. Foram utilizadas um total de 112 amostras de um total de 9 experimentos diferentes, a maioria (44 amostras) encontrada foi de blastocisto, foi possível a identificação de 24273 genes. Para a análise de diferença de expressão gênica a origem experimental e o tipo de material biológico (“pool” quando foi utilizado mais de um embrião por amostra ou “single” quando foi usado um único blastocisto por amostra) usado para a extração do RNA e produção da biblioteca de sequenciamento foram usados como bloco no modelo estatístico. Na Figura1 temos a análise de componentes principais, as amostras se agruparam segundo o desenvolvimento embrionário e o período do desenvolvimento embrionário (Figura3.1-A,C) independentemente da origem dos dados e de como o material foi processado para a produção da biblioteca de sequenciamento (Figura3.1-B,D). Por se tratar de 12 fases do desenvolvimento embrionário, Tabela3.2, exploramos os contrastes respeitando as fases mais próximas e a sequência biológica, assim os contrastes de estágios muito distantes como GV versus D19 não foram explorados. A Figura2 traz os contrastes escolhidos

representados na forma de volcano-plots, mostrando um grande número de genes diferencialmente expressos nas fases de mórula para Blast e de Blast para o D10. De todos os contrastes o que apresentou maior diferença absoluta foi a comparação “mórula vs Blast”, demonstrando 44 genes mais expressos em “mórula” e 3021 genes mais expressos em “Blast”. Desse contraste 669 genes (mais expressos em “Blast”) enriqueceram as vias de processo biológico para montagem de junções célula a célula. Dos 3065 genes diferencialmente expressos deste contraste foram escolhidos os genes cuja a média de expressão fosse maior que a média de expressão somada de um desvio padrão, o resultado está resumido na forma de um heatmap na Figura3.3.

Ao longo de todos os contrastes explorados foram encontrados 6457 genes diferencialmente expressos, a Figura3.4 traz um Heatmap com a representação gráfica dos valores de expressão desses genes ao longo das 112 amostras e ordenadas de acordo com os estágios do desenvolvimento embrionário (GV até D19) e ao longo dos períodos de desenvolvimento embrionário (oocyte até implantation).

Análise de co-expressão gênica e identificação de grupos de genes e vias específicas dos estágios do desenvolvimento

Com os 6457 genes diferencialmente expressos identificamos 21 grupos de genes ou “clusters” gênicos pela função SOTA, focamos então nos períodos do desenvolvimento pois não foi encontrado um grupo de genes estágio específico. Assim, foi possível identificar 285 genes que apresentaram a média de expressão mais alta durante a EGA, esse grupo de genes foi denominado “EGA”. 162 genes apresentaram redução na média de expressão durante o estágio de blastocisto e, portanto, esse grupo de genes foi denominado “Blastocyst”. 509 genes

demonstraram a maior média de expressão durante o período de implantação e, portanto, foram chamados de “Implantation”. 5501 genes que não foi possível restringir a um estágio ou período específico e não enriqueceram nenhuma via. A análise de enriquecimento desses genes está resumida na Figura 3.5. 62 genes do “cluster EGA” enriqueceram as vias de reprodução sexuada, alquilação, metilação, demetilação e modificação do DNA. 33 genes do grupo “ Blastocyst” enriqueceram as vias de organização de lamelipodium. 189 genes do grupo “Implantation” enriqueceram as vias de migração celular, regulação de resposta a estímulos externos, regulação de sinalização para tradução da proteína Rho, efluxo de colesterol, processo de metabolismo e metabolismo celular de lipídeos.

Tabela 1. *Contendo a descrição dos dados obtidos que foram utilizados.*

NÚMERO DE AMOSTRAS	Estágio	Período	Origem	GSE	PLATAFORMA	Tipo de biblioteca
3	GV	Oocyte	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
3	GV	Oocyte	REYS_et_al.	GSE61717	Illumina HiSeq 2000	single
3	MII	Oocyte	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
2	MII	Oocyte	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
3	MII	Oocyte	REYS_et_al.	GSE61717	Illumina HiSeq 2000	single
2	2cells	Minor_EGA	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
3	4cells	Minor_EGA	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
2	4cells	Minor_EGA	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
3	8cells	Major_EGA	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
2	8cells	Major_EGA	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
3	16cells	Major_EGA	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
2	16cells	Major_EGA	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
4	Morula	Pre_Implantation	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
2	Blast	Pre_Implantation	HUANG_et_al.	GSE25082	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
3	Blast	Pre_Implantation	GRAF_et_al.	GSE52415	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
2	Blast	Pre_Implantation	JIANG_et_al.	GSE59186	AB_5500xl_Genetic_Analyzer	single
16	Blast	Pre_Implantation	HERAS_et_al.	GSE74675	Illumina HiSeq 2000	single
5	Blast	Pre_Implantation	CHITWOOD_et_al.	GSE44023	illumina_HiSeq2500	single
16	Blast	Pre_Implantation	PEÑAGARICANO_et_al.	GSE48147	Illumina HiSeq 2000	pool
7	D10	Implantation	MAMO_et_al.	GSE56513	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
5	D13	Implantation	MAMO_et_al.	GSE56513	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
5	D16	Implantation	MAMO_et_al.	GSE56513	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
5	D19	Implantation	MAMO_et_al.	GSE56513	Illumina_Genome_AnalyzerII	pool
11	D19	Implantation	FORDE_et_al.	GSE85563	Illumina HiSeq 2000	pool

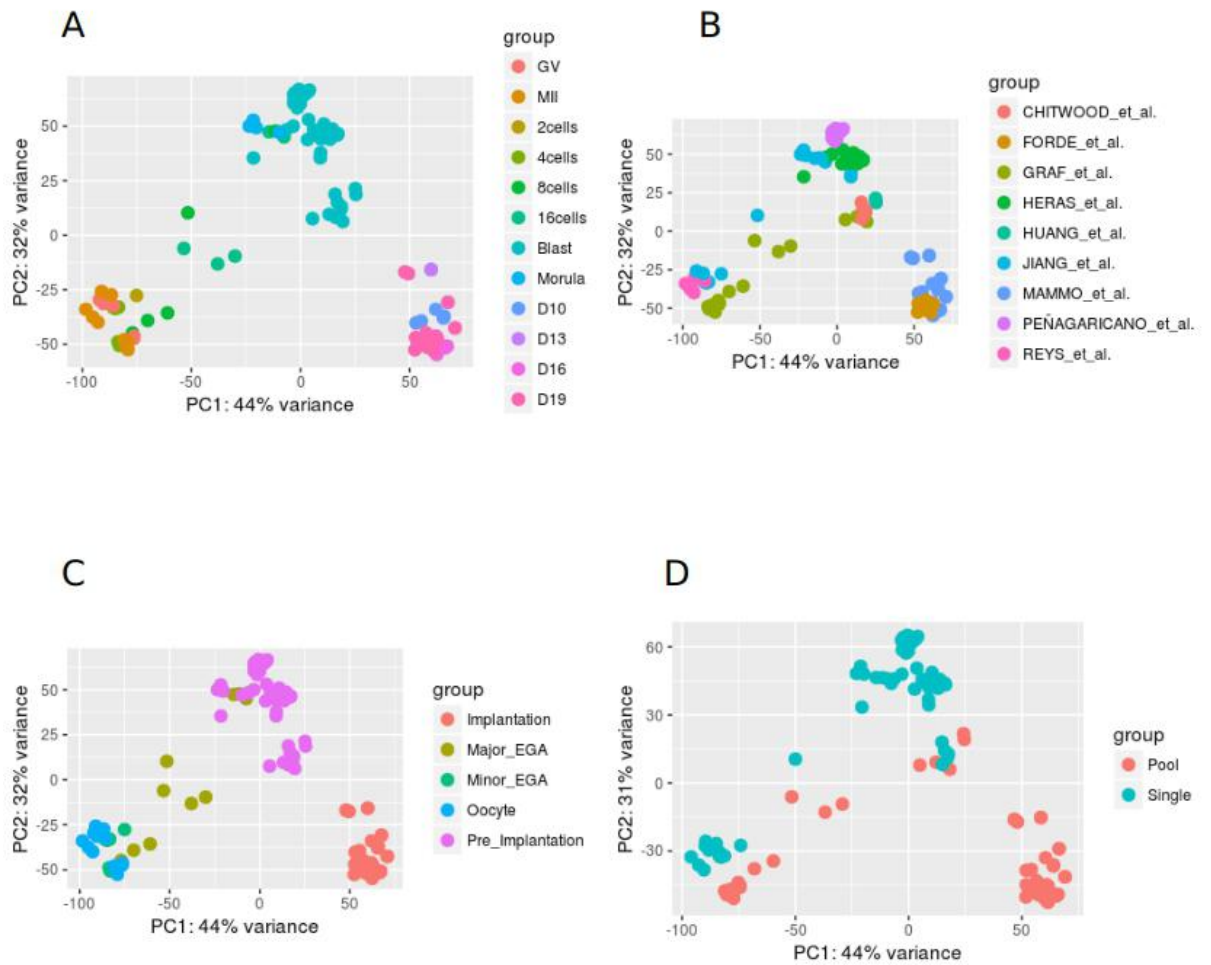


Figura 1. Análise de componentes principais: (A) cores indicam as fases do desenvolvimento embrionário;(B) cores indicam a origem dos dados; (C) as cores indicam o período do desenvolvimento embrionário; (D) as cores indicam como o material foi processado para a produção da biblioteca de sequenciamento.

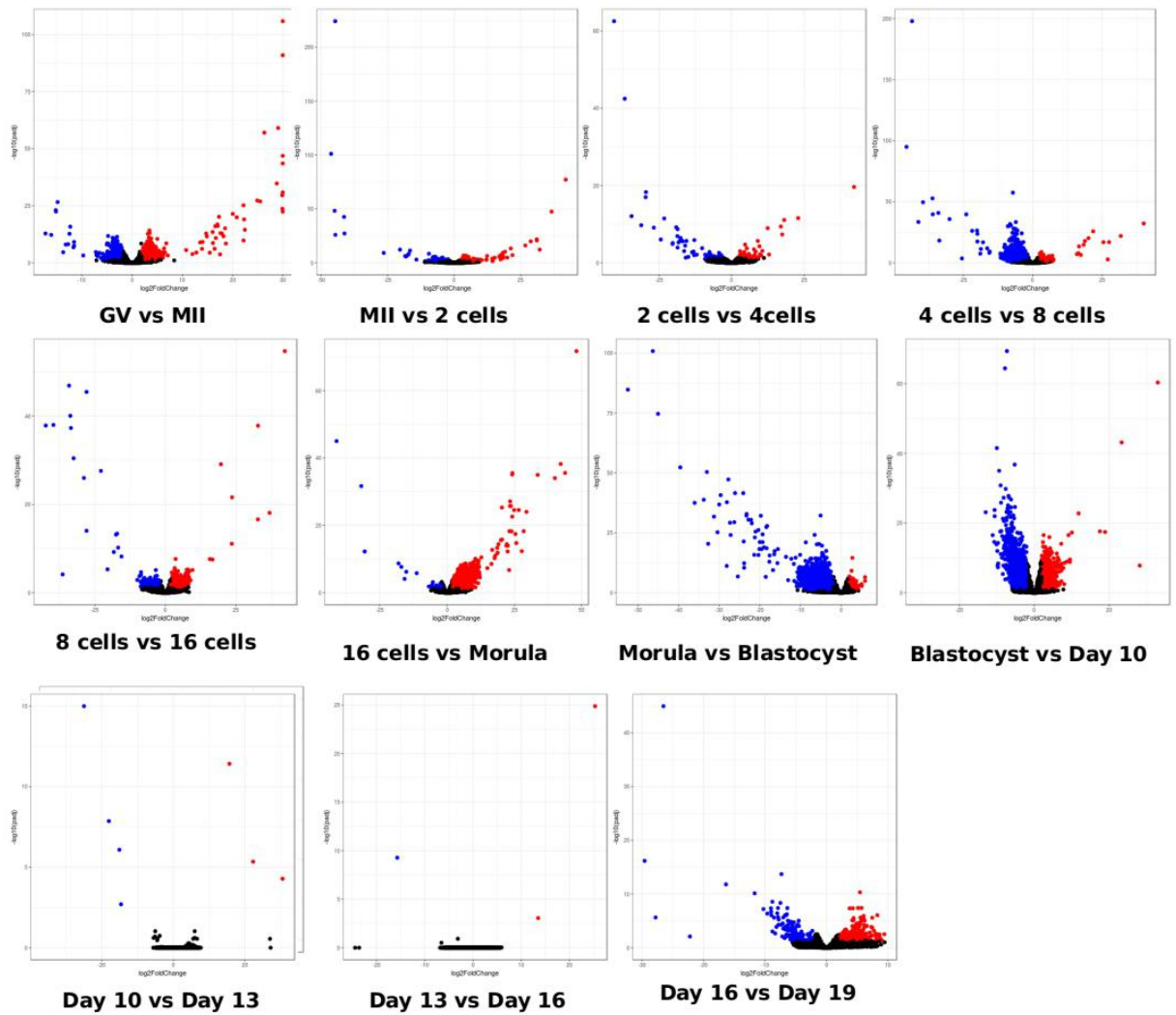


Figura 2. Volcano plots dos contrastes escolhidos para serem explorados, no eixo Y temos o valor de \log_{10} do padj e no eixo x temos o valor de “ \log_2 fold change”, os genes diferentemente expressos estão representados pela cor azul, expressão reprimida (“down regulated”), e pela cor vermelha, expressão aumentada (“up regulated”).

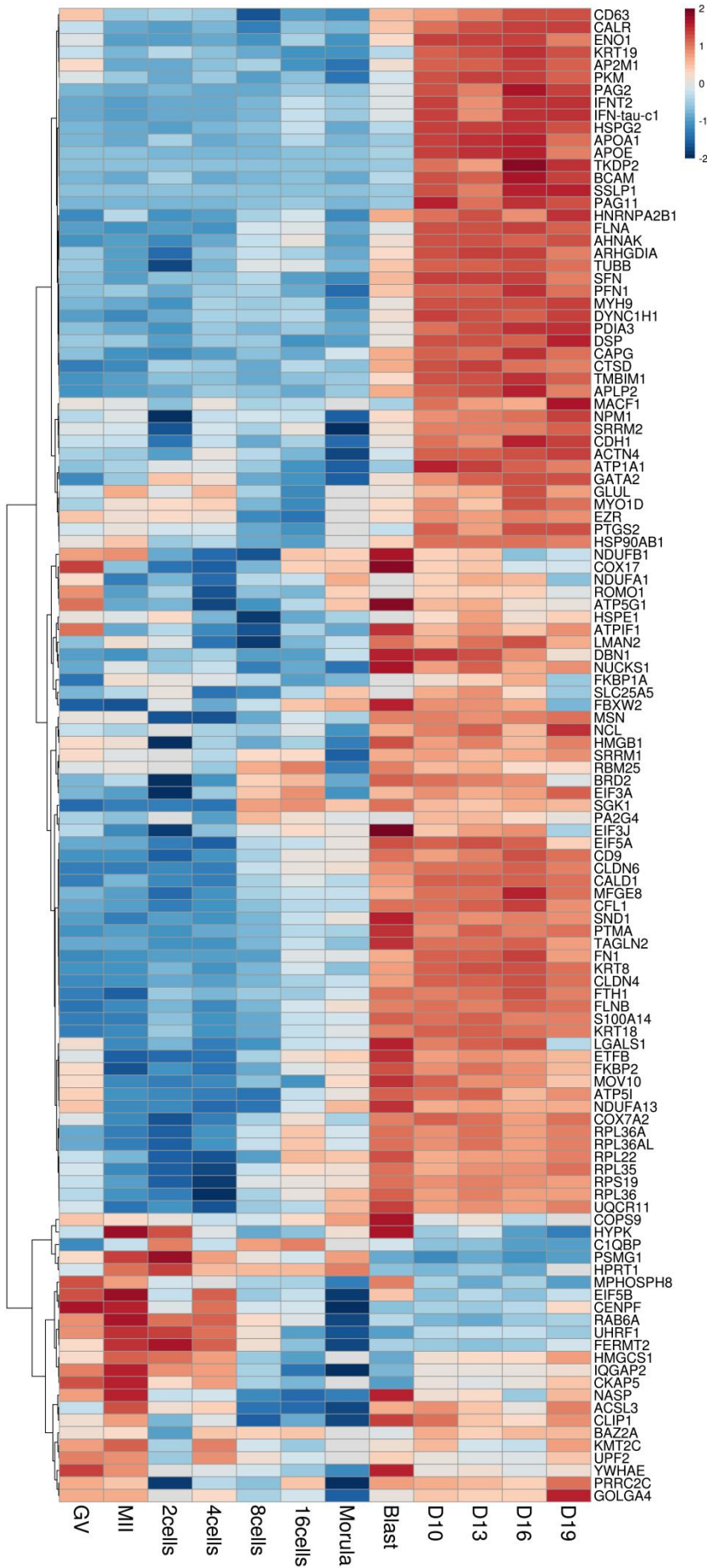


Figura 3. Heatmap gerado com a média de expressão por período do desenvolvimento e com os genes diferentemente expressos mais relevantes do contraste “Morula vs Blastocyst”.

