



Universidade Norte do Paraná

UNOPAR

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO MOMENTO
DA CLIVAGEM NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA E NO
PERFIL DE METILAÇÃO DA HISTONA H3K4 E DE
TRIMETILAÇÃO DA H3K27 EM BLASTOCISTOS BOVINOS**

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO MOMENTO
DA CLIVAGEM NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA E NO
PERFIL DE METILAÇÃO DA HISTONA H3K4 E DE
TRIMETILAÇÃO DA H3K27 EM BLASTOCISTOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Arapongas
2014

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO MOMENTO DA
CLIVAGEM NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA E NO PERFIL DE
METILAÇÃO DA HISTONA H3K4 E DE TRIMETILAÇÃO DA H3K27 EM
BLASTOCISTOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção em Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina [UEL] e Universidade Norte do Paraná [UNOPAR]), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Celso Koetz Junior
Universidade Norte do Paraná

Dra. Katia Cristina Silva Santos
Universidade Estadual de Londrina

Aprovada em ____ de _____ de ____.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela paciência e apoio incondicionais de sempre,
Ao querido professor Marcelo, pela orientação brilhante e amizade inestimável,

Ao professor Amauri A. Alfieri, por ter gentilmente nos cedido espaço e tornado possível a realização deste trabalho,

À Luciana, sem a qual esses dois anos não teriam valido a pena, pelos ensinamentos, pela fé em mim, pelos inúmeros significados de “apoio” que me ensinou, pela amizade pra vida toda e infinita parceria; À Camila Rosa, Camila Bizarro, Lívia, Marilu e Fabi, pelas risadas que fizeram dos meus dias mais divertidos; Ao Thiago, pela parceria e dedicação imensuráveis; Aos Gustavo, Kátia e Ferzinha, pelo enorme carinho e amizade de sempre; À Eleni e Alethéia, importantíssimas à realização deste trabalho e a todos os queridos pós-graduandos e estagiários do REPROA e da Virologia pela agradabilíssima convivência,

Ao Alexandre e demais funcionários do Frigomax, pelo fornecimento dos ovários, imprescindíveis ao experimento,

Aos professores Paulo Bayard e João Francisco (*in memoriam*), aos Marcos, Matheus e Charles e a todos os pós-graduandos e estagiários do Biorep (UFSM), por terem me apresentado de maneira tão agradável as Biotécnicas e despertado minha curiosidade, o que com certeza, me levou à concretização de mais esta etapa,

Ao Prof. Werner Okano e ao corpo docente do Mestrado, sempre muito atenciosos e prestativos,

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram e fizeram dessa jornada mais doce,

O meu “Muitíssimo Obrigada”!

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis.

LUNARDELLI, Paula Alvares. **Influência do diâmetro folicular e do momento da clivagem na produção embrionária e no perfil de metilação da histona H3K4 e de trimetilação da H3K27 em blastocistos bovinos.** 2014. 41p. Dissertação Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2014.

RESUMO

O diâmetro dos folículos dos quais os oócitos são obtidos e o tempo de início da primeira clivagem dos embriões possivelmente influenciam a competência e organização epigenética do desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial de desenvolvimento e a ocorrência de metilação simples na lisina 4 da histona H3 (H3K4me) e de metilação tripla na lisina 27 da mesma histona (H3K27me3) em blastocistos de clivagem precoce, intermediária e tardia a partir da fertilização de oócitos provenientes de folículos pequenos e grandes. Foram utilizados ovários de abatedouro (n = 991) de vacas *Bos indicus* para a punção dos folículos pequenos e grandes (P: ≤ 2 mm; G: 4-8 mm). Dos oócitos obtidos, 639 (G) e 699 (P) foram submetidos à maturação e fecundação *in vitro*. Os prováveis embriões foram cultivados e as taxas de início da clivagem foram avaliadas, separando nos grupos precoce (P; ≤ 28 h pós-FIV), intermediária (I; 28-34 h pós-FIV) e tardia (T; 34-54 h pós-FIV), sendo posteriormente avaliada a taxa de blastocistos. Destes, foram selecionados aleatoriamente 5 embriões por grupo, nos quais foi pesquisada, por imunofluorescência, a ocorrência de H3K4me e H3K27me3 aos 7 e 8 dias de cultivo. As taxas de clivagem foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos de clivagem tardia quando comparados aos de clivagem precoce, tanto para folículos de 4-8 mm (GT: 30% vs. GP: 19%), quanto para os ≤ 2 mm (PT: 33,8% vs. PP: 16,6%). As taxas de blastocistos do grupo de folículos de 4-8 mm (36,3%) foram maiores do que as dos folículos ≤ 2 mm (22,9%; $P < 0,05$), assim como a dos grupos de clivagem precoce e intermediária (45,3% e 33,8% vs. 13,5% de clivagem tardia; $P < 0,05$). À imunofluorescência, os blastocistos de todos os grupos apresentaram marcação para H3K4me, intensa no que pareciam ser células do trofotoderma (TE) e marcação fraca ou ausente no que pareciam ser células da massa celular interna (MCI). Todos os grupos apresentaram marcação para H3K27me3, sem apresentar diferenças distinguíveis à microscopia de imunofluorescência. Os dados do presente estudo demonstram que maiores taxas de blastocisto são obtidas com embriões que clivam em até 34 h pós-fertilização e em embriões oriundos de oócitos de folículos com 4 a 8 mm de diâmetro, indicando maior capacidade de se desenvolverem até o estágio de pré-implantação embrionária. Foi também demonstrada, pela primeira vez, a existência de metilação da H3K4 em blastocistos bovinos, presente em todos os embriões analisados. Além disso, a presença de trimetilação da H3K27 em todos os grupos do experimento sugere uma atuação das modificações de histonas estudadas nesta importante fase do desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Modificações de histonas. Tamanho folicular. Clivagem precoce. Clivagem tardia. Embriões.

LUNARDELLI, Paula Alvares. **Influence of follicular diameter and time of cleavage on embryo production and in the methylation of histone H3K4 and trimethylation of H3K27 in bovine blastocysts.** 2014. 41p. Dissertação Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, 2014.

ABSTRACT

The diameter of the follicles from which oocytes are obtained and the time of onset of the first embryonic cleavage possibly influence competence and epigenetic organization of early embryonic development. Our objective was to investigate the potential for development and the occurrence of simple methylation at lysine 4 of histone H3 (H3K4me) and triple methylation at lysine 27 of the same histone (H3K27me3) in early-, intermediate- and late-cleavage blastocysts from fertilization of oocytes from small and large follicles. We used slaughterhouse ovaries (n = 991) of *Bos indicus* cows to punch small and large follicles (P: ≤ 2 mm; G: 4-8 mm). From the oocytes recovered, 699 (P) and 639 (G) were subjected to in vitro maturation and fertilization. We cultivated the embryos and evaluated the rate of beginning of cleavage, separating them into early-cleavage (P, ≤ 28 h after IVF), intermediate-cleavage (I; 28-34h after IVF) and late-cleavage embryos (T; 34-54 h after IVF), and blastocyst rate. From these, 5 embryos were randomly selected per group, in which we investigated by immunofluorescence the occurrence of H3K4me and H3K27me3 at 7 and 8 days of culture. Cleavage rates were higher (P < 0.05) from late cleavage when compared to early cleavage, for both 4-8 mm follicles (GT: 30% vs. GP: 19%), and ≤ 2 mm follicles (PT: 33.8% vs. PP: 16.6%). The blastocysts rates from 4-8 mm follicles (36.3%) were higher than those from ≤ 2 mm follicles (22.9%, P < 0.05), as well as groups in which embryos cleaved early and intermediate (45.3% and 33.8% vs. 13.5% from late cleavage group, P < 0.05). At immunofluorescence, all blastocysts from all groups showed marks of H3K4me, which appeared to be intense in cells of trophectoderm (TE) and weak or absent in cells which appeared to be from the inner cell mass (ICM) marks. All groups showed marks for H3K27me3, without presenting distinguishable differences to immunofluorescence microscopy. Data from the present study demonstrate that higher rates of blastocyst are obtained from embryos that cleave up to 34 h post-fertilization and in embryos derived from oocytes from follicles of 4-8 mm in diameter, indicating higher ability in developing to the embryo pre-implantation stage. It was also demonstrated, for the first time, the existence of methylation of H3K4 in bovine blastocysts, present in all embryos analyzed. Furthermore, the presence of the trimethylation at H3K27 in all the experimental groups suggests a role of this studied histone modifications in this important phase of the embryonic development.

