

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATMOSFERA GASOSA NA
MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O
METABOLISMO CELULAR E EPIGENÉTICO DE EMBRIÕES
BOVINOS**

**Carolina Miziara Nogueira
Biotecnologista**

2019

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATMOSFERA GASOSA NA
MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O
METABOLISMO CELULAR E EPIGENÉTICO DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Carolina Miziara Nogueira
Orientadora: Prof.^a Dra. Vera F. M. H. De Lima
Coorientadora: Dra. Yeda Fumie Watanabe
Coorientador: Dr. Rafael Vilar Sampaio

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

2019

M685i

Miziara, Carolina

Investigação do efeito da atmosfera gasosa na maturação e fecundação *in vitro* sobre o metabolismo celular e epigenético de embriões bovinos : -- / Carolina Miziara. -- Jaboticabal, 2019.

70 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Orientadora: Vera F. M. H. De Lima

Coorientador: Rafael Vilar Sampaio

1. Tensão de oxigênio. 2. Estresse oxidativo. 3. Produção *in vitro* de embriões (PIVE). 4. Metilação. 5. Histonas. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATMOSFERA GASOSA NA MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O METABOLISMO CELULAR E EPIGENÉTICO DE EMBRIÕES BOVINOS


AUTORA: CAROLINA MIZIARA NOGUEIRA

ORIENTADORA: VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

COORIENTADORA: YEDA FUMIE WATANABE

COORIENTADOR: RAFAEL VILAR SAMPAIO

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


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


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

Pós-Doutoranda MAITE DEL COLLADO BARRONDO
Departamento Zootecnia e Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP



Jaboticabal, 14 de outubro de 2019

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “Investigação do papel da atmosfera gasosa na maturação e fecundação in vitro de embriões: Uma abordagem epigenética”, protocolo nº 003948/19, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 11 de abril de 2019.

Vigência do Projeto	01/05/2019 a 01/08/2019
Espécie / Linhagem	Bovino/ não definido
Nº de animais	350
Peso / Idade	600 a 700 kg
Sexo	Feminino
Origem	Fazendas de produção de carne

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.


Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Carolina Miziara Nogueira nascida no dia 23 de março de 1992, na cidade de Araraquara, São Paulo, filha de Rubens Velloso Nogueira e Marister Teresa Miziara Nogueira. Iniciou o curso de Biotecnologia em março de 2011 na Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, campus Alfenas. Foi aluna de iniciação científica no ano de 2014 sob orientação da professora Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa. Foi estudante de pesquisa no Centro de pesquisa em Reprodução Animal na Université de Montréal, de agosto a novembro de 2016. Obteve o título de bacharel em Biotecnologia em dezembro de 2016. Em agosto de 2017, ingressou no curso de mestrado pelo programa Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal. Foi bolsista CNPq, sob orientação da professora Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e coorientação do Dr. Rafael Vilar Sampaio e da Dra. Yeda Fumie Watanabe.

Agradecimentos

Em todos os momentos desta jornada, sempre estive em meu pensamento esta frase: “Don't worry about a thing, cause every little thing gonna be all right...” Foram dois anos de muito aprendizado e um crescimento pessoal e profissional enorme. Passei por vários momentos durante essa trajetória, mas sempre acreditando que tudo ia dar certo, com pensamento positivo.

Primeiramente gostaria de agradecer a espiritualidade, que proporcionou esta experiência em minha vida. Por toda proteção e amparo nas horas mais difíceis. Certamente eram os passos certos a serem caminhados. Toda gratidão hoje e sempre.

Não poderia esquecer de todos aqueles que viveram comigo cada passo desta jornada. Agradeço imensamente aos meus pais, tão queridos, por tudo, principalmente por todo o suporte dado para conseguir completar mais esta etapa em minha vida. Por toda paciência, amor e companheirismo recebidos nestes anos todos. Agradecer ao meu irmão por todo amparo, sempre tão querido e tentando sempre estar presente em todos os momentos. Ao meu pequeno, por toda cumplicidade, amor, companheirismo e carinho recebidos nesta caminhada, sempre juntos ajudando um ao outro mesmo distantes. Às amigadas, obrigada por todos os momentos de tranquilidade. Sem a ajuda de todos os meus queridos/queridas de coração não estaria de pé sem vocês. Agradecer toda ajuda das meninas da rep das latinas quando estive em Pirassununga, amizade que vai além das fronteiras desse Brasil. Agradecer a Letícia (Le), pela ajuda, conversas sobre FIV e amizade que construímos em Pira, muito obrigada. Gratidão a minha amiga Bruna por ser tão querida, pelo companheirismo nas disciplinas da Unesp e 100 dias, também pela ajuda nos momentos de desespero, brigada por tudo miga sua louca. À minha família de Descalvado, Tio Zé, Marcinha, Tati, Hagatha, Morriz, Arnaldo, Herculano gratidão de coração por todo carinho e pelos momentos de tranquilidade nas cachoeiras. A todos, essa vitória não é só minha, é nossa. Amo todos vocês!!

Agradeço a professora Dra. Vera, pela grande oportunidade de poder contribuir para as Biotecnologias da Reprodução Animal, eterna gratidão por tudo. A Dra. Yeda, muito obrigada pela oportunidade da coorientação e por ter feito parte do time Vitrogen, lugar onde o aprendizado foi essencial. A Gabi/Fer, obrigada pela ajuda e amizade quando estive em Cravinhos. Dr. Rafael, agradeço imensamente a oportunidade, paciência, disponibilidade e dedicação para que eu entendesse cada passo do que estava fazendo. Sem sua ajuda nada disso teria sido possível. Gostaria de agradecer a oportunidade concedida pelo professor Flávio Vieira Meirelles de ter feito parte do time LMMD, aos parceiros do laboratório LMMD, Jéssica, Estrepa, João, Raquel, Alessandra, Maitê, Jorge, Gabriela, Ramon, Cibele, obrigada por todo apoio no experimento e paciência ao longo do projeto. A Dani, quando o chão fugia dos meus pés no laboratório, sempre me socorria; obrigada pelas caronas para Descalvado e pela amizade!! Gostaria de agradecer a Maíra de todo o coração, pela paciência e amor em ensinar algumas técnicas do experimento e pelo companheirismo e amizade enquanto estava em Pira. Àqueles que de alguma forma ou outra estiveram presentes durante a realização desse trabalho, gratidão.

Gostaria de agradecer ao amigo Léo pelas idas aos matadouros, independente do tempo que estivesse, e agradecer aos frigoríficos Olhos D'água, Barra Mansa e Vale do Prata pela doação dos ovários.

À CNPq pelo apoio financeiro (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - Brasil (CNPq).

A todos nesta caminhada, muito obrigada de coração.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Maturação <i>in vitro</i>	3
2.2 Fecundação <i>in vitro</i>	5
2.3 Estresse oxidativo e seu impacto nas ARTs	6
2.4 Atmosfera gasosa e o epigenoma.....	9
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	13
4. HIPÓTESES.....	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1 Experimento I: Efeito da tensão de oxigênio na maturação <i>in vitro</i>	14
5.2 Experimento II: Efeito da tensão de oxigênio na fecundação <i>in vitro</i>	15
5.3 Experimento III: Efeito da tensão de oxigênio na maturação e fecundação <i>in vitro</i> e sua influência no desenvolvimento embrionário.....	16
5.4 Experimento IV: Efeito da tensão de oxigênio no nível intracelular de GSH e EROs em blastocistos.....	16
5.5 Experimento V: Efeito da tensão de oxigênio nos níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas em blastocistos	17
5.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	18
5.7 Avaliação da Metáfase II	20
5.8 Quantificação dos níveis intracelulares de EROs e GSH.....	20
5.9 Avaliação da Taxa de Fecundação	21
5.10 Análise da expressão gênica.....	21

5.11 Imunofluorescência para detecção das marcas epigenéticas 5mC, 5hmC, H3K9me2 e H3K9me3	24
5.12 Análise dos resultados	25
6. RESULTADOS.....	25
6.1 Experimento I: Efeito da tensão de oxigênio na maturação <i>in vitro</i>	25
6.1.1 Avaliação da Metáfase II	25
6.1.2 Níveis intracelulares de EROs e GSH em oócitos.....	25
6.1.3 Níveis de expressão de mRNA em oócitos e células do cumulus	26
6.2 Experimento II: Efeito da tensão de oxigênio na fecundação <i>in vitro</i>	29
6.3 Experimento III: Efeito da tensão de oxigênio na maturação e fecundação <i>in vitro</i> e sua influência no desenvolvimento embrionário.....	30
6.3.1 Níveis expressão de RNAm em blastocistos.....	31
6.4 Experimento IV: Efeito da tensão de oxigênio no nível intracelular de GSH e EROs em blastocistos.....	32
6.5 Experimento V: Efeito da tensão de oxigênio nos níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas em blastocistos	33
7. DISCUSSÃO	37
8. CONCLUSÃO	48
9. REFERÊNCIAS.....	49

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ATMOSFERA GASOSA NA MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O METABOLISMO CELULAR E EPIGENÉTICO DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO - As tecnologias de reprodução assistida ou ARTs (“*Assisted Reproductive Technology*”) são amplamente utilizadas na reprodução humana e animal. Para estes procedimentos, gametas e embriões são expostos a um ambiente artificial que mimetiza o trato reprodutivo. Um dos fatores mais discrepantes neste contexto é a atmosfera gasosa, visto que *in vivo* a concentração de O₂ encontrada no trato reprodutivo é menor do que a utilizada no ambiente *in vitro*, sendo comumente utilizada a concentração de 20% de oxigênio neste sistema artificial. Altas concentrações deste gás provocam estresse oxidativo e aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüente maior proporção de células apoptóticas em oócitos e embriões. Entretanto, pouco se sabe sobre as conseqüências da mudança de atmosfera gasosa durante as fases iniciais da produção *in vitro* de embriões e as possíveis conseqüências no remodelamento epigenético. Para validar a hipótese de que **diferentes concentrações de oxigênio durante a maturação e a fecundação *in vitro* modulam a transcrição de genes envolvidos no estresse oxidativo e modeladores epigenéticos em oócitos, células do cumulus e embriões bovinos. Além disso, o estresse oxidativo gerado nos embriões exerce efeito sobre os níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas**, cinco experimentos foram realizados com objetivo de investigar o papel da atmosfera gasosa nos passos iniciais da produção *in vitro* de embriões bovinos. Para diferenciar os efeitos da tensão de oxigênio nas etapas iniciais da PIVE o desenvolvimento embrionário foi analisado, testando a tensão de oxigênio atmosférica (20% O₂) e a baixa tensão de oxigênio (5% O₂) na maturação e fecundação *in vitro* de embriões bovinos. Os grupos formados foram: baixa tensão de O₂ na maturação e fecundação *in vitro* (M5F5), baixa tensão de O₂ na maturação e alta tensão na fecundação *in vitro* (M5F20), alta tensão de O₂ na maturação e fecundação *in vitro* (M20F20) e alta tensão de O₂ na maturação e baixa tensão na fecundação *in vitro* (M20F5). No primeiro experimento, analisou-se o efeito da tensão de oxigênio na maturação *in vitro* por meio da análise da metáfase II, quantificação da concentração intracelular de EROs e glutathiona reduzida (GSH), assim como expressão de mRNAs relacionados a vias de resposta ao estresse oxidativo e remodelamento epigenético em oócitos e células do cumulus. Os resultados iniciais indicaram que oócitos maturados em alta e baixa tensão de O₂ não apresentam diferença na maturação nuclear. Oócitos maturados em alta tensão de O₂ geram maior concentração de EROs e GSH comparado ao ambiente de baixa tensão de oxigênio. As células do cumulus de oócitos submetidos a alta tensão de oxigênio na maturação *in vitro*, apresentaram níveis de transcritos maiores para o gene SOD1 relacionado a via de resposta ao estresse oxidativo celular. No segundo experimento, analisou-se o efeito da tensão de oxigênio na fecundação *in vitro* por meio da análise da taxa de fecundação. A partir dos dados obtidos neste experimento, foi constatado que zigotos expostos a um ambiente de baixa tensão de O₂ na FIV não resultam em maior taxa de polispermia. Todos os presumíveis zigotos foram cultivados em baixa tensão de

oxigênio até atingirem o estágio de blastocisto. No terceiro experimento, avaliou-se o efeito da tensão de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro* e sua influência no desenvolvimento embrionário. Na taxa de blastocisto, quando houve interação entre ambos os fatores (tensão de oxigênio na MIV e FIV) (*one way ANOVA*, $p \geq 0.05$), a produção de embriões demonstrou que o grupo M20F20 apresentou uma maior produção (50.63 ± 4.55) em relação aos grupos M20F5 (29.66 ± 2.81), M5F5 (32.00 ± 3.27) e M5F20 (31.88 ± 3.99). No entanto, na análise dos efeitos dos fatores (*two way ANOVA*, $p \leq 0.05$), a alta tensão de oxigênio mostrou um efeito benéfico na MIV e FIV através das taxas de desenvolvimento. Na análise de expressão gênica dos blastocistos não houve interação ($p > 0.05$), de modo que os efeitos principais de MIV ($p < 0.05$) diferiram. Alguns genes analisados apresentaram um aumento nos transcritos de embriões que foram maturados em baixa tensão de oxigênio e relacionados a via de resposta ao estresse oxidativo (NRF2, SOD1, SOD2) e remodelamento epigenético (KDM5A e TET1). No quarto experimento deste estudo, demonstrou-se o efeito da tensão de oxigênio a nível intracelular de GSH e EROs em blastocistos. Embriões coletados no dia 7 do desenvolvimento embrionário demonstraram que os níveis intracelulares de GSH foram maiores nos grupos M20F20 e M5F5, em relação aos grupos M20F5 e M5F20. As concentrações intracelulares de EROs foram menores nos grupos M20F20 e M5F5, não existindo diferença entre esses grupos. Já os grupos M20F5 e M5F20 tiveram maior acúmulo de EROs e diferiram entre si. No último experimento deste estudo (V), observou-se o efeito da tensão de oxigênio nos padrões globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas em blastocistos. Na análise dos níveis globais de metilação do DNA, foi encontrado maiores níveis de 5mC nos grupos M5F20 e M5F5, em relação aos grupos M20F5 e M20F20, todos os grupos diferiram entre si. Os níveis de 5hmC foram analisados e a média da intensidade de fluorescência foi superior em embriões do grupo M20F5 e M5F5 comparado aos grupos M5F20 e M20F20, existindo diferença entre os grupos. Na marcação das histonas ambas se comportaram de maneira semelhante, sendo encontrada maiores níveis de H3K9me2/me3 em embriões dos grupos M5F5 e M20F20, em relação a M5F20 e M20F5, existindo diferença entre os grupos. Em conclusão, este estudo elucidou as diferenças que a alta e a baixa tensão de oxigênio podem provocar nas fases iniciais da produção *in vitro* de embriões bovinos e possíveis consequências na homeostase celular. Contribuiu para o entendimento dos mecanismos básicos da interação ambiente e genoma, além da aplicação dos conhecimentos adquiridos para a melhoria de biotecnologias nas etapas iniciais da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chaves: tensão de oxigênio, estresse oxidativo, produção *in vitro* de embriões, metilação, histonas.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GAS ATMOSPHERE IN THE MATURATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION ON CELLULAR AND EPIGENETIC METABOLISM OF BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT- Assisted Reproductive Technology (ARTs) are widely used in human and animal reproduction. For these procedures, gametes and embryos are exposed to an artificial environment that mimics the reproductive tract. One of the most discrepant factors in this context is the gaseous atmosphere, since *in vivo* the O₂ concentration found in the reproductive tract is lower than that used in the *in vitro* environment, and the concentration of 20% oxygen in this artificial system is commonly used. High concentrations of this gas cause oxidative stress and increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, higher proportion of apoptotic cells in oocytes and embryos. However, little is known about the consequences of gaseous atmosphere change during the early stages of *in vitro* embryo production and the possible consequences on epigenetic remodeling. To validate the hypothesis that different oxygen concentrations during maturation and *in vitro* fertilization modulate the transcription of genes involved in oxidative stress and epigenetic modelers in oocytes, cumulus cells and bovine embryos. In addition, oxidative stress generated in embryos has an effect on global DNA methylation and histone tagging levels. Five experiments were carried out to investigate the role of the gaseous atmosphere in the initial steps of *in vitro* production of bovine embryos. To differentiate the effects of oxygen tension in the early stages of IVPE, embryonic development was analyzed by testing atmospheric oxygen tension (20% O₂) and low oxygen tension (5% O₂) on *in vitro* maturation and fertilization of bovine embryos. The groups formed were: low tension O₂ at *in vitro* maturation and fertilization (M5F5), low tension O₂ at maturation and high *in vitro* fertilization (M5F20), high tension O₂ at *in vitro* maturation and fertilization (M20F20) and high tension O₂ at maturation and low tension at *in vitro* fertilization (M20F5). In the first experiment, the effect of oxygen tension on *in vitro* maturation was analyzed by metaphase II analysis, quantification of intracellular concentration of ROS and reduced glutathione (GSH), as well as expression of stress response pathway-related mRNAs. Oxidative and epigenetic remodeling in oocytes and cumulus cells. Initial results indicated that oocytes matured at high and low O₂ tension do not differ in nuclear maturation. Oocytes matured at high tension O₂ generate higher concentration of ROS and GSH compared to the low oxygen tension environment. Cumulus cells from oocytes subjected to high oxygen tension at *in vitro* maturation showed higher transcript levels for the SOD1 gene related to the cellular oxidative stress response pathway. In the second experiment, the effect of oxygen tension on *in vitro* fertilization was analyzed by analyzing the fertilization rate. From the data obtained in this experiment, it was found that zygotes exposed to a low tension O₂ environment in IVF do not result in higher polyspermia rate. All presumed zygotes were cultured at low oxygen tension until they reached the blastocyst stage. In the third experiment, the effect of oxygen tension on *in vitro* maturation and fertilization and its influence on embryonic development was evaluated. In the blastocyst rate, when there was interaction between both factors (oxygen tension in IVM and IVF) (one way ANOVA,

$p \geq 0.05$), embryo production showed that the M20F20 group had a higher production (50.63 ± 4.55) in for the groups M20F5 (29.66 ± 2.81), M5F5 (32.00 ± 3.27) and M5F20 (31.88 ± 3.99). However, in the analysis of factor effects (two way ANOVA, $p \leq 0.05$), high oxygen tension showed a beneficial effect on IVM and IVF through developmental rates. In the gene expression analysis of blastocysts there was no interaction ($p > 0.05$), so that the main effects of IVM ($p < 0.05$) differed. Some genes analyzed showed an increase in embryo transcripts that were matured at low oxygen tension and related to the oxidative stress response pathway (NRF2, SOD1, SOD2) and epigenetic remodeling (KDM5A and TET1). In the fourth experiment of this study, the effect of intracellular oxygen tension of GSH and ROS on blastocysts was demonstrated. Embryos collected on day 7 of embryonic development showed that intracellular GSH levels were higher in groups M20F20 and M5F5 than in groups M20F5 and M5F20. Intracellular ROS concentrations were lower in groups M20F20 and M5F5, with no difference between these groups. The M20F5 and M5F20 groups had higher ROS accumulation and differed among themselves. In the last experiment of this study (V), the effect of oxygen tension on global DNA methylation patterns and specific histone marks in blastoc was observed. In the last experiment of this study (V), we observed the effect of oxygen tension on global DNA methylation patterns and specific histone markings in blastocysts. In the analysis of global DNA methylation levels, higher levels of 5mC were found in groups M5F20 and M5F5, compared to groups M20F5 and M20F20, all groups differed. The 5hmC levels were analyzed and the mean fluorescence intensity was higher in M20F5 and M5F5 embryos compared to M5F20 and M20F20, with differences between groups. In histone marking both behaved similarly, with higher levels of H3K9me2 / me3 found in embryos of groups M5F5 and M20F20, compared to M5F20 and M20F5, with differences between groups. In conclusion, this study elucidated the differences that high and low oxygen tension may cause in the early stages of *in vitro* production of bovine embryos and possible consequences on cellular homeostasis. It contributed to the understanding of the basic mechanisms of environment and genome interaction, as well as the application of the knowledge acquired to the improvement of biotechnologies in the early stages of *in vitro* production of bovine embryos.