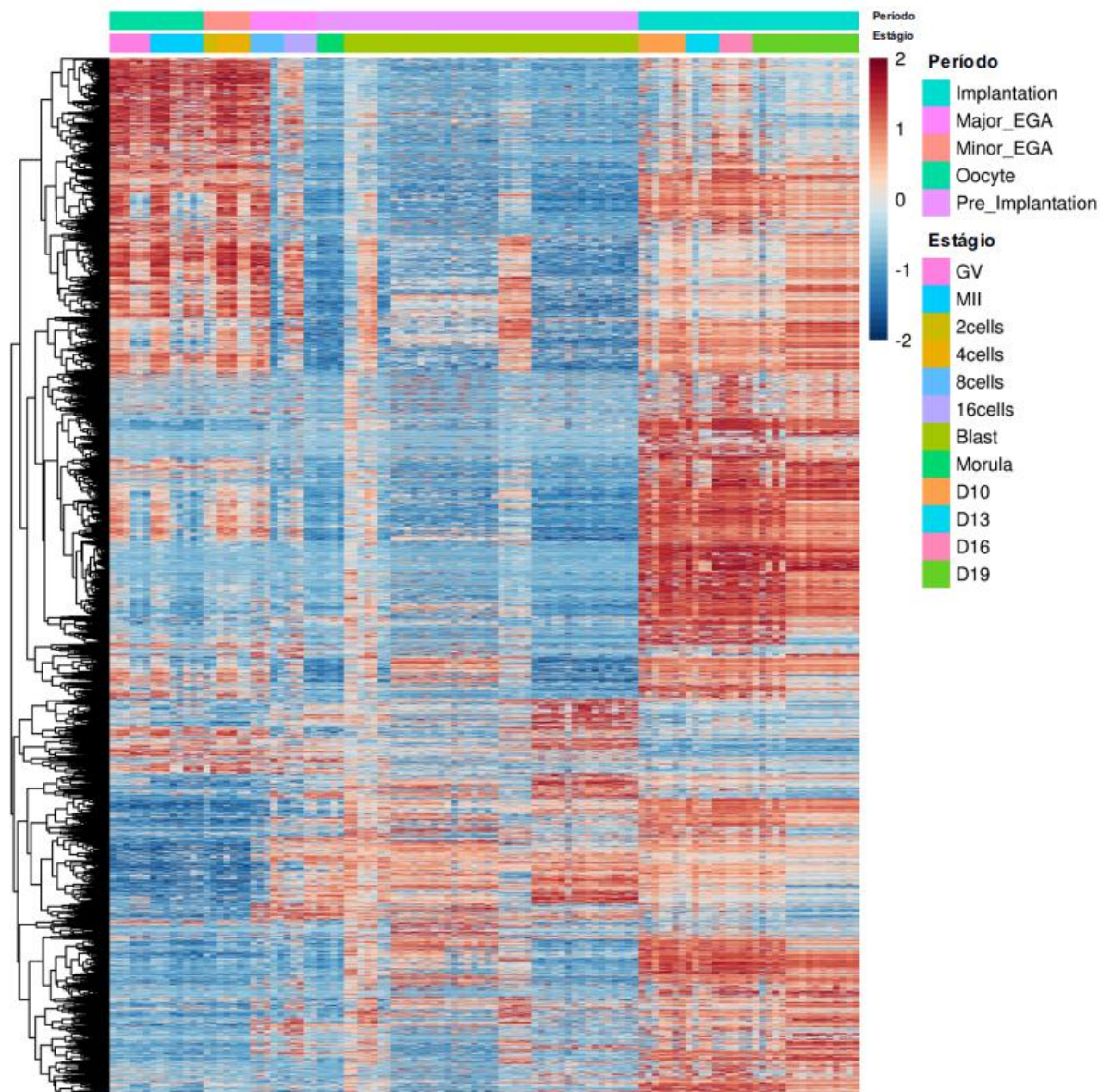


Figura 4. Heatmap gerado com todas as amostras e todos os 6457 genes considerados diferentemente expressos em algum dos contrastes explorados ao longo do desenvolvimento embrionário bovino.

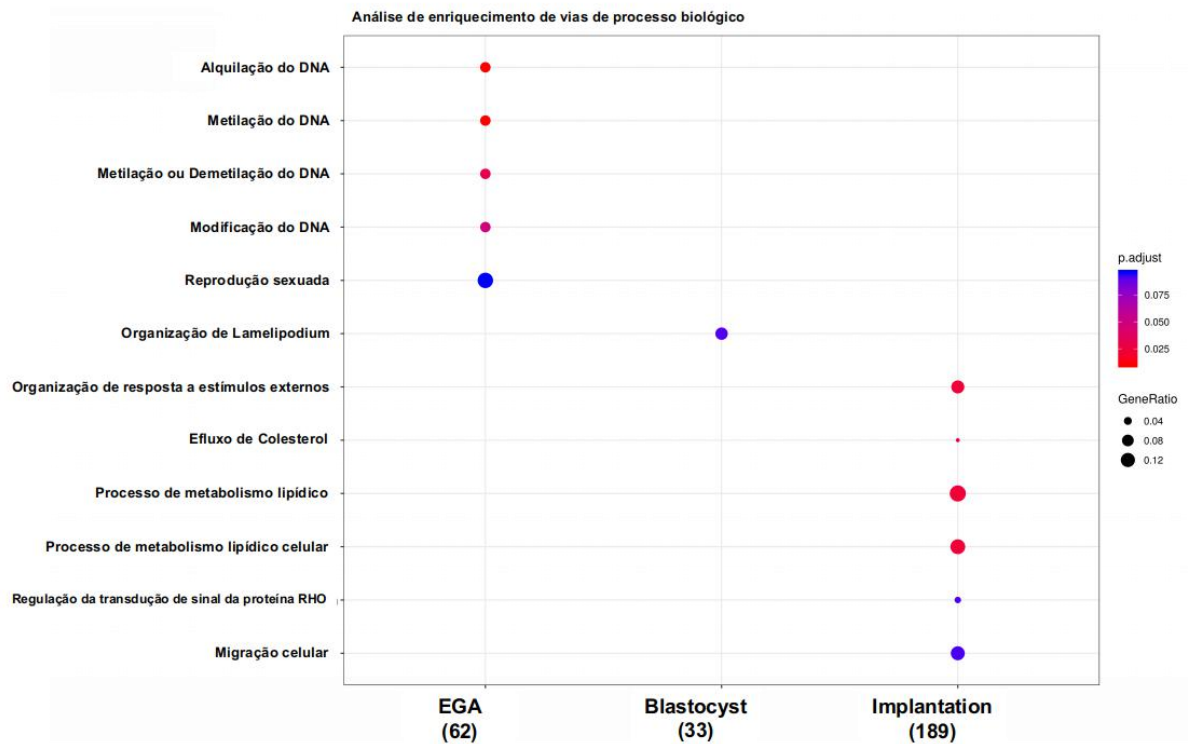


Figura 5. Análise de enriquecimento de vias para processo biológico contendo as vias mais enriquecidas para os grupos de genes obtidos da análise de co-expressão gênica dos 6457 genes diferentemente expressos.

Discussão

Dados utilizados e replicabilidade dos estudos de RNA-seq

Como mostrado na Figura 3.1 os dados se mostraram muito coerentes com a sequência biológica dos fatos, demos preferência para experimentos com metodologias experimentais e plataformas de sequenciamento mais próximas, porém os experimentos de Graf et.,al.(2014) e de Jiang et., al.(2014) usaram plataformas diferentes, métodos de obtenção de amostras e RNA diferentes e foram mantidos na análise pois se mantiveram congruentes. O estágio de Blastocyst foi a que mais conseguimos dados e com uma maior diversidade de tipos experimentais, pelo grande número de dados de diversas fontes encontramos, também, uma maior variação (Figura 1,B). Porém notamos que dados obtidos através do sequenciamento de um único blastocisto ficaram mais próximas entre si, mesmo

quando eram de obtenção *in vivo* e *in vitro*, do que amostras obtidas através de “pool” em relação a “single”. Contudo, tendo usado embriões *in vitro* (Graf et al., 2014) e *in vivo* (Jiang et al., 2014) os dados se mantiveram muito próximos, porém na Figura 3.1-D podemos ver uma tendência de distinção entre bibliotecas produzidas com embriões únicos e com grupos de embriões (“pool”), testamos essa possível distinção o que não resultou em diferença estatística, então mantivemos essa característica das amostras como bloco. A principal vantagem em se utilizar amostras em “pool” é evitar os desvios que cada embrião possa trazer a análise, trazendo assim um viés que não representaria a realidade do transcriptoma do estágio estudado (Graf et al., 2014). A vantagem em se utilizar as amostras em “single” é que podemos explorar a expressão alelo específica através de SNPs (Chitwood et al., 2013). Pela análise de componentes principais que tanto “single” quanto “pool” podem ser tão precisas e congruentes (Figura 1)

Os experimentos de Forde et al. (2017), amostras de D19, e Mamo et al. (2011), amostras de D10 a D19, ficaram mais próximas entre si dos que dos demais, neste caso o único tipo de biblioteca possível serial em “pool” e por serem do mesmo grupo e em fases mais próximas das demais apresentam muitas semelhanças experimentais entre si que em comparação ao demais, de todo modo mantiveram uma proximidade com os estágios anteriores mais próximos, obedecendo a sequência biológica. Além disso na Figura 2 e na Tabela 2 é possível notar que nesse período houve uma menor diferença de expressão entre os estágios do desenvolvimento. Diferenças no número de genes diferencialmente expressos entre os estágios e os períodos do desenvolvimento em comparação com a nossa análise e a análise feita em cada uma das fontes pesquisadas era esperada, uma vez que

os programas e metodologias de alinhamento (Wu et al.,2018) e o modelo estatístico (Assefa et al.,2018) podem influenciar o resultado final.

Análise de diferença de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário

Durante as estágios que abrangem GV e MII encontramos 3 experimentos os de Graf et. al.(2014) e de Reys et. al.(2015), enquanto que as Jiang et.al.(2014) apenas as de MII. As amostras de Graf et. al.(2014) e de Reys et. al.(2015) identificaram respectivamente 106 e 1553 genes mais expressos em GV e 14 e 313 em MII, adicionando os dados de Jiang et. al.(2014) identificamos 135 mais expressos em GV e 135 em MII.

As amostras de 4,8,16 cels foram usadas amostras de Graf et. al.(2014) e Jiang et. al.(2014) enquanto as amostras de 2 Cells e Morula apenas de Jiang et. al.(2014). Quando comparando MII contra 2 Cells Jiang et. al.(2014) relatou 159 genes mais expressos em MII e 165 em 2 Cells, adicionando as amostras de Graf et. al.(2014) e Reys et. al.(2015) encontramos 52 em MII e 33 em 2 Cells. Entre 2 e 4 Cells encontramos 14 genes mais expressos em 2 Cells e 33 genes mais expressos em 4 Cells contra 69 genes mais expressos por Jiang et. al. (2014) nesta fase. Jiang et. al.(2014) encontrou 2031 genes diferencialmente expressos entre 4 e 8 células , enquanto que Graf et. al.(2014) encontrou 1295 genes diferencialmente expressos nessa fases, esses experimento divergem principalmente no tipo de plataforma utilizada e no método de extração (“single” contra “pool”), ambos os dados estão homogêneos e muito próximos um dos outros (Figura3.1). No nosso experimento, utilizando ambos os dados, chegamos a um número muito mais próximo do experimento de Graf et. al.(2014), 1041 genes diferencialmente expressos sendo que 56 mais expressos em 4 Cells e 985 mais expressos em 8 Cells. Nossos dados corroboram com a literatura (Kopecny et al., 1989, Barnes & First, 1991, Jiang et

al.,2014; Graf et al., 2014) que durante a EGA o período de 4 para 8 células é um estágio de alta atividade transcricional e provavelmente o maior desse período, corroborando também com os nossos achados do Capítulo 2 (Figura 2.1). Jiang et. al.(2014) sugere um segundo período de alta atividade transcricional durante o período de 16 Cells que também foi notado no nosso experimento (Tabela 2).

Contudo o período de maior atividade transcricional quando comparado aos estágios imediatamente anterior e posterior, no entanto parece o estágio de Blastocyst, apresentando 3021 genes mais expressos que Morula e 2303 a mais que D10. Nessa fase podemos notar (Figura 3) a expressão genes (IFNT2, IFN-tau-c1) relacionados a produção de Interferon tau que estão envolvidos no reconhecimento da prenhez e regulação da $pgf-2\alpha$ e da progesterona durante a manutenção da prenhez em ruminantes (UNIPROT, 2017) e podem ser desregulados em processos como a clonagem (Biase et al., 2016). Outra família de genes que nos chamou a atenção nesse estágio do desenvolvimento foram os genes KRT8, KRT18, GATA2 que são genes restritos ao trofotoderma e essenciais para o desenvolvimento embrionário (Goosens et al., 2010; Bai et al., 2011).

Análise de coexpressão gênica

Com os 6457 genes diferencialmente expressos conseguimos através da análise de coexpressão pela função gênica identificar precisamente três grupos gênicos que marcaram períodos e estágios. Na nossa análise ficou claro o agrupamento dos estágios durante a oocyte até Major_EGA que chamamos de EGA e Blastocyst e durante o período de Implantation. Jiang et. al.(2014) conseguiu isolar grupos gênicos es períodos menos abrangentes que o nosso, no entanto para isso ele utilizou apenas amostras próprias. Mamo et. al.(2011) que também utilizou apenas amostras próprias, de Blastocyst até D19, conseguiu restringir em períodos

menores. Acreditamos que com colocando todos os experimentos juntos conseguimos isolar genes bem característicos de cada fase, porém um grande número de genes (5501) que foi identificado como diferencialmente expresso em algum contraste analisado não agrupou um estágio ou um período específico e falharam na análise de enriquecimento. Porém os genes que conseguimos agrupar nos períodos específicos estão em conformidade com a literatura (Jiang et al., 2014; Graf et al., 2014; Mamo et al., 2011 e Zuo et al., 2016).

Conclusão

Conseguimos identificar analisar dados públicos com qualidade que utilizaram embriões bovinos em diferentes estágios e assim que podem ser comparados. O estágio de blastocisto foi a que mais forneceu dados e com maior variabilidade entre os dados. Notamos que a metodologia de produção de bibliotecas partindo de um único blastocisto pode ser tão precisa quanto quando se agrupa amostras (“pooling”). Foi possível encontrar as características transcricionais e as principais vias metabólicas do período de transição materno zigoto, da fase de blastocisto e do período de implantação embrionária.

Referências

Assefa, A.T.; De Paepe, K.; Everaert, C.; Mestdagh, P.; Thas, O.; Vandesompele, J. Differential gene expression analysis tools exhibit substandard performance for long non-coding RNA-sequencing data. **Genome Biology**, v. 19(1), p. 1-16, 2018.

Barnes, F.L., First, N.L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, v.29, p.117–123, 1991.

Bai, H .; Sakurai, T.; Someya, Y.; Konno, T.; Ideta, A.; Aoyagi, Y.; Imakawa, K. Regulation of Trophoblast-Specific Factors by GATA2 and GATA3 in Bovine Trophoblast CT-1 Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57(4), p. 518-525, 2011.

Betsha S, Hoelker M, Salilew-Wondim D, et al. (2013) Transcriptome profile of bovine elongated conceptus obtained from SCNT and IVP pregnancies. **Molecular Reproduction and Development** 80:315-333.

Biase, F.H.; Rabel, C.; Guillomot, M.; Hue, I.; Andropolis, K.; Olmstead, C.A.; Oliveira, R.; Wallace, R.; Le Bourhis, D.; Richard, C.; Campion, E.; Chaulot-Talmon, A.; Giraud-Delville, C.; Taghouti, G.; Jammes, H.; Renard, JP.; Sandra, O.; Lewin, H.A. Massive dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned cattle conceptus and maternal endometrium. **PNAS**, v.113(51), p.14492-14501, 2016.

Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gaora P, et al. (2011) Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus1. **Biology of Reproduction** 85:285–295.

Dobbs KB, Gagné D, Fournier E, et al. (2014) Sexual Dimorphism in Developmental Programming of the Bovine Preimplantation Embryo Caused by Colony-Stimulating Factor 21. **Biology of Reproduction** 91:1–12.

Dorji, Ohkubo Y, Miyoshi K, Yoshida M (2012) Gene expression differences in oocytes derived from adult and prepubertal japanese black cattle during in vitro maturation. **Reprod Domest Anim** 47:392–402.

Forde N, Maillo V, O'Gaora P, et al. (2016) Sexually Dimorphic Gene Expression in Bovine Conceptuses at the Initiation of Implantation. **Biology of Reproduction** 95:92–92.

Forde, N.; Simintiras, C.A.; Sturmey, R.G.; Graf, A.; Wolf, E.; Blum, H.; Lonergan, P. Effect of lactation on conceptus-maternal interactions at the initiation of implantation in cattle: I. Effects on the conceptus transcriptome and amino acid composition of the uterine luminal fluid. **Biology of Reproduction**, v.97(6), p. 798-809, 2017.

Gad A, Besenfelder U, Rings F, et al. (2011) Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: Implications for animal breeding and human assisted reproduction. **Human Reproduction** 26:1693–1707.

Goossens, K.; Tesfaye, D.; Rings, F.; Schellander, K.; Hölker, M.; Van Poucke, M.; Van Zeveren, A.; Lemahieu, I.; Van Soom, A.; Peelman, L.J. Suppression of keratin 18 gene expression in bovine blastocysts by RNA interference. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22(2), p. 395-404, 2010.

Graf, A.; Krebs, S.; Zakhartchenko, V.; Schwalb, B.; Blum, H.; Wolf, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*, v.111(11), p.4139-4144, 2014.

Gupta A, Singh J, Dufort I, Robert C, Dias FCF, Anzar M (2017) Transcriptomic difference in bovine blastocysts following vitrification and slow freezing at morula stage. **PLoS One** 12:1–20.

Held E, Salilew-Wondim D, Linke M, et al. (2012) Transcriptome Fingerprint of Bovine 2-Cell Stage Blastomeres Is Directly Correlated with the Individual Developmental Competence of the Corresponding Sister Blastomere¹. **Biol Reprod** 87:1–13.

Heras, S.; De Coninck, D.I.M.; Van Poucke, M.; Goossens, K.; Bogado P.O.; Van Nieuwerburgh, F.; Deforce, D.; De Sutter, P.; Leroy, J. L.M.R.; Gutierrez-Adan, A.; Peelman, L.; Van Soom, A. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 17(1), p, 1-15, 2016.

Huang, W.; Khatib, H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**, v. 11(1), p. 711-720, 2011.

Labrecque R, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA (2014) Gene expression analysis of bovine oocytes at optimal coasting time combined with GnRH antagonist during theno-FSH period. **Theriogenology** 81:1092–1100.

Laskowski D, Sjunnesson Y, Humblot P, et al. (2017) Insulin exposure during in vitro bovine oocyte maturation changes blastocyst gene expression and developmental potential. **Reprod Fertil Dev** 29:876–889.

Mamo, S.; Mehta, J.P.; McGettigan, P.; Fair, T.; Spencer, T.E.; Bazer, F.W.; Lonergan, P. RNA Sequencing Reveals Novel Gene Clusters in Bovine Conceptuses Associated with Maternal Recognition of Pregnancy and Implantation. **BOR**, v.85(6), p. 1143-1151, 2011.

Mohan, M., Hurst, A. G., & Malayer, J. R. (2004) Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on Day 7 or produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 68(3):288–298.