Key words: Histones modifications. Follicular size. Early cleavage. Late cleavage. Embryos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 DIÂMETRO FOLICULAR E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA	10
2.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	11
2.2.1 Epigenética.....	12
2.2.1.1 Metilação do DNA	12
2.2.1.2 Modificações de histonas	13
3 HIPÓTESE	17
4 OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GERAL.....	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5 MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	18
5.2 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CULTIVO <i>IN VITRO</i>	19
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
5.4 IMUNOFLOUORESCÊNCIA.....	21
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
6 RESULTADOS	23
7 DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A busca por indivíduos de alto potencial genético se faz cada vez mais necessária na cadeia produtiva da carne e do leite. Nesse sentido, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresenta-se como ferramenta de grande potencial multiplicador e disseminador de genética de alta qualidade e tem se tornado mais acessível nas últimas décadas. A PIVE é atualmente considerada uma biotécnica consolidada ⁽¹⁾, na qual o Brasil apresenta-se como líder absoluto e é responsável por 85% da produção mundial de embriões produzidos *in vitro* ⁽²⁾.

O conhecimento da fisiologia das espécies de produção possibilitou a obtenção de protocolos de PIVE relativamente eficientes para bovinos ⁽³⁾, suínos ⁽⁴⁾, ovinos ⁽⁵⁾ e caprinos ⁽⁶⁾. Contudo, os meios de cultivo *in vitro* ainda não são capazes de mimetizar exatamente as mesmas condições do desenvolvimento *in vivo*. Quando comparados aos gerados *in vivo*, os embriões PIV apresentam diferenças estruturais, metabólicas e morfológicas que resultam em menores taxas de desenvolvimento e prenhez ^(7,8,9). A falta de conhecimento de todos os eventos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial limita a melhoria dos sistemas de cultivo para que possam suprir completamente as necessidades embrionárias e gerarem ótimos índices de produção.

Os grandes avanços obtidos na PIVE nos últimos 50 anos são consequência de estudos realizados nas áreas de biologia celular, molecular e genética, que contribuíram para o esclarecimento de eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial ^(10,11,12). Entretanto, nos últimos 15 anos, pesquisas no campo da epigenética têm proporcionado o esclarecimento de eventos não explicados pela biologia celular e molecular, ou tampouco por mecanismos genéticos ^(12,13).

Além de contribuir para a produção embrionária mais eficiente, o melhor entendimento dos processos epigenéticos do desenvolvimento embrionário e diferenciação celular pode resultar em implicações clínicas tanto na medicina veterinária quanto na humana. Trata-se de uma potencial ferramenta para o tratamento e a prevenção de condições tais como obesidade ⁽¹⁴⁾, diabetes ⁽¹⁵⁾, infertilidade ⁽¹⁶⁾, autismo ⁽¹⁷⁾ e câncer ⁽¹⁸⁾.

Diante do exposto, após breve revisão da literatura, apresentaremos neste trabalho a investigação de marcações epigenéticas e a produtividade de blastocistos bovinos, considerando o diâmetro folicular de origem dos oócitos e a importância da velocidade de início da clivagem pós fertilização *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIÂMETRO FOLICULAR E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

Uma justificativa para a disparidade entre os resultados da produção *in vitro* e *in vivo* de embriões pode estar na origem dos oócitos utilizados (¹⁹). A maior parte dos folículos disponíveis nos ovários e puncionados nas sessões de Ovum pick up (OPU) é de tamanho pequeno, enquanto que, em eventos fisiológicos, o oócito a ser fecundado seria proveniente de um folículo dominante, de tamanho grande (²⁰).

Fisiologicamente os oócitos, adquirem a capacidade de completar a maturação nuclear e citoplasmática e se tornarem blastocistos ao longo da fase de crescimento folicular (^{8, 19, 21}). A retomada da maturação nuclear oocitária (meiose), ocorre em folículos com diâmetro a partir de 2 a 3 mm (²⁰). *In vitro*, contudo, há um estímulo de reinício da meiose no momento da aspiração, durante o qual ocorre a separação do oócito de suas células foliculares, permitindo assim que sejam estimulados folículos menores, ainda incapazes de completá-la. A fim de superar esta dificuldade, os protocolos de PIVE têm sido constantemente adaptados na tentativa de retardar a retomada da meiose enquanto ocorre uma maior capacitação do oócito (⁸).

No entanto, o diâmetro folicular parece não ser o único responsável pela total competência dos complexos *cumulus-oophorus* (CCOs) em se desenvolverem até blastocistos (^{22,23}). A capacidade oocitária de acumular RNA materno também se mostra de suma importância ao início do desenvolvimento do embrião. A transição das informações genéticas restringe-se completamente ao RNA mensageiro (RNAm) estocado, uma vez que a atividade transcricional do oócito é

reduzida a níveis muito baixos no momento em que atinge seu crescimento máximo (aproximadamente 110 μ m; ^{8,21,24}).

2.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O desenvolvimento dos mamíferos se inicia com a fusão entre espermatozoide e oócito. A partir de então, o controle é transferido gradativamente das proteínas maternas, estocadas enquanto oócito, para o novo genoma embrionário. Este processo é denominado transição materna-zigoto (TMZ) e leva ao início da atividade transcricional embrionária (²¹).

A quantidade de RNAm estocado está relacionada ao tempo de início da clivagem e às taxas de blastocisto, indicando maior capacidade de chegar às fases finais de desenvolvimento daqueles embriões que possuem maior estoque de RNAm e iniciam a clivagem mais rapidamente (^{25,21,23}).

Em bovinos, é expressiva a quantidade de oócitos, capazes de completar a maturação meiótica e clivar após a fertilização *in vitro*, que têm seu desenvolvimento interrompido em torno do estágio de 8-16 células. Este momento corresponde à ativação genômica do zigoto (AGZ), e embriões que não ultrapassam este estágio provavelmente apresentam falha na TMZ (^{19,26}).

A complexidade do processo de TMZ é devida ao envolvimento de remodelação de estrutura da cromatina, incluindo degradação de fatores gaméticos, demetilação de DNA e modificações de histonas (²⁴). Concomitantemente, ocorre a reprogramação da expressão gênica e uma série de eventos celulares e moleculares que regem os diversos acontecimentos necessários à manutenção do desenvolvimento e ao início do processo de diferenciação celular embrionária (^{27,24}).

2.2.1 Epigenética

O termo epigenética refere-se a mudanças herdáveis no fenótipo celular que ocorrem sem alterações na sequência do DNA, por meio de mecanismos como RNAs não-codificantes, metilação do DNA ou modificações nas histonas ⁽²⁸⁾, que são grandemente influenciadas pelo meio ⁽²⁹⁾.

2.2.1.1 Metilação do DNA

O mecanismo epigenético mais mencionado e conhecido atualmente é a metilação de DNA. Trata-se de um processo de transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina para as posições C5 dos resíduos de citosina contidos nos dinucleotídeos CpG ⁽³⁰⁾. Esta transferência é realizada por enzimas chamadas metiltransferases ⁽³¹⁾ e pode aumentar ou reduzir o nível de transcrição de um gene. Tal efeito, estimulante ou inibitório, depende de a metilação do DNA inativar um elemento regulatório positivo ou negativo ⁽³²⁾.

A metilação de DNA é essencial para a regulação da expressão dos genes *imprinted* ⁽³³⁾, da dosagem do cromossomo X em embriões de fêmeas mamíferas ⁽³⁴⁾ e da transcrição dos genes específicos de cada tecido ⁽³⁵⁾. O silenciamento de *transposons*, imprescindível para manter a integridade e estabilidade da estrutura cromossômica, também é mediado pela metilação do DNA ⁽³⁶⁾.

Imediatamente após a fecundação, os dois genomas gaméticos haploides e altamente especializados são combinados em uma única célula, e devem assim ser integrados e reprogramados de forma a permitir a aquisição da

pluripotência e posteriormente a diferenciação dos tecidos (^{37,24}). Assim, no início do desenvolvimento embrionário, as marcações de metilação gaméticas são apagadas e substituídas por marcações embriônicas (³⁸). Enquanto o genoma paterno é submetido à demetilação ativa durante as primeiras horas após a fecundação, o genoma materno é demetilado de forma passiva em cada ciclo mitótico (^{39,40}). Posteriormente, todo o genoma é submetido à metilação *de novo* para o estabelecimento do padrão de metilação de células somáticas embrionárias (⁴¹).

2.2.1.2 Modificações de histonas

No núcleo dos eucariotos, o nucleossomo é a unidade funcional da cromatina e corresponde à porção de aproximadamente 147 pares de bases nitrogenadas da dupla-fita de DNA enrolada em um octâmero de histonas. O octâmero é constituído por quatro pares de histonas (2A, 2B, H3 e H4) ligados a uma histona H1, cuja função acredita-se ser puramente estrutural (²⁴).