Keywords: oxygen tension, oxidative stress, *in vitro* production of embryos (IVPE), methylation, histones.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do significativo avanço da produção *in vitro* de embriões (PIVE) nas últimas décadas, sabe-se que o desenvolvimento embrionário de mamíferos pode ser sensibilizado negativamente por fatores como composição do meio, temperatura, pH e tensão de oxigênio, que constituem o ambiente artificial (Menezo et al., 2016). O oxigênio é um componente essencial deste sistema, pois ele desempenha papel central na respiração celular e influencia fortemente a produção de energia (Morin, 2017). A concentração de oxigênio geralmente não é controlada nas etapas iniciais da PIVE, sendo comumente utilizado o modelo de alta tensão de oxigênio (20% O₂), diferente da concentração encontrada no trato reprodutivo de várias espécies ($\leq 7\%$ O₂) (Harvey, 2007). O desenvolvimento embrionário inicial acontece durante a migração do embrião pelo oviduto, em condições *in vivo* ideais, sob concentração de oxigênio entre 5 e 7% (Fischer e Bavister, 1993; Harvey, 2007). Para melhor resultado na PIVE, o sistema de produção (MIV, FIV, CIV) precisa de contínuo aperfeiçoamento (Leivas, 2006).

As condições de incubação adotadas nos sistemas de PIVE podem gerar estresse oxidativo ou desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (Nabenishi et al., 2012), podendo ser tóxica para oócitos e resultar em bloqueio no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Fukui e Oyamada, 2004). Os radicais gerados *in vitro*, como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e a hidroxila, reagem com as proteínas celulares, os lipídeos e o DNA, resultando em inativação enzimática, peroxidação lipídica da membrana e alterações do DNA (Andrade et al., 2010; Silva et al., 2011).

O ambiente artificial proporcionado pelas ARTs tem sido relacionado à alta frequência de desordens epigenéticas, tanto em humanos, como as síndromes de Beckwith-Wiedemann, Siver Russel, Angelman (Amor e Halliday, 2008); quanto em animais, como a síndrome da cria gigante ou LOS (*Large Offspring Syndrome*) (Young et al., 1998). Acredita-se que modificações epigenéticas alteram padrões de expressão gênica embrionária, podendo causar variações na metilação do DNA e estar envolvidas na síndrome LOS (Wrenzycki e Niemann, 2003). O surgimento de

LOS em bovinos devido sua grande similaridade (Chen et al., 2013), representa excelente modelo de estudos de síndromes epigenéticas em humanos.

Interessantemente, o cultivo *in vitro* de embriões em diferentes tensões de O₂ mostrou ser capaz de induzir mudanças no padrão de metilação do DNA (Bomfim et al., 2017), nas modificações de histonas (Gaspar et al., 2015) e, conseqüentemente, nos padrões de genes regulados por *imprinting* (Skiles et al., 2018). Entretanto, poucos estudos investigam o papel da tensão de O₂ durante a maturação e fecundação *in vitro*, pontos chaves para o sucesso das ARTs. A relação entre as modificações epigenéticas e a concentração de oxigênio é possível devido a um dos principais grupos de proteínas responsáveis por marcações epigenéticas, serem da família dioxigenases dependentes de α -cetoglutarato (α KG) e Fe (II), necessitando assim, de oxigênio como substrato para as reações químicas (Van der Knaap e Verrijzer, 2016). Dentre eles podemos citar as desmetilases de lisinas ou KDMs (*Lysine demethylases*) e a família das proteínas TETs, as desmetilases de DNA. Outro mecanismo de regulação, em estado de hipóxia ou níveis alterados de O₂, acontece através da comunicação de proteínas com produtos da heterodimerização, um fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF), que pode alterar vias intracelulares (Semenza, 2002; Loenarz e Schofield, 2008). O HIF-1 está envolvido em acontecimentos importantes da vida celular como o desenvolvimento embrionário (Lyer et al., 1998; Ryan et al., 1998; Kotch et al., 1999) e a apoptose (Carmeliet et al., 1998; Halterman et al., 1999). Vias adaptativas que incluem metabolismo, angiogênese e sobrevivência ao estresse hipóxico estão envolvidas no processo de regulação de muitos genes através do fator de transcrição indutível por hipóxia (Semenza, 2003).

Por isso, a hipótese central deste estudo é que, **diferentes concentrações de oxigênio durante a maturação e a fecundação *in vitro* modulam a transcrição de genes envolvidos no estresse oxidativo e modeladores epigenéticos em oócitos, células do cumulus e embriões bovinos. Além disso, o estresse oxidativo gerado nos embriões exerce efeito sobre os níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas.** Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da atmosfera gasosa nos passos iniciais da produção *in vitro* de embriões bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maturação *in vitro*

A maturação do oócito envolve inúmeros eventos como: modificações estruturais e funcionais no complexo *cumulus*-oócito, tais como a formação do estoque de transcritos maternos, condensação do DNA e extrusão do primeiro corpúsculo polar, multiplicação e expansão das células do *cumulus* (Eppig, 1990). O suporte para o embrião na fase inicial da embriogênese é fornecido pela disponibilidade de moléculas que permite a condensação do seu DNA, possibilitando a diminuição da transcrição ativa pelo oócito, que é fundamental para o progresso da maturação e extrusão do primeiro corpúsculo (Sirard, 2012).

O oócito competente é definido por ser capaz de completar a meiose, clivar após a fecundação, formar blastocisto e desenvolver um indivíduo normal após o nascimento. Para isso a maturação deve ser completa, alcançando as duas etapas: nuclear, citoplasmática e molecular (Sirard et al., 2010). O processo de maturação *in vitro* deficiente, especialmente a maturação citoplasmática, está relacionado com a baixa formação de blastocistos (Oyamada e Fukui, 2004).

A atividade celular do embrião durante o desenvolvimento é predominantemente controlada por transcritos e proteínas de origem materna, até que estes estoques sejam gradualmente degradados e substituídos por transcritos do genoma embrionário, período denominado transição materno-zigótica (TMZ) (Barnes e Eyestone, 1990). Este estoque do oócito é crucial para reprogramação epigenética do embrião, na qual mecanismos de alteração da estrutura de cromatina alteram o padrão de expressão do genoma e, conseqüentemente, auxiliam na ativação do genoma do embrião (EGA). No entanto, mesmo após a ativação do genoma embrionário (que em bovinos ocorre entre os estágios de 8 para 16 células, aproximadamente no D4 de desenvolvimento), o sucesso desta etapa depende de componentes maternos armazenados, sem os quais os embriões não conseguem progredir além das divisões celulares iniciais (Graf et al., 2014).

No modelo bovino, a maturação *in vitro* dos oócitos é comumente conduzida entre 18 e 24 horas, à temperatura de 38.5 °C e concentração de 20% oxigênio (5% de CO₂ em ar), o que difere da concentração igual ou menor que 7% de O₂ encontrada no oviduto, durante o processo de ovulação dos oócitos em algumas espécies (Mastroianni e Jones, 1965; Mitchell e Yochim, 1968; Maas et al. 1976, Fischer e Bavister, 1993).

A maturação *in vitro* do oócito e o desenvolvimento embrionário podem ser afetados negativamente por condições de estresse oxidativo, resultando em aumento de células apoptóticas e fragmentação celular, em embriões murinos (Johnson e Nasr-Esfahani, 1994; Liu e Keefe, 2000), caprinos (Guerin et al., 2001), bovinos (Khurana e Niemann, 2000) e humanos (Bedaiwy et al., 2004), acúmulo de lipídios e qualidade reduzida (Abe et al., 2002; Sudano et al., 2011), mudanças na expressão gênica e metabolismo de embriões (Rinaudo et al., 2006; Balasubramanian et al., 2007; Harvey, 2007). Em suínos, as EROs podem provocar danos celulares apoptóticos somente à oócitos desnudos, sugerindo que as células do cumulus protegem os oócitos contra a apoptose causada por EROs durante a maturação *in vitro* (Tatemoto et al., 2004). O estado redox da célula quando alterado, resulta em uma acumulação de EROs e uma diminuição na quantidade de antioxidantes, podendo induzir a morte celular por apoptose (Buttke e Sandstrom, 1994; Fenwick et al., 2002).

A glutatona, antioxidante de grande abundância em oócitos e embriões, possui importantes reservatórios durante o processo de maturação dos oócitos, visto que sua síntese somente será retomada posteriormente a fase de EGA (Eichenlaub Ritter et al., 2011). A síntese deste importante antioxidante foi relatada durante a maturação de oócitos em várias espécies (Calvin et al., 1986; Perreault et al., 1988; Yoshida et al., 1992; Miyamura et al., 1995). Durante o desenvolvimento e maturação do oócito no ovário, o conteúdo de GSH aumenta à medida que o gameta se aproxima do tempo de ovulação (Perreault et al., 1988), esse acúmulo de glutatona durante o desenvolvimento protege o oócito nas fases posteriores à fertilização (Telford et al., 1990). A competência no desenvolvimento de oócitos bovinos pode ser prejudicada se houver estresse oxidativo, devido ao aumento das EROs intracelulares e diminuição da glutatona, antioxidante que tem função de proteger as células contra o estresse oxidativo (Hashimoto et al., 2000). A maturação oocitária pode ser afetada

através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo ter um impacto maior em alta tensão de oxigênio na MIV (Fowler e Callingham, 1978; Yang et al., 1998; Hashimoto et al., 2000; Guerin et al., 2001). De fato, é provável que o ambiente que envolve os gametas, antes da implantação do embrião, possa ter consequência nos desenvolvimentos posteriores (Harvey, 2007).

2.2 Fecundação *in vitro*

Na fecundação *in vitro*, a concentração de O₂ utilizada é um aspecto importante a ser considerado. Durante a FIV, a concentração de oxigênio usualmente não é controlada, sendo utilizado 20% de O₂, independentemente de outros fatores tais como meio, volume, densidade dos oócitos e touros utilizados. Existem poucos estudos relacionados com o efeito da concentração de O₂ afetando o sucesso da FIV e a produção de blastocistos, como em camundongos, bovinos e humanos (Dumoulin et al., 1995; Giotto et al., 2015).

Em bovinos, foi demonstrado que a redução do oxigênio durante a FIV tem um efeito divergente. Lazzari et al., (1998) encontraram um efeito benéfico na redução do oxigênio nas taxas de desenvolvimento embrionário. Leivas, 2006 avaliou a influência da atmosfera durante a MIV e FIV de oócitos bovinos obtidos por OPU, sobre a produção, qualidade dos embriões e taxa de prenhez. Como resultado encontraram uma taxa de prenhez similar entre os grupos de 5% O₂ e 20% O₂, concluindo que é possível utilizar a concentração de 5% de oxigênio durante todo o processo de PIVE em programas comerciais de OPU/PIVE. A concentração de 5% de O₂ foi também utilizada por Galli et al.(2001) para touros com baixas taxas de fecundação em protocolos convencionais. Takahashi e Kanagawa, (1998) não detectaram diferença na taxa de fecundação, porém o desenvolvimento embrionário foi superior no grupo onde a FIV foi conduzida sob atmosfera de 5% de O₂. Entretanto, em 1995, Pinyopummintr e Bavister observaram que, o percentual de polispermia aumentou acentuadamente quando a FIV foi conduzida em O₂ reduzido. No estudo de Bermejo-Álvarez et al, (2010), quando a FIV foi realizada em baixa tensão de oxigênio obtiveram um menor desenvolvimento embrionário.

Segundo Leivas, (2006), a qualidade dos oócitos aspirados e as condições de MIV e FIV podem afetar o desenvolvimento embrionário. Altos níveis de O_2 (20%) podem ser tóxicos para diferentes tipos de células, incluindo oócitos e espermatozoides, provavelmente devido à formação de radicais livres que podem causar danos celulares por oxidação, inativação enzimática e danos ao DNA, podendo ter graves resultados (Umaoka et al., 1992). Variações na produção de EROs e nas taxas de fertilização de oócitos, foram demonstradas no estudo de Giotto et al., 2015, fornecendo evidências da influência desses fatores na fertilização *in vitro*.

2.3 Estresse oxidativo e seu impacto nas ARTs

Em alguns estudos, a baixa tensão de O_2 é mencionada ser inadequada para sustentar o metabolismo celular aeróbio, enquanto um ambiente com alta concentração desse gás pode ter efeito prejudicial devido ao estresse oxidativo causado pelo aumento de EROs (Gigli et al., 2006). O distúrbio no estado de equilíbrio entre as EROs e os agentes antioxidantes é denominado estresse oxidativo ou desequilíbrio redox, sendo representados pela produção e eliminação destes radicais (Gupta et al., 2010; Machado et al., 2013). Existem dois tipos principais de espécies de radicais livres: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Agarwal et al., 2005). O mecanismo das EROs na respiração celular ocorre quando, uma molécula de O_2 é reduzida em duas moléculas de água, através da incorporação de 4 elétrons. Contudo, quando essa redução ocorre de forma incompleta, ou seja, agregando menos de 4 elétrons, há a formação das EROs. Se o O_2 for parcialmente reduzido pela recepção de somente 1 elétron, o produto desta redução será o radical superóxido (O_2^-). Este radical, ao receber mais um elétron e 2 íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Da reação entre o peróxido de hidrogênio e íons de ferro ou cobre ocorrerá à formação do radical hidroxila (OH^-), considerado o mais reativo e podendo ser formado também pela reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido (Menezo et al., 2016). Todos estes metabólitos derivados do oxigênio são denominados EROs devido a elevada instabilidade e reatividade (Nordberg e Arnér, 2001). Durante a fase de redução as

EROs podem induzir à peroxidação lipídica de membranas biológicas e acarretar em danos ao DNA (Silva et al., 2011).

Células de mamíferos desenvolveram uma variedade de mecanismos enzimáticos para controlar a produção de EROs, um dos elementos centrais nas vias de transdução de sinal envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose celular (Al-Gubory et al., 2010). As espécies reativas de oxigênio são produzidas por oócitos, células do *cumulus oophorus* e embriões durante o metabolismo aeróbico mais especificamente na cadeia de transporte de elétrons pela fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Agarwal et al., 2008). Devido às mitocôndrias celulares serem herdadas maternamente, toda a consequência do comprometimento mitocondrial é conduzida pelo oócito, com um efeito sobre a viabilidade e o desenvolvimento dos embriões (Ménézo et al., 2013). Estas organelas são a principal fonte geradora de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia (Jensen, 1966; Boveris et al., 1972, Brand, 2016). Alguns trabalhos revelaram que oxidantes mitocondriais também podem funcionar como sinalizador redox em resposta a estresses celulares, como a hipóxia (Chandel et al., 1998; Boveris et al., 2000; Chandel e Schumacker, 2000), apoiando a ideia de que a geração de EROs mitocondrial aumenta, ao invés de diminuir durante a hipóxia (Guzy e Schumacker, 2006). Os sinais das EROs que são induzidos por hipóxia na mitocôndria, desencadeiam a ativação de respostas transcricionais hipóxicas por meio da inibição das proil hidroxilases de HIF (PHD), um regulador negativo da estabilidade de HIF- α (Chandel et al., 1998, 2000). Novos estudos exploram uma correlação significativa entre hipóxia e mudanças na produção de EROs.

Antioxidantes podem exercer função de defesa contra danos induzidos por EROs à lipídios, proteínas e DNA. As EROs e os antioxidantes têm sido implicados na regulação de processos reprodutivos em animais e humanos, tais como alterações lúteas e endometriais cíclicas, desenvolvimento folicular, ovulação, fertilização, embriogênese, implantação embrionária, diferenciação e crescimento placentário, manutenção da gestação e início do parto (De Lamirande e Gagnon, 1995; Argawal et al., 2008; Al-Gubory et al., 2010). Em contraste, os desequilíbrios entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes induzem estresse oxidativo que afeta negativamente os processos reprodutivos (Agarwal e Allamaneni, 2004; Agarwal e

Said, 2005; Agarwal et al., 2006; Al-Gubory et al., 2010; Bermejo-Álvarez et al., 2010; Bontekoe et al., 2012; Bomfim et al., 2017). Segundo Hashimoto e colaboradores (2000), oócitos bovinos maturados sob alta tensão de oxigênio, podem ser prejudicados pelo estresse oxidativo, devido ao aumento das EROs e diminuição da glutathiona intracelular, que tem função de proteger as células do estresse oxidativo. A glutathiona reduzida (GSH) é um componente importante da maquinaria antioxidante da célula, podendo auxiliar na biologia redox em uma concentração celular de antioxidantes que pode variar dependendo da atividade celular, do grau de estresse e da capacidade da célula manter a homeostase durante o estresse redox (Michelakis et al., 2004). O nível de GSH aumenta durante a maturação oocitária e à medida que o oócito se aproxima do tempo de ovulação (Perreault et al., 1988). Após a fecundação, a glutathiona participa da descondensação espermiática junto à ativação do oócito (Yoshida et al., 1992; 1993) sendo, portanto, pré-requisito para a formação do pronúcleo masculino (Calvin et al., 1986; Perreault et al., 1988). É reconhecido que as condições redox são reguladas independentemente nos diferentes compartimentos subcelulares, existindo controle da geração de EROs e expressão de genes específicos do compartimento de sistema de enzimas antioxidantes (Smith et al., 2017).