Nault R, Fader KA, Zacharewski T (2015) RNA-Seq versus oligonucleotide array assessment of dose-dependent TCDD-elicited hepatic gene expression in mice. **BMC Genomics** 16:1–12.

Orozco-Lucero E, Dufort I, Robert C, Sirard MA (2014) Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. **Molecular Reproduction and Development** 81:31–41.

Kopecny, V.; Fleckon, J.E.; Camous, S.; Fulka, J. Nucleogenesis and the onset of transcription in the 8-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. **Molecular Reproduction and Development**, v.1, p.79–90, 1989.

Kues WA, Sudheer S, Herrmann D, et al. (2009) Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 105:19768–19773.

Peñagaricano, F.; Souza, A.H.; Carvalho, P.D.; Driver, A.M.; Gamba, R.; Kropp, J.; Hackbart, K.S.; Luchini, D.; Shaver, R.D.; Wiltbank, M.C.; Khatib, H. Effect of Maternal Methionine Supplementation on the Transcriptome of Bovine Preimplantation Embryos. **PLoS ONE**, v. 8(8), p. 1-10, 2013.

Reyes, J.M.; Chitwood, J.L.; Ross, P.J. RNA-Seq profiling of single bovine oocyte transcript abundance and its modulation by cytoplasmic polyadenylation. **MRD**, v.82(2), p.103-114, 2015.

Shojaei Saadi HA, Gagné D, Fournier É, Baldoceca Baldeon LM, Sirard MA, Robert C (2016) Responses of bovine early embryos to S-adenosyl methionine supplementation in culture. **Epigenomics** 8:1039–1060.

Salehi R, Colazo MG, Tsoi S, et al. (2016) Morphologic and transcriptomic assessment of bovine embryos exposed to long chain fatty acids. **Reproduction** 152:715–726.

Smith SL, Everts RE, Tian XC, et al. (2005) Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102:17582–17587.

Smith SL, Everts RE, Sung LY, et al. (2009) Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of in vitro maturation, fertilization and culture. **Molecular Reproduction and Development** 76:38–47.

Su Z, Li Z, Chen T, et al. (2011) Comparing next-generation sequencing and microarray technologies in a toxicological study of the effects of aristolochic acid on rat kidneys. **Chemical Research in Toxicology** 24:1486–1493.

Wu, D.C.; Yao, J.; Ho, K.S.; Lambowitz, A.M.; Wilke, C.O. Limitations of alignment-free tools in total RNA-seq quantification. **BMC Genomics**, v.19(1), p. 1-14, 2018.

Valour D, Degrelle SA, Ponter AA, et al. (2014) Energy and lipid metabolism gene expression of D18 embryos in dairy cows is related to dam physiological status. **Physiol Genomics** 46:39–56.

Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X (2014) Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One** 9:1–13.

Zuo, Y.; Su, G.; Wang, S.; Yang, L.; Liao, M.; Wei, Z.; Bai, C.; Li, G. Exploring timing activation of functional pathway based on differential co-expression analysis in preimplantation embryogenesis. **ONCOTARGET**, v. 7(45), p. 3-26, 2016.

CAPÍTULO 4 - Transcriptoma da massa celular interna e do trofotoderma de embriões bovinos produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por citometria de fluxo

Resumo

O sexo pode influenciar o desenvolvimento embrionário logo no estágio de blastocisto, além disso, o processo de sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo pode levar a danos no DNA e alterações no perfil de transcrição de embriões produzidos com esse tipo de espermatozóide. Este estudo teve como objetivo identificar as alterações transcricionais na Trofotoderma (TE) ou na massa celular interna (ICM) de embriões machos e fêmeas de blastocistos produzidos *in vitro* com espermatozóides convencionais ou sexados por citometria de fluxo. Usamos sêmen, de um único touro conhecido pela fertilidade, sexado (X e Y) e convencional na produção *in vitro* de embriões (PIVE). A taxa de clivagem às 48 horas e taxa de blastocistos e embriões foram coletados no dia 7,5. TE foram isolados a partir de embriões por microcirurgia, em seguida, aplicamos a imunocirurgia na ICM, do mesmo embrião, para remover as células da TE restantes. As células da TE removidas da Imuno foram usadas para verificar e confirmar o sexo do embrião por PCR. Avaliamos o processo de isolamento celular com imunomarcagem com SOX2 (ICM) e CDX2 (TE). Verificamos a viabilidade da ICM por cultivo *in vitro* em meio modificado com TeSR1. Utilizamos quatro TE e ICM, pareadas, machos e fêmeas, produzidos com sêmen sexado e convencional para a análise de RNA-seq. Não houve diferença na taxa de clivagem e na produção de embriões. A imunocoloração mostrou que foi possível isolar com precisão as células

da ICM e da TE, mantendo a viabilidade celular no cultivo in vitro. Fomos capazes de identificar o sexo do embrião usando as células da TE que estavam aderidas a ICM. O sêmen convencional produziu 60% de embriões do sexo masculino e 40% do sexo feminino. Tivemos uma precisão de 80% para ambos os sexos no semen sexado. Além disso, foram identificados 2065 transcritos diferencialmente expressos entre ICM (1101 genes) e TE (964 genes). Genes importantes para a manutenção da pluripotência celular (NANOG) e o desenvolvimento da massa celular interna (SOX2) foram identificados. Usando o gene SRY e os genes homólogos do cromossomo Y (EIF1AY, UTY, ZRSR2y, DDX3Y, EIF2S3Y) fomos capazes de confirmar o sexo do embrião. Entre os embriões machos e fêmeas de a diferença foi sutil encontrando uma diferença de 9 genes mais expressos nos embriões fêmeas, embora o log₂foldchange foi menor que 1. Não houve diferença entre os embriões produzidos com semen sexado e convencional. Estes resultados contribuem com informações robustas sobre diferenciação celular durante o estágio de blastocisto bovino.

Palavras chave: massa celular interna, trofotoderma, RNA-seq, diferenciação celular

Introdução

Na bovino cultura a seleção do sexo tem valores econômico e genético significativo pois a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (Splan et al., 1998; Hohenboken, 1999). Neste sentido e dentre as biotecnologias da reprodução se destaca o uso do sêmen sexado. Na bovino cultura leiteira pode reduzir o custo da bezerra produzida e aumentar o lucro durante a primeira lactação (Chebel et al., 2010), demonstrou-se, na bovino cultura de corte, associando com a

transferência de embriões um aumento da taxa de bezerros machos nascidos de forma eficaz (Morroti et al., 2014, Pellegrino et al., 2016), prometendo ainda diminuir os custos dos testes de progênie, da transferência de embriões e estimular o uso de marcadores moleculares (De Vvries et al., 2008). Neste contexto a tecnologia de sexagem por citometria de fluxo se tornou dominante e dificilmente será substituída num futuro próximo (Seidel Jr, 2014).

Com este horizonte em vista há um esforço para melhorar a eficiência da produção in vitro de embriões (PIVE) com sêmen sexado que demonstra resultados muito variáveis podendo apresentar taxas de blastocisto superiores a 45% (Underwood et al., 2010; Pellegrino et al., 2016), mas outros estudos observam em média, 25% (Puglise et al., 2006; Bermejo-Álvarez et al., 2008; Blondin et al., 2009; Bermejo-Álvarez et al., 2010). Relatando-se ainda diminuição na qualidade embrionária e descompasso das divisões celulares (Mikkola et al., 2017), podendo variar ainda de forma diferente entre touros (Inaba et al., 2016, Oliveira et al., 2016). Em contrapartida houve avanços, conforme revisado por Vishwanath e Moreno (2018), a fertilidade do sêmen sexado aumentou nos últimos anos e o processo evoluiu trocando-se os meios, diminuindo o tempo de processamento e aumentado a concentração do sêmen sexado que era 70% da dose do sêmen convencional. Resultados promissores já foram relatados, mostrando uma diferença de 60% contra 52% nas taxas de prenhez na inseminação artificial em tempo fixo com sêmen convencional versus sêmen sexado, respectivamente (Thomas et al., 2017). Além disso quanto aos danos da integridade do DNA, que já foi apontado como a causa da menor fertilidade, aparentemente foi superado (González-Marín et al., 2018).

Assim enquanto o sêmen sexado vai se consolidando percebe-se que há algo mais que foi negligenciado, as diferenças entre os sexos durante o período inicial do

desenvolvimento embrionário. O sexo pode influenciar vários tipos celulares (Shah et al., 2014), nos embriões bovinos produzidos *in vitro* já foi relatado uma diferença de 168 genes diferencialmente expressos (Chitwood et al., 2013). Tal diferença pode explicar a razão produção *in vitro* de embriões desvia a proporção dos sexos para o masculino (Gutiérrez-Adán et al., 2001a, 2001b; 2004) e o número mais elevado de células apoptóticas em embriões fêmeas cultivadas *in vitro* (Oliveira et al., 2016).

Os blastocistos possuem ao menos dois tipos celulares a Trofotoderma (TE) e a massa celular interna (ICM) que por sua vez pode dar origem ao epiblasto (EPI) e a endoderma primitiva (PE) (Iqbal et al., 2015; Hosseini et al., 2015; Zhao et al., 2016; Petropoulos et al., 2016). Para melhor elucidar esse problema de forma global a obtenção do transcriptoma por RNA-Seq, pois demonstra ter acuidade e repetibilidade para quantificar níveis de expressão gênica, como determinado por PCR quantitativo (qPCR) e requer menor quantidade de RNA nas amostras. Além disso, o RNA-Seq é o primeiro método de sequenciamento que permite sequenciar o transcriptoma inteiro em alto rendimento e de maneira quantitativa (Martin e Wang, 2011).

Criamos, então, a hipótese que existe diferença no perfil transcricional da massa celular interna e na trofotoderma de embriões produzidos *in vitro* com sêmen convencional e espermatozoides X e Y sexados pela citometria de fluxo. Para isso objetivamos:

1. Isolar e caracterizar a ICM e a TE dos sexos masculino e feminino, oriundos de um mesmo blastocistos produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados (X e Y) e com sêmen convencional.

2. Identificar os genes diferentemente expressos na ICM e na TE e entre a ICM e a TE dos sexos masculino e feminino, de blastocistos produzidos in vitro com espermatozoides sexados (X e Y) e com sêmen convencional por meio da análise do conjunto de dados obtidos pelo transcriptoma por RNA-seq utilizando RNA extraído da ICM e TE de embriões isolados individualmente.

Material e métodos

Experimento 1 - Isolamento da Massa celular interna e do Trofotoderma

Obtenção dos espermatozoides e formação dos grupos experimentais

Foram utilizadas doses de sêmen congelado convencional (grupo controle) e sexado (grupo X e grupo Y) dos mesmos touros da raça Angus, da mesma partida e do mesmo dia, adquiridas de empresa especializada, com eficiência comprovada na produção in vitro. Assim, formamos os seguintes grupos experimentais:

Grupo X controle (C-X): embriões do sexo feminino produzidos com sêmen convencional;

Grupo Y controle (C-Y): embriões do sexo feminino produzidos com sêmen convencional;

Grupo X sexado (S-X): embriões do sexo feminino produzidos com sêmen sexado para X;

Grupo Y Sexado (S-Y): embriões do sexo feminino produzidos com sêmen sexado para Y.

Produção in vitro de embriões

Um total de 7 rotinas de produção in vitro de embriões bovinos foram realizadas segundo o protocolo Chitwood et al. (2013). Foram utilizados ovários

fornecidos por abatedouro, coletados e transportados para o laboratório em solução salina a 30-33°C. A aspiração dos folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro feita com uma agulha de 19-g acoplada a uma seringa de 20 mL. O fluido folicular obtido pela aspiração foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e após 15 minutos o sedimento foi transferido para uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro e realizada uma avaliação em microscópio estereoscópico. Utilizou-se os COCs (complexo oócito cumulus) que apresentaram no mínimo 4 camadas de células e ooplasma de coloração uniforme, somente graus 1 e 2. Os oócitos considerados atrésicos e desnudos foram descartados.

Maturação in vitro (MIV)

Os COCs foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL) e então lavados uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µM de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB . Após as lavagens os COCs foram transferidos para as placas de maturação (4 poços) contendo gotas de 400µL, sendo 50 oócitos por gota, de meio de maturação, cobertas com óleo mineral. Cultivando-os durante 22 horas em estufa a 38,5°C, 100 % de umidade e atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de maturação, para se obter a taxa de maturação (oócitos maduros/ total de oócitos avaliados) uma amostra dos oócitos (25 por rotina) foram transferidos para placas com gotas de 100µL de PBS e agitados com uso de uma micro pipeta automática até os oócitos ficarem desnudos, e então, fixados por 5 min com paraformaldeído a 4% em PBS por 15

minutos e então lavados em solução de 1mg/mL de PVA em PBS e armazenados a 4°C. Posteriormente (máximo 15 dias) os oócitos foram corados com corante Hoechst 33342 e montados entre lâmina e lamínula sob solução anti clareamento (“anti-fade”) (ProLong Gold; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), vedados com esmalte, e levados ao microscópio de epifluorescência, para observação do estágio de maturação nuclear.

Os oócitos foram classificados da seguinte forma (WANG *et al.*,1998): (1) oócitos maturados, onde é possível observar a formação de um eixo em metáfase com extrusão do primeiro corpúsculo polar; e (2) oócitos imaturos, nos quais a placa metafásica não é observada. O restante dos oócitos serão destinados a fecundação *in vitro*.

Fecundação in vitro (FIV)

A fecundação foi realizada entre 22 a 24 horas após o início do cultivo de maturação. Uma dose de sêmen convencional congelada que contém de 15 a 20 milhões de espermatozoides, foi descongelada a 35°C, por 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre 4 mL de gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ (45% e 90%) à temperatura ambiente e centrifugado a uma força de 900 × g durante 15 minutos, a fim de sedimentar os espermatozoides viáveis. O sedimento espermático resultante (100µL) foram transferidos para 4 mL de meio TALP-Sêmen e centrifugado a 500 x g durante 5 minutos. Foram retiradas uma amostra de 5µL para determinar a concentração/µL. Aproximadamente 100 × 10³ espermatozoides foram adicionados a cada gota de 50 µL de meio SOF-FIV.

Para o grupo de espermatozoides sexados por citometria de fluxo, uma dose de sêmen sexado para fêmeas (X) ou um dose de sêmen sexado para macho (Y),

que contém 2 milhões de espermatozoides, foi descongelada e submetida a um mini gradiente 500µl de Percoll 45/90%, o qual foi centrifugado a $900 \times g$ por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e sobre o pélete serão adicionados 500 µL de meio TALP-Sêmen e centrifugado a $500 \times g$ por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, deixando apenas 100 µL. O procedimento para confirmação da concentração foi repetido da mesma maneira que para o sêmen convencional. Cada placa de FIV continha 8 gotas de 50 µL de meio SOF-FIV. Depositados em cada microgota 10 µL de meio contendo espermatozoides.

Foi adicionado 20 a 25 oócitos por gota de FIV e incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, na temperatura de 38,5°C.

Após o período de Fertilização, uma amostra dos oócitos (prováveis zigotos 25 /grupo/rotina) foram transferidos para placas com gotas de 100µL de PBS e agitados com uso de uma micro pipeta automática até os oócitos ficarem desnudos, e então, fixados por 15 min com paraformaldeído a 4% em PBS, lavados em solução de 1mg/mL de PVA em PBS e armazenados a 4°C. Em no máximo 15 dias os prováveis zigotos foram corados com corante Hoechst 33342 e montados entre lâmina e lamínula sob solução anti clareamento (“anti-fade”) (ProLong Gold; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), vedados com esmalte, e levados ao microscópio de epifluorescência. E assim se obteve a taxa de fertilização (oócitos fertilizados/total de oócitos avaliados), sendo considerados zigotos (ou oócitos fertilizados) somente aqueles que apresentaram dois pró-núcleos.

Cultivo in vitro (CIV)

Os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em SOF-HEPES e lavados uma ultima vez e cultivados em meio KSOM[®] suplementado com 4 mg/mL de BSA e

5% SFB e transferidos para placas (35mm) em gotas de 50 μ L sob óleo mineral. Foram cultivados de 20-25 zigotos por poço, em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C. A clivagem foi avaliada 48 horas após a FIV. Para garantir que apenas embriões de boa qualidade fossem selecionados para o RNA-Seq os embriões clivados foram colocados em gotas separadas dos demais, porém na mesma placa, assim se obteve a taxa de clivagem e o número de células de cada embrião selecionado nessa fase. A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliado 7,5 dias após a fecundação, considerando o dia da FIV como dia 0.

Obtenção de isolados celulares

A ICM e TE foram isoladas por microcirurgia e imunocirurgia segundo IQBAL et al. (2014) e BOGLIOTTI et. al. (2018) modificado, utilizando ambas as técnicas no mesmo embrião. Para a microcirurgia os blastocistos foram lavados uma vez em PBS e então transferidos para uma placa (60 mm) contendo PBS (entre 7 a 9 mL) cuidadosamente movimentados até se aderirem ao fundo da placa de forma alinhada uns com os outros, uma vez aderidos a TE e a ICM foram separadas usando uma lâmina acoplada ao micro-manipulador e então coletadas separadamente pipetando delicadamente SOF-HEPES imediatamente sobre elas até que se interrompesse a adesão com o fundo da placa. Assim que coletados a TE e ICM foram transferidas para gotas individuais com aproximadamente 50 μ L de SOF-HEPES com 10 % de SFB sob óleo mineral e previamente identificadas. Rapidamente a TE foi lavada individualmente 5 vezes em gotas de PBS/PVA (1mg/mL) e transferidas para um microtubo (DNAase/RNAase free) identificados e mergulhados em N₂ líquido (“SNAP Frozen”) e em seguida armazenadas a -80°C até

o momento da preparação das bibliotecas. Para se isolar somente as células da MCI, submeteu-se as MCI, individualizadas e previamente identificadas, à imunocirurgia segundo IQBAL *et al.* (2014). Brevemente as ICM foram incubadas em gotas de 25 μ L SOF-HEPES com 20% de soro anti-bovino sob óleo mineral por 1 hora a 37°C (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA), lavadas 6 vezes em SOF-HEPES e então incubadas em (por 1 hora) em gotas de 25 μ L SOF-HEPES com 20% de soro complemento de cobaia sob óleo mineral por 1 hora a 37°C (Innovative Research, Novi, MI), lavadas seis vezes em SOF-HEPES seguida por pipetagem com pipeta de vidro um pouco maior que o diâmetro da ICM para remoção dos debris celulares da TE. Lavadas 6 vezes em PBS/PVA (1mg/mL) e submetidas ao snap-frozen conforme relatado para as TEs. As gotas por onde as ICM foram lavadas e realizadas a imunocirurgia foram guardadas em microtubos (“DNAase” e “RNAase” free) para posterior extração de DNA e PCR para identificação do sexo do embrião, usando um gene housekeeping (GADPH2) e o SRY. O resumo do desenho experimental se encontra na figura1 e na figura2.