As histonas contidas no octâmero podem sofrer grande número de alterações pós-traducionais. Estas proteínas possuem caudas amino-terminais que podem projetar-se do seu próprio nucleossomo e estabelecer contato com os nucleossomos adjacentes, afetando a estrutura cromatínica global (⁴²). Tais modificações podem regular diretamente a estrutura cromatínica ou recrutar enzimas remodeladoras que promovem o reposicionamento nos nucleossomos (^{43,44}). As alterações de histonas podem não só influenciar a transcrição gênica como também afetar outros processos referentes ao DNA, como reparo, replicação e recombinação (^{45,46}).

As principais modificações pós-tradução de histonas em sua porção amino-terminal incluem acetilação, fosforilação, ubiquitilação, ADP-ribosilação e metilação. Esta última ocorre principalmente nas cadeias laterais dos aminoácidos lisina e arginina. Lisinas podem ser mono- (me), di- (me₂) ou trimetiladas (me₃), e argininas podem ser mono- ou dimetiladas (⁴³). Todas essas modificações são essenciais à regulação celular e aos eventos moleculares, incluindo remodelação de cromatina e expressão gênica (³⁸).

As modificações de histonas mais estudadas são a metilação e acetilação, catalisadas pelas metiltransferases e acetiltransferases, respectivamente. A acetilação de histonas é um processo reversível que parece neutralizar a carga positiva destas proteínas (⁴⁷), resultando em regiões de eucromatina permissivas à ligação de fatores de transcrição (^{48,49}).

A eucromatina é caracterizada pela abundância de histonas altamente acetiladas (como a H3K9ac e H4K12ac), histonas enriquecidas em lisinas 4 trimetiladas (H3K4me₃) e histonas variantes H3.3. A heterocromatina, por outro lado, possui tipicamente marcações metil repressivas (como a trimetilação da lisina 27 da histona 3 - H3K27me₃), que permitem modificações na cromatina e efeitos combinatórios como a comunicação com metilação de DNA (^{50,51}), levando à repressão transcricional e inativação (³⁸).

Estudos recentes demonstram que as H3K4me₂, H3K4me₃ e H3K27me₃ parecem estar relacionadas à reprogramação de células somáticas em oócitos. Embora a atividade transcricional seja reduzida conforme o crescimento oocitário, as metilações de H3K4 aumentam de oócitos imaturos (meioticamente incompetentes) para oócitos em estágio pré-ovulatório (meioticamente competentes; ^{53,54,55}).

Nos pronúcleos materno e paterno, as modificações de histonas são expressivamente diferentes das dos zigotos e sofrem mudanças dramáticas durante a TMZ. Após a fecundação, histonas hiperacetiladas são incorporadas ao genoma paterno e provavelmente contribuem para sua atividade transcricional relativamente mais alta comparada ao pronúcleo materno. No entanto, enquanto a di- e trimetilação da H3K27 estão presentes no pronúcleo materno, provavelmente com a função de proteger o genoma contra a demetilação ativa do DNA, elas não são detectadas no pronúcleo paterno (⁵⁵).

Estudos recentes têm demonstrado que os padrões de acetilação e metilação de diferentes porções das histonas sofrem alterações durante a embriogênese inicial. Os resultados apontam a grande importância da H3K27me3 e da H3K4me2 na regulação do desenvolvimento embrionário. Ambas estão presentes de maneira expressiva em regiões codificadoras dos genes de pluripotência Sox2, Oct4 e Sall4, promovendo sua ativação transcricional (⁵⁶). Sabe-se que a regulação da manutenção da pluripotência de células da massa celular interna (MCI) durante as primeiras clivagens e de células-tronco exercida pela H3K27me3 também se dá por meio da repressão de genes relacionados ao desenvolvimento e diferenciação celular (^{57,58}). À medida que as células sofrem diferenciação, os genes sofrem demetilação da H3K27 e passam a apresentar maior número de histonas acetiladas (⁵⁹).

A metilação da H3K4, diferentemente da maior parte das metilações de histonas, é uma marca epigenética tipicamente encontrada na eucromatina, que promove acessibilidade dos fatores de transcrição gênica (⁵⁰). Esta marca epigenética é fundamental para a viabilidade embrionária no período pré-implantação e exerce importante papel na regulação dos genes de pluripotência

(^{54,56}). O perfil global de monometilação da H3K4 sofre grandes alterações durante a maturação oocitária e desenvolvimento inicial embrionário, demonstrando que esta marca tem participação dinâmica e ativa na reprogramação epigenética embrionária (⁶⁰).

O cultivo *in vitro* também causa alterações permanentes na expressão gênica de embriões de diferentes espécies (^{61,62}). Metilação aberrante de DNA em regiões de controle *imprinting* foi observada em casos de cultivo *in vitro* e na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI; ^{63,64}). De maneira semelhante, os protocolos hormonais utilizados na superovulação demonstram causar perdas de metilação relacionada a genes *imprinted*, de maneira dose-dependente (⁶⁵).

Estes dados sugerem que fatores ambientais são cruciais para a regulação epigenética embrionária. Isto se dá por neste período ocorrerem alterações globais no cenário epigenético dos embriões e estas alterações são notadamente sensíveis às condições do meio no qual os embriões se encontram. Contudo, informações a respeito de alterações de histonas e sua importância no desenvolvimento embrionário são escassas, especialmente na espécie bovina.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a distribuição de monometilação da lisina 4 e da trimetilação da lisina 27 da histona H3, assim como a taxa de blastocistos de clivagem precoce, intermediária e tardia provenientes da fertilização de oócitos oriundos de folículos de até 2 mm e de 4 a 8 mm de diâmetro.

3 HIPÓTESE

A competência oocitária é influenciada pelo diâmetro folicular e embriões bovinos com clivagem precoce são mais aptos a se desenvolverem até o estágio de blastocisto. Tais eventos podem apresentar diferentes padrões de metilação da lisina 4 e trimetilação da lisina 27 da histona H3.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para um melhor entendimento do desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, considerando o padrão de metilação da histona H3, o diâmetro folicular e a velocidade de clivagem.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir, *in vitro*, embriões provenientes de folículos com até 2 mm de diâmetro e entre 4 e 8 mm de diâmetro.
- Comparar a taxa de desenvolvimento entre embriões cuja clivagem ocorreu até 28 horas e entre 34 e 54 horas pós fertilização *in vitro*.
- Analisar a distribuição de metilação da lisina 4 e trimetilação da lisina 27 da histona H3 no estágio de blastocisto do desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Companhia Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), a não ser quando especificado.

Foram produzidos embriões ao longo de 10 réplicas a partir de oócitos provenientes de folículos ≤ 2 mm e entre 4 e 8 mm de diâmetro de ovários de abatedouro.

5.1 RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA E MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Ovários de vacas zebuínas (*Bos indicus*; n = 991) foram coletados de abatedouro local e transportados em solução salina 0,9% a 30-35°C até o laboratório. Os CCOs foram aspirados de folículos de até 2 mm de diâmetro (n = 699) e de 4 a 8 mm de diâmetro (n = 639; mensurados utilizando uma régua gabarito como referência), utilizando-se agulhas hipodérmicas 21-gauges (30x8 mm) acopladas a seringas de 10 ml. Somente os CCOs circundados por um mínimo de 3 camadas de células do *cumulus* e com citoplasma homogêneo (graus 1 e 2; ⁶⁶) foram selecionados para a MIV. Grupos de 10 a 15 CCOs foram cultivados em 100 μ L de meio de maturação, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar e umidade saturada a 38.5°C, por 20 a 24 horas. O meio de maturação consistia de TCM 199 bicarbonato suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 5 μ g de hormônio luteinizante, 0,5 μ g de hormônio folículo estimulante, 1 μ g de estradiol, 2,2 μ g de piruvato e 50 μ g de gentamicina/mL de meio (In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP).

5.2 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV) E CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Os CCOs maturados foram lavados em meio tamponado com HEPES e transferidos para gotas de 100 μ L do meio de fecundação, que consistia em Tris-buffered medium (TBM) suplementado com 8 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos e 1 mM de glutamina (In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP).

Para a fecundação, sêmen de um único touro armazenado em nitrogênio líquido foi descongelado a 35°C e depositado em tubos tipo eppendorf contendo duas concentrações diferentes de Percoll (gradiente de Percoll 45% na parte superior e 90% na parte inferior) nos quais foram selecionados por centrifugação (12100 g, por 2 min). O sobrenadante (600 μ L) foi descartado e o pellet espermático foi ressuscitado em 300 μ L de meio de fecundação e homogeneizado. O sêmen foi novamente centrifugado (8127 g, por 45 segundos) e após o descarte do sobrenadante, a concentração espermática foi ajustada para a obtenção de uma concentração final de 1×10^6 spz vivos/gota de 10 a 15 CCOs.