Apesar do aumento dos níveis intracelulares das EROs desencadear as ações nocivas descritas, estas também atuam como moléculas sinalizadoras em diversas reações celulares e sua redução excessiva pode acarretar em parada do desenvolvimento embrionário (Ufer et al., 2010). Amin et al., 2014, Bomfim et al., 2017 e Leite et al., 2018 cultivaram blastocistos em alta e baixa tensão de O₂, e observaram uma maior concentração de EROs no grupo cultivado em alta tensão de oxigênio. O estresse oxidativo gerou também um aumento da metilação global nos blastocistos e alterou a expressão de transcritos e miRNAs (Bomfim et al., 2017). Outros estudos demonstraram que, um aumento na tensão de oxigênio, pode efetivamente aumentar a produção de EROs em embriões bovinos, podendo ser correlacionado com um aumento no nível de transcrição de genes relacionados ao estresse oxidativo (Wrenzycki et al., 2001; Rinaudo et al., 2006; Corrêa et al., 2008; Arias et al., 2012). No entanto, o oxigênio também pode ter um efeito potencialmente tóxico em embriões humanos via EROs (Catt et al., 2000; Kovacic e Vlaisavljevic, 2008). Batie e

colaboradores, (2019) concluíram que as EROs não estão envolvidas no aumento das marcas de metilação de histonas em células HeLa que foram expostas por uma hora em ambiente hipóxico, mas podem contribuir com aumento da metilação em hipóxia prolongadas. Já Smith et al., (2017) observaram que a hipóxia estimula a produção de oxidantes pela cadeia de transporte de elétrons e aumentam a liberação de sinais de EROs para o citosol (Duranteau et al., 1998; Guzy e Schumacker, 2006; Fernandez-Aguera et al., 2015). As EROs podem estar envolvidas na ocorrência de morte celular, especialmente no estágio de blastocisto (Parchment, 1991). Existem indicações de que altas concentrações de oxigênio durante o cultivo embrionário são prejudiciais para o embrião bovino, mas a hipóxia (abaixo do nível fisiológico de 5%) não prejudicou embriões de camundongos (Umaoka et al., 1992) e coelhos (Li e Foote, 1993), uma vez que esta pode ser um indutor de apoptose (Adachi et al., 2001). Além disso, estudos recentes demonstraram a presença da expressão de genes antioxidantes nas células do trato reprodutivo feminino, indicando que existe um equilíbrio de oxidante / antioxidante no ambiente celular (Agarwal e Allamaneni, 2004). A tensão de oxigênio pode ter importantes implicações na regulação da proliferação e diferenciação celular durante os estágios iniciais do desenvolvimento do embrião (Fischer; Bavister. 1993).

2.4 Atmosfera gasosa e o epigenoma

Modificações epigenéticas resultam em mudanças mitóticas e hereditárias na expressão gênica, sem alterar a seqüência de bases do DNA (Santos et al., 2003, Corry et al., 2009). As modificações das histonas podem incluir fosforilação, ubiquitilação, sumoilação, acetilação e metilação, entre outras (Berger et al., 2009). Essas modificações podem ter diferentes consequências para a compactação e acessibilidade da cromatina, assim tendo efeitos variados na expressão gênica (Ross e Sampaio, 2018).

A metilação do DNA e as modificações das histonas desempenham papéis essenciais durante o desenvolvimento pré-implantacional (Santos et al., 2003; Sarmiento et al., 2004). Segundo alguns estudos, é severamente deficiente a

reprogramação epigenética em embriões clones (Bourc'his et al., 2001). A metilação da histona pode sinalizar ativação ou repressão gênica, dependendo dos locais de metilação que ocorre (Martin e Zhang, 2005). Essas marcas altamente dinâmicas são frequentemente associadas a eventos críticos, incluindo a ativação do genoma embrionário e a primeira diferenciação celular (Mason et al., 2012). O processo de metilação e desmetilação das histonas é realizado por enzimas chamadas respectivamente de metiltransferases de lisina [(KMTs) do inglês *lysine methyltransferases*] e desmetilases de lisina [(KDMs) do inglês *lysine demethylases*] (Shi e Whetstine, 2007). A família das KDMs possui um domínio JmjC (Jumonji C). Elas são proteínas dependentes de α -cetoglutarato, oxigênio molecular e Fe (II) e usam estes como cofatores para atuar no processo de desmetilação (Sampaio, 2015). A metilação da histona H3 pode ocorrer em vários resíduos de lisina (K4, K9, K27, K36 e K79) tendo importante papel na regulação da expressão gênica (Lachner et al., 2003). A metilação de K4 está associada à cromatina ativa e a metilação da K9 com cromatina inativa, na maioria dos eucariotos (Lachner e Jenuwein, 2002). As condições de cultivo são altamente vulneráveis aos mecanismos epigenéticos (Niemann e Wrenzycki, 2000; Duranthon et al, 2008; Kohda e Ishino, 2013). Alguns estudos indicaram que não é alcançado um padrão epigenético correto em embriões manipulados, como os produzidos in vitro (Li et al., 2005; McEwen et al., 2013) e produzidos por transferência nuclear de células somáticas (Morgan et al., 2005; Maalouf et al., 2008). A metilação da H3K4 e K9 estão intimamente associadas à formação do pronúcleo paterno e a metilação do DNA genômico (Lepikhov e Walter, 2004; Liu et al., 2004; Park et al., 2007).

O processo de metilação no DNA consiste na adição covalente de um grupamento metil (-CH₃), um radical alcoila monovalente, na posição 5 do anel pirimídico da base citosina (5-metilcitosina ou 5mC) que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeos CpG), principalmente onde localizam-se regiões promotoras dos genes, mediado por enzimas metiltransferases de DNA (DNMTs) (Bird, 2002). Quando localizada em um local próximo ou em uma região promotora gênica, a metilação do DNA geralmente reprime a transcrição do gene (Gaspar et al., 2015). Dessa forma, a 5mC participa de mecanismos como a regulação da expressão gênica,

diferenciação gênica, regulação dos genes *imprinted*, silenciamento do DNA, desenvolvimento embrionário normal e carcinogênese (Jones, 2012).

A desmetilação ativa no DNA do zigoto, através da oxidação das 5-metilcitosinas (5mC) em 5-hidroximetilcitosinas (5hmC) seguida por um mecanismo de reparo e excisão de bases do DNA (Iqbal et al., 2011), é realizada por meio da família de enzimas TET (TET1, TET2 e TET3), que removem ou oxidam a 5mC em 5hmC por meios passivos ou ativos, estabelecendo um estado permissivo para a subsequente expressão gênica. Tornou-se aparente que alterações em nível molecular, incluindo modificações do DNA e proteínas da cromatina, são os eventos primários que regulam as dinâmicas epigenéticas durante o desenvolvimento em mamíferos (Morgan et al., 2005; Reik, 2001). É possível que estímulos externos, como a tensão de oxigênio, e moduladores genéticos, como modificações de histonas, possam interagir de maneira reguladora no desenvolvimento e diferenciação celular (Dunwoodie, 2009; Ufer et al., 2010). A interação destas enzimas tem grande importância no desenvolvimento embrionário (Geiman e Robertson, 2002), entretanto ainda não estão completamente compreendidas as alterações no processo de reprogramação epigenética durante esta etapa *in vitro*.

Na importância da PIVE como biotecnologia reprodutiva, pouco se sabe sobre como diferentes concentrações de oxigênio afetam eventos regulatórios, como os processos epigenéticos. A diferenciação celular pode ser regulada por mecanismos genéticos intracelulares e pelo microambiente extracelular (Ufer et al., 2010). É possível que estímulos externos, como a tensão de oxigênio, e moduladores genéticos, como modificações de histonas, possam interagir de maneira reguladora para impulsionar o desenvolvimento. Bomfim e colaboradores, (2017) estudaram como os embriões bovinos responderiam a alta (20% O₂) ou baixa (5% O₂) tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro*, avaliando alterações de transcritos epigenéticos em blastocistos. Em alta tensão, os embriões possuíam expressão alterada dos transcritos associados à epigenética e aumento na metilação global do DNA, sugerindo que, a hipermetilação do DNA é mediada por uma desregulação das enzimas relacionadas à epigenética devido ao estresse oxidativo. Gaspar et al., 2015 avaliaram tensões de oxigênio (5% e 20%) durante o cultivo embrionário *in vitro*, no remodelamento epigenético de H3K9me2 (repressivo) e H3K4me2 (permissivo) em

modelo bovino. Como resultado obteve efeito significativo para ambas as marcas de histonas, sendo as marcas repressivas e permissivas mais altas nos embriões cultivados na alta tensão de oxigênio. Harvey et al., (2004) cultivaram embriões bovinos sob diferentes tensões de oxigênio (2%, 7%, 20%) e observaram efeito sobre a expressão de genes regulados pelo oxigênio, desenvolvimento e localização da proteína HIF α ; os resultados sugeriram que o oxigênio pode influenciar na expressão gênica do embrião bovino durante o desenvolvimento pós-compactação e que esses efeitos podem ser mediados por HIF.

Novos conceitos exploram correlação significativa entre estresse oxidativo, metilação e desregulação epigenética. O estresse oxidativo que perturba os processos de metilação pode certamente afetar a manutenção do primeiro *imprinting* (preservação das marcas de metila nas seqüências de DNA correspondentes), e então sua reconfiguração no embrião (reaquisição das tags de metil) (Hoffman, 2005; Menezes et al., 2016). Segundo Bontekoe et al., (2012), baixas concentrações de oxigênio recapitulam o ambiente *in vivo* de embriões humanos, e ao mesmo tempo, altos níveis de O₂ podem causar estresse oxidativo via EROs. Assim, existe a necessidade de se esclarecer os efeitos das diferentes concentrações de oxigênio nas etapas iniciais da PIVE bovina, pois o papel do estresse oxidativo na causa dos efeitos epigenéticos é de grande preocupação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel da atmosfera gasosa nos passos iniciais da produção *in vitro* de embriões bovinos e os possíveis efeitos do estresse oxidativo sob a expressão de 17 RNAm relacionados ao metabolismo oxidativo e modeladores epigenéticos por RT-qPCR.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a mudança na atmosfera gasosa durante a MIV é capaz de aumentar os níveis de GSH e EROs no oócito bovino;
- Investigar se as diferentes concentrações de oxigênio durante a MIV podem reduzir as proporções de oócitos que atingem a Metáfase II;
- Analisar através de qPCR a abundância de transcritos dos genes envolvidos no estresse oxidativo e reguladores epigenéticos de complexos cumulus-oócitos (COC) que se mantiveram em 5 ou 20% de oxigênio;
- Avaliar se diferentes tensões de O₂ durante a FIV podem influenciar a taxa de polispermia de zigotos;
- Avaliar as taxas de desenvolvimento dos embriões submetidos a diferentes tensões de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro*.
- Determinar se diferentes tensões de oxigênio na MIV e na FIV são capazes de regular os níveis de GSH e EROs nos embriões bovinos produzidos *in vitro*;
- Verificar se mudanças na atmosfera gasosa durante a MIV e a FIV podem influenciar os níveis globais de metilação do DNA e de histonas nos blastocistos bovinos;
- Investigar através de qPCR a abundância de transcritos dos genes envolvidos no estresse oxidativo e reguladores epigenéticos em embriões bovinos submetidos à alta e baixa tensão de O₂;

4. HIPÓTESES

- Diferentes tensões de oxigênio no início da PIVE são capazes de gerar uma condição de estresse oxidativo e modificar os níveis de GSH e EROs celular em oócitos e embriões bovinos.
- Diferentes concentrações de oxigênio durante a maturação e fecundação alteram a transcrição de genes envolvidos no estresse oxidativo e reguladores epigenéticos em oócitos, células do cumulus e embriões bovinos.
- A variação na tensão de oxigênio no início do desenvolvimento *in vitro* é capaz de modular os fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIF), desencadeando ativação de reguladores epigenéticos como as KDMs e as TETs.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento I: Efeito da tensão de oxigênio na maturação *in vitro*

No experimento I os COCs foram selecionados e divididos aleatoriamente em dois grupos para maturar sob uma atmosfera de 20% de O₂ em ar (grupo M20) ou 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ (grupo M5). Depois de aproximadamente 22 horas de maturação, os oócitos foram coletados para avaliação da metáfase II (Hoescht 33342), análise de expressão gênica e quantificação da concentração intracelular de EROs e GSH. Na avaliação da metáfase II, foram colhidos pools de 112 e 110 oócitos maturados em alta e baixa tensão de oxigênio, respectivamente, de sete rotinas experimentais diferentes. Para a análise de expressão gênica, pools de 10 COCs maturados em alta e baixa tensão de oxigênio, respectivamente, de cinco rotinas experimentais. Pools de 116 e 120 oócitos maturados em alta e baixa tensão de oxigênio, respectivamente, de quatro rotinas experimentais diferentes foram colhidos para quantificação da concentração intracelular de EROs (sonda CellRox Green) e GSH (sonda CellTracker Blue) (Figura 1).

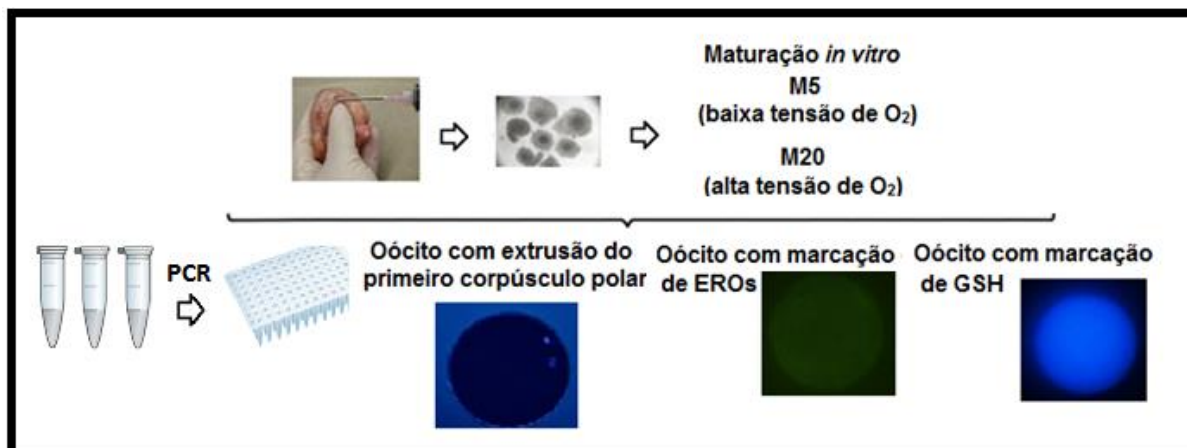


Figura 1. Delineamento do experimento I. Os oócitos foram maturados em diferentes tensões de O₂ (baixa 5% O₂ e alta 20% O₂), posteriormente a maturação foram realizadas coletas de oócitos para cada técnica, com no mínimo 4 repetições biológicas.

5.2 Experimento II: Efeito da tensão de oxigênio na fecundação *in vitro*

Neste experimento foram desenvolvidos dois grupos adicionais para cada grupo de oócito maturado em alta e baixa tensão de O₂. Foi também realizada a FIV em alta e baixa tensão, em arranjo fatorial 2x2. Na etapa de fecundação *in vitro*, os oócitos maturados se mantiveram por aproximadamente 20 horas sob atmosfera de 20% de O₂ em ar (grupo F20) ou 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ (grupo F5). Foram realizadas 6 coletas de 15 zigotos por grupo/repetição depois de 13 horas da fecundação, para análise da taxa de fecundação (Hoescht 33342) (Figura 2).

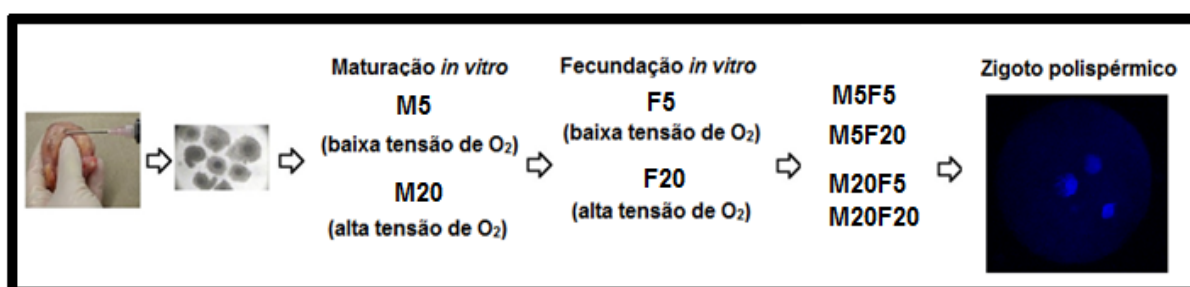


Figura 2. Delineamento do experimento II. Os oócitos foram maturados em diferentes tensões de O₂ (baixa 5% O₂ e alta 20% O₂), posteriormente a maturação foi realizada FIV em baixa (F5) e alta tensão de O₂ (F20). Foram realizadas coletas de zigotos para avaliação da taxa de fecundação, com no mínimo 6 repetições biológicas.

5.3 Experimento III: Efeito da tensão de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro* e sua influência no desenvolvimento embrionário

No experimento III, os oócitos foram cultivados por aproximadamente 22 horas em alta (M20) e baixa (M5) tensão de O₂, posteriormente foram desenvolvidos dois grupos adicionais para a FIV em alta (M5F20, M20F20) e baixa tensão (M5F5, M20F5) por 20 horas, e no cultivo os embriões foram mantidos em baixa tensão de oxigênio (C5) por 7 dias. As taxas de desenvolvimento foram avaliadas 7 dias após a fecundação *in vitro*, em quatorze rotinas experimentais diferentes. Sendo que para cada grupo foram distribuídos aleatoriamente os oócitos (M5F5 n=757, M5F20 n=755, M20F5 n=699, M20F20 n=710) (Figura 3).

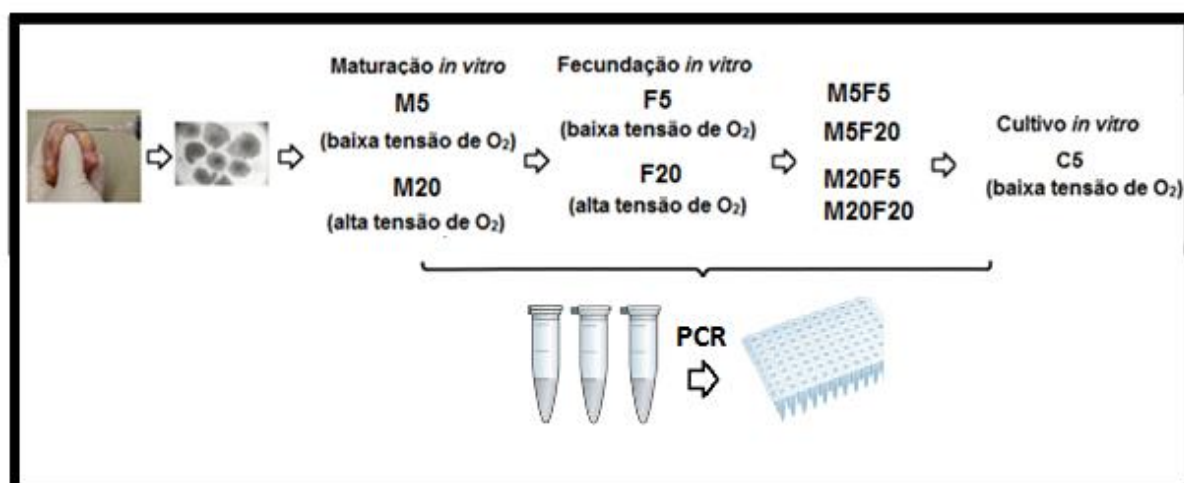


Figura 3. Delineamento do experimento III. Os oócitos foram maturados em diferentes tensões de O₂ (baixa 5% O₂ e alta 20% O₂), posteriormente a maturação foi realizada FIV em baixa (F5) e alta tensão de O₂ (F20) e no cultivo os embriões foram mantidos em baixo O₂. Foram analisadas as taxas de desenvolvimento dos blastocistos, com no mínimo 14 repetições biológicas.

5.4 Experimento IV: Efeito da tensão de oxigênio no nível intracelular de GSH e EROs em blastocistos

No experimento IV os COCs foram divididos aleatoriamente em dois grupos para maturar por aproximadamente 22 horas sob atmosfera de 20% de O₂ em ar ou

5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Na FIV foram desenvolvidos dois grupos adicionais em alta e baixa tensão de O₂ por 20 horas, e no cultivo os embriões foram mantidos em baixa tensão por 7 dias. No dia 7 do desenvolvimento, foram realizadas coletas de 10 blastocistos para as técnicas, de 7 rotinas experimentais para análise da quantificação do nível intracelular de EROs (sonda CellRox Green) e 4 rotinas experimentais para GSH (sonda CellTracker Blue) (Figura 4).

