

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/07/2020.

**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

COORDENADOR: 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 memorian*), 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 memorian*), por todos os conselhos, carinho e amor durante toda a minha vida.

Aos meus Tios Marcos e Teresinha, Plínio e Jacyra, 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.....	89
ANEXOS.....	100

RESUMO

O processo transcricional em embriões extremamente complexo, nosso trabalho estimou o impacto de perturbações nos processos de transcricionais, 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 transcricional 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.

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

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 sêmentechology in cattle. **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