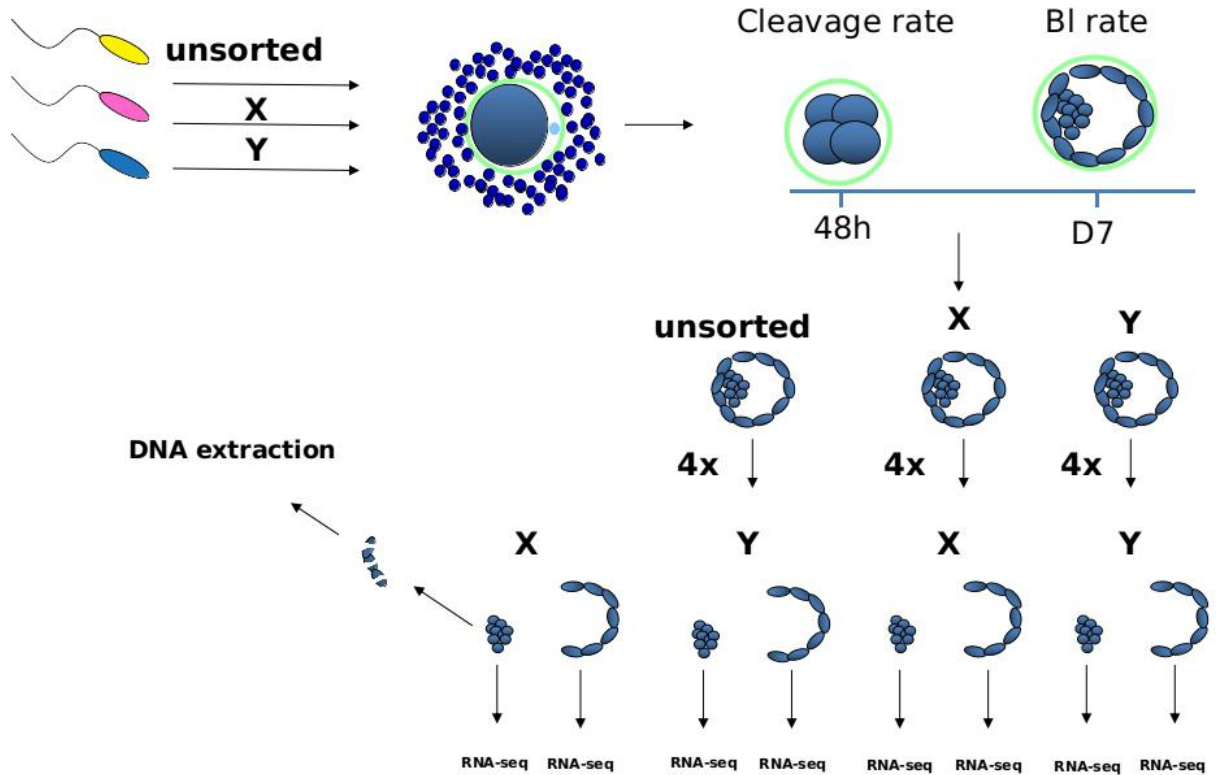


Figura 1. Esquema do desenho experimental para isolamento e sexagem da massa celular interna (ICM) e do trofotoderma de embriões bovinos produzidos in vitro com a utilização ou não do sêmen sexado por citometria de fluxo.

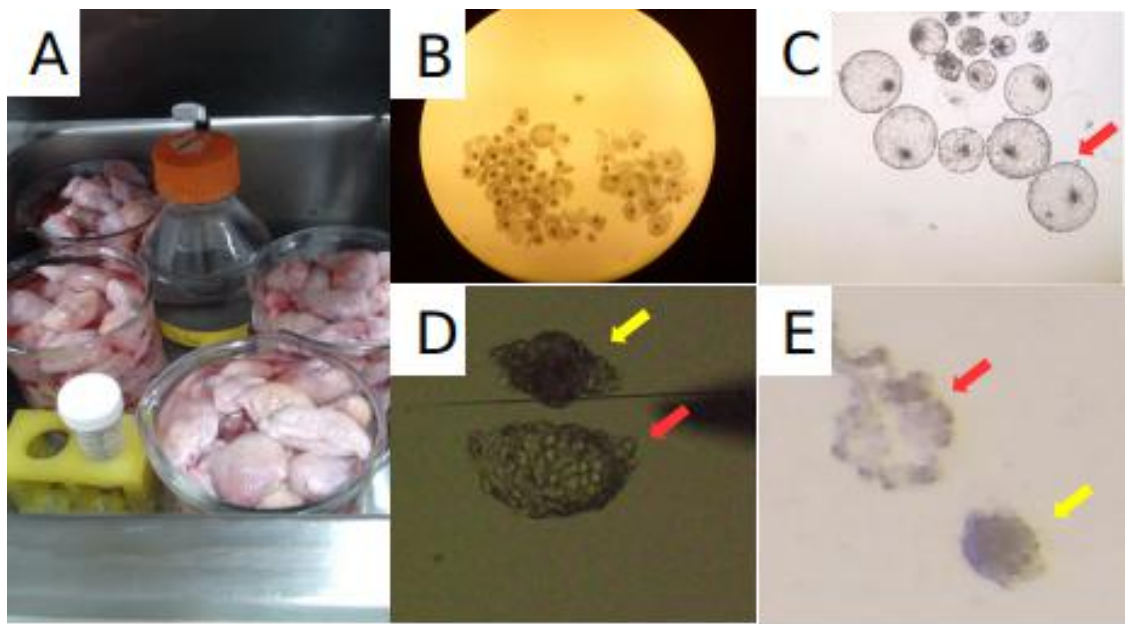


Figura 2. Etapas da produção de embriões in vitro e do isolamento da massa celular interna (ICM) e do trofocotoderma de embriões bovinos por micro cirurgia seguida de imuno cirurgia: (A) chegada dos ovários ao laboratório (aproximadamente 400 ovários na foto); (B) oócitos maduros; (C) embriões bovinos no dia 7,5, a seta vermelha indica os embriões que eram selecionados para o procedimento; (D) resultado da microcirurgia, a seta amarela indica a ICM ainda com a TE e a seta vermelha apenas a TE; (E) ICM isolada após a imuno cirurgia (seta amarela), é possível observar as células remanescentes (seta vermelha) que foram utilizadas para a identificação do sexo dos embriões.

Imuno coloração dos embriões e dos isolados celulares

Para verificar a qualidade, a quantidade de células presentes e a confiabilidade dos isolados celulares, 20 embriões e 20 pares de isolados celulares não utilizados para o RNA-Seq foram fixados em paraformaldeído 4% em pbs por 15 minutos, lavados em PBS/PVA (1mg/mL) e submetidos a Imuno coloração segundo

Goissis e Cibelli (2014) para determinar o número de células da massa celular interna e da trofotoderma). Foi criado assim os seguintes grupos:

Blastocyst : blastocistos inteiros

ICM-WTE: massa celular interna obtida de embriões que passaram apenas pela microcirurgia;

ICM: Massa celular interna que passou pela microcirurgia e pela imunocirurgia;

TE: Trofotoderma obtido pela microcirurgia.

Resumidamente após serem fixados e lavados os embriões e isolados foram mantidos em PBS/PVA 4°C até o momento das análises (máximo 15 dias). Permeabilizados com solução de 1% Triton X-100 em Pbs por 30 minutos em temperatura ambiente e então incubados em solução de bloqueio (1% Triton X100, 1% BSA e 10 % soro normal de Jumento (normal donkey serum) em D-PBS por 2 horas. Após o bloqueio os embriões foram incubados “overnight” em solução do anticorpo primário a 4°C em D-PBS com 0.1% Triton X-100 e 1% BSA. Os anticorpos primários usados foram do tipo homeobox 2 (CDX2) (AM392-5M; BioGenex, Fremont, CA, USA) e anti-sex determining region Y-box 2 (SOX2) (AN579-5M; BioGenex). Após seis lavagens em solução de 0,1% Triton X-100 os embriões foram incubados em solução com os anticorpos secundários (donkey anti-mouse Alexa Flour 568(A10037) e donkey anti-rabbit Alexa Flour 488 (A21206) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora em temperatura ambiente. O DNA foi tingido com Hoechst 33342. Após corados os blastocistos foram montados em lamina e laminula sob solução anti clareamento (“anti-fade”) (ProLong Gold; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As imagens foram analisadas em aumento de 40X microscópio de epifluorescência. As células foram contadas segundo National

Institutes of Health (Bethesda, MD, USA; Schneider et al. 2012) ImageJ version 1.40.

Cultivo e confirmação da viabilidade dos isolados celulares

Baseado nos experimentos de BOGLIOTTI et. al.(2018), que conseguiu isolar de forma eficiente células tronco embrionárias bovinas, e devido a natureza do processo de obtenção dos isolados celulares. Para se obter uma estimativa do quão viável poderia ser os isolados celulares obtidos, foram feitas 3 rotinas de cultivo de isolado da massa celular interna (ICM) com 5 isolados e 5 blastocistos contemporâneos como controle em cada rotina. Conforme os autores supracitados, brevemente, usando o meio de cultivo celular base TeSR1, suplementado com 20 ng/mL FGF2 humano e 2.5 μ M IWR1 humano, os blastocistos ou os isolados foram colocados em uma placa de 12 poços, previamente colonizada (células feeders) com uma monocamada de fibroblastos embrionários murinos gamma irradiados (MEFs), cultivados a 37 °C, sob atmosfera de 5% CO₂ por 48 h. Blastocistos ou ICM que falharam em aderir a monocamada foram fisicamente fixadas ao fundo da placa com o auxílio de uma agulha de 22G, somente então as células foram deixadas em cultivo por mais 5 dias (totalizando 7 dias de cultivo), trocando-se o meio a cada 24 horas, no fim desse período foi feita a avaliação da expansão celular sobre as células feeders. Cada ICM ou blastocistos que cresceram durante esse período foram marcadas como um “sucesso” daquela rotina, sendo comparado então o número de “sucessos” por rotina das ICM versus número de “sucessos” por rotina dos blastocistos.

Análise Estatística

Para os dados relativos ao desenvolvimento embrionário e a Imuno coloração a estatística foi feita utilizando-se o software R e de acordo com as recomendações de Chen & Peace (2010); Baguley(2012) e de Avriva & Watson (2013) Após a confirmação da homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene e normalidade dos dados pelo teste de Cramér-Von Mises caso necessário foi feita a transformação por ranque de acordo com Canover & Iman (1981), e então a análise de variância com a aproximação dos graus de liberdade de Satterthwaite, para tal foi utilizado o pacote lmerTest (KUZNETSOVA et al., 2016). A comparação mínima significativa das médias foi obtida pelo teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$. Para os valores qualitativos foi construída uma tabela de contingência e posteriormente realizado o teste Qui-quadrado para avaliar a independência entre os fatores, sendo considerada significativa para o p menor que 0,05 ($p < 0,05$), os gráficos para representação dos resultados foram gerados com o pacote do R ggplot2 (Wickham, H.; 2009).

Experimento 2 - Transcriptoma da massa celular interna e do trofocotoderma

Produção da biblioteca de sequenciamento

Foram utilizados um total de isolados de 4 embriões (4 ICM e 4 TE) por grupo de 4 rotinas diferentes, coletados entre os dias 7 e 8 do desenvolvimento (blastocisto eclodido) e previamente sexados por PCR. Foram usados na preparação de bibliotecas com o kit Ovation SoLo RNA-Seq Systems (NuGen, San Carlos, CA) customizado para bovinos e, que permite produzir bibliotecas “*strand*” específicas. O cDNA produzido foi amplificado (11 a 15 ciclos) com a distribuição de tamanho entre 100 a 200bp e 200 ng de cDNA no laboratório de genética molecular da Universidade da Califórnia - Davis, seguindo as recomendações do fabricante. As

bibliotecas produzidas foram sequenciadas no Genome Center Sequencing Core na Universidade da Califórnia com o aparelho Illumina Hiseq4000.

Processamento dos dados e bioinformática

Os dados foram processados no cluster do laboratório de Genética molecular e bioinformática da (LGMB) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Todos os dados tiveram a qualidade de sequenciamento verificada pelo software FASTQC (Andrews S.;2010). e em seguida realizou-se a remoção das reads de acordo com a qualidade dos dados (“trimagem”) com o software TRIMMOMATIC (Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B.; 2014), utilizando os parâmetros “ -threads 24 LEADING:22 TRAILING:22 SLIDINGWINDOW:4:26 MINLEN:36 AVGQUAL:24”; ou seja qualidade mínima (phred) do início e fim da read de 22, qualidade média (phred) de 24 e tamanho mínimo de read de 24. Após feita a seleção for qualidade das reads repetiu-se a análise com o software FASTQC. As amostras que passaram pela triagem de qualidade foram então alinhadas com o genoma bovino *Bos_taurus_UMD_3.1.1* com o software STAR (DOBIN et. al.; 2013), utilizando os parâmetros padrões do software. A qualidade do alinhamento foi então verificada com o software QUALIMAP, um relatório final foi gerado usando o software MULTIQC (EWELS et al., 2016).

Análise de diferença de expressão gênica

A análise de diferença de expressão gênica foi realizada com o pacote DESEQ2 (LOVE, M.I., HUBER, W., ANDERS, S.; 2014) do software R (R Core Team, 2018), foi realizada a análise de componentes principais, para um gene ser

considerado diferentemente expresso foi adotado um valor de p ajustado menor que 0,05 ($p_{adj} < 0,05$), pelo método de Benjamini-Hochberg (“BH”) e um “log2 fold change” maior que 2 ou menor que -2. Para a representação dos valores de expressão gênica foi utilizada a transformação de normalização da variância (função “varianceStabilizingTransformation” do pacote DESEQ2). Para a análise de ontologia gênica e enriquecimento de vias foi utilizado o pacote ClusterProfiler (YU et. Al.; 2012) do software R, com a função “compareCluster” e as flags “goupGO” e “enrichGO”. Para visualização dos resultados foram utilizadas as funções Heatmap.2 do pacote gplots (Warnes et. Al. 2016) e pheatmap do pacote pheatmap (KOLDE, 2015) ambos do software R.

As condições tipo celular, sexo e tipo de sêmen foram usadas como fatores no modelo. Os seguintes contrastes foram avaliados entre os tipos celulares e ICM versus TE ; Male (S-Y+C-Y) versus (S-X +C-X) e sexado versus controle. Para auxiliar a interpretação dos resultados foram realizadas análise de componentes principais (PCA), volcanoplots e Heatmaps. Para a análise de ontologia gênica e enriquecimento de vias foi utilizado o pacote ClusterProfiler do software R.

Resultados

Experimento1.

Produção de embriões *in vitro*

Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão da média. A taxa de maturação foi de $79,04 \pm 1,76$ %. A Taxa de clivagem, taxa de blastocisto e blastocisto por embrião clivado estão resumidos na Figura3, para as variáveis relativas ao desenvolvimento embrionário não foi encontrada diferença estatística.

Confirmação da viabilidade e da qualidade dos isolados celulares

Foi possível determinar o sexo dos embriões usando as células remanescentes da imunocirurgia e o resultado encontra-se resumido na Figura 3. O resultado da Imunocoloração dos embriões (resumido na Figura 4. A Imunocoloração anti CDX2 (Figura 4 - A), demonstra que pouca ou nenhuma célula do trofotoderma continuou aderida a ICM após a imunocirurgia e colaborando com o resultado demonstrado na figura 5 (C), quando comparado com ICM-WTE é possível observar células pertencentes ao trofotoderma ainda aderidas a massa celular interna, essas células podem ser visualizadas na figura 5 (B - merged). A Imunocoloração anti SOX2 (figura 5 - B), podemos dizer que a microcirurgia é precisa, não foi notada nenhuma célula da massa celular interna nas amostras de TE, corroborando com os resultados representados na figura 29 (D). Ademais foi possível verificar que o número de células isoladas da massa celular interna no grupo ICM não diferiu do número de células encontradas nos blastocistos avaliados (figura 4 - B). É possível verificar na figura 6 um exemplo de ICM após 7 dias de cultivo, 38,88% das ICM cultivadas proliferaram durante o período de cultivo contra 64,44% de sucesso de proliferação dos blastocistos.