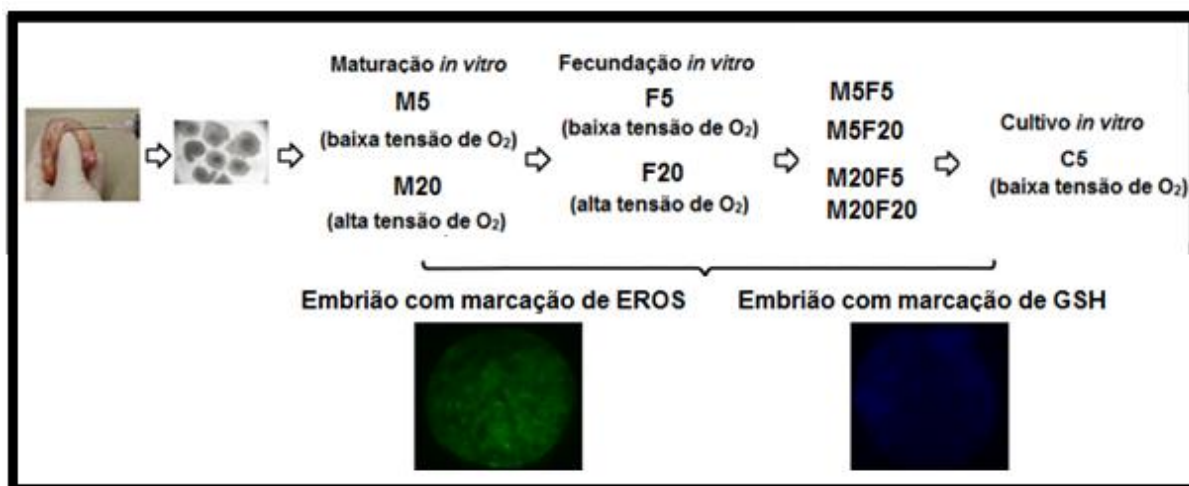


Figura 4. Delineamento do experimento IV. Os oócitos foram maturados em diferentes tensões de O₂ (baixa 5% O₂ e alta 20% O₂), posteriormente a maturação foi realizada FIV em baixa (F5) e alta tensão de O₂ (F20) e no cultivo os embriões foram mantidos em baixo O₂. Foram realizadas coletas dos blastocistos no dia 7 do desenvolvimento para cada técnica, com no mínimo 4 repetições biológicas.

5.5 Experimento V: Efeito da tensão de oxigênio nos níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas em blastocistos

No experimento V, os oócitos foram cultivados por aproximadamente 22 horas em alta (M20) e baixa (M5) tensão de O₂, posteriormente foram desenvolvidos quatro grupos adicionais para a FIV em alta (M5F20, M20F20) e baixa tensão (M5F5, M20F5) por 20 horas, e no cultivo os embriões foram mantidos em baixa tensão de oxigênio (C5) por 7 dias. No dia 7 do desenvolvimento, pools de 10 blastocistos de 6 rotinas experimentais diferentes foram colhidos e fixados para análise de imunofluorescência das marcas epigenéticas 5mC, 5hmC, H3K9me2 e H3K9me3 (Figura 5).

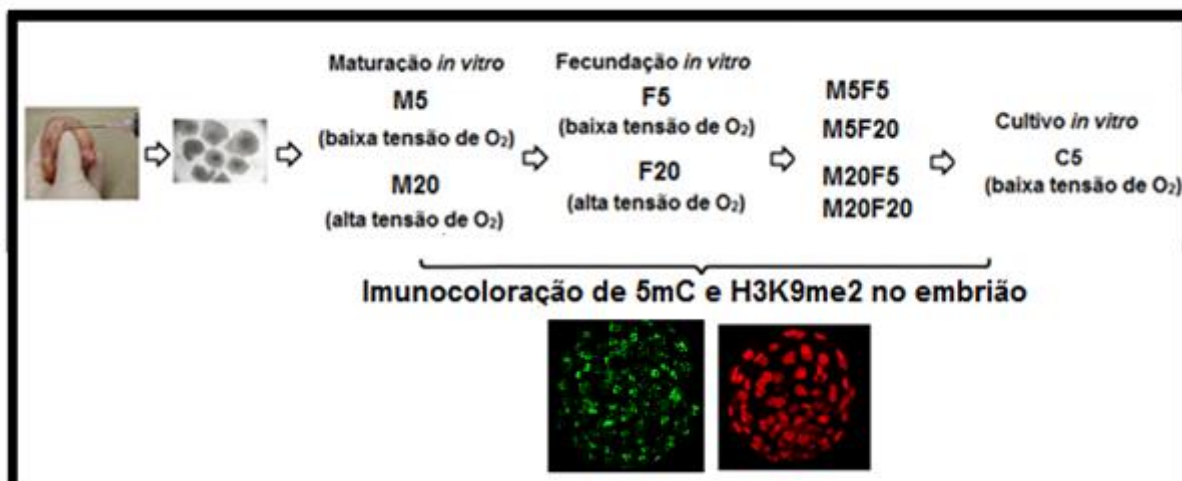


Figura 5. Delineamento do experimento V. Os oócitos foram maturados em diferentes tensões de O₂ (baixa 5% O₂ e alta 20% O₂), posteriormente a maturação foi realizada FIV em baixa (F5) e alta tensão de O₂ (F20) e no cultivo os embriões foram mantidos em baixo O₂. Foram realizadas coletas dos blastocistos no dia 7 do desenvolvimento para cada técnica, com no mínimo 6 repetições biológicas.

5.6 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Os procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* dos oócitos/embriões bovinos foram baseados no trabalho de Bomfim et al., (2017) com poucas modificações. Os ovários foram obtidos nos frigoríficos localizados no município de Sertãozinho (Barra Mansa), Ipuã (Olhos D'Água) e São João da Boa Vista (Vale do Prata), sendo acondicionados em garrafas térmicas e imediatamente transportados ao laboratório a temperatura entre 33 e 36°C. O líquido folicular aspirado foi condicionado em tubos de 50 mL, mantidos em repouso para sedimentação dos oócitos e posteriormente visualizado por meio de estereomicroscópio para seleção dos COCs. Após a seleção e classificação dos COCs em grau I, II ou III, um total de 20-25 oócitos foram condicionados em gotas de 100 µL de meio de maturação (meio de cultivo de tecidos B199 (GIBCO BRL) com sais de Earle, suplementado com 10% de SFB, piruvato sódico (22 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), LH (50µg/mL)) cobertas com óleo mineral estéril (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA). Posteriormente os oócitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos que foram

maturados sob atmosfera de 20% de O₂ em ar (grupo M20) ou 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ (grupo M5), temperatura de 38,5°C, por aproximadamente 22 h, finalizando o processo de maturação oocitária. Depois de maturados, 10 COCs (por grupo e por repetição) foram desnudados por sucessivas pipetagens e posteriormente, oócitos e células do cumulus foram congelados separadamente e armazenados a -80°C para posterior análise molecular. Pools de 10 oócitos dos grupos M5 e M20 foram corados com a sonda CellROX Green e CellTracker Blue para quantificação dos níveis intracelulares de EROs e GSH, respectivamente.

Os oócitos maturados foram submetidos à fecundação *in vitro* com sêmen congelado de um único touro Nelore (CRV Lagoa, Sertãozinho, SP, Brasil). Espermatozóides capacitados foram obtidos após a separação por gradiente de Percoll (45% e 90%). O meio de fertilização foi composto por Tyrode's-lactate stock, 50 µg / ml de gentamicina, 22 µg / ml de piruvato de sódio, 40 µl / ml de PHE (2mM D-penicilamina, 1mM de hipotaurina e 245 µM de epinefrina), 5 U/mL de heparina e 6 mg/mL BSA. Cada grupo de maturação foi subdividido em dois grupos para FIV sob 5% CO₂ em ar (grupo F20) ou 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ (grupo F5) com umidade máxima, por 20 horas a 38,5°C, resultando em quatro grupos (M20F20, M20F5, M5F20 M5F5). Os presumíveis zigotos foram lavados e transferidos para as placas com meio de cultivo (meio SOFaaci suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato sódico, 5 mg/mL de BSA, e 2,5% SFB) sob óleo mineral. Todo o desenvolvimento dos grupos foi realizado em incubadora com baixa tensão de O₂ (5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂), a 38,5°C, permanecendo nesta por 7 dias até os embriões atingirem o estágio de blastocisto. Neste período de cultivo, 96 horas após a fecundação (D4), foi feita uma pipetagem dos embriões e analisada a taxa de clivagem visualmente, com o auxílio de um estereomicroscópio, no momento do *feeding*. A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada 7 dias após a fecundação, junto a coleta do dia 7 do cultivo. Foram coletados blastocistos para quantificação de EROs, GSH e marcas epigenéticas.

5.7 Avaliação da Metáfase II

Para se obter a taxa de maturação (oócitos maduros/ total de oócitos avaliados) uma amostra dos oócitos (15 por repetição) foi transferida para placas com gotas de 100µL de PBS. Estes foram agitados com uso de uma micropipeta até ficarem desnudos, e então, foram fixados por 15 min em paraformaldeído a 4% e lavados em PBS. Posteriormente foram lavados em solução de 1mg/mL de PVA em PBS e armazenados a 4°C. 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 (Patrizio et al., 2007): (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.

5.8 Quantificação dos níveis intracelulares de EROs e GSH

Para quantificar a formação de EROs e glutathiona reduzida (GSH) nos oócitos e embriões *in vitro*, pools de 10 oócitos maturados em alta e baixa tensão de oxigênio e grupos de 10 blastocistos foram comparados para a coloração com a sonda CellRox Green e CellTracker Blue. A análise foi realizada mediante as técnicas fluorimétricas em microscopia de epifluorescência utilizando 5µM da sonda CellROX Green (Molecular Probes) e 10 µM de Celltracker Blue (Molecular Probes), por 30 min a 37°C. Logo após, foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 min. Os oócitos foram lavados em PBS e condicionados em lâminas para as análises de epifluorescência. As amostras foram analisadas na objetiva 40X e comprimento de onda de 488 nm. As imagens foram analisadas a partir da quantificação da intensidade de fluorescência dos oócitos, em escala de cinza, utilizando o programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), onde o software atribui valores de intensidade entre 0 e 255 para cada píxel.

5.9 Avaliação da Taxa de Fecundação

Os procedimentos de coleta para avaliação de polispermia foram baseados no trabalho de Alves et al., (2019) com poucas modificações. Para se obter a taxa de fecundação (fecundação total, fecundação normal e polispermia), uma amostra dos zigotos (15 por repetição) foram transferidos para placas com gotas de 100 μ L de PBS. Estes foram fixados por 15 min em paraformoldeído a 4%. Posteriormente foram lavados em solução de 1mg/mL de PVA em PBS e armazenados a 4°C. Os 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.

5.10 Análise da Expressão Gênica

O procedimento de análise da expressão gênica foi realizado conforme descrito por Sampaio em 2015, com algumas adaptações para o modelo de embriões bovinos. Pools de 10 oócitos e células do cumulus de 5 repetições biológicas diferentes foram coletados para análise dos padrões de expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo e remodelamento epigenético no dia 7 do desenvolvimento embrionário. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, foi adicionado em cada tubo 1000 μ L de Trizol. O RNA extraído foi eluído em 10 μ L de solução de DNase I (Invitrogen) mais 1 unidade/ μ L de RNase OUT para a degradação de DNA contaminante, como sugerido pelo fabricante. Foi realizada a quantificação individual de cada amostra no Espectrofotômetro NanoDrop para determinar a concentração de RNA. Após isto, o RNA foi imediatamente convertido em cDNA com o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Tech cat # 4387406) de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenado a -20°C até o uso. Os genes alvos de interesse foram genes envolvidos no estresse oxidativo e remodelamento epigenético (Tabela 1). A quantificação relativa dos transcritos de mRNA foi realizada em reações de 15- μ L contendo 0.2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores (descritos anteriormente) mais 1 x

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2 μ L de um cDNA diluído 8 vezes em água ultra-pura. Todas as amostras foram analisadas, para determinado gene, em triplicata na mesma placa de PCR. As seguintes condições de ciclagem foram aplicadas para amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos consistindo de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. A fluorescência do SYBR Green foi lida no final de cada passo de extensão (60°C). Experimentos pilotos usando 5 diferentes concentrações de cDNA (estendendo-se de 4 vezes até 64 vezes diluído) foram corridas para ajustar as condições dos experimentos. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela análise da curva de *melting*. A quantidade dos transcritos alvos foi determinada usando a seguinte fórmula: $E(\text{target}) - \Delta C_t(\text{target}) / E(\text{ref}) - \Delta C_t(\text{ref})$, na qual o E corresponde a eficiência de amplificação e ΔC_t a diferença do ciclo de threshold (C_t) entre as amostras controle e tratadas. Valores de C_t foram obtidos após retirar-se a média das triplicatas das amostras, enquanto E refere-se à eficiência média estimada para cada par de primers (os quais variaram de 90% a 100%) usando o software LinRegPCR (Sampaio, 2016).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na técnica de PCR em tempo Real (q-PCR).

Sigla do Gene	Nome do Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados (5'-3')	Fonte
<i>TET1</i>	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1	F: TGCCTACTTGCAACTGTCTTGATC	Sampaio, 2016
		R: TCTATCCTTATGCATTTCTTTTGG	
<i>TET2</i>	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2	F: GGATACACCTCAAGACTCAGTATGA	Sampaio, 2016
		R: GGACCTGCTCCTAGATGGGTATAA	
<i>TET3</i>	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3	F: TGCGGCCTCAACGATGA	Sampaio, 2016
		R: GGCAACCGAAGGAGAAGGA	
<i>EHMT2</i>	Euchromatic Histone Methyltransferase 2	F: GCCAAGAAGAAATGGCGGAA	Sampaio, 2016
		R: GTCATTGGACACCCTCGT	
<i>KDM3A</i>	Lysine (K) - Specific Demethylase 3A	F: AGTGGCCTGCAATAATGTACAAA	Sampaio, 2016
		R: GAAAGACGAAGATTGTTTACATCC	
<i>KDM5A</i>	Lysine (K) - Specific Demethylase 5A	F: TGCTTCTGTAGCCTTGACCG	Sampaio, 2016
		R: GGTCAGGCAGAAATCGCAGA	
<i>KDM6A</i>	Lysine (K) - Specific Demethylase 6A	F: CCCAAGCAGTTCTCAAGGGT	Sampaio, 2016
		R: GCTTCCTGGGTGATCTTGCA	
<i>SUV39H1</i>	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1	F: AGATCTATGACCGCCAGGGT	Sampaio, 2016
		R: GGAGGTTGGGGTCACAACCTG	
<i>ACTB</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	F: GGTCTGGCATCTTGCCAT	Sampaio, 2016
		R: TGCCATCCAACCACTCAGTCT	
<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15	F: CAAACGCCAGTTCCTAAGG	Sampaio, 2016
		R: TCGAGCAAACCTGAGCTGGTT	
<i>HIF1α</i>	Hypoxia Inducible Factor 1α	F: TGAAGGCACAGATGAATTGCTT	Harvey, 2004
		R: ACTTCCTGAGTTAATCCCATGAA	
<i>HIF2α</i>	Hypoxia Inducible Factor 2α	F: GCACCATGTCAAACATCTTCCA	Harvey, 2004
		R: TCAAAGAAGGCGAAGGACACA	
<i>HIF1β (ARNT)</i>	Hypoxia Inducible Factor 1 β	F: CGAGAATGGCTCTGGGTGAG	Harvey, 2004
		R: CAGTGAAGGTCGTGGTTCCTG	
<i>KEAP1</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1	F: TCACCAGGGAAGGATCTACG	Amin, 2014
		R: AGCGGCTCAACAGGTACAGT	
<i>SOD1</i>	Superoxide Dismutase 1	F: AGAGGCATGTTGGAGACAT	Amin, 2014
		R: CAGCGTTGCCAGTCTTTGTA	
<i>NRF2</i>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	F: AGCTGCCAAGATGGTGAAC	Amin, 2014
		R: ACTCTGCAGCAACATCCTGA	
<i>CAT</i>	Catalase	F: TGGGACCCAACTATCTCCAG	Amin, 2014
		R: AAGTGGGTCCTGTGTTCCAG	
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase-2	F: AGAGGCAATGTTGGAGACCTG	Amin, 2014
		R: TCTCGTTGCCAGTCTTTGTA	

5.11 Imunofluorescência para detecção das marcas epigenéticas 5mC, 5hmC, H3K9me2 e H3K9me3

Foi feita a imunomarcagem em embriões produzidos em baixa e alta tensão de oxigênio para avaliação da intensidade de fluorescência da metilação do DNA (5mC e 5hmC) e marcas de histonas específicas (H3K9me2 e H3K9me3). Os blastocistos foram previamente fixados em 4% de paraformaldeído por 15 min, depois estes foram agrupados em *pools* de 10 embriões, de 6 rotinas diferentes por grupo. Os embriões foram permeabilizados com solução de PBS acrescido de 0,5% de Triton por 10 min, seguidos por lavagem em PBS, desnaturação do DNA com 4 N de HCl por 12 min, neutralização com 100 mM de solução Tris HCl por 20 min e bloqueio com solução de PBS, 1% de BSA e 0,3 M de glicina por 1 hora. Os blastocistos foram incubados com os anticorpos primários para anti-H3K9me2, anti-H3K9me3, anti-5mC e anti-5hmC (Abcam), foi utilizada diluição de 1: 200, *overnight* a 4°C. Após 2h lavando em 0,1% de Triton X-100, os embriões foram incubados com anticorpos secundários Goat anti-MOUSE IgG - AlexaFluor 488 (#11008, Invitrogen - Foster City, CA, EUA) e Goat anti-rabbit IgG - Texas Red (#111075144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluídos na concentração de 1:400 em PBS por 1h a temperatura ambiente. Para cada grupo foi separado um blastocisto controle, que não foi submetido à incubação com o anticorpo primário. Os blastocistos foram lavados e colocados em lâminas. Para a análise os embriões foram montados em lâminas com 12µL de solução anti-fade (ProLong Antifade Gold reagent with DAPI; Invitrogen) e cobertos com lamínulas. Por fim, as amostras foram analisadas por microscopia confocal, em equipamento SP5 da LEICA (Leica Microsystems, Wetzlar, WZ, Alemanha), por meio de objetiva 40X em imersão a óleo. As amostras tiveram emissão de 590 a 630 nm, sendo 5 cortes por embrião. As imagens foram analisadas para quantificação das marcas epigenéticas por meio da intensidade de fluorescência (f.i.) utilizando o programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), onde o software atribui valores de intensidade entre 0 e 255 para cada píxel.