Espermatozoides e CCOs foram co-incubados por 18 a 22 horas em meio de fecundação sob óleo mineral a 38.5°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Para o cultivo *in vitro*, os prováveis zigotos foram submetidos à remoção das células do *cumulus* por pipetagens sucessivas e foram incubados em meio SOF (synthetic oviduct fluid) suplementado com 8 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos sob óleo mineral a 38.5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

As taxas de clivagem foram avaliadas às 28 h, 34 h e 54 h pós-FIV (essa última, juntamente com a troca de 50% do meio SOF por SOF glicosado; In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP) e as taxas de blastocisto foram avaliadas (em relação aos prováveis zigotos cultivados e aos embriões clivados) nos dias 7 e 8 após a FIV.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os embriões foram divididos em seis grupos de acordo com o diâmetro folicular do oócito utilizado para FIV (≤ 2 mm de diâmetro: pequeno; 4-8 mm de diâmetro: grande) e com o momento de início da clivagem (≤ 28 h de cultivo: precoce; entre 28 e 34 h: intermediária e de 34 a 54 h: tardia), conforme segue: Grupo Pequeno Precoce – PP; Pequeno Intermediária – PI; Pequeno Tardia – PT; Grande Precoce – GP; Grande Intermediária – GI e Grande Tardia – GT. Foram calculadas as taxas de clivagem e blastocistos, e os embriões foram fixados no estágio de blastocisto aos 7 e 8 dias de cultivo e submetidos à imunofluorescência para detecção de H3K4me e H3K27me3, como ilustrado nas figuras 1 e 2.

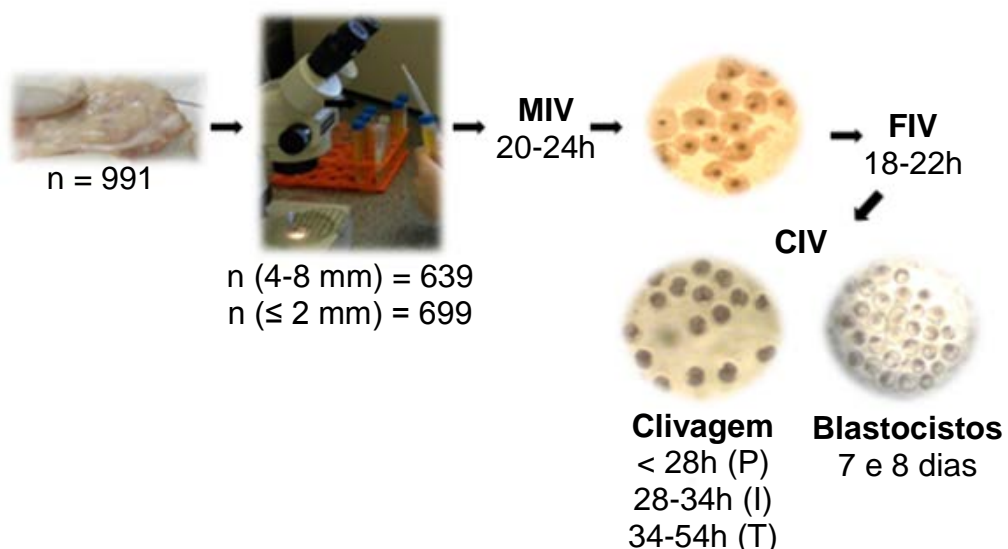


Figura1. Representação esquemática do delineamento experimental.

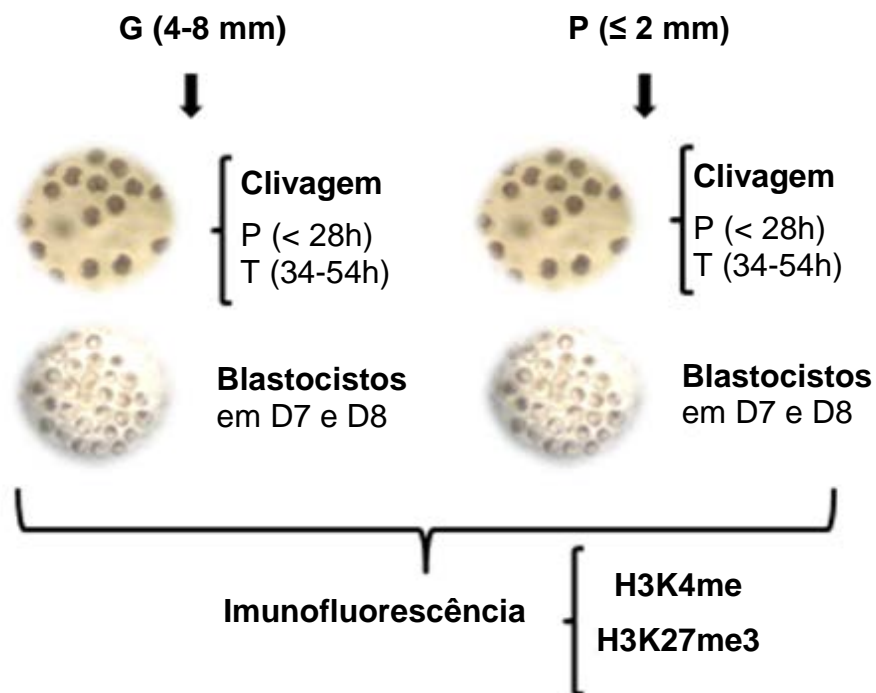


Figura2. Representação esquemática do delineamento experimental.

5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os blastocistos dos grupos clivagem precoce e tardia e folicúlos ≤ 2 mm e 4-8 mm foram primeiramente lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS), imersos em paraformaldeído 4% por 15 a 20 min, lavados novamente em PBS e armazenados a 4 °C em 0,5% de TritonX-100 em PBS com 0.3% de BSA para permeabilização celular.

Posteriormente, foram expostos a 37 °Celsius na solução de permeabilização e então lavados duas vezes, por 10 minutos cada, em solução de bloqueio (3% de BSA e 0,2% de Tween-20 em PBS) e expostos overnight a 4°C aos anticorpos primários policlonais de coelho anti-H3K4 metilada (Abcam, Cambridge,

Inglaterra; ab8895) e anti-H3K27 trimetilada (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha; 07-449), diluídos na concentração de 1:500 em solução de bloqueio.

As amostras foram então lavadas três vezes por 20 min cada em solução de bloqueio e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente na presença do anticorpo secundário caprino anti-coelho Alexa Flour 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) diluído na concentração de 1:1000. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes (20 min cada) em solução de bloqueio, a segunda com 10 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) em PBS para coloração do DNA.

Os embriões foram alocados em lâminas de microscópio com uma gota de Vectashield[®] (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e examinados por epifluorescência em microscópio com magnificação de 200x. As imagens foram capturadas com as mesmas configurações, utilizando-se uma câmera digital acoplada ao microscópio (marca), e individualmente armazenadas e salvas em formato TIFF.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem e blastocisto foram comparadas pelo teste de regressão logística por meio do software R ⁽⁶⁷⁾. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

A taxa de clivagem foi maior para os embriões provenientes de folículos de 4 a 8 mm de diâmetro (77,5%) em relação aos ≤ 2 mm de diâmetro (71,8%; $P < 0,05$).

O grupo de folículos de 4 a 8 mm apresentou maior taxa de blastocisto calculada em relação ao número de prováveis zigotos cultivados (28,1%) e maior taxa de blastocisto em relação aos embriões clivados (36,3%) quando comparadas à taxa do grupo de folículos ≤ 2 mm (16,4% e 22,9%, respectivamente; $P < 0,05$; Figura 3).