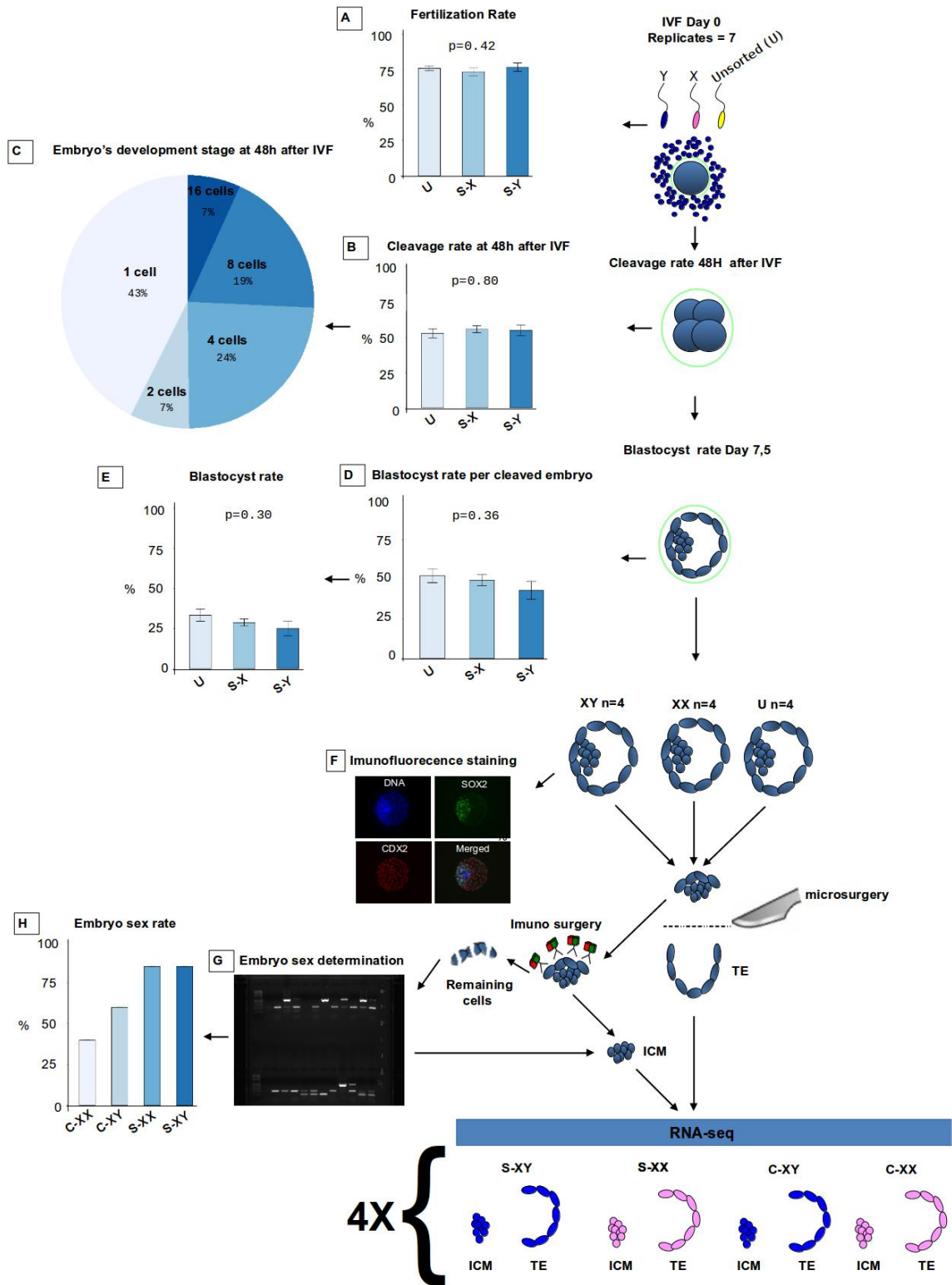


Figura 3. (A)-Taxa de Fertilização, (B)- Taxa de clivagem, (C)- Estagio de desenvolvimento embrionário ; (D)- Taxa de produção de Blastocistos por embriões clivados; (E)- Taxa produção de Blastocisto; (F)- Exemplo de resultado da imunofluorescência dos embriões; (G)- Exemplo do Gel de PCR para determinação do Sexo; H- Taxa de Sexagem embrionária por grupo.

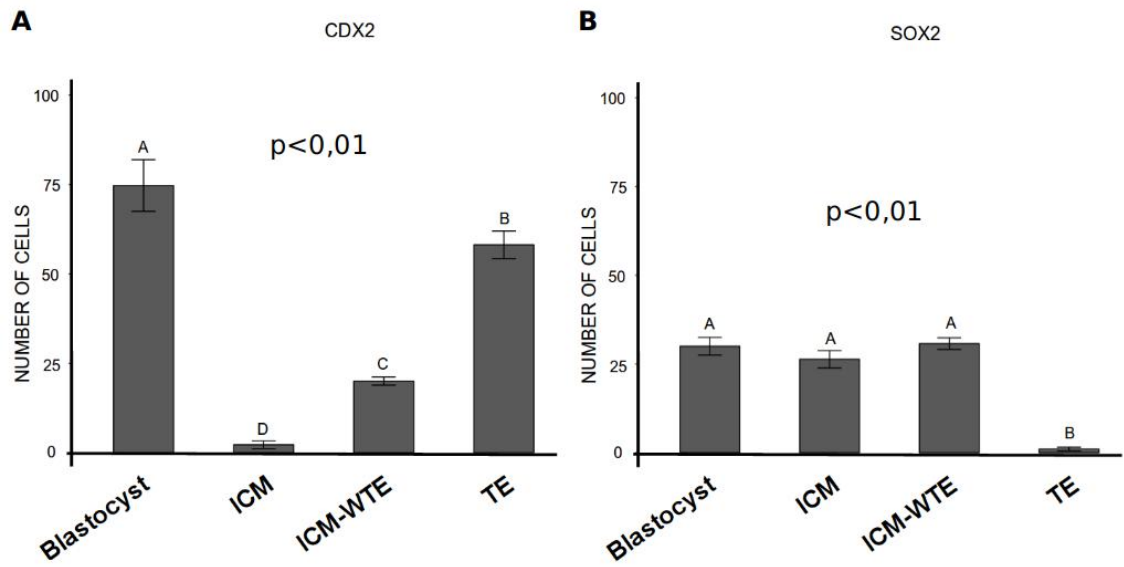


Figura 4. Número de células para os diferentes tipos de Imuno coloração: (A) CDX2 para a identificação do número de células oriundas do Trofoblasto e (B) SOX2 para a identificação de células pertencentes a massa celular interna.

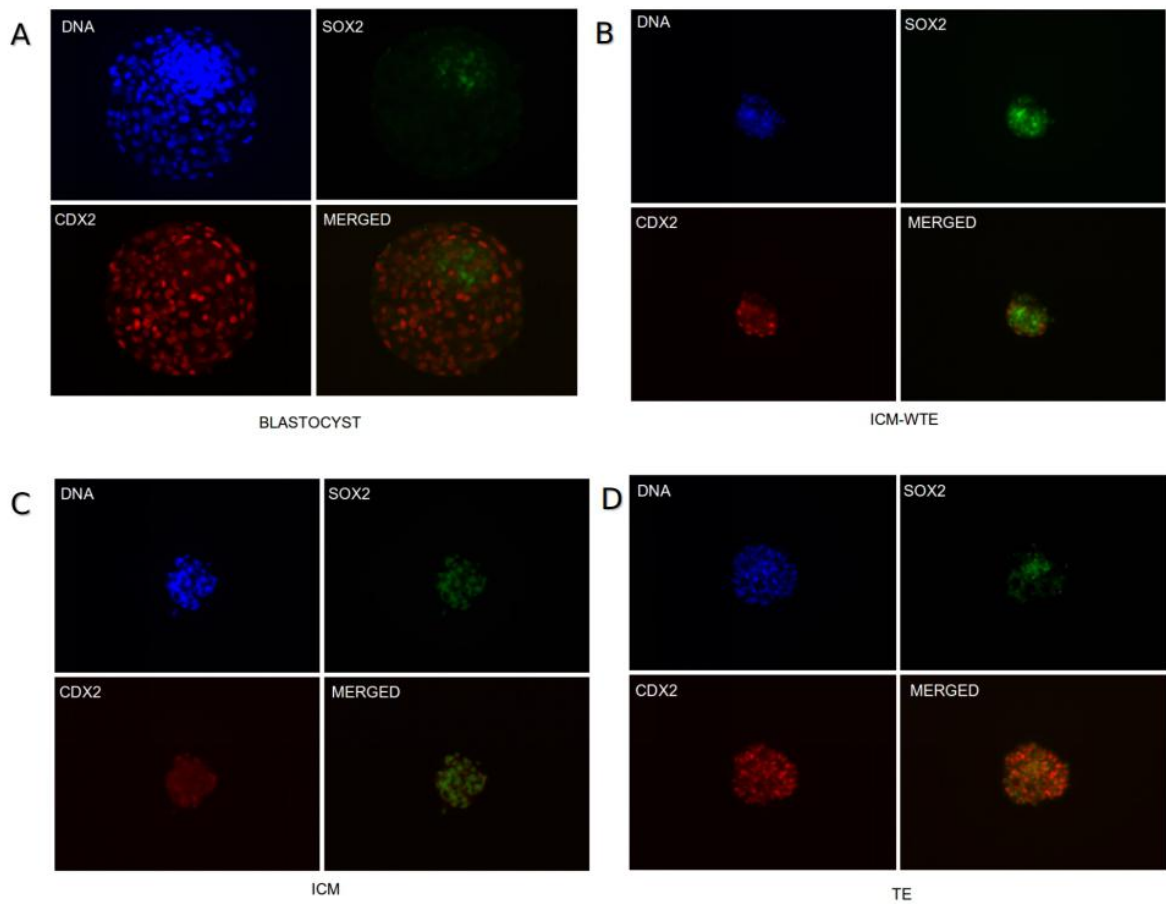


Figura 5. Exemplo dos resultados obtidos na Imuno coloração nos diferentes grupos avaliados nas diferentes colorações e na versão fundida ou “merged”. (A) - Blastocisto; (B) - Massa celular interna isolada apenas com a microcirurgia; (C) - Massa celular interna isolada por microcirurgia seguida de imunocirurgia; (D) - Trofotoderma isolada com microcirurgia.

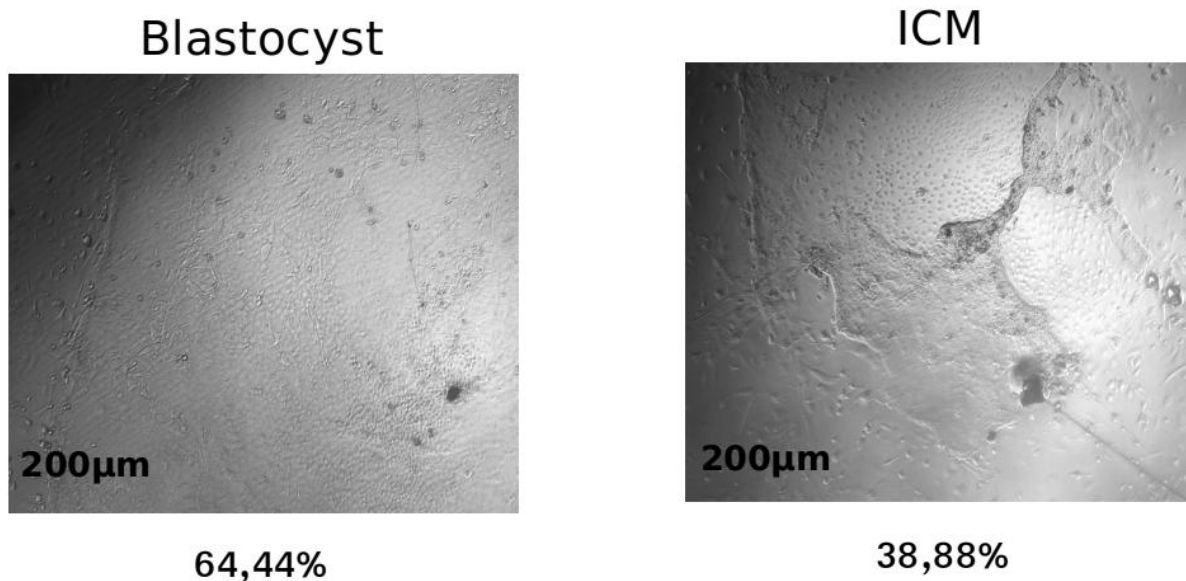


Figura 6. Exemplo do resultado do cultivo por 7 dias, no meio TeSR1 modificado, dos embriões bovinos (*Blastocyst*) e da massa celular interna (*ICM*) obtida por microcirurgia seguida de imunocirurgia

Experimento2.

Resultado do sequenciamento

As 32 amostras sequenciadas passaram nos critérios de qualidade pré-estabelecidos, gerando amostras entre 3 milhões de reads (*ICM S-Y*) e 12 milhões de reads (*TE C-X*), o resultado da avaliação da qualidade está resumido na Figura 7. Foram considerados como expressos 23099 transcritos.

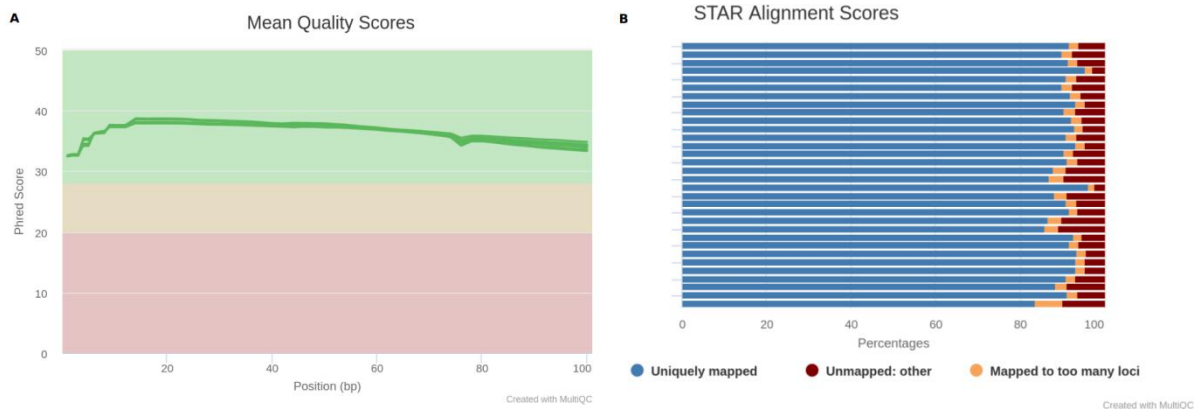


Figura 7. Resumo gráfico do software MULTIQC das análises de qualidade; A - Resultado do software FASTQC da qualidade das reads das amostras após a “trimagem” com o software TRIMMOMATIC; B - Resultado da Análise da qualidade de alinhamento do software STAR.

Análise de diferença de expressão gênica

Os resultados dos contrastes ICM versus TE estão expostos na figura 8, demonstrando a dispersão dos dados e o agrupamento de acordo com o tipo celular. Na figura 9 está exposto os transcritos considerados diferentemente expressos entre ICM e TE, 1101 transcritos (4,8% dos transcritos) estavam mais expressos na massa celular interna do que no trofotoderma, tais transcritos serão tratados como específicos da ICM. 964 transcritos (4,2% dos transcritos) estavam mais expressos na trofotoderma quando comparado com a ICM, portanto serão tratados como transcritos específicos da TE. Entre os 200 transcritos com a maior diferença de expressão ($\log_2\text{foldchange}$) da ICM estavam o NANOG e SOX2 dois importantes marcadores da massa celular interna. Para representação dos genes desse contraste escolhemos os genes com nível de expressão, “basemean” Tabela 1,

acima da média e com isso estão representados na Figura 9 e na Tabela 1, 33 genes relativos a ICM, Figura 9 - A, e 19 genes relativos a TE, Figura 9 - B. A análise de enriquecimento para todos os genes diferencialmente expressos entre ICM e a TE estão resumidos na Figura 9 - C. Além desses genes buscamos também o nível de expressão dos genes POU5F1, SOX2, NANOG, KLF4, DNMT3B, ID2, DPPA4, SALL4, FGFR4, PRDM14, ID1, OTX2, STAT3 e FGF19, (marcadores da ICM), dos genes METRNL, IFNT2, WNT4, CDX4, GATA2, GATA3 e TFAP2A (marcadores da TE), os genes GATA4, GATA6, FOXA2, HNF4A e PDGFRA relacionados a formação da endoderma primitiva (PE), o resultado está resumido na Tabela 2 . Adicionalmente buscamos o nível de expressão dos genes imprinting dos quais identificamos 17 genes sendo que destes os genes SNRPN e IGF2R apresentaram padj menor que 0,05, o resultado está resumido na Tabela 2.

Sobre os genes de interesse para confirmação do sexo dos embriões. O gene XIST, importante para a inativação do cromossomo X, que se espera estar expresso apenas nos embriões fêmeas, não foi identificado em nenhuma amostra. O gene SRY não foi expresso em nenhum embrião classificado como fêmea, porém foi identificado apenas em 5 embriões machos. Para se confirmar o sexo dos embriões foi usado a mesma técnica usada por CHITWOOD et. Al.(2013), na qual se explorou genes associados ou homólogos ao cromossomo Y e que se espera que sejam mais expressos apenas nos machos, o resultado está exposto na figura 10. Mantendo o mesmo limiar para consideração de diferença de expressão não foi possível identificar diferença entre os grupos produzidos com espermatozoides sexados e não sexados, tão pouco houve diferença entre embriões macho e fêmeas. Embora, quando consideramos apenas o valor de p ajustado é possível observar 9 genes mais expressos em fêmeas, esses genes possuem um valor de “log2 fold

change” abaixo de 1, ademais tais transcritos falham na análise de enriquecimento de vias, figura 10. Logo no contraste Male vs Female foram considerados os genes SSR4, BRWD3, OGT, UBA1, TIMP1, MSN, KDM6A, USP9X e EIF2S3 com os valores de “log2foldchange”, respectivamente, igual a -0,89, -0,92, -0,98, -0,63, -0,86, -0,66, -0,81, -0,62, -0,64, -0,62.

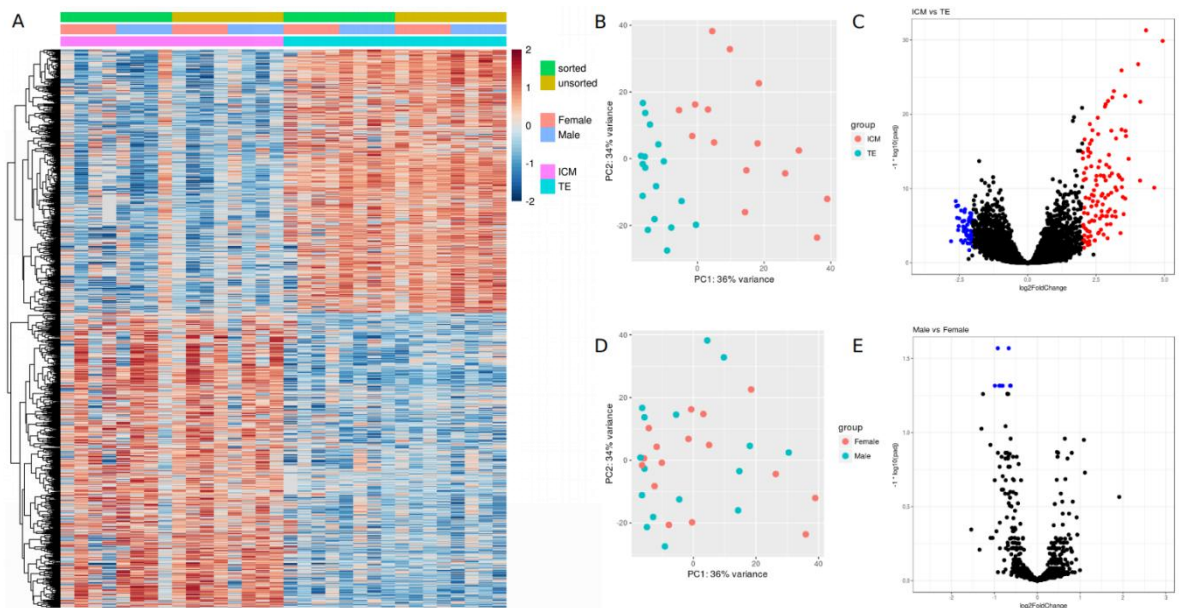


Figura 8. Resumo do resultado da análise de Diferença de expressão com DESEQ2; A - Heatmap com todos os 2065 genes diferencialmente expressos; B - Análise de componentes principais do contraste ICM vs TE; C - Volcano plot do contraste ICM vs TE; D - Análise de componentes principais do contraste Male vs Female; E - Volcano plot do contraste Male vs Female.