5.12 Análise dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas com o software R[®] 3.0.3. Para os dados relativos à PIVE foi adotado o seguinte procedimento. Após a confirmação da homogeneidade dos dados pelo teste de Levene e normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilks foi feita a análise de variância (ANOVA) dos dados quantitativos para avaliar as respostas das rotinas de produção de embriões e foram consideradas como blocos. A comparação de médias dos pares foi feita usando o teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$. Se necessário as variáveis foram transformadas de acordo com o método de BOX-COX. Mesmo que utilizando tal transformação se os dados não apresentassem distribuição normal, tais dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de diferenças mínimas de Fisher e ajuste do valor de p (p -adj) por Benjamini-Hochberg, com valor de p -adj $< 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento I: Efeito da tensão de oxigênio na maturação *in vitro*

6.1.1 Avaliação da Metáfase II

No experimento I foi determinada a taxa de maturação nuclear em oócitos maturados em alta e baixa tensão de oxigênio. A taxa de maturação não diferiu entre oócitos maturados em alto (M20) (84.09 ± 2.93) e baixo O_2 (M5) (75.08 ± 5.32) ($p=0.1639$).

6.1.2 Níveis intracelulares de EROs e GSH em oócitos

No experimento I foi determinada a intensidade de fluorescência intracelular de EROs e GSH em oócitos maturados em alta e baixa tensão de oxigênio. Os níveis de EROs diferiram entre oócitos maturados em alta (M20) (21.67 ± 1.70) e baixa (M5) (17.30 ± 0.84) tensão de O_2 ($p=0.0124$) (Figura 6). Oócitos maturados em

alta tensão de O₂ (M20) (90.60 ± 4.43) apresentaram níveis superiores de GSH em relação ao grupo de baixa tensão (M5) (68.79 ± 4.41) ($p < 0.01$).

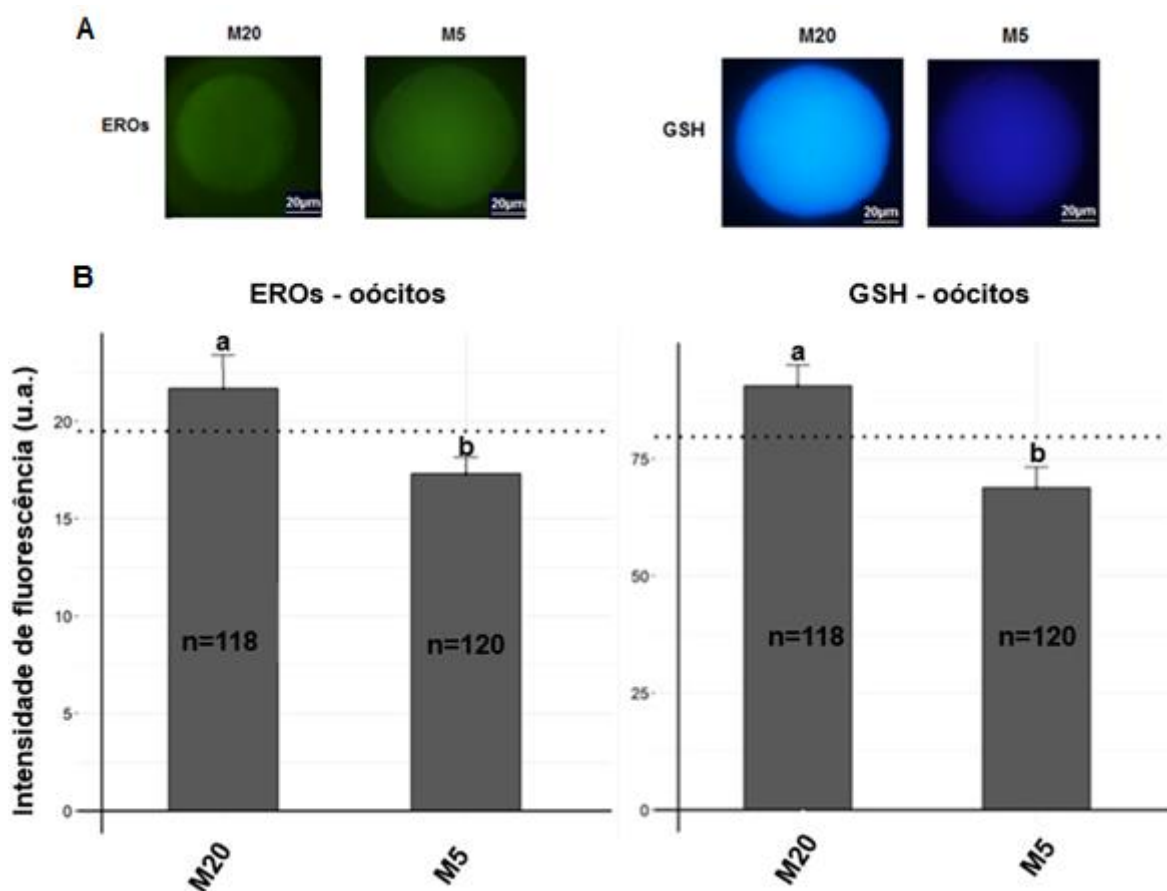


Figura 6. Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados em alta (M20) e baixa (M5) tensão de oxigênio. (A). Fotomicrografias de epifluorescência de oócitos para detecção de EROs. (B). Para a quantificação de EROs dos oócitos, foi mensurada a intensidade de fluorescência do corante CellROX Green no microscópio de epifluorescência Zeiss por meio de objetiva 40X. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) nas barras indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

6.1.3 Níveis de expressão de mRNA em oócitos e células do cumulus

Os resultados da análise do perfil de 17 mRNA de 5 repetições biológicas demonstraram que os padrões de expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo (SOD1, SOD2, CAT, KEAP1, NRF2) e remodelamento epigenético (EHMT2,

SUV39H1, TET1, TET2, TET3, HIF1a, HIF1b, HIF2a, KDM3A, KDM4E, KDM5A, KDM6A) em oócitos, não se modificaram após diferentes tensões de oxigênio na etapa de maturação *in vitro* (Figura 7).

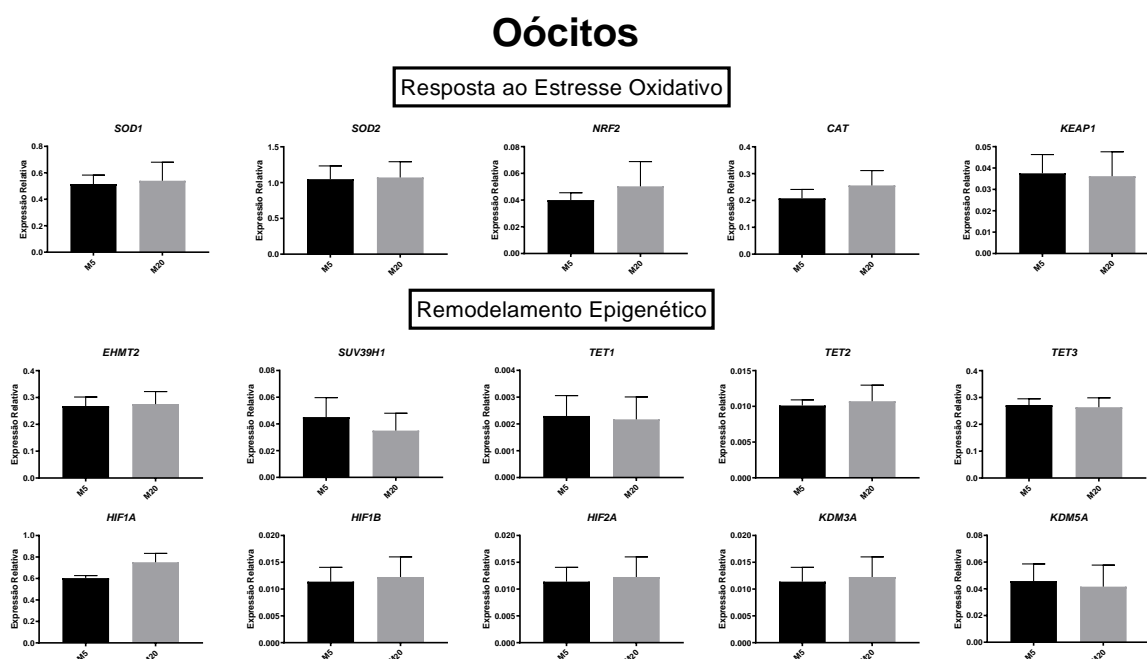


Figura 7. Expressão relativa dos genes alvo relacionados a resposta ao estresse oxidativo e remodelamento epigenético diferentemente expressos entre maturação e fecundação em alta ou baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença ($p < 0,05$).

As células do cumulus submetidas a alta e baixa tensão de oxigênio na maturação *in vitro* dos oócitos apresentaram níveis de transcritos maiores para o gene SOD1, relacionado a via de resposta ao estresse oxidativo celular, sendo mais expresso em alta tensão de oxigênio, em relação a baixa tensão (Figura 8 e 9).

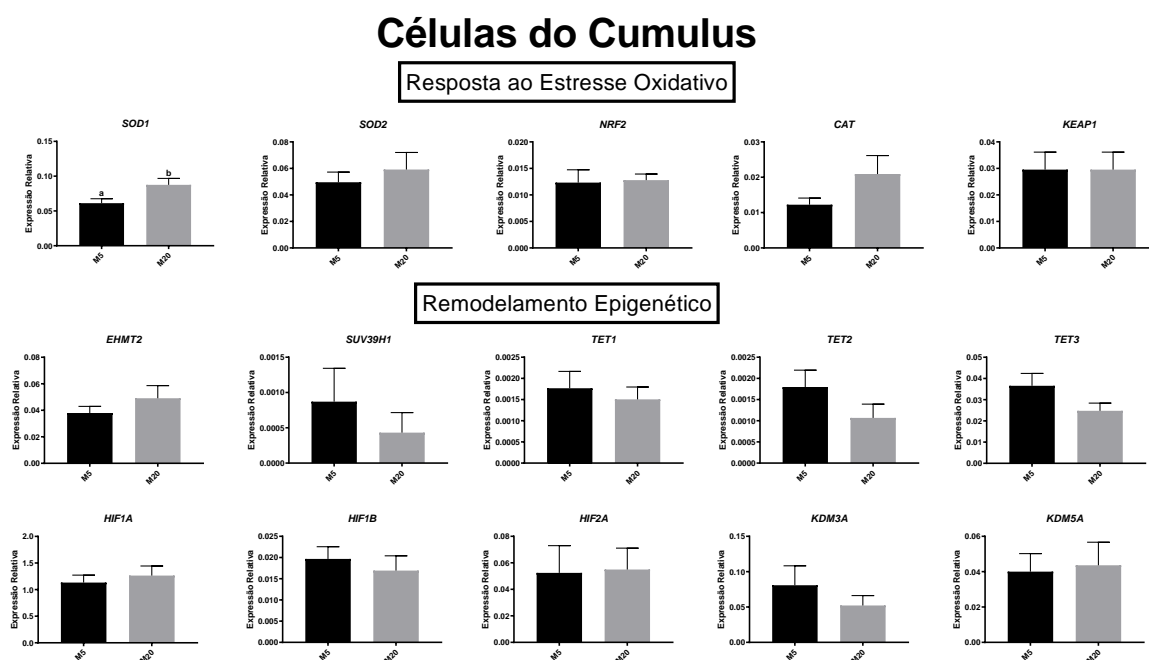


Figura 8. Expressão relativa dos genes alvo relacionados a resposta ao estresse oxidativo e remodelamento epigenético diferentemente expressos entre maturação e fecundação em alta ou baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença ($p < 0,05$).

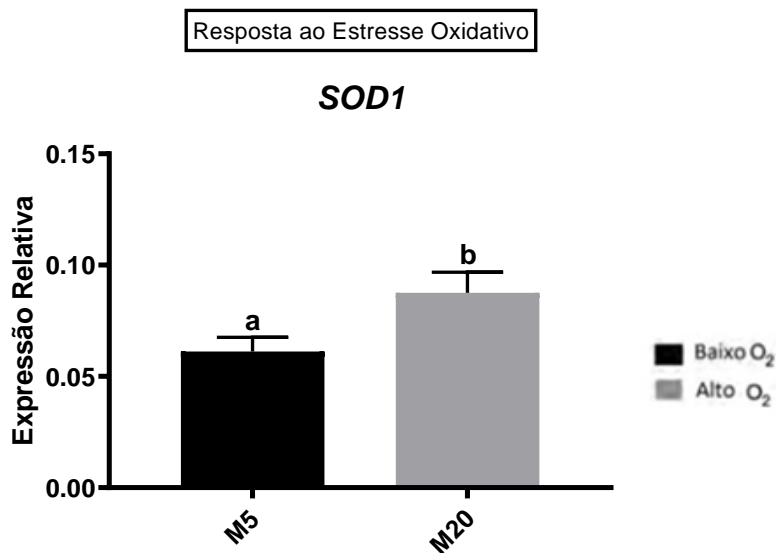


Figura 9. Expressão relativa do gene alvo relacionado a resposta ao estresse oxidativo diferentemente expresso entre maturação em alta ou baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) acima das barras indicam diferença ($p < 0,05$).

6.2 Experimento II: Efeito da tensão de oxigênio na fecundação *in vitro*

Os presumíveis zigotos foram classificados em não fecundados, polispérmicos e fecundação normal (Figura 10). Na Tabela 2 observa-se que não houve diferença na porcentagem de fecundação total ($p=0.9207$), normal ($p=0.9880$) e polispermia ($p=0.8585$) entre os grupos maturados e fecundados em baixa ou alta tensão de oxigênio (M5F5, M5F20, M20F5 e M20F20). Os efeitos das diferentes concentrações de oxigênio na MIV e FIV sob a taxa de fecundação total (MIV ($p=0.2718$) e FIV ($p=0.7633$)), normal (MIV ($p=0.5375$) e FIV ($p=0.6970$)) e polispermia (MIV ($p=0.3389$) e FIV ($p=0.2825$)) não diferiram.

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de oxigênio durante a FIV na taxa de fecundação *in vitro*.

Grupos	Taxa de fecundação		
	% fecundação total	% fecundação normal	% polispermia
M5F5	53.51 ± 9.54	22.97 ± 10.06	23.50 ± 7.15
M5F20	57.59 ± 9.17	25.94 ± 8.77	16.45 ± 4.93
M20F5	49.23 ± 8.30	33.62 ± 11.80	17.14 ± 4.78
M20F20	51.61 ± 4.60	36.32 ± 4.95	12.06 ± 4.83

Maturação *in vitro* e FIV sob atmosfera de 5 ou 20% de oxigênio. Dados apresentados como média ± erro padrão, ($P>0.05$).

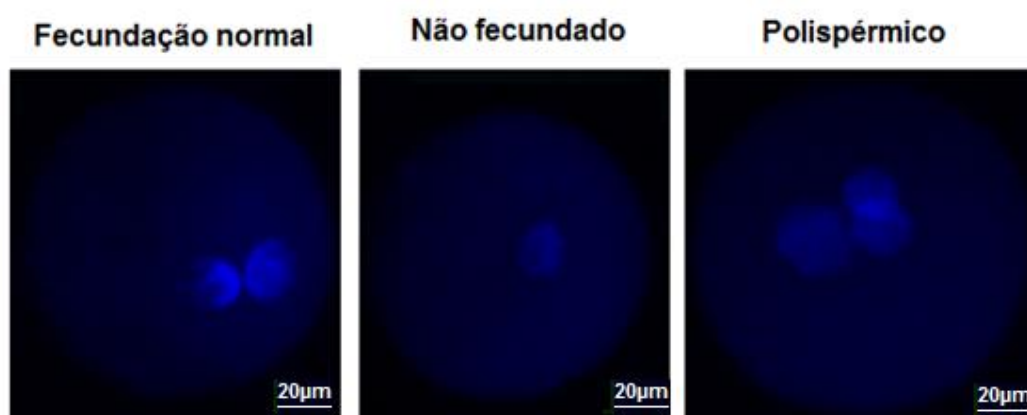


Figura 10. Fotomicrografia de fluorescência de zigotos produzidos em alta e baixa tensão de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro*, corados com Hoescht 33342.

6.3 Experimento III: Efeito da tensão de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro* e sua influência no desenvolvimento embrionário

No experimento III foi avaliado o efeito da tensão de oxigênio na atmosfera gasosa durante a maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) sob a eficiência da PIV de embriões bovinos. Na Tabela 3 observa-se que não houve interação para taxa de clivagem ($p=0.1395$), de modo que os efeitos principais de MIV ($p=0.0003$) e FIV ($p=0.0022$) diferiram. Já na produção embrionária, houve interação entre os fatores tensão de oxigênio na MIV e na FIV. O grupo M20F20 apresentou maior produção de blastocistos entre os grupos, diferindo destes ($p=0.0080$) (Tabela 3).

Tabela 3. Taxas de clivagem e blastocisto dos grupos experimentais após maturação e fecundação *in vitro* sob tensão de oxigênio atmosférica (20%) ou baixa tensão (5%) de O₂.

Tratamento	Oócitos (n)	Clivagem (%) D4	Blastocisto (%) D7
M5F5	757	62.35 ± 3.07	32.00 ± 3.27 ^b
M5F20	755	67.57 ± 4.34	31.88 ± 3.99 ^b
M20F5	699	69.34 ± 2.08	29.66 ± 2.81 ^c
M20F20	710	83.70 ± 1.94	50.63 ± 4.55 ^a
M5	1512	64.96 ± 2.65	21.94 ± 2.53
M20	1409	76.52 ± 1.96	40.14 ± 3.31
F5	1456	65.84 ± 1.94	30.83 ± 2.12
F20	1465	75.64 ± 2.80	41.25 ± 3.4
(p-valor)			
Interação MIV-FIV		0.4564	0.0080
Tensão de O2 MIV		0.0003	0.0374
Tensão de O2 FIV		0.0022	0.0121

Maturação *in vitro* e FIV sob atmosfera de 5 ou 20% de oxigênio. Valores com diferentes sobrescritos (a, b) dentro da mesma coluna diferem entre si (p<0.05). Dados apresentados como média ± erro padrão.

6.3.1 Níveis de expressão de RNAm em blastocistos

A expressão de 17 RNAm foi investigada por qPCR de 8 repetições biológicas. Observa-se que não houve interação (p>0.05), de modo que os efeitos principais de MIV (p<0.05) diferiram. Os resultados demonstraram que 5 transcritos foram diferencialmente expressos (p<0.05) entre os grupos de blastocistos maturados em alta ou baixa tensão de oxigênio. Entre os 17 RNAm, 5 foram mais expressos em baixa tensão de oxigênio. Os padrões de expressão dos transcritos diferentemente expressos nestes blastocistos foram de resposta ao estresse oxidativo NRF2 (p=0.01482), SOD1 (p=0.0410), SOD2 (p=0.01374) e remodelamento epigenético KDM5A (p=0.04879) e TET1 (p=0.02798).

6.4 Experimento IV: Efeito da tensão de oxigênio no nível intracelular de GSH e EROs em blastocistos

Os níveis intracelulares de glutathiona reduzida (GSH) foram mensurados em blastocistos maturados e fecundados em alta ou baixa tensão de oxigênio. Os grupos M20F20 e M5F5 apresentaram níveis superiores de GSH em relação aos grupos M20F5 e M5F20 ($p < 0.05$). Os efeitos das diferentes concentrações de oxigênio na MIV ($p = 0.0227$) diferiram, já na FIV não houve diferença ($p = 0.3801$) (Figura 11). Os níveis intracelulares de EROs foram avaliados em blastocistos maturados e fecundados em diferentes tensões de oxigênio (5% e 20%). O grupo de embriões M20F20 e M5F5 apresentaram níveis intracelulares de EROs menores que os grupos M20F5 e M5F20, diferindo dos mesmos ($p = 0.0016$).

