

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITARIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Modificações pós traducionais de histonas de
embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes
fases do desenvolvimento Inicial**

Acadêmica: Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira

Aquidauana – MS
Novembro/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITARIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Modificações pós traducionais de histonas de
embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes
fases do desenvolvimento Inicial**

Acadêmica: Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira

Orientadora: Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana – MS

Novembro/2017

F442m Ferreira, Mariane Gabriela Cesar Ribeiro

Modificações pós traducionais de histonas de embriões
bovinos produzidos in vitro em diferentes fases do
desenvolvimento inicial/Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira.
Aquidauana, MS: UEMS, 2017.

41p. ; 30cm.

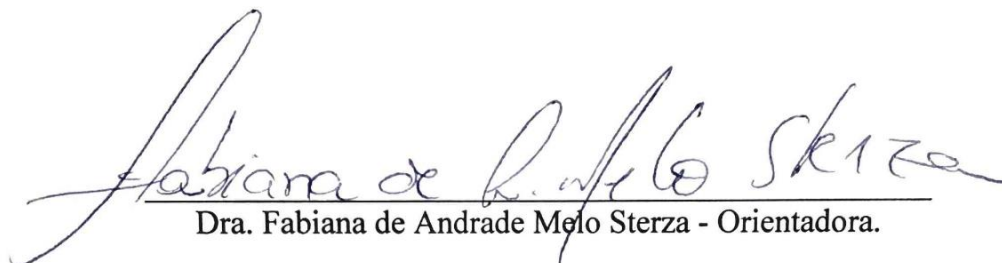
Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual
de Mato Grosso do Sul, 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza.

MARIANE GABRIELA CESAR RIBEIRO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

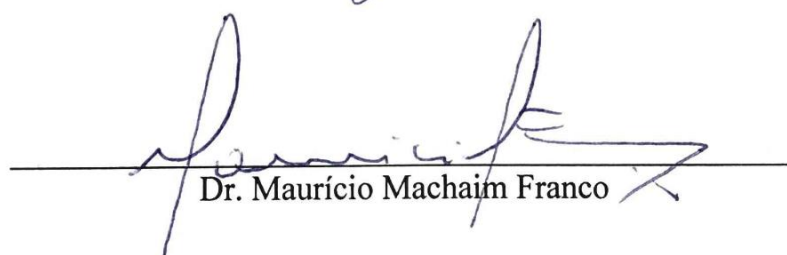
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/05/2017.



Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza - Orientadora.



Dr. André Luiz Julien Ferraz



Dr. Maurício Machaim Franco

**Cantai ao Senhor um cântico novo, porque ele tem feito maravilhas; a sua
destra e o seu braço santo lhe alcançaram a vitória (Salmo 98. vs1)**

Ao meu Filho José Evandro
Por desde o ventre já me compreender e
dar coragem para continuar em busca
dos objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro Lugar agradeço a DEUS, pela graça de poder acordar todos os dias e ter disposição para poder cumprir todos os legados que ele me reserva.

À minha mãe que sempre me apoiou muito em todas as etapas da minha vida, com muito carinho e dedicação, sem medir esforços para estar do meu lado, pelas orações que sempre me cuidaram, muitas vezes de longe, mas com todo amor do mundo. Também ao meu marido, companheiro e acima de tudo amigo, que também não mede esforços para estar comigo, compreendendo cada madrugada em claro, cada dia cheio de atividades que foram necessários para a conclusão dessa etapa. Ao meu pequeno José, meu filho que tão pequeno me acompanhou nessa fase final, que é a minha felicidade depois de um dia cansativo, meu combustível, é a razão para eu enfrentar cada batalha. As tios e primos que de longe e de perto me apoiaram e contribuíram com todo o incentivo do mundo.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós Graduação em Zootecnia e todos os professores e funcionários que me deram suporte e apoio para que fosse possível a conclusão desse curso.

À Minha Orientadora Fabiana por todo o conhecimento transmitido, crescimento profissional e pessoal, pelas palavras de carinho, apoio e pela compreensão que sempre me dedicou. A tenho como um exemplo profissional e principalmente pessoal, por ser essa pessoa maravilhosa que está sempre disposta a ajudar, Muito obrigada!