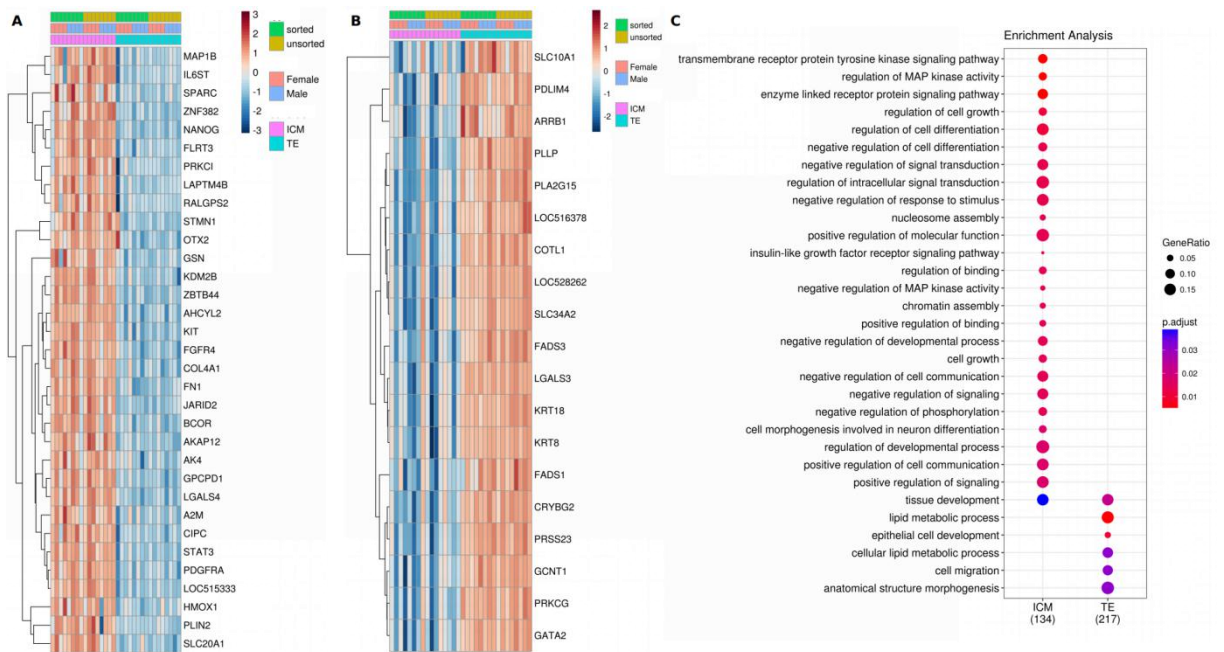


Figura 9. Representação gráfica dos genes específicos e análise de Enriquecimento de vias ; A - Heatmap com todos os 33 genes mais expressos na ICM; B - Heatmap com todos os 33 genes mais expressos na TE; C - Comparação do enriquecimento de vias de processo biológico entre todos os genes mais expressos na ICM ou TE.

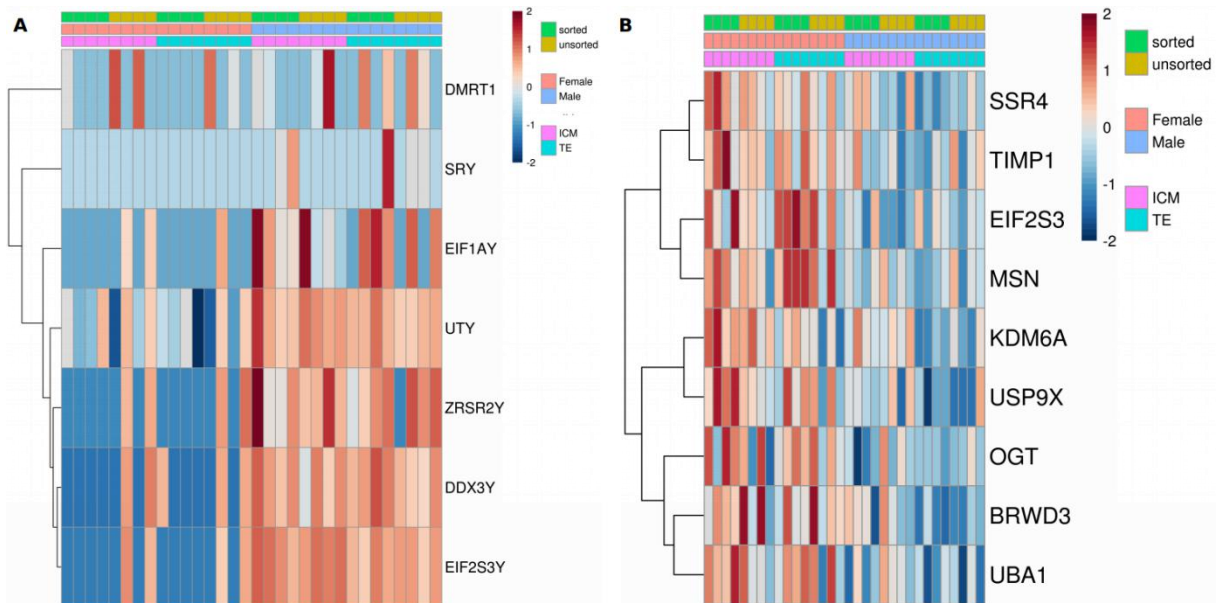


Figura 10. Representação gráfica do contraste Male vs Female; A - os genes relacionados com o sexo de acordo com a metodologia proposta por CHITWOOD et. al.(2013); B - Heatmap com os 9 genes com valor de padj menor que 0,05.

Tabela 1. Valores de expressão dos genes da ICM (33 genes) e TE (19 genes) do contraste ICM vs TE

ENSEMBL	SYMBOL	ENTREZID	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
ICM vs TE								
ICM								
ENSBTAG0000001403	PRKCI	528478	91,887	2,017	0,232	8,692	0,000	0,000
ENSBTAG00000047339	BCOR	784529	70,413	2,207	0,249	8,844	0,000	0,000
ENSBTAG00000008300	FN1	280794	2594,625	2,852	0,275	10,366	0,000	0,000
ENSBTAG00000013761	STMN1	616317	49,677	2,294	0,264	8,681	0,000	0,000
ENSBTAG00000030674	AK4	517063	53,335	2,324	0,285	8,161	0,000	0,000
ENSBTAG00000015582	HMOX1	513221	57,288	3,313	0,424	7,810	0,000	0,000
ENSBTAG00000018137	A2M	513856	98,243	2,735	0,394	6,941	0,000	0,000
ENSBTAG00000020916	NANOG	538951	99,456	4,932	0,403	12,229	0,000	0,000
ENSBTAG00000001754	AHCYL2	532836	134,332	3,432	0,301	11,405	0,000	0,000
ENSBTAG00000007173	PDGFRA	282301	151,751	3,574	0,377	9,470	0,000	0,000
ENSBTAG00000002699	KIT	280832	145,450	3,230	0,351	9,208	0,000	0,000
ENSBTAG00000005718	PLIN2	280981	52,928	2,226	0,261	8,536	0,000	0,000
ENSBTAG00000019915	GSN	535077	53,609	2,057	0,261	7,892	0,000	0,000
ENSBTAG00000010543	FGFR4	317696	53,858	3,566	0,335	10,656	0,000	0,000
ENSBTAG00000014835	SPARC	282077	204,129	2,421	0,340	7,125	0,000	0,000
ENSBTAG00000007895	SLC20A1	514255	241,325	2,078	0,227	9,172	0,000	0,000
ENSBTAG00000014788	AKAP12	513774	101,642	2,270	0,252	9,015	0,000	0,000
ENSBTAG00000014741	OTX2	538953	53,387	2,452	0,614	3,992	0,000	0,001
ENSBTAG00000009923	CIPC	506130	66,357	2,560	0,258	9,923	0,000	0,000
ENSBTAG000000032603	LOC515333	515333	307,975	4,325	0,345	12,549	0,000	0,000
ENSBTAG00000012849	COL4A1	282191	65,829	2,136	0,264	8,081	0,000	0,000
ENSBTAG00000016959	LAPTM4B	404155	68,868	2,337	0,256	9,136	0,000	0,000
ENSBTAG00000003319	FLRT3	529416	70,124	2,984	0,368	8,118	0,000	0,000
ENSBTAG00000008293	GPCPD1	518469	178,062	2,825	0,275	10,287	0,000	0,000
ENSBTAG00000010718	RALGPS2	789713	85,904	2,017	0,238	8,463	0,000	0,000
ENSBTAG00000002328	KDM2B	614487	59,929	2,576	0,275	9,359	0,000	0,000
ENSBTAG00000001961	MAP1B	514739	53,098	2,249	0,335	6,709	0,000	0,000
ENSBTAG00000017745	IL6ST	522155	76,280	2,515	0,324	7,763	0,000	0,000
ENSBTAG00000008084	ZNF382	518291	50,452	2,210	0,253	8,750	0,000	0,000
ENSBTAG00000016312	LGALS4	614804	45,470	4,038	0,348	11,595	0,000	0,000
ENSBTAG000000021523	STAT3	508541	72,889	3,094	0,292	10,596	0,000	0,000
ENSBTAG00000012938	JARID2	528253	153,891	2,271	0,234	9,712	0,000	0,000
ENSBTAG00000009210	ZBTB44	540532	63,963	2,937	0,280	10,481	0,000	0,000
TE								
ENSBTAG00000016748	LOC516378	516378	457,308	-2,045	0,448	-4,561	0,000	0,000
ENSBTAG000000039346	LOC528262	528262	518,962	-2,286	0,571	-4,001	0,000	0,001
ENSBTAG00000005629	CRYBG2	507142	57,900	-2,321	0,426	-5,454	0,000	0,000
ENSBTAG00000001517	KRT18	506480	1538,369	-2,082	0,437	-4,762	0,000	0,000
ENSBTAG00000000836	KRT8	281269	1892,548	-2,157	0,519	-4,155	0,000	0,001
ENSBTAG00000001545	SLC34A2	282484	592,480	-2,007	0,583	-3,442	0,001	0,006
ENSBTAG00000012757	GCNT1	281778	95,991	-2,136	0,395	-5,408	0,000	0,000
ENSBTAG00000015426	PDLIM4	515410	57,827	-2,056	0,448	-4,587	0,000	0,000
ENSBTAG00000002326	LGALS3	786492	742,062	-2,026	0,369	-5,496	0,000	0,000
ENSBTAG00000001881	SLC10A1	532890	52,774	-2,002	0,368	-5,435	0,000	0,000
ENSBTAG000000020485	ARRB1	281637	53,313	-2,157	0,397	-5,436	0,000	0,000
ENSBTAG00000016315	COTL1	617165	274,439	-2,075	0,360	-5,756	0,000	0,000
ENSBTAG00000011700	PLLP	613446	66,554	-2,310	0,386	-5,978	0,000	0,000
ENSBTAG00000007512	PLA2G15	282271	109,013	-2,295	0,374	-6,139	0,000	0,000
ENSBTAG00000013550	PRKCG	282002	81,077	-2,151	0,389	-5,534	0,000	0,000
ENSBTAG00000019707	GATA2	506809	102,111	-2,125	0,515	-4,125	0,000	0,001
ENSBTAG00000015177	PRSS23	538575	87,650	-2,540	0,401	-6,341	0,000	0,000
ENSBTAG00000022294	FADS1	533107	60,571	-2,208	0,426	-5,180	0,000	0,000
ENSBTAG00000015511	FADS3	515925	181,219	-2,105	0,356	-5,919	0,000	0,000
MALE vs FEMALE								
FEMALE								
ENSBTAG00000021421	SSR4	504438	155,980	-0,890	0,230	-3,820	0,000	0,040
ENSBTAG00000016230	BRWD3	534539	45,280	-0,920	0,210	-4,340	0,000	0,030
ENSBTAG00000000902	OGT	532053	46,980	-0,990	0,250	-3,910	0,000	0,049
ENSBTAG00000016764	UBA1	282869	118,630	-0,630	0,160	-3,890	0,000	0,049
ENSBTAG00000005043	TIMP1	282092	90,600	-0,860	0,230	-3,820	0,000	0,049
ENSBTAG00000003418	MSN	540426	362,220	-0,660	0,160	-4,280	0,000	0,030
ENSBTAG00000003740	KDM6A	280952	84,210	-0,810	0,210	-3,850	0,000	0,049
ENSBTAG00000006242	USP9X	507307	181,710	-0,620	0,150	-4,040	0,000	0,049
ENSBTAG00000014337	EIF2S3	100271721	72,020	-0,630	0,170	-3,790	0,000	0,040

Tabela 2. Valores de expressão dos genes específicos da ICM, específicos da TE, relativos a endoderma primitiva e os genes “imprinted” tidos como expressos obtidos do contraste ICM vs TE.

ENSEMBL	SYMBOL	ENTREZID	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
ICM vs TE								
genes ICM específicos								
ENSBTAG00000021111	POU5F1	282316	87,057	1,005	0,205	4,909	0,000	0,000
ENSBTAG00000011598	SOX2	784383	17,734	3,443	0,474	7,258	0,000	0,000
ENSBTAG00000020916	NANOG	538951	99,456	4,932	0,403	12,229	0,000	0,000
ENSBTAG00000020355	KLF4	520842	106,502	1,798	0,231	7,774	0,000	0,000
ENSBTAG00000021187	ID2	505025	53,503	1,713	0,291	5,887	0,000	0,000
ENSBTAG000000038103	DPP4	783813	18,433	1,295	0,254	5,104	0,000	0,000
ENSBTAG00000003101	SALL4	541170	100,777	1,073	0,212	5,063	0,000	0,000
ENSBTAG00000010543	FGFR4	317696	53,858	3,566	0,335	10,656	0,000	0,000
ENSBTAG00000000060	PRDM14	100140032	19,496	2,942	0,427	6,887	0,000	0,000
ENSBTAG000000016169	ID1	497011	4,305	2,421	0,619	3,909	0,000	NA
ENSBTAG000000014741	OTX2	538953	53,387	2,452	0,614	3,992	0,000	0,001
ENSBTAG000000021523	STAT3	508541	72,889	3,094	0,292	10,596	0,000	0,000
ENSBTAG000000017285	FGF19	521475	1,382	0,770	0,928	0,830	0,407	NA
genes TE específicos								
ENSBTAG00000004787	METRNL	534297	11,676	-1,759	0,518	-3,399	0,001	0,007
ENSBTAG000000047551	IFNT2	317698	111,085	-1,945	0,588	-3,308	0,001	0,009
ENSBTAG000000022671	WNT4	789600	0,973	-0,488	1,157	-0,421	0,673	NA
ENSBTAG00000001726	CDX4	519648	1,609	-0,798	0,937	-0,852	0,394	NA
ENSBTAG000000019707	GATA2	506809	102,111	-2,125	0,515	-4,125	0,000	0,001
ENSBTAG000000017243	GATA3	505169	68,994	-1,915	0,280	-6,835	0,000	0,000
ENSBTAG00000001250	TFAP2A	505849	23,945	-1,811	0,446	-4,062	0,000	0,001
genes endoderma primitiva								
ENSBTAG000000005425	GATA4	327716	6,733	1,351	0,433	3,120	0,002	0,015
ENSBTAG000000005734	GATA6	654400	117,921	1,061	0,174	6,102	0,000	0,000
ENSBTAG000000012407	FOXA2	503580	1,104	0,378	0,983	0,385	0,700	NA
ENSBTAG000000012116	HNF4A	509200	23,243	4,107	0,544	7,550	0,000	0,000
ENSBTAG000000007173	PDGFRA	282301	151,751	3,574	0,377	9,470	0,000	0,000
genes Imprinted								
ENSBTAG000000002402	IGF2R	281849	47,298	-0,627	0,220	-2,848	0,004	0,030
ENSBTAG000000008251	SNRPN	780877	36,028	0,775	0,187	4,145	0,000	0,001
ENSBTAG000000026769	ASC2	664650	1,386	-0,908	0,995	-0,913	0,361	NA
ENSBTAG000000038093	PEG10	618138	5,864	0,683	0,519	1,316	0,188	0,486
ENSBTAG000000010128	NAP1L5	508508	7,934	0,323	0,536	0,603	0,546	0,833
ENSBTAG000000017086	GRB10	407210	21,064	0,101	0,242	0,417	0,676	0,897
ENSBTAG000000018207	M6PR	281291	49,764	0,025	0,173	0,144	0,886	0,969
ENSBTAG000000026523	PLAGL1	539761	1,702	0,784	1,057	0,742	0,458	NA
ENSBTAG000000017475	GNA5	281793	87,001	-0,357	0,207	-1,722	0,085	0,287
ENSBTAG000000047223	GNA5	281793	2,609	0,090	0,554	0,162	0,871	NA
ENSBTAG000000003212	NNAT	353114	9,317	1,059	0,495	2,141	0,032	0,143
ENSBTAG000000031194	PHLDA2	618810	2,208	0,371	0,925	0,401	0,689	NA
ENSBTAG000000045998	MAGEL2	538665	2,762	0,102	0,764	0,134	0,894	NA
ENSBTAG000000047793	TSSC4	509559	2,849	0,274	0,534	0,513	0,608	NA
ENSBTAG000000017223	MEST	404180	8,175	0,181	0,636	0,285	0,775	0,935
ENSBTAG000000046585	RTL1	606737	4,021	0,833	0,765	1,089	0,276	NA
ENSBTAG000000013066	IGF2	281240	2,349	-0,161	0,866	-0,186	0,852	NA

Discussão

Experimento1.