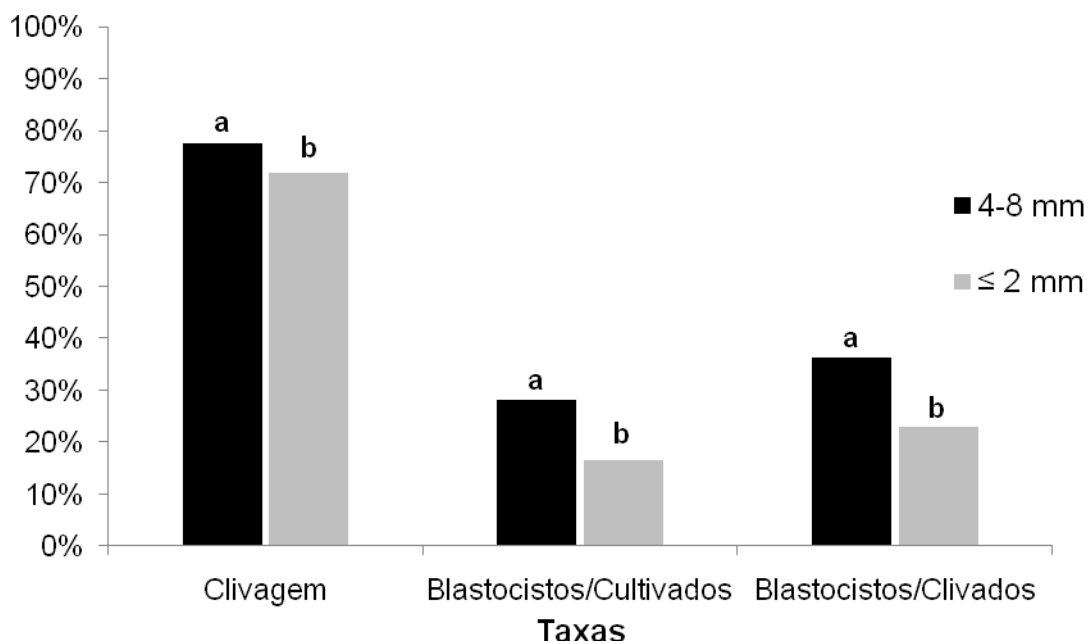


Figura 3. Taxas de clivagem e blastocisto de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de folículos ≤ 2 mm de diâmetro (P) e de 4 a 8 mm de diâmetro (G).

^{a, b} – Letras diferentes na mesma categoria indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

Na comparação entre o momento de início de clivagem, os embriões dos grupos precoce (P) e intermediária (I) apresentaram taxas de blastocisto

significativamente maiores (45,3% e 38,3% respectivamente; $P < 0,05$) quando comparados aos de clivagem tardia (T; 13,5%; Figura 4).

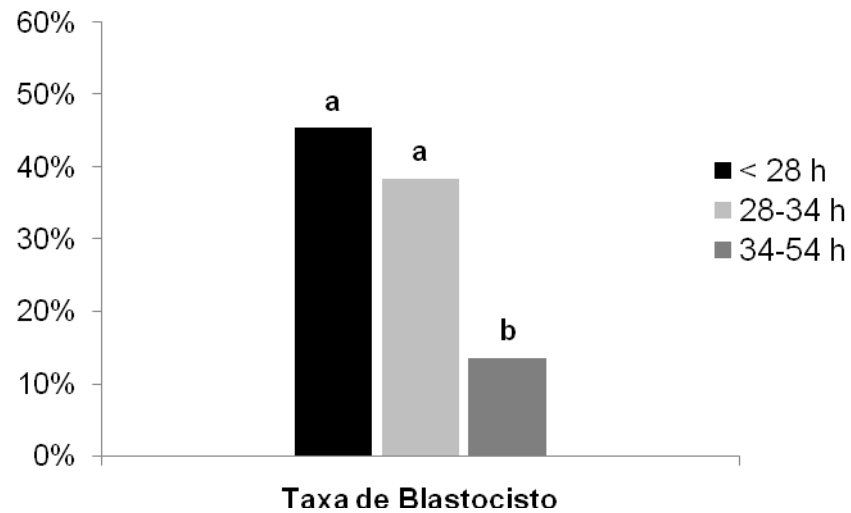


Figura 4. Taxa de blastocisto obtida a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro* de clivagem precoce (<28h; P), intermediária (28-34h; I) e tardia (34-54h; T).

^{a-b} – Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Quando analisadas as duas variáveis simultaneamente (diâmetro folicular e momento de início da clivagem), a taxa de clivagem foi maior nos grupos GT e PT (30,0% e 33,8%), enquanto que a taxa de blastocisto foi maior nos grupos GP (50,5%), GI (45,9%) e PP (40,2%), como demonstrado na Tabela 1 ($P < 0,05$).

Tabela 1. Taxas de clivagem e blastocisto após PIV de embriões bovinos utilizando-se oócitos provenientes de folículos grandes (4-8 mm; G) e pequenos (≤ 2 mm; P), de clivagem precoce (<28h; P), intermediária (28-34h; I) e tardia (34-54h; T).

Grupo	Oócitos n	Prováveis Zigotos Cultivados	Clivagem		Blastocistos	
			n	%	n	%
Grande Precoce			109	19,0 ^{cd}	55/109	50,5 ^a
Grande Interm.	639	573	163	28,4 ^b	74/163	45,4 ^a
Grande Tardia			172	30,0 ^{ab}	32/172	18,6 ^c
Peq. Precoce			112	16,6 ^d	45/112	40,2 ^{ab}
Peq. Interm.	699	675	145	21,5 ^c	44/145	30,3 ^b
Peq. Tardia			228	33,8 ^a	22/228	9,6 ^d
Total	1338	1248	929	74,4	272	29,22

^{a-d} – Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

À imunofluorescência, os blastocistos de todos os grupos apresentaram marcação para H3K4me (Figura 5) e H3K27me3 (Figura 6). Interessantemente, a H3K4me apresentou marcação intensa no que pareciam ser células do trofotoderma (TE), e marcação discreta ou ausente no que pareciam ser células da MCI.

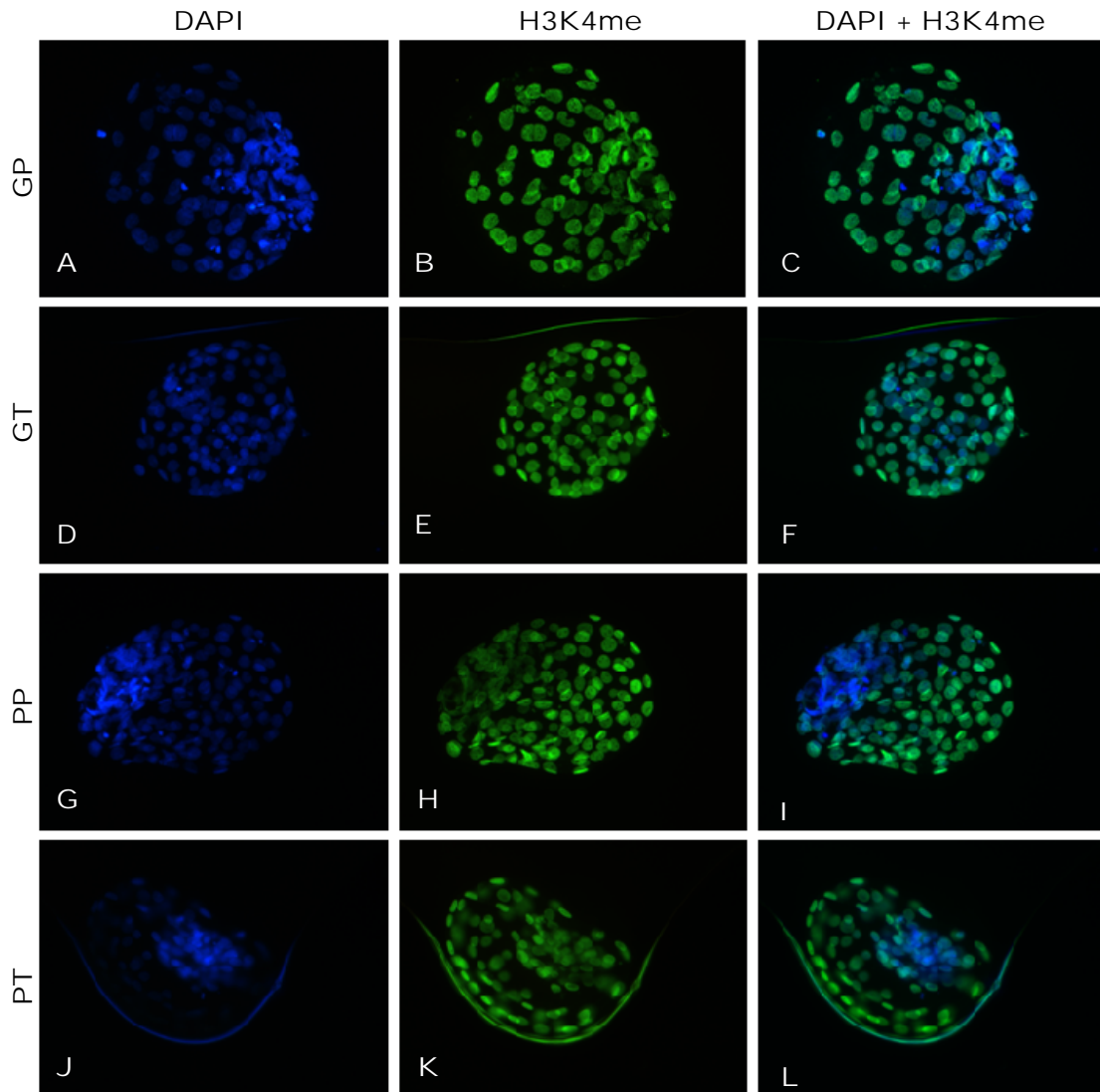


Figura 5. Padrão da monometilação da H3K4 em blastocistos bovinos de clivagem precoce (≤ 28 horas pós-FIV) e tardia (entre 34 e 54 horas pós-FIV), produzidos *in vitro* a partir de oócitos provenientes de folículos ≤ 2 mm e 4-8 mm de diâmetro.