À Mirela, por todo o que ensinou, por me ajudar com a coleta de dados, amostras e análise dos resultados a tempo, pelos sempre bons conselhos e sempre estar disposta a ajudar em qualquer coisa sobre qualquer assunto, sempre pronta para estender a mão, em qualquer situação.

À Equipe GENTRA, Wilian, Christopher, Janaína, Jéssica, Carol, Carol Bini, Dani, Giovanna, Elielton, Henrique, Silvio, Vitória, Lucas, pelo companheirismo do dia a dia, as idas no frigorífico, as boas risadas que tornam o nosso dia mais leve e fazem esquecer um pouco dos problemas da vida.

Ao Ralf Poehland e ao Leibniz institute For Farm Animal Biology por transmitir seus conhecimentos e não medir esforços em nos ajudar com análises e resultados.

Aos Membros da banca de qualificação, Professores Splinter, Dalton e Carolina por aceitarem me auxiliarem nesse trabalho e a correria para entregar o mesmo. Além de fornecerem importantes contribuições para este trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Dr. Maurício, Professor Dr. Splinter, Profesora Dra. Aya e Dra. Alessandra, por aceitarem o convite e dedicarem o seu tempo para contribuir com este trabalho.

A agencias de fomentos CAPES, CNPq e Fundect, por financiar a pesquisa.

A todos que de alguma maneira colaboraram para que tudo ocorresse bem, e agora termine bem.

MEU SINCERO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
1. Introdução	3
2. Objetivo	4
3. Desenvolvimento de embriões pré-implantação	4
4. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	7
5. Gargalos da PIVE	9
6. Referências	9
CAPÍTULO 2 – Revisão de Literatura (Animal Reproduction)	15
Influência dos sistemas de produção <i>in vitro</i> de embriões sobre mecanismos epigenéticos	15
Resumo	15
Abstract	15
Introdução	16
Modificações pós-traducionais de histonas (MPTs)	17
Modificações epigenéticas em gametas e embriões	19
Efeitos ambientais sobre as marcas epigenéticas do desenvolvimento de embriões pré-implantação	22
Considerações finais.....	24
Referências	24
CAPÍTULO 3 – Artigo Científico (Theriogenology).....	30
Profile of H3K4me3 and the global methylation of H3K9 from bovine embryos produced <i>in vitro</i> at different stages of development.....	30
Abstract	30
1. Introduction.....	31
2. Materials and methods	32
<i>In vitro</i> embryo production.....	32
<i>Immunofluorescence Analysis</i>	33
<i>Statistical analyzes</i>	34
3. Results	35
4. Discussion	37
5. References	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO. IETS (1998) 6

FIGURE 1: SIGNAL INTENSITY OF H3K4ME3 IN PRE-IMPLANTATION BOVINE EMBRYOS AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT. A: IMAGES OF H3K4ME3 FLUORESCENCE IN PRE-IMPLANTATION EMBRYOS. B: CHART OF VALUES FOR PIXEL COUNT, LOWERCASE LETTERS DIFFER BY 5% PROBABILITY (SCOTT-KNOTT). MO: MORULA; BI: INITIAL BLASTOCYST; BL: BLASTOCYST; BX: EXPANDED BLASTOCYST; BN: BLASTOCYST IN HATCHING; BE: BLASTOCYST HATCHED 35

FIGURE 2: SIGNAL STRENGTH OF THE GLOBAL METHYLATION OF H3K9 IN PRE-IMPLANTATION BOVINE EMBRYOS AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT. A: IMAGES OF H3K9ME FLUORESCENCE IN PRE-IMPLANTATION EMBRYOS. B: CHART OF VALUES FOR PIXEL COUNT, LOWERCASE LETTERS DIFFER BY 5% PROBABILITY (SCOTT-KNOTT). BI: INITIAL BLASTOCYST; BL: BLASTOCYST; BX: EXPANDED BLASTOCYST; BN: BLASTOCYST IN HATCHING; BE: BLASTOCYST HATCHED 36