Produção de embriões in vitro

Como não houve diferença no desenvolvimento embrionário (taxa de fertilização, taxa de clivagem e na taxa de blastocisto), tampouco houve um descompasso no tempo de clivagem dos embriões, o que é indicativo, ao menos em nosso experimento, de embriões qualidade semelhante (Sugimura et al. 2010, Sugimura et al. 2012). Nossos achados também corroboram com os de Bremejo-Alvarez et al.(2010) quanto ao desenvolvimento embrionário, e com os de Inaba et.al., (2016) quanto a fertilização, assim a diferença nas taxas no desenvolvimento embrionário podem ser mais dependentes a variações individuais do touro e de laboratório (Ferré et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Inaba et al., 2016).

Durante o desenvolvimento embrionário há uma troca no metabolismo energético dos embriões, dessa forma criou-se a hipótese que o ambiente in-vitro poderia ser mais favorável a um dos sexos (Gómez et al., 2018) . No nosso grupo controle houve uma maior produção de embriões macho que fêmeas (Figura 3 - H), mas não houve diferença no desenvolvimento embrionário, o que sugere que se há um favorecimento ao sexo masculino no ambiente in-vitro ele pode ocorrer na fertilização.

Confirmação da viabilidade e da qualidade dos isolados celulares

Não houve diferença entre o número de células entre os tratamentos, a quantidade de células da ICM é um indicativo de qualidade embrionária associado ao touro, meio de cultivo e a interação entre esses fatores (Ferré et. al,2015), como utilizamos apenas um touro e os meios foram os mesmo, conseguimos isolar esse fatores.

A microcirurgia seguida de imuno cirurgia, não diminuiu o número de células da ICM, os resultados da microcirurgia fora semelhantes ao relatado por Iqbal et. Al.(2014). O teste de cultivo da ICM foi semelhante ao relatado por Bogliotti et. al.(2018), ressaltamos assim a importância da TE a adesão dos embriões ao fundo da placa.

Experimento2.

Genes da Massa celular interna

Conseguimos identificar os genes específicos da ICM (POU5F1, SOX2, NANOG, KLF4, ID2, SPP1, DPPA4, SALL4, FGFR4, PRDM14, ID1, OTX2, STAT3, FGF19). Os genes AK4, AHCYL2, A2M, GSN, FGFR4 ,AKAP12, OTX2, CIPC, LOC515333, COL4A1, GPCPD1, KDM2B, IL6ST, LGALS4, JARID2, também foram encontrados mais expressos na ICM que na TE (Ozawa et al., 2012; Iqbal et al., 2014; Goissis e Cibelli , 2014; Zhao et al., 2016; Hosseini et al., 2015). Conseguimos identificar ainda os genes GATA4, GATA6, FOXA2, HNF4A, PDGFRA , marcadores da PE (Negrón-Pérez et al., 2017; Petropoulos et al., 2016). GATA4/6 são essenciais para o desenvolvimento das linhagens celulares que dão origem ao epiblasto e a PE (Do et al., 2013). PDGFRA está diretamente envolvido na diferenciação da ICM em endoderma (Petropoulos et al., 2016), na formação do

hipoblasto (Negrón-Pérez et al., 2017), com o desenvolvimento embrionário e o metabolismo de tirosina quinase (Chitwood et al., 2013), embora possa ser expresso na TE está envolvido com a regulação da migração celular em ICM equina (Iqbal et al., 2014).

O gene BCOR (co-repressor de BCL6), controla a renovação e a diferenciação de células tronco de trofoblasto (Zhu et al., 2015), reprime a expressão de IGFBP2 (Wang et al., 2017). O IGFBP2 está ligado ao crescimento de células tronco cancerosas (Tombolan et al., 2011), sendo assim alvo de novos tratamentos para evitar a proliferação, metástase, desse tipo celular (Tang et al., 2018); também já foi encontrado mais expresso na ICM bovina (Jiang et al., 2011), em nosso trabalho com apresentou “log2folchange” igual a 3,46. Assim, BCOR pode ser um gene regulador da pluripotência da ICM bovina, assim como ZNF382 que é expresso nos estágio iniciais do desenvolvimento embrionário (Luo et al., 2002), suprime a expressão dos genes STAT3 (Cheng et al., 2010). STAT3, em camundongos, começa a ser expresso nos oócitos (Do et al., 2013) em bovinos começa a ser expresso entre 4 e 8 células (Jiang et al., 2014), em nosso estudo foi encontrado mais expresso na ICM, porém em equinos não houve diferença entre os níveis de expressão entre a ICM e a TE (Iqbal et al., 2014), sendo essencial para manutenção da ICM, ligando-se aos promotores de POU5F1 e NANOG e assim modulando a expressão e mantendo a pluripotência (Do et al., 2013).

FN1 (Fibronectina 1), é mais expressa na ICM equina (Iqbal et al., 2014) e bovina (Zhao et al., 2016), na endoderma primitiva bovina (Negrón-Pérez et al., 2017) e humana (Petropoulos et al., 2016). Faz parte do desenvolvimento na placentário bovino (Salilew-Wondim et al., 2013), e humano (Yabe et al., 2016). SPARC está envolvido com a regulação da pluripotência em embriões humanos (Theunissen e Rudolf, 2017) e na reprogramação celular bovina (Salilew-Wondim et al., 2013). FN1 e SPARC possuem a expressão dependente do POU5F1 (Simmet et al., 2018). O bloqueio da expressão de POU5F1 em zigotos (Daigneault et al., 2018) e em clones bovinos (Simmet et al., 2018) compromete o desenvolvimento embrionário e a expressão de NANOG. Assim como o SOX2 que é um fator de transcrição importante para a manutenção da pluripotência (Fang et al., 2011) em bovinos é marcadamente restrito a ICM e quando sua transcrição é bloqueada afeta a transcrição do gene NANOG diminuindo a viabilidade embrionária, que é um gene

importante para manutenção da pluripotência e renovação celular que impede a diferenciação celular embrionária para as linhagens do trofotoderma e endoderma extra embrionária (Goissis e Cibelli; 2014).

STMN1 coordena a motilidade e adesão celular (Ringhoff e Cassimeris, 2009), também é mais expresso na ICM do que na TE bovina (Hosseini et al., 2015), está envolvido na implantação embrionária (DOMINGUÉZ et al., 2009; Gou et al., 2017) e manutenção da gestação (Tian et al., 2015) e a expressão de MAP1B. O MAPB1 (microtúbulos associado a proteína 1 B) participa da interação entre a os micro filamentos de actina e os micro tubulos na espermatogênese (Li et.al.,2012), da estabilidade do citoesqueleto oocitário (Magalhães-Padilha et al., 2013), da morfogenese, diferenciação, regeneração e organização celular da ICM (Iqbal et.al., 2014), é expresso no endométrio pré implantacional (Bauersachs e Wolf, 2012) e conforme revisado por Kropp et al.(2014) está associado a fertilidade bovina. PLIN2 em bovinos está envolvido no transporte de ácidos graxos de cadeia longa (Connor et al., 2013), no endométrio (Forde et al., 2012; Waters et al., 2014), em COCs (Yang et al., 2012) e no acúmulo de lipídios nos oócitos cultivados in-vitro (Del Collado et.al., 2017). PRKCI (proteína quinase C iota) está relacionado com a organização do citoesqueleto durante a maturação oocitária (Reys et al., 2015) e com a desregulação da angiogênese placentária em clones bovinos (Salilew-Wondim et al.,2013).

Genes da Trofotoderma

Conseguimos identificar os genes específicos da TE (METRNL, IFNT2, WNT4, CDX4, GATA2, GATA3, TFAP2A, KRT8/18). GATA2 se destacou entre os genes específicos do trofotoderma, pois além de ser um gene de expressão seletiva ao TE (Home et al., 2017; Iqbal et al., 2014; Hosseini et al.,2015) em primatas demonstrou-se que agindo em conjunto com GATA3, TFAP2A e TFAP2C ativa os genes placentários e inibe a expressão de OCT4/POU5F1 inibindo a pluripotência celular (Krendl et al., 2017). Em nossos dados as “tetráde” GATA2/3 e TFAP2A/C foi significativo e com os seguintes valores de “log2foldchange” no contraste ICM vs TE -2,12; -1,91; -1,81 e -1,11, podendo assim ocorrer um mecanismo de formação do trofotoderma em bovinos semelhante ao de primatas.

Os genes SLC10A1, PLA2G15 e PRKCG também foram encontrados mais expressos na TE que na ICM (Ozawa et al., 2012; Iqbal et.al., 2014; Zhao et al.,

2016). Enquanto que os genes LOC516378, LOC528262, CRYBG2, LGALS3, COTL1, PLLP, não haviam sido reportados anteriormente como expressos na TE bovina.

Os genes SLC34A2, GCNT1, ARRB1, PRSS23, FADS1 e FADS3 estão envolvidos principalmente com o metabolismo energético, sendo que SLC34A2 está envolvido no processo de desenvolvimento embrionário bovino (Chitwood et al., 2014), codificando o co-transportador de sódio fosfato tipo IIb (NaPi- II b), envolvido no metabolismo de fosforo inorgânico in vivo, sendo essencial no desenvolvimento embrionário inicial e na formação da placenta (Shibasaki et al., 2009). GCNT1 expressou duas isoformas (ENSBTAG00000012757 e ENSBTAG00000015426), regula a velocidade de crescimento controlando positivamente o gasto energético, atuando no balanço entre carboidratos e lipídios (Liu et al., 2017). ARRB1 está relacionado com o metabolismo de lipídios de embriões bovinos (Cagnone e Sirard, 2014; Waters et al., 2014). PRSS23 está envolvido no processo de alongamento do embrião bovino (Forde et al., 2012) e no metabolismo lipídico embrionário (Waters et al., 2014), degrada a matriz extra celular (Tsuchiya et al., 2005) e tem ação sensível a hormônios (Wahlberg et al., 2008; Forde et al., 2012). FADS1 também está envolvido no processo de alongação embrionária (Clemente et al., 2011) e no metabolismo lipídico das células da granulosa (Hughes et al., 2011). Já FADS3 está envolvido no metabolismo energético oocitário (Reyes et al., 2015).

Genes imprinting

O IGF2R está envolvido na síndrome da descendente gigante (“large offspring syndrome”, Young et al., 2001), a identificação desse gene na fase de blastocisto chama a atenção, pois é mais investigado durante a fase de implantação (Smith et al., 2015). Conforme revisado por Cassidy e Charalambous (2018), IGF2R é o receptor do fator de crescimento fetal IGF2, sendo também um dos primeiros genes identificados como maternalmente expresso. Fazendo parte dos genes envolvidos com metabolismo energético e uma vez que a TE se tornará a placenta e assim “nutrirá” o embrião, é compreensível a sua maior expressão neste isolado celular.

Conforme revisado por Kropp et. al.(2014) SNRPN é um gene paternalmente expresso e mais expresso no cultivo in vitro. Conforme Smith et al., (2015), tanto

SNRPN quanto IGF2R sofrem alterações epigenéticas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (dia 17), assim quando sobre influência desses efeitos, existe a possibilidade de ser durante a fase de blastocisto, porém ainda sujeito a investigação.

Genes ligados ao sexo

Encontramos uma diferença sutil entre os sexos, apenas 9 genes, enquanto que Chitwood et al.,(2013) encontraram 168 genes e Bermejo-Alvarez et al., (2010a) anunciaram que um terço da diferença dos níveis de expressão em blastocistos bovinos era relacionada as diferenças sexuais. Além da forma de obtenção e plataforma de obtenção dos dados, nosso estudo e o de Chitwood et al.,(2013) utilizou-se apenas um touro e Bermejo-Alvarez et al., (2010a) utilizaram 3 touros, pode ser que essa característica também seja touro dependente.

Dos 9 genes estavam mais expressos nos tipos celulares femininos 3 estão ligados com stress metabólico e 4 com o controle da transcrição e divisão celular.

Em relação a resposta ao stress metabólico o SSR4 é um gene ligado ao cromossomo X que codifica a proteína do complexo TRAP que se liga a oligosacaril transferase (Losfeld et al., 2014), relacionado a sobrevivência celular devido ao stress metabólico ligado a glicose (Singh et al., 2013), glicolisação e transporte da transferrina (Ng et al., 2015) e em oócitos bovinos faz parte do processo de transporte de proteína intracelular (Reys et al., 2015). BRWD3 é um gene ligado a coordenação do crescimento tecidual e da expressão gênica (Shih et al., 2016), e do “relógio” celular (Ozturk et al., 2013). OGT é um gene do cromossomo X que codifica a glicosil-transferase ligando a n-acetil-glucosamina aos resíduos de serina e treonina no núcleo e nas proteínas do citosol, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (O'Donnell et al., 2004) metabolizando a glucosamina (Kimura et. al,2009), é mais expresso em fêmeas, sendo um biomarcador de estresse placentário sexo específico, diminui a expressão com stress crônico (Howerton et al., 2013; Howerton e Bale, 2014, Briffa et al., 2017) em situações de hiperglicemia (Dela Justina et al., 2018), aumentando os níveis de expressão na presença de corticóides (Pantaleon et al., 2017).

Sobre o controle transcricional e divisão celular a UBA1 é essencial no processo de capacitação espermática e de funcionamento do acrossoma, pois faz parte da via ubiquitina-proteossoma que é essencial durante os processos

progressão do ciclo celular e endocitose por receptores de membrana (Yi et al., 2012). TIMP1 é um inibidor de metaloproteinase tecidual, envolvido com a regeneração e reparo tecidual (Alvarez Rojas, et al., 2015), envolvido na formação do trofoblasto (Tian et al., 2015) e da placenta (Salilew-Wondim et al., 2013). Segundo Hosseini et al., (2015) KDM6A é um gene envolvido na ativação transcricional mais expresso na ICM, é essencial para o desenvolvimento embrionário atuando como mediador na desmetilação de histona reduzindo o níveis de H3K2me3 durante o processo de ativação do genoma embrionário (Chung et al., 2017). USP9X é um gene associado ao cromossomo X que está envolvido na manutenção da estabilidade cromossomal durante as divisões mitóticas (Skowyra et al., 2018).

Segundo OLIVEIRA et. al.(2016) os embriões fêmea são mais propensos a fragmentação celular a partir do estágio de mórula devido principalmente ao stress metabólico durante o processo de cultivo in vitro. Não fizemos as mesmas análises e selecionamos os melhores embriões, muito parecidos morfológicamente, para a análise do transcriptoma. Contudo, mesmo que possa ser considerada baixa essa diferença, os genes diferencialmente expressos estão apontando para uma maior fragilidade metabólica dos embriões fêmeas.

Conclusões

Conseguimos isolar de forma eficiente e precisa a massa celular interna, mantendo a viabilidade de tais isolados celulares. O perfil transcricional desse isolados demonstrou diferenças entre os isolados celulares e uma sutil diferença entre os sexos. Na ICM apontamos para o mecanismo de manutenção da pluripotência enquanto que na TE os mecanismos ativados mostram uma concentração no controle do metabolismo energético. Os embriões fêmeas embora não tenham desenvolvido de forma diferente dos machos ativaram genes relacionados a resposta de stress metabólico e ao controle das divisões mitóticas, assim demonstram ser mais sensíveis ao cultivo in vitro.

Referências

Abe K, Funaya S, Tsukioka D, et al. (2018) Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci** 115:1–9.

Alvarez Rojas, C.A., Ansell, B.R.E., Hall, R.S., Gasser, R.B., Young, N.D., Jex, A.R., Scheerlinck, J.P.Y (2015) Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. **Parasites and Vectors** 8:1-30.

Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Baguley,T (2012) Serious stats: A guide to advanced statistics for the behavioral sciences. Ba'singstoke: Palgrave.Palgrave Macmillan.

Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A (2010a) Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy Sciences** 107:3394–3399.

Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Bermejo-Álvarez P (2010b) Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. **Reprod Fertil Dev** 22:426–436.

Bogliotti, Y.S.; Wu,J.; Vilarino, M.; Okamura; Soto,D.A.; Zhong, C.; Sakurai, M.; Sampaio, R. V.; Suzukie. K.; Belmonte, J.C.I.; Ross, P.J. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy Sciences**, 115(9):2090-2095, 2018.

Briffa, J.F., Hosseini, S.S., Tran, M. Moritz, K.M., Cuffe, J.S.M., Wlodek, M.E. Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters. **Placenta**, v.9, p.30-38, 2017.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 2014.

Cagnone, G., Sirard, M.A. The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.81, p.712-722, 2014.

Chebel, R.C., Guagnini, F.S., Santos, J.E.P., Fetrow, J.P., Lima, J.R. Sex-sorted sêmenfor dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.2496-2507, 2010.

Chen, D.G., Peace, K.E. Clinical Trial Data Analysis Using R. CRC Press, 2010.

Cheng, Y., Geng, H., Cheng, S.H., Liang, P., Bai, Y., Li, J., Srivastava, G., Ng, Margaret H.L., Fukagawa, T., Wu, X., Chan, A.T.C., Tao, Q. KRAB zinc finger protein ZNF382 is a proapoptotic tumor suppressor that represses multiple oncogenes and is commonly silenced in multiple carcinomas. *Cancer Research*, v.70, p.6516-6526, 2010.

Chitwood JL, Rincon G, Kaiser GG, Medrano JF, Ross PJ (2013) RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. **BMC Genomics** 14:350.

Chung, N., Bogliotti, Y.S., Ding, W., Vilarino, M., Takahashi, K., Chitwood, J.L., Schultz, R.M., Ross, P.J. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos. **Epigenetics**, v.12, p.1048-1056, 2017.

Clemente, M., Lopez-Vidriero, I., O'Gaora, P., Mehta, J.P., Forde, N., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D. Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus. **Biology of Reproduction**, v.85, p.285-295, 2011.

Del Collado, M., Da Silveira, J.C., Oliveira, M.L.F., Alves, B.M.S.M., Simas, R.C., Godoy, A.T., Coelho, M.B., Marques, L.A., Carriero, M.M., Nogueira, M.F.G., Eberlin, M.N., Silva, L.A., Meirelles, F.V., Perecin, F. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. *Reproduction*, v.154, p.881-893, 2017.

Cassidy, F.C., Charalambous, M. Genomic imprinting, growth and maternal–fetal interactions. *The Journal of Experimental Biology*, v.221, p.1-9, 2018.

Connor, E.E., Baldwin, R.L., Li, C.J., Li, R.W., Chung, H. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. *Functional and Integrative Genomics*, v.13, p.133-142, 2013.