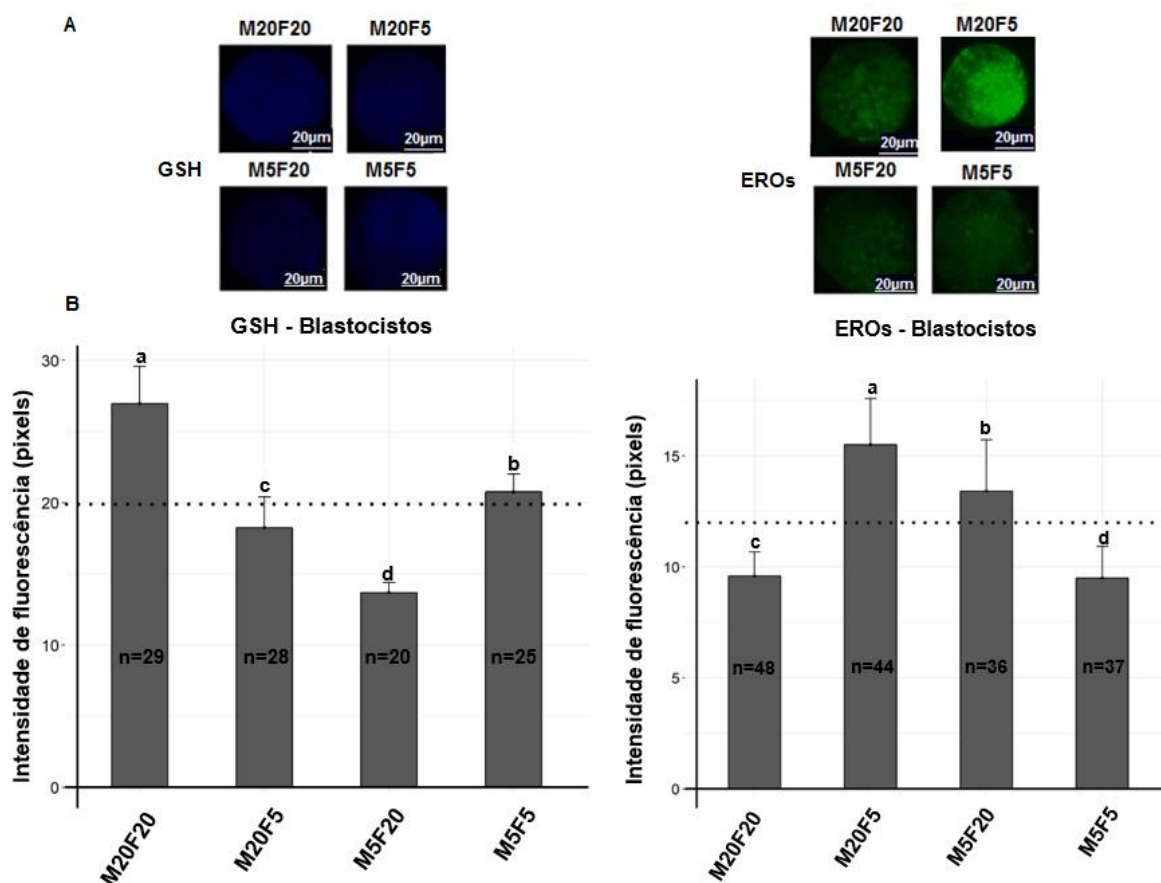


Figura 11. Níveis intracelulares de GSH e EROs em embriões maturados e fecundados em diferentes tensões de oxigênio (5% e 20%). (A) Fotomicrografias de epifluorescência de blastocistos corados com CellTracker Blue para marcação de GSH (azul) e CellROX Green para marcação de EROs (verde). Todas as imagens foram tiradas na objetiva de 40x, no mesmo tempo de exposição para comparação dos níveis de intensidade de fluorescência. (B) Quantificação dos níveis intracelulares de glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROs) em blastocistos maturados e fecundados em alta e baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b, c, d) nas barras indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

6.5 Experimento V: Efeito da tensão de oxigênio nos níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas em blastocistos

Foi realizado procedimento de imunofluorescência para detecção das marcas epigenéticas H3K9me2 e H3K9me3. Quando houve interação entre os fatores MIV e FIV, as médias de intensidade de fluorescência para as marcas H3K9me2 e H3K9me3

foram significativamente afetadas pela influência da tensão de O₂. Ambas se comportaram de maneira semelhante, foram encontradas concentrações maiores de H3K9me2 em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio (M5F5) e em embriões maturados e fecundados em alta tensão de O₂ (M20F20), em relação aos grupos M5F20 e M20F5 ($p < 0.05$). Da mesma forma, em níveis de H3K9me3 analisados, a média da intensidade de fluorescência foi semelhante à marcação H3K9me2 ($p < 0.05$) (Figura 12).

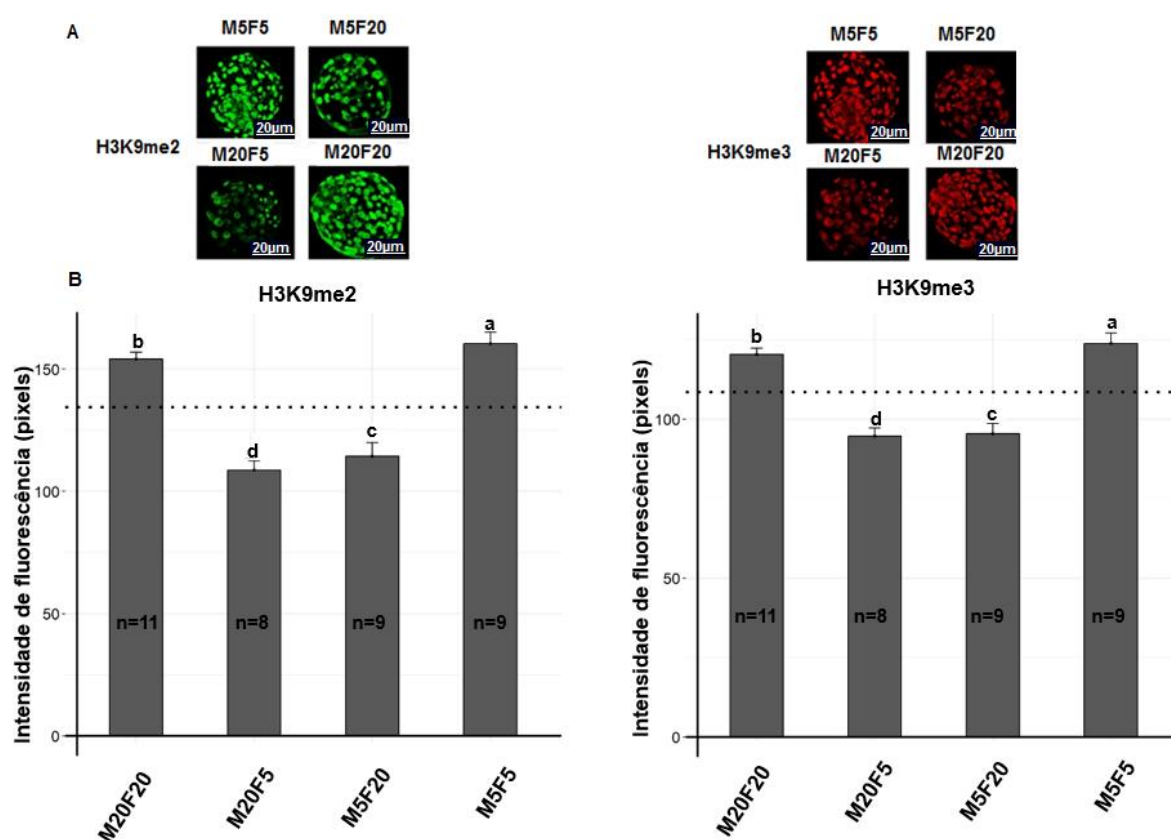


Figura 12. Níveis de H3K9me2 e H3K9me3 em embriões maturados e fecundados em diferentes tensões de oxigênio (5% e 20%). (A) Fotomicrografias de confocal de blastocistos corados com anticorpo anti-H3K9me2 (verde) e anti-H3K9me3 (vermelho). Todas as imagens foram tiradas na objetiva de 40x, no mesmo tempo de exposição para comparação dos níveis de intensidade de fluorescência. (B) Quantificação de H3K9me2 e H3K9me3 em embriões maturados e fecundados em alta e baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b, c, d) nas barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Analisando os efeitos da tensão de oxigênio na MIV e FIV, as médias das intensidades de fluorescência encontradas para a marcação da histona H3K9me2 dos grupos de embriões maturados em alta (M20) (137.52 ± 2.41) ou baixa (M5) (139.41 ± 3.77) tensão de O₂, não diferiram entre si ($p=0.6495$). Já blastocistos que foram fecundados em alta tensão de oxigênio (F20) (142.33 ± 2.67) diferiram nesta mesma marcação, de embriões fecundados em baixa tensão de O₂ (F5) (132.78 ± 3.22) ($p=0.0125$). Na análise da marcação de histona H3K9me3, os grupos de blastocistos maturados em alta (M20) (111.03 ± 1.59) ou baixa (M5) (110.87 ± 2.41) tensão de O₂, não diferiram entre si ($p=0.5217$). Blastocistos fecundados em alta tensão de oxigênio (F20) (113.04 ± 1.68) diferiram, nesta mesma marcação, dos fecundados em baixa tensão de O₂ (108.24 ± 2.18) ($p=0.0247$).

Foi realizado procedimento de imunofluorescência para detecção dos níveis globais de metilação e hidroximetilação do DNA. Na análise da interação entre os fatores, as médias de intensidade de fluorescência para as marcas epigenéticas 5mC e 5hmC se comportaram de maneira divergente. Foram encontradas concentrações maiores de 5mC em embriões maturados em baixa tensão de oxigênio e fecundados em alta tensão de oxigênio (M5F20) e em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de O₂ (M5F5), em relação aos grupos M20F5 e M20F20 ($p<0.05$). Diferentemente, nos níveis de 5hmC analisados, a média da intensidade de fluorescência foi superior em embriões maturados em alta tensão de oxigênio e fecundados em baixa tensão de oxigênio (M20F5) e em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de O₂ (M5F5) comparado aos grupos M5F20 e M20F20 ($p=0.03838$) (Figura 13).

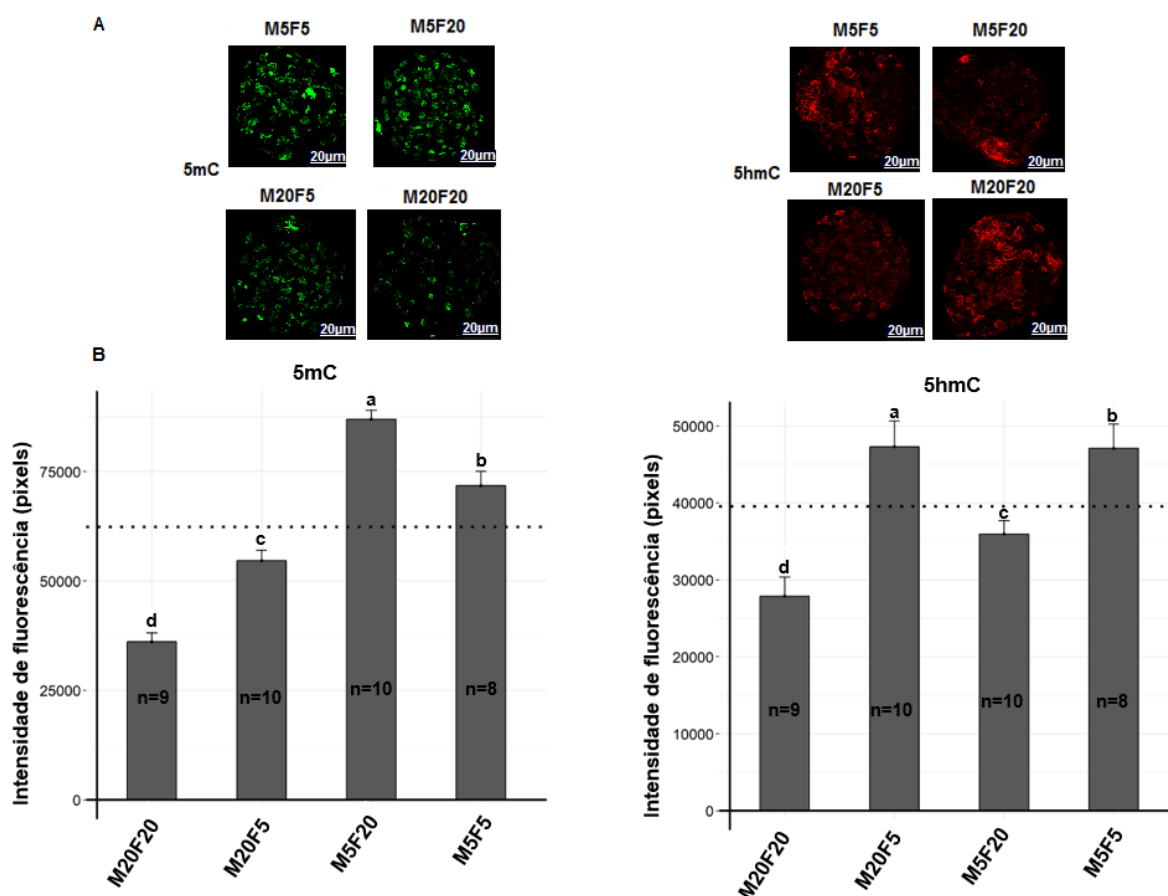


Figura 13. Níveis de 5mC e 5hmC em embriões maturados e fecundados em diferentes tensões de oxigênio (5% e 20%). (A) Fotomicrografias de confocal de blastocistos corados com anticorpo anti-5mC (verde) e anti-5hmC (vermelho). Todas as imagens foram tiradas na objetiva de 40x, no mesmo tempo de exposição para comparação dos níveis de intensidade de fluorescência. (B) Quantificação de 5mC e 5hmC em embriões maturados e fecundados em alta e baixa tensão de oxigênio. As barras do gráfico representam as médias e as barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b, c, d) nas barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na análise dos efeitos da tensão de oxigênio na MIV e FIV, as médias das intensidades de fluorescência encontradas para a marcação 5mC dos grupos de embriões maturados em baixa (M5) tensão de O_2 (80566.08 ± 1861.99), diferiram de embriões maturados em alta tensão (M20) (45909.97 ± 1618.80), ($p < 0.05$). Já blastocistos que foram fecundados em alta tensão de oxigênio (F20) (67236.60 ± 1874.48) não diferiram nesta mesma marcação, de embriões fecundados

em baixa tensão de O₂ (F5) (63322.19±2081.61) (p=0.9628). Na análise da marcação 5hmC, os grupos de blastocistos maturados em baixa (M5) tensão de O₂ (40635.44±1687.86) diferiram de blastocistos maturados em alta tensão (M20) (38131.22±2180.10) (p=0.0252). Blastocistos fecundados em baixa tensão de oxigênio (F5) (47180.30±2295.35) diferiram, nesta mesma marcação, dos fecundados em alta tensão de O₂ (32814.22±1453.39) (p<0.05).

7. DISCUSSÃO

A PIVE fornece uma excelente fonte de grande interesse econômico para a aplicação de biotecnologias, na pecuária bovina. Nos últimos anos, a produção de embriões *in vitro* cresceu significativamente, mas as taxas de desenvolvimento para o estágio de blastocisto continuam baixas (~30 a 40%) (Bermejo-Álvarez et al, 2010). Esses valores são principalmente devido à incapacidade de replicar o ambiente *in vivo* em condições laboratoriais. A tensão de oxigênio atmosférico, a manipulação de gametas e embriões e o meio de cultivo, alguns dos limites impostos pelo próprio sistema *in vitro*, muitas vezes são ignorados em nome da economia e facilidade (Del Collado et al., 2017). Ainda não foi elucidada qual a significativa influência da tensão de oxigênio nas fases iniciais da PIVE e as possíveis conseqüências do estresse oxidativo no remodelamento epigenético de oócitos e embriões bovinos. Para isso, foi necessário determinar as condições ideais de tensão de oxigênio que podem variar entre a MIV e a FIV, através de 5 experimentos. Este trabalho foi um dos poucos a abordar o papel da tensão de oxigênio durante as etapas de maturação e fecundação *in vitro*.

Nos resultados encontrados deste estudo, oócitos maturados em alta tensão de O₂ geram maior concentração de espécies reativas de oxigênio e glutatona reduzida e células do cumulus de oócitos submetidos a mesma tensão de oxigênio na MIV, apresentaram níveis de transcritos maiores para o gene SOD1 relacionado a via de resposta ao estresse oxidativo celular. Foi constatado que, zigotos que são expostos a um ambiente de baixa tensão de O₂ na FIV não resultam em maior taxa de polispermia. Na avaliação da taxa de desenvolvimento, o grupo M20F20

apresentou uma maior quantidade de blastocistos em relação aos grupos M20F5, M5F5 e M5F20. Os padrões de expressão dos transcritos de embriões maturados em baixa tensão de oxigênio foram diferencialmente expressos, sendo relacionados a via de resposta ao estresse oxidativo (NRF2, SOD1, SOD2) e remodelamento epigenético (KDM5A e TET1). Na avaliação do estresse oxidativo nos embriões, os grupos M20F20 e M5F5 apresentaram níveis superiores de GSH em relação aos grupos M20F5 e M5F20. O grupo de embriões M20F20 e M5F5 apresentaram níveis intracelulares de EROs menores que os grupos M20F5 e M5F20. Houve interação entre os fatores e as médias de intensidade de fluorescência para as marcas H3K9me2 e H3K9me3 foram significativamente afetadas pelas diferentes tensões de O₂. Ambas as marcas se comportaram de maneira semelhante, sendo encontrados níveis maiores de H3K9me2 em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio e em embriões maturados e fecundados em alta tensão de O₂, em relação aos outros grupos.

O Experimento I investigou o efeito da tensão de oxigênio na maturação *in vitro* por meio da quantificação do nível intracelular de EROs e GSH em oócitos, e avaliação de transcritos relacionados a resposta ao estresse oxidativo e modeladores epigenéticos, em oócitos e células do cumulus. As concentrações intracelulares de EROs e GSH demonstraram que, oócitos que são expostos a um ambiente de alta tensão de O₂ na maturação *in vitro*, geram maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio e glutathiona reduzida. Nossos resultados estão parcialmente de acordo com os de Hashimoto et al., (2000) e Hashimoto, (2009), pois eles encontraram um efeito prejudicial da tensão de oxigênio atmosférica aos oócitos bovinos, devido a maior quantidade de peróxido de hidrogênio, um tipo de espécie reativa de oxigênio. Segundo Del Collado et al., (2017), os níveis de EROs e GSH em oócitos maturados *in vivo* são superiores à oócitos maturados *in vitro* em atmosfera de 20% de O₂. A interação entre as diferentes concentrações de oxigênio e os vários fatores que afetam a dinâmica na maturação *in vitro* tem sido estudadas (Hashimoto et al., 2000; Marques et al., 2012; Kind et al., 2015). Maior quantidade de GSH intracelular fornece à oócitos maturados *in vitro* grandes reservas disponíveis para proteção do embrião até o estágio de blastocisto (De Matos et al., 1996), obtendo-se eficiência na produção de blastocistos *in vitro* a partir de oócitos imaturos (Telford et al., 1990). Danos oxidativos

à oócitos são mais prováveis sob condições *in vitro* devido à exposição a concentrações mais altas de oxigênio do que a que ocorre *in vivo* (Agarwal, 2008). As EROs têm sido associadas a numerosos processos biológicos quando são produzidas em níveis corretos e podem exercer efeitos prejudiciais quando estão em excesso (Al-Gubory et al., 2010). De acordo com os trabalhos mencionados a cima, a concentração de GSH encontrada neste experimento se mostrou positivo em relação a produção de embriões, pois quando os oócitos foram mantidos em alta tensão de oxigênio na MIV, foi encontrada uma maior produção.