A, D, G e J: Marcação com DAPI para realce dos núcleos embrionários dos grupos GP, GT, PP e PT, respectivamente. B, E, He K: Marcação do anticorpo anti-H3K4me em blastocistos dos grupos GP, GT, PP e PT, respectivamente. C, F, I e L: Sobreposição das imagens de marcação da H3K4me e do DAPI. Magnificação de 200 x.

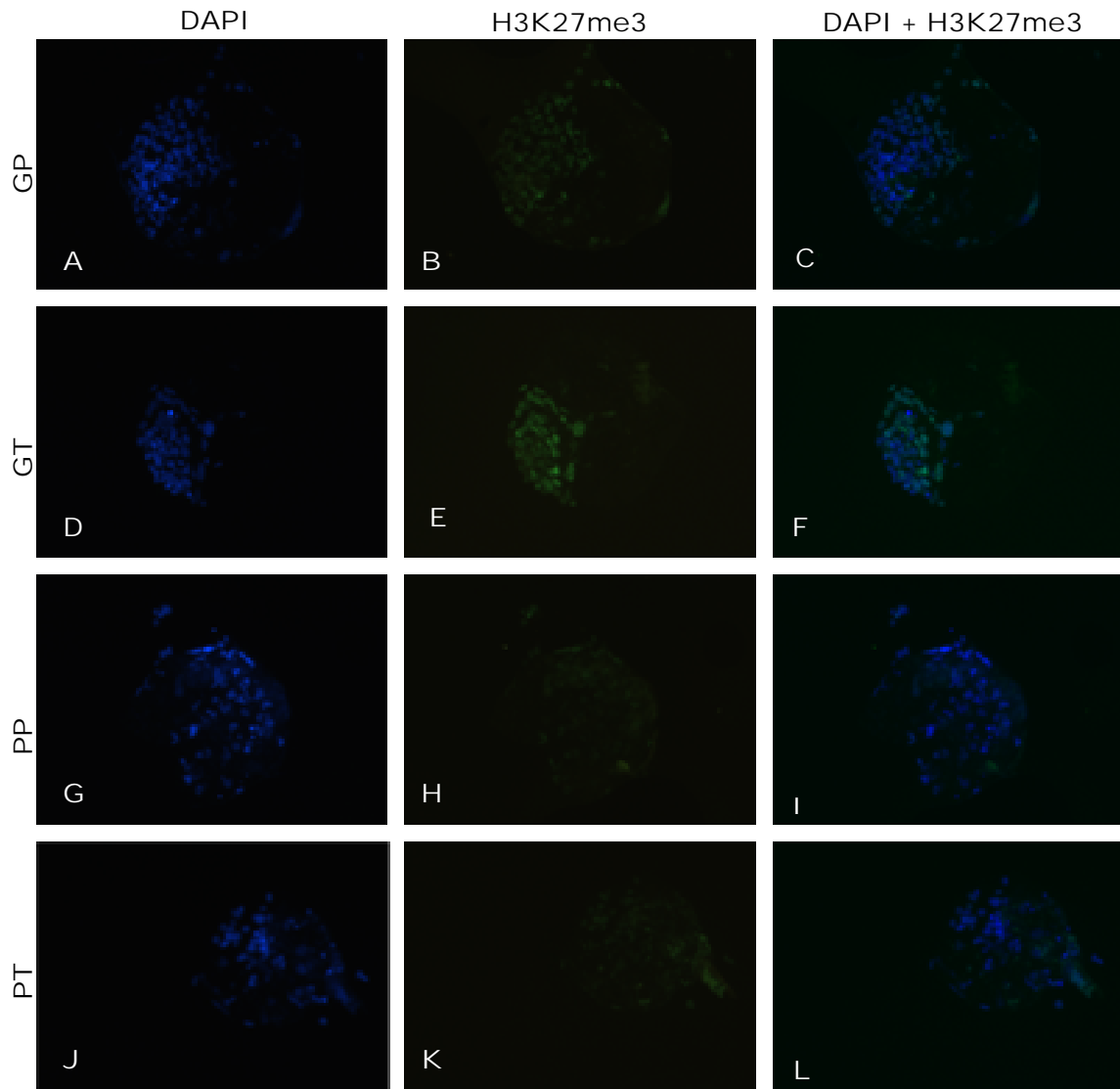


Figura 6. Padrão da trimetilação da H3K27 em blastocistos bovinos de clivagem precoce (≤ 28 horas pós-FIV) e tardia (entre 34 e 54 horas pós-FIV), produzidos *in vitro* a partir de oócitos provenientes de folículos ≤ 2 mm e 4-8 mm de diâmetro.

A, D, G e J: Marcação com DAPI para realce dos núcleos embrionários dos grupos GP, GT, PP e PT, respectivamente. B, E, H e K: Marcação do anticorpo anti-H3K27me3 em blastocistos dos grupos GP, GT, PP e PT, respectivamente. C, F, I e L: Sobreposição das imagens de marcação da H3K27me3 e do DAPI. Magnificação de 200 x.

7 DISCUSSÃO

O momento da clivagem analisado no presente estudo exerceu influência direta na taxa de blastocisto, que foi maior nos grupos em que os embriões clivaram mais cedo, independente do diâmetro folicular (GP: 50,5% vs. GT: 18,6% e PP: 40,2% vs. PT: 9,6% ou P: 45,3% vs. T: 13,5%). Resultados semelhantes foram obtidos por outro grupo de pesquisadores, que obtiveram taxas de 40% (clivagem até 30 horas pós-FIV) e 10% (clivagem 30-36 horas pós-FIV; ²²), em concordância com relatos anteriores (^{68,69,70}) e estudos nos quais embriões de clivagem tardia resultaram em menores taxas de blastocisto e de prenhez (^{71,27,72}).

As razões pelas quais os embriões de clivagem precoce têm maior viabilidade do que os de clivagem tardia não são completamente conhecidas, mas sabe-se que embriões que completam o primeiro ciclo celular de forma mais lenta possuem maior incidência de anormalidades cromossômicas e mixoploidia do que os que completam o ciclo mais rapidamente (^{71,72}). Além disso, embriões de clivagem tardia possuem redução na expressão do gene *Interferon tau*, envolvido no estabelecimento e sinalização do reconhecimento materno de prenhez em ruminantes, bem como no desenvolvimento da placenta (^{73,74,75}).

O fato de os grupos precoces e intermediários terem se comportado semelhantemente ($P > 0,05$; tabela 1) quanto às taxas de blastocisto, sugere que 34 horas após a fertilização é o momento mais interessante de analisar a clivagem para a predição do desenvolvimento embrionário até o estágio pré-implantação.

As taxas de blastocisto resultantes da fertilização dos oócitos provenientes de folículos de 4 a 8 mm (G: 36,3% ou GI 45,9% e GT 18,6%, considerando o tempo de clivagem) foram maiores ($P < 0,05$) do que a dos folículos

≤ 2 mm (P: 22,9% ou PI: 30,3% e PT: 9,6% levando em conta o tempo de clivagem; figura 3). A taxa de blastocisto do grupo GP, apesar de não ter sido estatisticamente diferente, numericamente também foi maior (50,5%) que a do grupo PP (40,2%). Esses resultados estão em discordância com os encontrados por Castilho et al. (⁷⁸), que não obtiveram diferença estatística, provavelmente por terem comparado taxas de blastocisto de embriões provenientes de folículos <5, de 5 a 7 e >7 mm.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os encontrados por Bastos et al. (²⁷), em experimento com embriões bovinos partenogênicos no qual a taxa dos blastocisto do grupo de folículos com 4-8 mm foi de 34,3% contra 18,9% do grupo de 1-2 mm. Também estão em concordância com os resultados encontrados por outros três grupos diferentes, confirmando a influência positiva do maior diâmetro folicular no desenvolvimento até o estágio de blastocisto defendida por vários autores (^{76,19,77}).