FIGURE 3: COMPARISON OF H3K4ME3 AND OVERALL METHYLATION OF H3K9 IN EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENTAL STAGES. * $P < 0.05$. BI: INITIAL BLASTOCYST; BL: BLASTOCYST; BX: EXPANDED BLASTOCYST; BN: BLASTOCYST IN HATCHING; BE: HATCHED BLASTOCYST 37

RESUMO

Modificações pós-traducionais de histonas participam da regulação da expressão gênica durante a embriogênese. A H3K4me3 está envolvida com a permissão da transcrição gênica, enquanto a metilação global da H3K9 está envolvida com a repressão gênica. O objetivo do presente estudo foi caracterizar as modificações H3K4me3 e metilação global da H3K9 durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Os embriões foram produzidos *in vitro* e acondicionados em diferentes estágios de desenvolvimento para a investigação das referidas modificações de histonas pela análise de Imunofluorescência sob microscopia confocal. Em todas as fases de desenvolvimento investigadas, tanto a H3K4me3 quanto a metilação global da H3K9 estavam presentes. Antes do estágio de blastocisto inicial (Bi) foi observada maior quantidade da metilação global de H3K9 do que de H3K4me3, situação invertida após o referido estágio. No estágio de Bi não foi observada diferença estatística entre as marcas epigenéticas estudadas, sugerindo um estado de preparação dos embriões para um período de grandes modificações e diferenciação celular. Essas marcas podem estar relacionadas com a regulação de pluripotência das células nesse período. A fase de blastocisto em eclosão foi a que apresentou maior atividade de H3K4me3, sugerindo que a eclosão do blastocisto demanda alta atividade gênica. Conclui-se que a H3K4me3 e a metilação global de H3K9 são muito importantes para o desenvolvimento de embriões bovinos pré-implantação. A H3K4 tem comportamento mais dinâmico, apresentando picos importantes nas fases de blastocisto e blastocisto em eclosão.

Palavras-Chave: Embriogênese, epigenética, histonas, blastocistos

ABSTRACT

Post-translational histone modifications participate in the regulation of gene expression during embryogenesis. H3K4me3 is involved with the permission of gene transcription, while the global methylation of H3K9 is involved in gene repression. The aim of the present study was to characterize the H3K4me3 modifications and global methylation of H3K9 during the in vitro development of bovine embryos. The embryos were produced in vitro and conditioned at different stages of development for the investigation of said histone modifications by Immunofluorescence analysis under confocal microscopy. In all stages of development investigated, both H3K4me3 and the global methylation of H3K9 were present. Before the initial blastocyst stage (Bi) a greater amount of the global methylation of H3K9 was observed than of H3K4me3, situation reversed after that stage. In the Bi stage there was no statistical difference between the epigenetic marks studied, suggesting a state of preparation of the embryos for a period of great modifications and cellular differentiation. These tags may be related to the regulation of pluripotency of cells in this period. The hatching blastocyst stage was the one with the highest H3K4me3 activity, suggesting that the blastocyst hatching demands high gene activity. It is concluded that H3K4me3 and the global methylation of H3K9 are very important for the development of pre-implantation bovine embryos. H3K4 has more dynamic behavior, presenting important peaks in the phases of blastocyst and blastocyst in hatching.

Key words: Embryogenesis, epigenetics, histones, blastocysts

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O Brasil apresenta grande destaque mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE), pois é responsável pela produção de 69% dos embriões do mundo (IETS, 2014). O destaque se deve em grande parte pelas características do rebanho brasileiro, que predominantemente é composto por animais zebuínos, cuja produção de oócitos é em média duas a quatro vezes maior que a das fêmeas taurinas (Silva-Santos *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de embriões pré-implantação (Andreu-Vieyra *et al.*, 2010) é regido por mecanismos epigenéticos, os quais controlam a atividade de transcrição e consequentemente expressão gênica, através de mudanças reversíveis e herdáveis, entre as divisões celulares, e que não estão relacionadas a mudanças na sequência de DNA (Reik, 2007). Porém erros nesse processo ocasionam graves anomalias de desenvolvimento e funcionamento anormal nos organismos.