Nossos resultados mostraram que em células do cumulus houve um aumento de expressão da enzima antioxidante SOD1, em alta tensão de oxigênio. Isto sugere que o estresse oxidativo induzido pelo excesso de EROs leva a alterações na regulação desses genes, aparentemente compensadas por meio de um aumento da concentração intracelular de GSH. Segundo Harvey e colaboradores (1995), a enzima SOD1 realiza a reação de dismutase através do processo de catálise para remoção das espécies reativas ao oxigênio. A baixa tensão de oxigênio durante a MIV de oócitos altera a expressão de genes relacionados a competência oocitária e metabolismo da glicose (Bermejo-Álvarez et al., 2010). Sabe-se que um aumento na tensão de oxigênio pode efetivamente aumentar a produção de EROs, podendo ser correlacionado com um aumento no nível de transcrição de genes relacionados ao estresse oxidativo em embriões bovinos (Wrenzycki et al., 2001; Rinaudo et al., 2006; Corrêa et al., 2008; Arias et al., 2012).

Quando a etapa de maturação *in vitro* dos oócitos foi avaliada, oócitos maturados em alta tensão de oxigênio não diferiram na análise de metáfase II de maturados em baixo O₂. Segundo Mingoti e colaboradores, (2011) a alta tensão de oxigênio durante a MIV pode melhorar as taxas de oócitos que atingem metáfase II, pois reduzir a tensão de oxigênio durante a MIV pode causar um atraso na maturação (Mingoti et al., 2009). O mesmo foi encontrado por Pinyopummintr e Bavister, (1995), reduzindo o oxigênio, a proporção de oócitos que atingem MII diminui drasticamente. Alguns estudos demonstram que em camundongos, a atmosfera de 5% de O₂ na MIV não alterou a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (Adam et al., 2004). Com base em dados metabólicos de oócitos desnudados, Clark e colaboradores. (2006) propuseram um modelo de difusão do oxigênio através de complexos cumulus-oócito

de murinos e bovinos, o modelo constatou que pouco oxigênio é consumido pelas células do cumulus, sobrando à maioria do oxigênio disponível para o oócito efetuar a síntese de ATP pela via de fosforilação oxidativa. Estes autores concluíram que as condições de oxigênio para a maturação *in vitro* devem ser similares às aquelas observadas *in vivo*.

No Experimento II observou-se o efeito da tensão de oxigênio na fecundação *in vitro*, através da avaliação da taxa de fecundação de zigotos expostos a um ambiente de alta ou baixa tensão de O₂ na MIV e fecundação *in vitro*. Segundo Hashimoto (2000), sob MIV e FIV em alta tensão de oxigênio, uma maior taxa de polispermia é encontrada quando adiciona-se 20 mM de glicose em meio SOFaa na maturação *in vitro*. Por meio dos dados obtidos neste experimento, foi constatado que zigotos que são expostos a um ambiente de baixa tensão de O₂ na FIV, não resultam em maior taxa de polispermia.

Neste estudo a condição ideal de tensão de oxigênio utilizada na fecundação *in vitro* foi a alta concentração de oxigênio, por resultar em maior taxa de clivagem e blastocistos, resultados encontrados no experimento III. A importância da baixa tensão de oxigênio durante a fecundação *in vitro* tem sido abordada em alguns estudos, podendo ser benéfico (Lazzari et al., 1998; Takahashi e Kanagawa, 1998; Galli et al., 2001; Yuan et al., 2003; Leivas, 2006; Arias et al., 2012; Bontekoe et al., 2012; Wale e Gardner, 2016) ou prejudicial (Pinyopummintr e Bavister, 1995, Bermejo-Álvarez et al, 2010).

As conseqüências das modificações realizadas na FIV levantam questões importantes, não completamente resolvidas. A implantação da fecundação *in vitro* (FIV) em animais e humanos implica em decisiva mudança no ambiente onde ocorre o início de um novo organismo (Gluckman et al., 2004). Durante esta fase, ocorre grande reprogramação epigenética, sendo crucial para o destino do embrião (Simon e Keith, 2008). Segundo Ventura-Juncá et al., (2015) essa reprogramação epigenética é muito vulnerável a mudanças nas condições ambientais, como as implícitas na fecundação *in vitro* (luz, temperatura, tensão de oxigênio, nutrição, cultivo *in vitro*). Na análise do efeito da tensão de oxigênio nas marcas epigenéticas H3K9me2 e H3K9me3 em embriões bovinos, a alta tensão de oxigênio na FIV apresentou níveis

superiores em ambas as marcações. Sabe-se que, um aumento nos níveis dessas marcas significa anormalidade na reprogramação nuclear, no entanto, embriões produzidos *in vivo* poderiam servir de melhor parâmetro para avaliação da qualidade embrionária.

No experimento III analisou-se o efeito das diferentes concentrações de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro* e sua influência no desenvolvimento embrionário. Os principais resultados encontrados neste experimento sugeriram que, a alta tensão de oxigênio na maturação *in vitro* apresentou um efeito benéfico nas taxas do desenvolvimento embrionário. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Castro e Paula; Hansen (2007), Pinyopummintr e Bavister (1995), Watson et al., (2000), as taxas de clivagem e blastocisto foram superiores em oócitos expostos a um ambiente de alta tensão de oxigênio na maturação *in vitro*. Entretanto, os resultados de Kruij et al., (2000); Hashimoto et al., (2000); (2009), Miller; Rorie, (2000); Bermejo-Álvarez et al, (2010), demonstraram que, a taxa de clivagem e blastocisto, foram maiores em oócitos maturados em 5% de O₂, em bovinos. Adam et al., (2004), encontrou o mesmo resultado em camundongos. Alguns estudos demonstraram o efeito da redução da concentração de oxigênio (5%) no desenvolvimento de embriões de ovelhas (Wright et al., 1976; Betterbed e Wright, 1985), este trabalho é similar as observações originais de Tervit et al. (1972), que uma concentração de oxigênio em torno de 5-10% seria ideal para o desenvolvimento de embriões ovinos e bovinos *in vitro*. A PIVE se desvia das condições *in vivo* em muitos aspectos, mas um dos fatores críticos que geralmente não são considerados é a tensão de oxigênio sob a qual os gametas e embriões são mantidos. Neste trabalho a tensão de oxigênio que se apresentou benéfica, em termos de maior produção de blastocistos, foi a alta tensão de O₂.

Sabe-se que o ambiente artificial proporcionado pelas ARTs tem sido relacionado com a alta frequência de desordens epigenéticas, tanto em humanos (Amor e Halliday, 2008) quanto em animais (Young et al., 1998). Modificações epigenéticas podem alterar padrões de expressão gênica em embriões, podendo causar variações na metilação do DNA (Wrenzycki e Niemann, 2003). A influência da atmosfera gasosa sobre o epigenoma tem ganhado especial atenção recentemente.

A concentração de O₂ é responsável por controlar processos metabólicos fundamentais para o desenvolvimento embrionário (Harvey, 2007). Segundo Bomfim et al., (2017) embriões produzidos *in vitro* em baixa concentração de oxigênio podem ser considerados similares aos produzidos *in vivo*. No presente trabalho, uma vez que os níveis de metilação do DNA de embriões maturados, fecundados e cultivados em baixa tensão de O₂ estavam alterados, esperou-se encontrar alterações na expressão dos transcritos. Os padrões de expressão dos genes revelaram que os remodeladores epigenéticos, KDM5A e TET1, são mais expressos em embriões que permanecem em baixa tensão de oxigênio na MIV. Apesar de estudos anteriores demonstrarem que um aumento na concentração de O₂ no cultivo embrionário, pode estar relacionado a reprogramação epigenética anormal em embriões na espécie bovina (He et al., 2012; Mioranza, 2014; Gaspar et al., 2015; Bomfim et al., 2017), nosso trabalho evidenciou que uma diminuição da concentração de oxigênio na MIV também pode estar correlacionada com esta anormalidade. Interessantemente, Bermejo-Álvarez e colaboradores, (2010) avaliaram o efeito de duas concentrações de oxigênio (20 e 5%) durante a maturação *in vitro*, no desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos e observou que a baixa tensão de O₂ pode ter um efeito benéfico durante a MIV nas taxas de desenvolvimento e alterar a expressão de genes relacionados à competência do oócito e ao metabolismo da glicose. Diferentemente deste estudo, Yamanaka et al., (2011) não encontraram diferença no padrão de metilação entre embriões produzidos *in vitro* sob baixa tensão de O₂ e embriões *in vivo*. Segundo Melvin e Rocha, (2012) existe uma regulação indireta das desmetilases pelo oxigênio, via regulação transcricional, entre elas a KDM5A pode ser induzida por baixas concentrações de oxigênio nos níveis de RNAm. Segundo os resultados no nosso estudo, uma maior expressão do transcrito KDM5A em embriões maturados em baixa tensão de oxigênio pode ter sido encontrada devido maior bi/trimetilação das histonas, que também foram encontradas nestes embriões. Segundo Lamadema et al., (2019) os níveis de expressão das diferentes TETs encontradas, mostram distintos padrões de sensibilidade perante diferentes níveis de baixa concentração de oxigênio. Segundo este trabalho, uma diminuição na disponibilidade de oxigênio na MIV pode elevar a desmetilação no DNA através de maiores níveis de transcritos do gene TET2, concordando com o resultado encontrado do experimento V, de uma maior metilação

no DNA de embriões maturados em baixo O₂. Nos dados da análise de expressão não foi observada diferença no padrão dos transcritos durante a fecundação *in vitro*. Os resultados do nosso estudo, portanto, corroboram com a hipótese que diferentes concentrações de oxigênio durante a maturação e a fecundação *in vitro* modulam a transcrição de genes envolvidos no estresse oxidativo e modeladores epigenéticos em embriões bovinos. Além disso, o estresse oxidativo gerado nos embriões exerceu efeito sobre os níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas.

Blastocistos submetidos a baixa tensão de oxigênio na maturação *in vitro* mostraram níveis de transcritos maiores para os genes NRF2, SOD1 e SOD2 comparado àqueles com alta tensão de O₂ nesta etapa. Segundo Del Collado, (2017) uma das mais importantes vias antioxidantes é ativada pelo fator de transcrição NRF2. Segundo Amin et al., (2014) este fator pode ser associado a sobrevivência e melhor competência para o desenvolvimento de embriões cultivados sobre condições de estresse oxidativo. Devido isto, os resultados aqui apresentados indicam que embriões maturados em baixa tensão de oxigênio apresentam aumento no estresse celular e conseqüentemente maior atividade das vias de resposta ao estresse oxidativo. Diferentemente do que foi descrito por Corrêa (2009), em que um aumento da concentração intracelular de EROs acompanhado de uma diminuição da enzima SOD estão diretamente ligados ao aumento da morte celular, neste estudo foi encontrado menor nível de EROs em embriões bovinos maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio e maiores níveis de transcritos dos genes SOD1 e SOD2, nestes embriões. Entretanto, futuras análises de apoptose poderão evidenciar se esses embriões maturados e fecundados em baixa tensão de O₂ apresentariam maior ou menor apoptose celular.

No experimento IV analisou-se o efeito da tensão de oxigênio no nível intracelular de EROs e GSH em blastocistos bovinos. Os resultados dos níveis intracelulares de EROs demonstraram que, na interação entre os fatores MIV e FIV, este experimento identificou níveis intracelulares de EROs menores em embriões dos grupos M20F20 M5F5, diferindo de M20F5 e M5F20, que tiveram maior acúmulo de EROs. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram os níveis de EROs em blastocistos maturados e fecundados em alta e baixa tensão de oxigênio, como neste trabalho. Nossos resultados estão parcialmente de acordo com o estudo de

Bonfim (2017), neste estudo foram maturados e fecundados oócitos em alta tensão de oxigênio e os embriões cultivados em baixo e alto O₂, um cultivo embrionário em baixa concentração de oxigênio resultou em um menor nível de EROs. Alguns trabalhos reportaram que, o estresse oxidativo induzido por EROs pode promover efeitos prejudiciais durante a PIVE (Khurana e Niemann, 2000; Liu e Keefe, 2000; Guerin et al., 2001; Harvey et al., 2004; Agarwal e Said, 2005; Agarwal et al., 2005, 2008), associando o nível de estresse com a presença de EROs. Um excesso de EROs pode acarretar em atraso no desenvolvimento embrionário e uma baixa qualidade dos embriões (Crocomo et al., 2012; Amin et al., 2014). Em sistemas que utilizam baixa tensão de oxigênio, as células podem não ter oxigênio suficiente para geração de energia, o que pode causar um desequilíbrio na produção de EROs e nas defesas antioxidantes (Silva et al., 2011). A geração de EROs nas células e as futuras consequências biológicas dependem do contexto e concentração destes (Samanta e Semenza, 2017). Os dados aqui apresentados confirmam a hipótese de que, diferentes tensões de oxigênio no início da PIVE é capaz de gerar uma condição de estresse oxidativo e elevar os níveis de EROs intracelular em embriões bovinos.

Os níveis intracelulares de glutathiona reduzida (GSH) apresentaram-se superiores em blastocistos que foram maturados e fecundados em alta (M20F20) e baixa (M5F5) tensão de oxigênio. Os resultados dos níveis intracelulares de GSH de embriões que foram maturados e fecundados em alta (M20F20) e baixa tensão de oxigênio (M5F5) estão em concordância com as observações feitas por Samanta e Semenza, (2017), de que as células do metabolismo oxidativo são alteradas para o glicolítico através de fatores induzíveis por hipóxia, reduzindo a geração de superóxido mitocondrial e aumentando a síntese de NADPH e glutathiona, com intenção de conservar a homeostase redox em condições hipóxicas. Os níveis intracelulares de EROs e GSH encontrados em embriões bovinos dos grupos M20F20 e M5F5 se complementam pois observa-se que, quando houve um aumento de GSH nestes dois grupos, houve uma diminuição nas espécies reativas de oxigênio nos mesmos. Nos estudos de Inoue, (2003) e Aitken et al., (2004), relataram que as EROs diminuem os níveis de GSH, resultando em apoptose celular. Inúmeros fatores celulares extrínsecos e intrínsecos controlam o processo de apoptose. Espécies reativas de oxigênio também podem iniciar uma cadeia de reações que levam à morte celular programada (Agarwal,

2004). Concentrações aumentadas de H_2O_2 em embriões fragmentados foram associadas a altos níveis de morte celular (Yang et al., 1998). Segundo Kitagawa et al., (2004) encontraram uma quantidade reduzida de peróxido de hidrogênio (EROs) em embriões porcos que foram cultivados sob 5% de oxigênio, associado a uma redução na fragmentação do DNA. Quando há um desequilíbrio entre EROs/antioxidantes, pode ocorrer apoptose e danificar os tecidos (Aitken e Baker, 2006). Pode-se concluir através dos resultados obtidos no experimento IV que, utilizar somente alta ou baixa tensão de oxigênio na MIV e FIV gera uma condição de estresse oxidativo em embriões, por meio de um aumento das EROs e diminuição de GSH. Com objetivo de avaliar o efeito das diferentes tensões de oxigênio nos níveis globais de metilação do DNA e marcas de histonas específicas, no V experimento, os blastocistos foram analisados por imunofluorescência para detecção de 5mC, 5hmC, H3K9me2/3. Na marcação das histonas, os resultados relataram hipermetilação em ambas as marcações de embriões maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio (M5F5) e maturados e fecundados em alta tensão de O_2 (M20F20), em relação aos grupos M5F20 e M20F5. Gaspar et al., (2015) relataram um aumento nas marcações epigenéticas H3k9me2/H3K4me2, sendo superiores em embriões maturados/fecundados/cultivados em alta tensão de oxigênio, corroborando com o resultado encontrado neste estudo, de uma maior bi / tri metilação na lisina 9 da histona H3 do grupo de alta tensão de oxigênio na MIV e FIV (M20F20). O estudo de Santos et al., (2003) evidenciaram que a metilação da H3K9 é reprogramada paralelamente a metilação do DNA, em embriões FIV. Nossos dados estão parcialmente de acordo com este estudo, pois foi encontrada maior bi/trimetilação da H3K9 e metilação do DNA em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio. Segundo Wu e colaboradores, (2011), existe uma reprogramação epigenética severamente deficiente em embriões clone, comparado a embriões fecundados *in vitro*, devido a altos níveis de metilação e desmetilação anormal no DNA serem observados durante o período de pré-implantação embrionária.

A hipermetilação global de H3K9me3 e H3K9me2 também foi observada em suínos (Cao et al., 2015; Huang et al., 2016). Segundo Liu et al., (2018) duas demetilases da H3K9, a KDM4D e KDM4E, estão relacionadas à desmetilação ativa de H3K9me3 / 2 em embriões fecundados *in vitro*; a KDM4E pode funcionar tanto

como um regulador epigenético crucial da EGA, como um fator defeituoso interno responsável por barreiras H3K9me3/2 que são persistentes à reprogramação.

Os fatores ambientais ao qual o embrião é exposto durante o período de pré-implantação são críticos para um desenvolvimento embrionário adequado (Salilew-Wondim et al., 2015), tanto para o embrião *in vivo* quanto para a *in vitro* (Abe et al., 2002; Nedambale et al., 2004). Nossos resultados indicaram que, as alterações nos mecanismos de remodelação indicam que a baixa tensão de oxigênio é capaz de interferir na reprogramação epigenética por meio da modulação da expressão de transcritos relacionados aos processos de metilação das histonas (KDM5A) e do DNA (TET1) durante o desenvolvimento do embrião bovino.

Observando a outra análise epigenética deste experimento, a interação dos fatores curiosamente demonstrou por meio dos níveis globais de metilação do DNA, maior metilação em embriões produzidos em baixa tensão de oxigênio, comparado a alta tensão. Na análise dos efeitos desta marcação, embriões maturados em baixa tensão de O₂ também apresentaram uma maior metilação do que embriões maturados em alta tensão. Nossos resultados estão em concordância com o estudo de Bennemann et al., (2018), pois encontraram uma maior metilação no DNA de pronúcleos maternos de zigotos produzidos a partir de oócitos maturados sob 5% de O₂, indicando uma falha na competência da reprogramação desses oócitos. O potencial remodelamento epigenético condicionado no processo de maturação, pode não ser completamente alcançado em condições anormais no ambiente celular, afetando a competência funcional oocitária e o futuro do embrião (Gioia et al., 2005). O resultado encontrado pode ser explicado através dos dados obtidos no experimento III, pois o desenvolvimento embrionário do grupo maturado e fecundado em baixa tensão de oxigênio (M5F5) foi menor, podendo ser causado através de um processo de desmetilação ineficiente que pode ocorrer durante o desenvolvimento de embriões de baixa qualidade embrionária, sendo apontada como uma das principais causas de erros epigenéticos na reprogramação nuclear de clones através da persistência da hipermetilação tanto do DNA quanto de histonas (Dean et al., 2001; Santos et al., 2003). Em murinos também foi demonstrado que, uma clivagem *in vitro* rápida pode ter um processo anormal de metilação no DNA (Market Velker et al., 2012). No entanto, não foram detectadas diferenças na metilação global do DNA em oócitos de

humanos, após a vitrificação e subsequente maturação *in vitro* (Liu et al., 2017). A metilação global do DNA também mostrou ser estável durante o período de maturação de oócitos bovinos (Racedo et al., 2009).