Possivelmente, a maior competência de oócitos oriundos de folículos de maior diâmetro sobre folículos maiores deve-se ao menor efeito inibitório exercido pelos folículos dominantes em relação aos folículos menores (⁷⁸). Adicionalmente, a capacidade oocitária de completar a maturação nuclear e citoplasmática e de suportar o desenvolvimento embrionário é adquirida progressivamente até a fase final de crescimento folicular (^{79,20}). Portanto, é possível que os oócitos provenientes de folículos maiores possuam maior quantidade de RNAm e, conseqüentemente, sejam mais aptos a concluir as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, ultrapassando com mais facilidade períodos críticos como a TMZ.

No presente trabalho, as taxas de clivagem foram maiores nos grupos de clivagem tardia quando comparados aos de clivagem precoce, tanto de folículos de 4 a 8 mm (GT: 30,0% vs. GP: 19,0%), quanto ≤ 2 mm (PT: 33,8% vs.

PP: 16,6%; $P < 0,05$; tabela 1), indicando que a maioria dos embriões inicia o primeiro ciclo de divisão celular de forma mais tardia. O mesmo foi relatado para embriões humanos fertilizados *in vitro*, cujas taxas de clivagem também foram maiores para embriões clivados tardiamente (96% 25-27 pós-FIV vs. 86%;⁸⁰).

Quando excluída a variável de tempo de clivagem (figura 3), os resultados do presente estudo apresentaram-se de acordo com os obtidos por Racedo et al. (⁸¹), uma vez que o grupo G atingiu uma taxa de clivagem estatisticamente maior (77,5%) que o grupo P (71,8%). Na comparação entre diâmetros foliculares, levando em conta o momento da clivagem, as taxas de clivagem entre os grupos GP vs. PP e GT vs. PT foram semelhantes, em concordância com os resultados obtidos por outros pesquisadores com embriões bovinos (⁶⁶) e suínos (⁸²).

O perfil epigenético dos embriões também foi analisado no presente estudo quanto à distribuição de H3K27me3 e H3K4me. À imunofluorescência, os blastocistos de todos os grupos (GP, GT, PP e PT) apresentaram marcações para H3K4me e H3K27me3 (figuras 4 e 5).

Sabe-se que a H3K27me3 inibe a transcrição gênica por meio do recrutamento do Complexo Repressor Polycomb (CRP) que entra em contato com a cromatina e promove o silenciamento do gene (⁸³). Segundo Ross et al. (⁸⁴), a H3K27me3 está fortemente presente em oócitos, com redução gradual até o estágio de 8 células, e posterior aumento de intensidade em mórulas e blastocistos. No presente trabalho, não foi observada diferença na intensidade da marcação da H3K27me3 entre MCI e TE em nenhum dos grupos avaliados, concordando com relatos prévios em que não houve assimetria da H3K27 entre MCI e TE de embriões bovinos PIV (⁸⁴). Entretanto, estudos realizados em blastocistos de camundongos

descreveram maior intensidade de trimetilação da H3K27 na MCI que no TE (^{85,86}), provavelmente devido à maior abundância de proteínas do grupo Polycomb observada na MCI em relação ao TE (⁸⁵). É possível que, assim como em embriões murinos, também exista algum tipo de assimetria na metilação entre MCI e TE em embriões bovinos, em estágios mais avançados do que os 7 ou 8 dias de desenvolvimento embrionário.

Além de regular a pluripotência, a H3K27me3 também possui importante participação no mecanismo de inativação do cromossomo X (⁸⁷). O RNA Xist, transcrito específico do X inativo e responsável por mediar o silenciamento do cromossomo X, recruta diretamente o complexo Polycomb para o X inativo, com posterior espalhamento do silenciamento por todo o cromossomo (⁸⁸). A ausência de diferença na marcação de H3K27me3 entre os blastocistos dos grupos avaliados no presente estudo sugerem não haver disfunções marcantes no processo de inativação do cromossomo X que explicariam a diferença entre a qualidade de embriões produzidos a partir de folículos ≤ 2 mm ou de 4 a 8 mm de diâmetro, nem entre os embriões de clivagem precoce e tardia.

No presente trabalho, a marcação da H3K4me não apresentou diferença entre os grupos, indicando uma semelhança epigenética entre embriões de clivagem precoce ou tardia e entre embriões provenientes de folículos grandes ou pequenos neste aspecto. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a detectar a H3K4me em blastocistos. Interessantemente, foi observada uma hipermetilação (H3K4me) das células do TE em comparação às da MCI dos blastocistos submetidos à imunofluorescência. Esta assimetria entre os dois tipos celulares pode significar que a monometilação da H3K4 apresenta funções diferentes da di- e da trimetilação desta mesma histona. Em núcleos de células

somáticas de mamíferos transplantadas em oócitos de anfíbios, as H3K4 me2 e me3 foram observadas de forma intensa em regiões reguladoras de genes de pluripotência, como Oct4 e Sox2 (⁵⁴). Por ser uma marcação tipicamente encontrada em promotores de genes que se encontram transcricionalmente ativos (⁸⁹), seria esperada uma maior quantidade da H3K4me3 em células da MCI. Desta forma, a maior intensidade de H3K4me observada nas células do TE de embriões bovinos PIV pode estar relacionada à ativação de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário ou, ainda, à repressão de genes de pluripotência.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as taxas de produção de blastocistos são mais altas em embriões PIV que clivam em até 34 horas pós-fertilização e em embriões provenientes de folículos de 4 a 8 mm quando comparados aos provenientes de folículos de até 2 mm de diâmetro. Dessa forma, o momento de início da clivagem e o diâmetro folicular apresentaram-se como excelentes critérios de seleção para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto e uma importante ferramenta à indústria da PIVE.

Os dados do presente estudo demonstraram, pela primeira vez, a presença de metilação da H3K4 em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, como também a presença de trimetilação da H3K27, sugerindo uma atuação dessas modificações de histonas no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos.

REFERÊNCIAS

- (1) THIBIER M. Transfers of both in vivo-derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *International Embryo Transfer Society Newsletter*, 2006, 24:11-19.
- (2) STROUD B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report*, 2012.
- (3) PONTES JHF, MELO-STERZA FA, BASSO AC, et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 2011, 75:1640-1646.
- (4) YOSHIOKA K, NOGUCHI M, SUZUKI C. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. *Animal Reproduction Science*, 2012, 131:23-29.
- (5) AMIRIDIS GS, CSEH S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 2012, 130: 152-161.
- (6) RODRÍGUEZ-DORTA N, COGNIE Y, GONZÁLES F, et al. Effect of co-culture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 2007, 68:908-913.
- (7) CROSIER AE, FARIN PW, DYKSTRA MJ, et al. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 2000, 62:1459-1465.
- (8) FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 2003, 78:203-216.
- (9) SUDANO MJ, SANTOS VG, TATA A, et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*, 2012, 87:130.
- (10) GRISART B, MASSIP A, DESSY F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1994, 101:257-264.
- (11) PLANTE L, KING WA. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1994, 11:515-529.
- (12) VERONA RI, MANN MR, BARTOLOMEI MS. Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2003, 19:237-259.

- (13) FARTHING CR, FICZ G, NG RK, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genetics*, 2008, 4:e1000116.
- (14) SPENCER, SJ. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. *Frontiers in Neuroscience - Neuroendocrine Science*, 2013, 7:144.
- (15) JUFVAS A, SJÖDIN S, LUNDQVIST K, et al. Global differences in specific histone H3 methylation are associated with overweight and type 2 diabetes. *Clinical Epigenetics*, 2013, 5:15.
- (16) DADA R, KUMAR M, JESUDASAN R, et al. Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2012, 29:213-223.
- (17) SINISCALCO D, CIRILLO A, BRADSTREET JJ, et al. Epigenetic findings in autism: new perspectives for therapy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013, 10:4261-4273.
- (18) KIM JG, PARK MT, HEO K, et al. Epigenetics meets radiation biology as a new approach in cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14:15059-15073.
- (19) LEQUARRE A-S, VIGNERON C, RIBAUCCOUR F, et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *theriogenology*, 2005, 63:841-859.
- (20) GONÇALVES PBD, BARRETA MH, SANDRI LR, et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2007, 31:212-217.
- (21) PATEL OV, BETTEGOWDA A, IRELAND J, et al. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, 2007, 133:95-106.
- (22) HUMBLLOT P, HOLMP P, LONERGAN P, et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 2005, 63:1149-1166.
- (23) CAIXETA ES, DODE MAN. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. *Veterinária e Zootecnia*, 2010, 17:8-18.
- (24) LI L, LU X, DEAN J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34:919-938.
- (25) GUTIÉRREZ-ADÁN A, RIZOS D, FAIR T, et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction and development*, 2004, 68:441-448.
- (26) SIRARD MA, RICHARD F, BLONDIN P, et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 2006, 65:126-136.