Daigneault, B.W., Rajput, S., Smith, G.W., Ross, P.J (2018) Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Scientific Reports** 8:1-11.

Dela Justina, V., dos Passos Junior, R.R., Bressan, A.F., Tostes, R.C., Carneiro, F.S., Soares, T.S., Volpato, G.T., Lima, V.V., Martin, S.S. Giachini, F.R (2018) O-linked N-acetyl-glucosamine deposition in placental proteins varies according to maternal glycemic levels. **Life Sciences** 205:18-25.

Do, D.V., Ueda, J., Meserschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, M.Z., Zhang, W., Moh, A., Wu, Q., Robson, P., Ng, H.H., Poellinger, L., Knowles, B.B., Solter, D., Xin-Yuan, F (2013) A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4 – NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4 – NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. **GENES & DEVELOPMENT** 27:1378-1390.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Philippe Batut,1 Mark Chaisson.; Gingeras, T. R (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.

Driver AM, Peñagaricano F, Huang W, et al. (2012) RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics** 13:118.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källér, M (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics** 32(19):3047–3048.

Fang, X., Yoon, J.G., Li, L., Tsai, Y.S., Zheng, S., Hood, L., Goodlett, D.R., Foltz, G., Lin, B (2011) Landscape of the SOX2 protein–protein interactome. **Proteomics** 11:921–934.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM (2006) DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology** 27:176–188.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, et al. (2008) Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring1. **Biology of Reproduction** 78:761–772.

Ferré, L.B., Bogliotti, Y., Chitwood, J.L., Fresno, C., Ortega, H.H., Kjelland, M.E., Ross, P.J (2015) Comparison of different fertilisation media for an in vitro maturation – fertilisation – culture system using flow-cytometrically sorted X chromosome-bearing spermatozoa for bovine embryo production. **Reproduction, Fertility and Development** 28(11):1695-1703.

Forde, N., Mehta, J.P., Minten, M., Crowe, M.A., Roche, J.F., Spencer, T.E., Lonergan, P (2012) Effects of Low Progesterone on the Endometrial Transcriptome in Cattle. **Biology of Reproduction** 87:1-11.

Goissis, M.D., Cibelli, J.B (2014) Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. **Biology of Reproduction** 90:1-10.

Gómez, E., Carrocera, S., Martin, D., Herrero, P., Canela, N., Muñoz, M (2018) Differential release of cell-signaling metabolites by male and female bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology** 114:180-184.

Gou, J., Jia, J., Feng, J., Zhao, X., Yi, T., Cui, T., Li, Z (2017) Stathmin 1 plays a role in endometrial decidualisation by regulating hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor during embryo implantation. **Reproduction, Fertility and Development** 29:1530-1537.

Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E (2014) Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 111:4139–4144.

Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E (2014) Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science** 149:46–58.

Gutiérrez-Adán A, Granados J, Pintado B, Fuente JD La (2001a) Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development** 13:361–365.

Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, et al. (2001b) Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology** 55:1117–1126.

Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, et al. (2004) Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Mol Reprod Dev** 68:441–448.

Hohenboken, W. D (1999) Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology** 52(8):1421-1433.

Home, P., Kumar, R.P., Ganguly, A., Saha, B., Milano-Foster, J., Bhattacharya, B., Ray, S., Gunewardena, S., Paul, A., Camper, S.A., Fields, P.E., Paul, S (2017) Genetic redundancy of GATA factors in the extraembryonic trophoblast lineage

ensures the progression of preimplantation and postimplantation mammalian development. **Development** 144:876-888.

Hosseini, S. M., Dufort, I., Caballero, J., Moulavi, F., Ghanaei, H. R., Sirard, M. A (2015) Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. **BMC Developmental Biology** 15:1-13.

Howerton, C. L., Morgan, C. P., Fischer, D. B., Bale, T. L (2013) O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110:5169-517.

Howerton, C. L., Bale, T. L (2014) Targeted placental deletion of OGT recapitulates the prenatal stress phenotype including hypothalamic mitochondrial dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 111:9639-9644.

Hughes, J., Kwong, W.Y., Li, D., Salter, A.M., Lea, R.G., Sinclair, K.D (2011) Effects of omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids on ovine follicular cell steroidogenesis, embryo development and molecular markers of fatty acid metabolism. **Reproduction** 141:105-118.

Inaba, Y., Abe, R., Geshi, M., Matoba, S., Nagai, T., Somfai, T (2016) Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner. **The Journal of reproduction and development** 62:451-456.

Iqbal, K., Chitwood, J.L., Meyers-Brown, G.A., Roser, J.F., Ross, P.J (2014) RNA-Seq Transcriptome Profiling of Equine Inner Cell Mass and Trophectoderm. **Biology of Reproduction** 90:1-9.

Jiang, L., Marjani, S.L., Bertolini, M., Anderson, G.B., Yang, X., Tian, X.C (2011) Indistinguishable transcriptional profiles between in vitro- and in vivo-produced bovine fetuses. **Molecular Reproduction and Development** 78:642-650.

Jiang, Z., Sun, J., Dong, H., Luo, O., Zheng, X., Obergfell, C., Tang, Y., Bi, J., O'Neill, R., Ruan, Y., Chen, J., Tian, X (2014) Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics** 15:1-15.

Kimura, K., Iwata, H., Thompson, J.G (2009) The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. **Animal Reproduction Science** 103:228-238.

Krendl C, Shaposhnikov D, Rishko V, et al. (2017) GATA2/3-TFAP2A/C transcription factor network couples human pluripotent stem cell differentiation to trophectoderm with repression of pluripotency. **Proc Natl Acad Sci** 114:9579–9588.

Kolde, R (2015). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.8. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

Kropp, J., Peñagaricano, F., Salih, S.M., Khatib, H (2014) Genetic contributions underlying the development of preimplantation bovine embryos. **Journal of Dairy Science** 97:1187-1201.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B.; Christensen, R. H. B (2016) lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. R package version 2.0-33.

Li G, Peñagaricano F, Weigel KA, Zhang Y, Rosa G, Khatib H (2012) Comparative genomics between fly, mouse, and cattle identifies genes associated with sire conception rate. *J Dairy Sci* 95:6122–6129.

Liu, L., Cui, H., Fu, R., Zheng, M., Liu, R., Zhao, G., Wen, J (2017) The regulation of IMF deposition in pectoralis major of fast- and slow- growing chickens at hatching. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 8:1-8.

Losfeld, M.E., Ng, B.G., Kircher, M., Buckingham, K.J., Turner, E.H., Eroshkin, A., Smith, J.D., Shendure, J., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., Freeze, H.H (2014) A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in SSR4, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex. **Human Molecular Genetics** 23:1602-1605.

Love, M.I., Huber, W., Anders, S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology** 15(12):550

Luo, K., Yuan, W., Zhu, C., Li, Y., Wang, Y., Zeng, W., Jiao, W., Liu, M., Wu, X (2002) Expression of a novel Krüppel-like zinc-finger gene, ZNF382, in human heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 299:606-612.

Li, G., Peñagaricano, F., Weigel, K.A., Zhang, Y., Rosa, G., Khatib, H (2012) Comparative genomics between fly, mouse, and cattle identifies genes associated with sire conception rate. **Journal of Dairy Science** 95:6122-6129.

Magalhães-Padilha, D.M., Geisler-Lee, J., Wischral, A., Gastal, M.O., Fonseca, G.R., Eloy, Y.R.G., Geisler, M., Figueiredo, J.R., Gastal, E.L (2013) Gene Expression

During Early Folliculogenesis in Goats Using Microarray Analysis. **Biology of reproduction** 89:1-12.

González-Marín, C., Góngora, C. E., Gilligan, T. B., Evans, K. M., Moreno, J. F., Vishwanath, R (2018) In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. **Theriogenology** 114:40-45.

Mikkola, M., Andersson, M., Taponen, J (2017) Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. **Theriogenology** 84:1118-1122..

Negrón-Pérez, V.M., Zhang, Y., Hansen, P.J (2017) Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. **Reproduction** 154:627-644.

Ng, B.G., Raymond, K., Kircher, M., Buckingham, K.J., Wood, T., Shendure, J., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., Wong, J.T.S., Monteiro, F.P., Graham, B.H., Jackson, S., Sparkes, R., Scheuerle, A.E., Cathey, S., Kok, F., Gibson, J.B., Freeze, H.H (2015) Expanding the Molecular and Clinical Phenotype of SSR4-CDG. **Human Mutation** 36:1048-1051..

O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., Marth, J.D (2004) Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability Ogt - Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. **Mol Cell Biol** 24:1680-1690.

Oliveira, C. S., Saraiva, N. Z., de Lima, M. R., Oliveira, L. Z., Serapião, R. V., Garcia, J. M., Borges, C. A.V., Camargo, L. S.A (2016) Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development. **Mechanisms of Development** 139:42-50.

Ozawa M, Sakatani M, Yao J, et al. (2012) Global gene expression of the inner cell mass and trophoblast of the bovine blastocyst. **BMC Dev Biol** 12:1–13 10.1186/1471-213X-12-33.

Ozturk, N., VanVickle-Chavez, S. J., Akileswaran, L., Van Gelder, R. N., Sancar, A (2013) Ramshackle (Brwd3) promotes light-induced ubiquitylation of Drosophila Cryptochrome by DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110:4980-4985.

Pantaleon, M., Steane, S.E., McMahon, K., Cuffe, J.S.M., Moritz, K.M (2017) Placental O-GlcNAc-transferase expression and interactions with the glucocorticoid receptor are sex specific and regulated by maternal corticosterone exposure in mice. **Scientific Reports** 7:1-13.

Pellegrino, C. A.G., Morotti, F., Untura, R. M., Pontes, J. H.F., Pellegrino, M. F.O., Campolina, J. P., Seneda, M. M., Barbosa, F. A., Henry, M (2016) Use of sexed sorted sêmenfor fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro–produced embryos in cattle. **Theriogenology** 86:888-893.

Peñagaricano F, Souza AH, Carvalho PD, et al. (2013) Effect of Maternal Methionine Supplementation on the Transcriptome of Bovine Preimplantation Embryos. *PLoS One* 8:1-10.

Petrie, Aviva.; Watson, Paul (2013) *Statistics for Veterinary and Animal Science*, **3rd Edition;Wiley-Blackwell.**

Petropoulos, S., Edsgård, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S.P., Codeluppi, S., Plaza Reyes, A., Linnarsson, S., Sandberg, R., Lanner, F (2016) Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. Cell* 165:1012-1026.

Reyes JM, Chitwood JL, Ross PJ (2015) RNA-Seq profiling of single bovine oocyte transcript abundance and its modulation by cytoplasmic polyadenylation. **Mol Reprod Dev** 82:103–114.

Ringhoff, D.N., Cassimeris, L (2009) Gene expression profiles in mouse embryo fibroblasts lacking stathmin, a microtubule regulatory protein, reveal changes in the expression of genes contributing to cell motility. **BMC Genomics** 10:1-12.

R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Salilew-Wondim, D., Tesfaye, D., Hossain, M., Held, E., Rings, F., Tholen, E.,Looft, C., Cinar, U., Schellander, K., Hoelker, M (2013) Aberrant placenta gene expression pattern in bovine pregnancies established after transfer of cloned or in vitro produced embryos. **Physiol Genomics** 45:28–46.

Seidel Jr, G.W (2014) Update on sexed sêmentechonology in catte. **Animal** 8:160-164.

Shah, K., McCormack, C. E., Bradbury, N. A (2014) Do you know the sex of your cells? **AJP: Cell Physiology** 306:3-18.

Shibasaki, Y., Etoh, N., Hayasaka, M., Takahashi, M.O., Kakitani, M., Yamashita, T., Tomizuka, K., Hanaoka, K (2009) Targeted deletion of the tybe IIb Na⁺-dependent Pi-co-transporter, NaPi-IIb, results in early embryonic lethality. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 381:482-486..

Simmet, K., Zakhartchenko, V., Philippou-Massier, J., Blum, H., Klymiuk, N., Wolf, E (2018) OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 115:2770-2775.

Singh, H., Farouk, M., Bose, B.B., Singh, P (2013) Novel genes underlying beta cell survival in metabolic stress. **Bioinformatics** 9:37-41.

Shih, H.T., Chen, W.Y., Liu, K.Y., Shih, Z.S., Chen, Y.J., Hsieh, P., Chen, K., Kuan, L., Huang, K.H., Hsu, P.H., Liu, Y. W., Chan, S.P., Lee, H., Hsiang, T., Yu, C., Wu, J.T. dBRWD3 Regulates Tissue Overgrowth and Ectopic Gene Expression Caused by Polycomb Group Mutations. *PLoS Genetics*, v.12 , p.1-30 , 2016.

Skowyra, A., Allan, L.A., Saurin, A.T., Clarke, P.R (2018) USP9X Limits Mitotic Checkpoint Complex Turnover to Strengthen the Spindle Assembly Checkpoint and Guard against Chromosomal Instability. **Cell Reports** 23:852-865.

Smith, L.C., Therrien, J., Filion, F., Bressan, F., Meirelles, F.V (2015) Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2 and IGF2R. **Frontiers in Genetics** 5:1-6..

Splan RK, Cundiff L V., Vleck LD Van (1998) Genetic Parameters for Sex-Specific Traits in Beef Cattle. **J Anim Sci** 76:2272–2278.

Theunissen, T.W., Jaenisch, R (2017) Mechanisms of gene regulation in human embryos and pluripotent stem cells. **Development** 144:4496-4509.

Thomas, J. M., Locke, J. W.C., Vishwanath, R., Hall, J. B., Ellersieck, M. R., Smith, M. F., Patterson, D. J (2017) Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted sêmenfor timed artificial insemination of beef heifers. **Theriogenology** 98:88-93.

Tombolan, L., Orso, F., Guzzardo, V., Casara, S., Zin, A., Bonora, M., Romualdi, C., Giorgi, C., Bisogno, G., Alaggio, R., Pinton, P., De Pitt, C., Taverna, D., Rosolen, A., Lanfranchi, G (2011) High IGFBP2 expression correlates with tumor severity in pediatric rhabdomyosarcoma. **American Journal of Pathology** 179:2611-2624.

Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WMC, Evans G (2010) Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Anim Reprod Sci** 118:7–12.

Tang, D., Yao, R., Zhao, D., Zhou, L., Wu, Y., Yang, Y., Sun, Y., Lu, L., Gao, W (2018) Trichostatin A reverses the chemoresistance of lung cancer with high IGFBP2 expression through enhancing autophagy. **Scientific Reports** 8:1-10.

Tian, F.J., Qin, C.M., Li, X.C., Wu, F., Liu, X.R., Xu, W.M., Lin, Y (2015) Decreased Stathmin-1 Expression Inhibits Trophoblast Proliferation and Invasion and Is Associated with Recurrent Miscarriage. **American Journal of Pathology** 185:2709-2721.

Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M., Oka, C (2005) Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. **Bone** 27:323-336.

Vishwanath R, Moreno JF (2018) Review: Semen sexing – current state of the art with emphasis on bovine species. **Animal** 12:85–96.

Wang, Y., Liu, Y., Fan, Z., Liu, D., Wang, F., Zhou, Y (2017) IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. **PLoS ONE** 12:1-18.

Wahlberg, P., Nylander, Å., Ahlskog, N., Liu, K., Ny, T (2008) Expression and localization of the serine proteases high-temperature requirement factor A1, serine protease 23, and serine protease 35 in the mouse ovary. **Endocrinology** 149:5070-5077.

Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B (2016) gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. **R package version 3.0.1**.

Waters, S.M., Coyne, G.S., Kenny, D.A., Morris, D.G (2014) Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on transcription factor regulation in the bovine endometrium. **Molecular Biology Reports** 41:2745-2755.

Yang, X., Wu, L.L., Chura, L.R., Liang, X., Lane, M., Norman, R.J., Robker, R.L (2012) Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility** 97:1438-1443.

Yi, Y. J., Zimmerman, S. W., Manandhar, G., Odhiambo, J. F., Kennedy, C., Jonáková, V., Maňásková-Postlerová, P., Sutovsky, M., Park, C. S., Sutovsky, P (2012) Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization. **International Journal of Andrology** 35:196-210.

Young, L.E., Fernandes, K., McEvoy, T.G., Butterwith, S.C., Gutierrez, C.G., Carolan, C., Broadbent, P.J., Robinson, J.J., Wilmut, I., Sinclair, K.D (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **NATURE** 27:153-154.

Zhao, X. M., Cui, L., S., Hao, H. S., Wang, H. Y., Zhao, S. J., Du, W. H., Wang, D., Liu, Y., Zhu, H. B (2016) Transcriptome analyses of inner cell mass and trophectoderm cells isolated by magnetic-activated cell sorting from bovine blastocysts using single cell RNA-seq. **Reproduction in domestic animals** 51:726-735.

Zhu, G., Fei, T., Li, Z., Yan, X., Chen, Y.G (2015) Activin regulates self-renewal and differentiation of trophoblast stem cells by down-regulating the X chromosome gene Bcor. **Journal of Biological Chemistry** 36:22019-22029.

ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de incorporação de etinil uridina em embriões bovinos

Adaptado do kit de etiquetagem de síntese de RNA Click-it

1- Rotulagem

Solução 2mM Eu: 1 μ L de 100mM em 50 μ L de KSOM + BSA (use a mesma gota que os embriões) → Incube durante 1 hora em incubadora.

2- Fixar em 4% de PFA durante 15 minutos → lavar em PBS / PVA

3 - Adicione 1mL de Triton x100 a 0,5% em PBS, incube em temperatura ambiente por 15 minutos

4- Make (FRESH) 1x de tampão de reação click-it aditivo de 10X + 45 μ L de DDW (água bidestilada) - 5 μ L de 10X tampão de reação aditivo +45 μ L de DDW

5- Faça clique cocktail - nesta ordem:

uma. 428 μ L de tampão de reação de RNA click-IT (componente C)

b. 20 μ L de CuSO₄ (componente D)

c. 1,8 μ L de Alexa fluor.

d. 50 μ L de aditivo do buffer de reação Click-IT (feito na etapa 4)

7- Transferir os embriões para 100 μ L de cocktail e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos (proteger da luz) → lavar primeiro em Solução de Enxaguamento Click-it (componente F)

8- Coloração de DNA - solução de estoque de 1 μ L de hoescht por 100 μ L de PBS

9-Lave bem em PBS / PVA ou solução de enxaguamento Click-it (componente F)

10- Montar slide - semelhante ao vectashield