Na análise da hidroximetilação do DNA (5hmC), os níveis foram superiores em embriões maturados em alta tensão de oxigênio e fecundados em baixa tensão de oxigênio (M20F5) e em embriões maturados e fecundados em baixa tensão de O₂ (M5F5) comparado aos grupos M5F20 e M20F20. Na análise dos efeitos desta marcação, blastocistos fecundados em baixa tensão de oxigênio (F5) possuíram maiores níveis de 5hmC, do que blastocistos fecundados em alta tensão de O₂. Esses resultados podem ter alguma relação no processo de oxidação do espermatozoide no momento da fecundação *in vitro*. Em bovinos, o genoma paterno demonstrou ser rapidamente desmetilado após a fertilização *in vitro* e ICSI (Abdalla et al., 2009). Também foi relatada desmetilação no genoma zigótico paterno no processo de criopreservação de espermatozoides de camundongos (Jia et al., 2015) e em bovinos (Rahman et al., 2014). A hidroxilação do DNA, uma outra modificação na posição 5 da citosina, tem ganhado destaque em estudos do desenvolvimento embrionário inicial. A 5-hidroximetilcitosina (5hmC) é encarregada da desmetilação ativa do genoma paterno durante a etapa de fecundação (Iqbal et al., 2011; Wossidlo et al., 2011). A enzima responsável por esse processo de desmetilação que ocorre no genoma paterno é a TET 3, podendo estar relacionada aos eventos que ocorrem no núcleo somático (Gu et al., 2011).

Muitas pesquisas evidenciam que os efeitos epigenéticos podem ser induzidos por procedimentos de ARTs (Kohda e Ishino, 2013). Pouco se sabe sobre as consequências da mudança de atmosfera gasosa durante as fases iniciais da produção *in vitro* de embriões e as possíveis consequências no remodelamento epigenético, com os resultados encontrados neste trabalho, eventualmente poderá obter-se uma melhor avaliação do impacto das técnicas usadas nas ARTs no epigenoma de bovinos.

8. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que a tensão atmosférica e baixa disponibilidade de oxigênio repercutem negativamente na primeira etapa da PIVE (MIV), através de uma maior concentração intracelular de EROs e GSH, relacionados ao estresse oxidativo. Estas alterações observadas são acompanhadas de alterações dos mRNAs de células do cumulus pois os níveis de transcritos do gene SOD1 foram superiores em células do cumulus de oócitos maturados em baixa tensão de oxigênio, gene relacionado a via de resposta ao estresse oxidativo celular. Verificou-se que zigotos que são expostos a um ambiente de baixa tensão de O₂ na FIV, não resultam em uma maior taxa de polispermia, confirmando que a baixa tensão de oxigênio pode ser utilizada na FIV. Entretanto, a alta tensão de oxigênio na maturação e fecundação *in vitro* apresentou um efeito benéfico nas taxas do desenvolvimento embrionário enquanto a baixa tensão influenciou a maturação *in vitro* de blastocistos através de níveis de transcritos maiores para os genes NRF2, SOD1, SOD2, TET1 e KDM5A. Foram observadas menores concentrações de EROs em embriões maturados e fecundados em alta tensão de O₂ e maturados e fecundados em baixa tensão de oxigênio, e maiores quantidades de GSH nestes mesmos grupos. Na avaliação das marcas epigenéticas H3K9me2 e H3K9me3 em blastocistos bovinos, ambas se comportaram de maneira semelhante, sendo encontrados níveis superiores destas marcações em embriões do grupo M5F5 e M20F20, em relação aos grupos M5F20 e M20F5. Embriões maturados em baixa tensão de O₂ apresentaram uma maior metilação no DNA comparado aos maturados em alta tensão.

Os resultados encontrados foram importantes para estimular pesquisas sobre a real influência que as tecnologias de reprodução assistida (ARTs) podem ter nos gametas e no desenvolvimento embrionário, pois essas técnicas requerem grandes mudanças no ambiente. Estes resultados ressaltam a necessidade de maiores estudos para elucidar os motivos pelos quais oócitos e embriões produzidos *in vitro* sofrem por estresses celulares e modificações epigenéticas.

9. REFERÊNCIAS

- Abdalla, H. et al. (2009) Demethylation dynamics of the paternal genome in pronuclear-stage bovine zygotes produced by in vitro fertilization and ooplasmic injection of freeze-thawed or freeze-dried spermatozoa. **The Journal of reproduction and development** 55:433-439.
- Abe, H. et al. (2002) Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum free or serum containing media. **Mol Reprod Dev** 61:57-66.
- Adachi, S. et al. (2001) Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. **Circ Res** 88:408-414.
- Adam, A. A. G. et al. (2004) Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos. **Japanese Journal of Veterinary Research** 52: 77–84.
- Agarwal, A.; Allamaneni, S.S. (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reprod Biomed Online** 9:338-347.
- Agarwal, A.; Said, T. M. (2005) Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International** 95: 503–507.
- Agarwal, A. et al. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol** 3:28.
- Agarwal, A. et al. (2006) Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility** 86: 503–512.
- Agarwal A. et al. (2008) Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal** 10: 1375–403.
- Aitken, R.J., et al. (2004) Seeds of concern. **Nature** 432: 48–52.
- Aitken, R. J.; Baker, M. A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology** 250: 66–69.
- Alves, M. B. R. et al. (2019) Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14.
- Al-Gubory, K. H. et al. (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 42:1634–1650.
- Amin, A. et al. (2014) Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development** 81: 497–513.
- Amor D.J.; Halliday, J. (2008) A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. **Hum Reprod** 23:2826-2834.

- Andrade, E.R. et al. (2010) Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 34:79-85.
- Arias, M. E. et al. (2012) Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. **Zygote** 20: 209–217.
- Balasubramanian, S. (2007) Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology** 68: 265–275.
- Barnes F.L.; Eyestone WH. (1990) Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology** 33:141–152.
- Batie, A. M. et al. (2019) Hypoxia induces rapid changes to histone methylation reprogramming chromatin for the cellular response. **Science** 363: 1–24.
- Bedaiwy, M. et al. (2004) Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. **Fertil. Steril.** 82, 593–600.
- Bennemann, J. et al. (2018) Reduced oxygen concentration during in vitro oocyte maturation alters global DNA methylation in the maternal pronucleus of subsequent zygotes in cattle. **Molecular Reproduction and Development** 85: 849–857, 2018.
- Bermejo-Álvarez, P. et al. (2010) Low oxygen tension during ivm improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. **Reproductive biomedicine online** 20: 341-349.
- Bomfim, M. M. et al. (2017) Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and dna methylation in bovine blastocysts. **Molecular reproduction & development.** 84: 1296-1305.
- Buttke, T.M.; Sandstrom P.A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunol Today** 15:7-10.
- Calvin, H.I. et al. (1986) Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Res** 14: 265-275.
- Cao, Z. et al. (2015) Genome-wide dynamic profiling of histone methylation during nuclear transfer-mediated porcine somatic cell reprogramming. **Plos One** 10:1-18
- Carmeliet, P. et al. (1998) Role of HIF-1 alpha or in hypoxiamediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature** 394:485–90.
- Chen, Z. et al. (2013) Large offspring syndrome: A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics** 8: 591-601.
- Corrêa, G. A. et al. (2008) Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science** 104:132–142.

- Corry, G. N. et al. (2009) Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews** 87: 297–313.
- Dean, W. et al. (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98: 13734–8.
- De Matos, D. G. et al. (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development** 45: 451–457.
- Del Collado, M. et al. (2017) In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction** 154: 881–893.
- Dumoulin, J. C. M. et al. (1995) Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse. **Fertility and Sterility** 63: 115–119.
- Dunwoodie, S. L. (2009) The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. **Developmental Cell** 17: 755–773.
- Eppig, J.J. et al. (1990) Developmental capacity of mouse oocytes that grow and mature in culture: the effect of modification of the protocol. **Theriogenology** 33: 89–100. Eichenlaub Ritter, U. et al. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 783-96, Sep 2011. ISSN 1872-8278 (Electronic) 1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817047> >.
- Fenwick, J. et al. (2002) Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. **Human Reproduction** 17: 407–412.
- Fischer B, Bavister BD. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J Reprod Fertil** 99:673-9.
- Fowler, C. J.; Callingham, B. A. (1978) Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. **Biochem. Pharmacol.** 27:1995-2000.
- Fukui, Y.; Oyamada, T. (2004) Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined médium. **J. Reprod.** 50: 107-117.
- Galli, C. et al. (2001) Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology** 55: 1341-1357.
- Gaspar, R. C. et al. (2015) Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro–produced embryos in a bovine model. **Theriogenology** 83: 1408–1415.
- Gioia, L. et al. (2005) The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. **Reproduction** 130:29-39.

- Giotto, A. B. et al. (2015) Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect the in vitro fertilization of bovine oocytes. **Seminario:Ciencias Agrarias** 36: 4277–4287.
- Graf, A. et al. (2014) Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 111:4139-4144.
- Guerin P, et al. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update** 7: 175–189.
- Gupta, M.K. et al. (2010) Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertil Steril Elsevier** 93:2602– 2607.
- Gu, T.P.P. et al. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature** 477: 606–10.
- Halterman, M.W. et al. (1999) Hypoxia-inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves. **J Neurosci** 19:6818–24.
- Hamatani, T. et al. (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. **Dev Cell**, 6:117-131.
- Harvey, A. J. et al. (2002) REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction** 123: 479–486.
- Harvey, A. J. et al. (2004) Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction** 71: 1108–1119.
- Harvey, A. J. (2007) The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim Reprod Sci.** 98:113-128.
- Hashimoto, S., et al. (2000) Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Mol. Reprod. Dev.** 57: 353–360.
- Hashimoto, S. (2009) Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. **Journal of Reproduction and Development** 55: 1-10.
- Huang, J. et al. (2016) BIX-01294 increases pig cloning efficiency by improving epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Reproduction** 151: 39-49.
- Inoue, M. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Med Chem** 10: 2495–2505.
- Iqbal, K. et al. (2011) Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. 11: 2–7.
- Jensen, P. K. (1966) Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles, **Biochim. Biophys.** 122: 157–166.
- Jia, G. et al. (2015) Spermatozoa cryopreservation alters pronuclear formation and zygotic DNA demethylation in mice. **Theriogenology** 83:1000-1006.
- Johnson, M.H.; Nasr-Esfahani, M.H. (1994) Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? **BioEssays** 16: 31–38.

Khurana, N.K., Niemann, H., (2000) Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology** 54: 741–756.

Kitagawa, Y. et al. (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology** 62: 1186–1197.

Kohda T., Ishino F. (2013) Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** Biol Sci p.368.

Kotch, L.E. et al. (1999) Defective vascularization of HIF-1 alphanull embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. **Dev Biol** 209:254–67.

Kovacic, B.; Vlajsavljevic, V. (2008) Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. **Reprod Biomed Online** 17: 229–236.

Kruip, T. A. M. et al. (2000) Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology** 53: 611–618.

Lachner, M.; Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14: 286–98.

Lachner, M. et al. (2003) Na epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell. Sci.* 116: 2117–2124.

Lazzari G, et al. (1998) Lowering the oxygen level during IVF improves the fertilizing ability of bovine sperm and does not affect the developmental capacity of the embryos obtained. In: Abstracts of 19th Scientific Meeting of the A.E.T.E., Rolduc, Holland. Rolduc: **European Embryo Transfert Association**. p.198.

Leite, R. F. et al. (2018) Corrigendum to Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on In Vitro Produced Embryos. **Oxidative medicine and cellular longevity** 2017: 1-14.

Leivas, F. G. (2006) **Influência da atmosfera gasosa e da fonte proteica sobre o desenvolvimento embrionário in vitro e taxa de prenhez em bovinos** Dissertação (Doutorado) - UFSM, Santa Maria, p.40–42.

Li, J.; Foote, R.H. (1993) Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. **J Reprod Fertil** 98:163-167.

Liu, L.; Keefe, D. L. (2000) Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. **Biol. Reprod.** 62:1828–1834.

Liu, Y. et al. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J. Neurochem.** 80: 780–787.

Liu, M.H. et al., (2017) Ultrastructural Changes and Methylation of Human Oocytes Vitrified at the Germinal Vesicle Stage and Matured in vitro after Thawing. **Gynecological and obstetric investigation** 82(3):252-261.

- Liu, Z. et al. (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic. Cell Nuclear Transfer. **Cell** 172: 881–887.
- Loenarz, C.; Schofield, C. J. (2008) Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. **Nature Chemical Biology** 4: 152–156.
- Lyer, N.V. et al. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. **Genes Dev** 12:149–62.
- Maas, D.H.A., et al., (1976) Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertil. Steril.** 27: 1312–1317.
- Machado, G.M. et al. (2013) Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. **Mol Reprod Dev** 80: 936–47.
- Market Velker, B.A. et al. (2012) Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. **Biology of reproduction** 86:143, 141-116.
- Marques, M. G. et al.(2012) Effect of low oxygen tension atmosphere and maturation media supplementation on nuclear maturation, cortical granules migration and sperm penetration in swine in vitro fertilization. **Reproduction in Domestic Animals** 47: 491-497.
- Mason K., et al. (2012) Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. **Anim Reprod Sci** 134:45-55.
- Mastroianni, L.J.; Jones, R. (1965) Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility** 9: 99-102.
- Melvin, A.; Rocha, S. (2012) Chromatin as an oxygen sensor and active player in the hypoxia response. **Cellular Signalling** 24: 35-43.
- Menezes, Y. J. R. et al. (2016) Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v.33, n.6, p. 668-683.
- Ménézo, Y. et al. (2013) New insights into human pre-implantation metabolism in vivo and in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 30: 293-303.
- Mingoti, G.Z. et al. (2009) Influence of macromolecule supplementation and gaseous atmosphere on bovine oocyte maturation. **Zygote** 17: 321-328.
- Mingoti, G.Z. et al. (2011) The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 47:361–7.
- Mitchell, J.A., Yochim, J.M., (1968) Measurement of intrauterine oxygen tension in the rat and its regulation by steroid hormones. **Endocrinology** 83: 701–705.
- Miyamura, M. et al. (1995) Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. **Theriogenology** 43:282.

- Morin, S. J. (2017) Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O₂ in extended culture represent the most physiologic system? **Journal of assisted reproduction and genetics** 34: 309-314.
- Nabenishi, H. et al. (2012) The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Mol Reprod Dev** 79: 31–40.
- Nedambale, T.L. et al. (2004) Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology** 62:437–49.
- Niemann, H.; Wrenzycki, C. (2000) Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology** 53: 21–34.
- Parchment, R.E. (1991) Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free-radicals, polyamines, and other cytotoxic agents. **In Vivo** 5:493-500.
- Patrizio, P. et al. (2007) Molecular methods for selection of the ideal oocyte. **Reproductive BioMedicine Online** 15: 346–353.
- Perreault, S.D. et al. (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Dev Biol** 125: 181-186.
- Pinyopummintr, T.; Bavister, B.D. (1995) Minimum energy substance requirement for early cleavage stages of bovine embryo development. **Theriogenology** 43: 299.
- Racedo, S.E. et al. (2009). Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction, fertility, and development** 21:738-748.
- Rahman, M.B. et al. (2014) Altered chromatin condensation of heat-stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. **Reproduction, fertility, and development** 26:1107-1116.
- Rinaudo, P.F. et al. (2006) Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. **Fertil Steril** 86: 1252–1265.
- Ross, P. J.; Sampaio, R. V. (2018) Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. **Animal Reproduction** 15: 204–214.
- Ryan, H.E. et al. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. **EMBO J** 17:3005–15.
- Salilew-Wondim, D. et al. (2015) Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. **Plos One** 10: 1-31.
- Samanta, D.; Semenza, G. L. (2017) Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. **Redox Biology** 13: 331–335.

Sampaio, R. V. (2015) **Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos**. Dissertação (Doutorado) - USP, Pirassununga p. 128.

Santos, F. et al. (2003) Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Curr. Biol.** 13: 1116-1121.

Semenza, G. (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. **Biochem Pharmacol** 64:993–8.

Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 3:721–32.

Shi, Y.; Whetstine, J. R. (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. **Molecular cell** 25: 1–14.

Silva C.M.G et al. (2011) Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 34: 233-242.

Simon, M.C.; Keith, B. (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9: 285–296.

Skiles, W. M. et al. (2018) Oxygen-induced alterations in the expression of chromatin modifying enzymes and the transcriptional regulation of imprinted genes. **Gene expression patterns** 28: 1-11.

Smith, K. A. et al. (2017) Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. **Redox Biology** 13: 228–234.

Sirard M. A. (2010) Activation of the embryonic genome. **Soc Reprod Fertil** 67: 145–158.

Sirard, M. A. (2012) Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals** 47: 148–155.

Sudano, M.J. et al. (2011) Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology** 75:1211-1220.

Takahashi, Y.; Kanagawa, H. (1998) Effect of Oxygen Concentration in the Gas Atmosphere during In Vitro Insemination of Bovine Oocytes on the Subsequent Embryonic Development In Vitro. **Journal of Veterinary Medical Science** 60: 365–367.

Tatemoto, H. et al. (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biol Reprod** 71: 1150–1157.

Telford NA, et al. (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev** 26: 90–100.

Ufer, C. et al. (2010) Redox Control in Mammalian Embryo Development. **Antioxidants & Redox Signaling** 13: 833–875.

Umaoka, Y. et al. (1992) Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development** 31: 28–33.

Van Der Knaap, J. A.; Verrijzer, C. P. (2016) Undercover: Gene control by metabolites and metabolic enzymes. **Genes and Development** 30: 2345–2369.

Ventura-Juncá, P. et al. (2015) In vitro fertilization (IVF) in mammals: Epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. **Biological Research** 48: 1–13.

Watson, A. et al. (2000) Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biol. Reprod.** 62: 355–364.

Wossidlo, M. et al. (2011) J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature communications** 2: 241.

Wrenzycki, C. et al. (2001) Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biology of Reproduction** 65, 309–317.

Wrenzycki, C. et al. (2001) Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction** 16: 893–901.

Wrenzycki, C.; Niemann, H. (2003) Epigenetic reprogramming in early embryonic development: Effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reproductive BioMedicine Online** 7: 649–656.

Wright, R.W et al. (1976) In vitro culture of embryos from adult and prepuberal ewes **J. Anim. Sci.** 42: 912-917.

Wu, X. et al. (2011) Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. **Zygote** 19: 31-45.

Yang, H.W. et al. (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Hum Reprod** 13: 998–1002.

Young, L.E. et al. (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod** 3:155-163.

Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG (1992) Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. **Mol Reprod Dev** 31:68-71.

Yoshida, M. et al. (1993) Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biol Reprod** 49:89-94.