- (27) BASTOS GM, GONÇALVES PBD, BORDIGNON V. Immunolocalization of the high-mobility group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75:282-290.
- (28) BERGER SL., KOUZARIDES T, SHIEKHATTAR R, et al. An operational definition of epigenetics. *Genes and Development*, 2009, 23:781-783.
- (29) RIGGS AD, MARTIENSSEN RA, RUSSO VEA. Introduction. In VEA. RUSSO et al. (ed.) *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (ed.), Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996 p.1.
- (30) ABDALLA H, YOSHIZWA Y, HOCHI S. Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55:356-360.
- (31) JIN B, ROBERTSON KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 754:3-29.
- (32) JONES PA, TAKAI D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293:1068-1070.
- (33)** WILKINS JF. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends in Genetics*, 2005, 21:356-365.
- (34) BASU R, ZHANG LF. X chromosome inactivation: a silence that needs to be broken. *Genesis*, 2011, 49:821-834.
- (35) CHATTERJEE R, VINSON C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819:763-770.
- (36) YAGI S, HIROSAWA M, SHIOTA K. DNA methylation profile: a composer-, conductor-, and player-orchestrated Mammalian genome consisting of genes and transposable genetic elements. *Journal of Reproduction and Development*, 2012, 58:265-273.
- (37) MEEHAN RR. DNA methylation in animal development. *Seminar in Cell and Developmental Biology*, 2003, 14:53-65.
- (38) RIVERA RM, ROSS JW. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2013, 113:423-432.
- (39) HAAF T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006, 310:13-22.
- (40) TOKORO M, SHIN SW, NISHIKAWA S, et al. Deposition of acetylated histones by RNAPII promoter clearance may occur at onset of zygotic gene

- activation in preimplantation mouse embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 2010, 56:607-615.
- (41) BOURC'HIS D, LE BOURHIS D, PATIN D, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Current Biology*, 2001, 11:1542-1546.
 - (42) BANNISTER AJ, KOUZARIDES T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 2011, 21:381-395.
 - (43) KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128:693-705.
 - (44) CHAMPAGNE KS, KUTTELADZE TG. Structural insight into Histone Recognition by the ING PHD fingers. *Current Drug Targets*, 2009, 10:432-441.
 - (45) STUCKI M, CLAPPERTON JA, MOHAMMAD D, et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA doublestrand breaks. *Cell*, 2005, 123:1213-1226.
 - (46) HANSEN KH, BRACKEN AP, PASINI D, et al. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nature Cell Biology*, 2008, 10:1291-1300.
 - (47) DION MF, ALTSCHULER SJ, WU LF, et al. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102:5501-5506.
 - (48) MARGUERON R, TROJER P, REINBERG D. The key to development: Interpreting the histone code. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2005, 15:163–176.
 - (49) CICCONE DN, TAIPING C. Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics*, 2009, 4:216-220.
 - (50) BERNSTEIN BE, MIKKELSEN TS, XIE X, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006, 125: 315-326.
 - (51) HASHIMOTO H, VERTINO PM, CHENG X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, 2010, 2:657-669.
 - (52) SUGANUMA T, WORKMAN JL. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80:473-499.
 - (53) KAGEYAMA SI, LIU H, KANEKO N, et al. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, 2007, 133:85-94.
 - (54) SENEDA MM, GODMANN M, MURPHY B, et al. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. *Reproduction*, 2008, 135:829-838.

- (55) ANDREU-VIEYRA C, CHEN R, AGNO JE, et al. MLL2 Is Required in Oocytes for Bulk Histone 3 Lysine 4 Trimethylation and Transcriptional Silencing. *PLoS Biology*, 2010, 8: e1000453.
- (56) FEIL R. Epigenetic asymmetry in the zygote and mammalian development. *International Journal of developmental Biology*, 2009, 53:191-201.
- (57) MURATA K, KOUZARIDES T, BANNISTER AJ, et al. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics and Chromatin*, 2010, 3:4.
- (58) LEE TI, JENNER RG, BOYER LA, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006, 125:301-313.
- (59) SURFACE LE, THORNTON SR, BOYER LA. Polycomb Group Proteins Set the Stage for Early Lineage Commitment. *Cell Stem Cell*, 2010, 7:288-298.
- (60) BOGLIOTTI YS, FERRÉ LB, HUMPAL DJ, et al. 68 epigenetic remodeling of histone 3 marks during bovine pre-implantation development. *Reproduction, Fertility and Development*, 2013, 26:148.
- (61) CORCORAN D, FAIR T, PARK S, et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction*, 2006, 131:651–660.
- (62) FERNÁNDEZ-GONZALEZ R, RAMIREZ MA, PERICUESTA E, et al. Histone modifications at the blastocyst Axin1(Fu) locus mark the heritability of in vitro culture-induced epigenetic alterations in mice. *Biology of Reproduction*, 2010, 83:720–727.
- (63) MORGAN H, SANTOS F, GREEN K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 2005, 1:47-58.
- (64) MARKET-VELKER BA, DENOMME MM, MANN MRW. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. *Biology of Reproduction*, 2012, 86:1-16.
- (65) MARKET-VELKER BA, ZHANG L, MAGRI LS, et al. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Human Molecular Genetics*, 2010, 19:36-51.
- (66) SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 2001, 67:37-43.
- (67) R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2013, Vienna, Austria. Available from: <<http://www.R-project.org/>>.
- (68) LONERGAN P, RIZOS D, GUTIÉRREZ-ADAN A, et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.

- Reproduction in Domestic Animals, 2003, 38:259–267. Domestic Animals, 2003, 38:259–267.
- (69) LECHNJAK D, PERS-KAMCZYC E, PAWLAK P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproduction Biology*, 2008, 8:23-42.
- (70) ISOM SC, LI R, WHITWIRTH KM, et al. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the *in vitro* developmental potential of porcine embryos derived from *in vitro* fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79:197-207.
- (71) MAGLI MC, GIANAROLI L, FERRARETTI AP, et al. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and Sterility*, 2007, 87:534-541.
- (72) SUGIMURA S, AKAI T, HASHIYADA Y, et al. Promising System for Selecting Healthy *In Vitro*–Fertilized Embryos in Cattle. *PLoS One*, 2012, 7:e36627.
- (73) IMAKAWA K, ANTHONY RV, KAZEMI M, et al. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoctoderm. *Nature*, 1987, 330:377-379.
- (74) ROBERTS RM. Interferon-tau and pregnancy. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1996, 16: 271-273.
- (75) SOUSA PA, KING T, HARKNESS L, et al. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction*, 2001, 65:23-30.
- (76) LONERGAN P, KHATIR H, PIUMI F, et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1999, 117:159-167.
- (77) HAN Z-B, LAN GC, WU YG, et al. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus–oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, 2006, 132:749-758.
- (78) CASTILHO C, ASSIS GS, GARCIA JM. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2007, 59:288-294.
- (79) EPPIG JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 2001, 122:829-838.
- (80) STEIN AC. Avaliação dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* com estimulação ovariana. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, 83p.

- (81) RACEDO SE, WRENSYCKI C, HERRMENN D, et al. Effects of follicle size and stages of Maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75:17-25.
- (82) KOHATA C, IZQUIERDO-RICO MJ, ROMAR R, et al. Development competence and relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts. *Theriogenology*, 2013, *in press*: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.023
- (83) SCHUETTENGRUBER B, CHOURROUT D, VERVOORT M, et al. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 2007, 128:735-745.
- (84) ROSS PJ, RAGINA NP, RODRIGUEZ RM, et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*, 2008, 136:777-785.
- (85) ERHARDT S, SU IH, SCHNEIDER R, et al. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development*, 2003, 130:4235-4248.
- (86) DAHL JA, REINER AH, KLUNGLAND A, et al. Histone h3 lysine 27 methylation asymmetry on developmentally-regulated promoters distinguish the first two lineages in mouse preimplantation embryos. *PLoS One*, 2010, 5:e9150.
- (87) OKAMOTO I, OTTE AP, ALLIS CD, et al. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004, 303:644-649.
- (88) MOREY C, AVNER P. The Demoiselle of X-Inactivation: 50 Years Old and As Trendy and Mesmerising As Ever. *PLoS Genetics*, 2011, 7: e1002212.
- (89) BENEVOLENSKAYA EV. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. *Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 85:435-443.