Considerando ainda, que apesar de já ter sido descrita a relação de modificações epigenéticas com a gametogênese e embriogênese (Santos *et al.*, 2003; Kues *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016; Souza Caceres *et al.*, 2016), ainda permanecem muitas dúvidas a serem esclarecidas. Nesse sentido o estudo das modificações epigenéticas durante a embriogênese é essencial para a otimização das biotecnologias da reprodução, do mesmo modo que o conhecimento básico de mecanismos epigenéticos já auxiliou na elaboração de terapias para a cura de câncer e doenças neurológicas (Esteller, 2005; Dialynas *et al.*, 2008; Selvi *et al.*, 2010).

Este trabalho buscou caracterizar algumas modificações epigenéticas entre as diferentes fases de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Assim, no primeiro capítulo desta dissertação foi feita uma breve abordagem de como ocorre o desenvolvimento embrionário precoce e de como é realizada a biotécnica de Produção *in vitro* de Embriões (PIVE). O capítulo seguinte corresponde a uma revisão de literatura sobre a influência dos meios de cultivo *in vitro* sobre as modificações epigenéticas durante a produção de embriões e o terceiro capítulo corresponde ao artigo científico propriamente dito.

2. Objetivo

Caracterizar as modificações da metilação global da lisina 9 na histona 3 (H3K9me) e trimetilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4me3) de embriões bovinos em diferentes fases de desenvolvimento *in vitro*.

3. Desenvolvimento de embriões pré-implantação

O desenvolvimento embrionário envolve uma série de acontecimentos importantes, correspondendo à primeira clivagem ou divisão mitótica, a ativação do genoma embrionário (AGE), compactação, diferenciação celular, formação de blastocisto, rompimento da zona pelúcida e eclosão do embrião (Lonergan *et al.*, 2006).

A AGE, é o período onde ocorre a expressão da maior parte do genoma embrionário, que em bovinos ocorre entre 4 e 8 células (Kues *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). Acreditava-se que até este período os embriões se desenvolvessem somente com informações estocadas pelos oócitos (Sirard *et al.*, 2003), porém estudos mais recentes com embriões *in vivo* e *in vitro* demonstraram que em todas as fases de desenvolvimento há atividade transcricional e expressão de genes (Kues *et al.*, 2008; Kanka *et al.*, 2009; Graf *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014).

Quando o indivíduo atinge 32 células passa a ser denominado mórula, esta sofre compactação para a diferenciação celular. A compactação é seguida pelo acúmulo de líquidos formando uma cavidade central, chamada de blastocelo, a partir de então o embrião passa a ser conhecido como blastocisto. A blastocelo continua acumulando líquido causando uma expansão no blastocisto, e após aproximadamente 9 dias de desenvolvimento ocorre a eclosão do blastocisto, ou seja quando embrião sai da zona pelúcida.

A International Embryo Transfer Society (IETS, 1998) propôs uma classificação para embriões bovinos pré-implantação (figura 1), que consiste em 9 categorias:

1. Embrião de uma célula: embrião recém fecundado (1º dia de desenvolvimento)
2. Embrião de 2 – 16 células: primeiras divisões mitóticas (2º -5º dias de desenvolvimento)

3. Mórula (Mo): massa celular com separação nítida entre os blastômeros, ocupando quase todo o espaço perivitelínico (EPV), (5º - 6º dias de desenvolvimento)
4. Mórula compacta (Mc): compactação dos blastômeros, ocupando de 60-70% do EPV. (6º dia de desenvolvimento)
5. Blastocisto inicial (Bi): início da formação da blastocèle, início da diferenciação do TE e da MCI. Ocupação de 70-80% do EPV. (7º dia de desenvolvimento)
6. Blastocisto (Bl): diferenciação celular evidente, predominância da blastocèle e o embrião ocupa 100% do EPV, (7º - 8º dias de desenvolvimento)
7. Blastocisto expandido (Bx): aumento de 1,2 a 1,5 vezes do diâmetro do embrião, a zona pelúcida se torna mais distendida, diminui 1/3 da sua espessura, pressão evidente da blastocèle sobre o TE contra a zona pelúcida (8º - 9º dias de desenvolvimento)
8. Blastocisto eclodido (Be): embrião completamente fora da zona pelúcida e a blastocèle ainda é muito evidente (9º dia de desenvolvimento)
9. Blastocisto eclodido em expansão: aumento da blastocèle (9º - 10º dia de desenvolvimento)

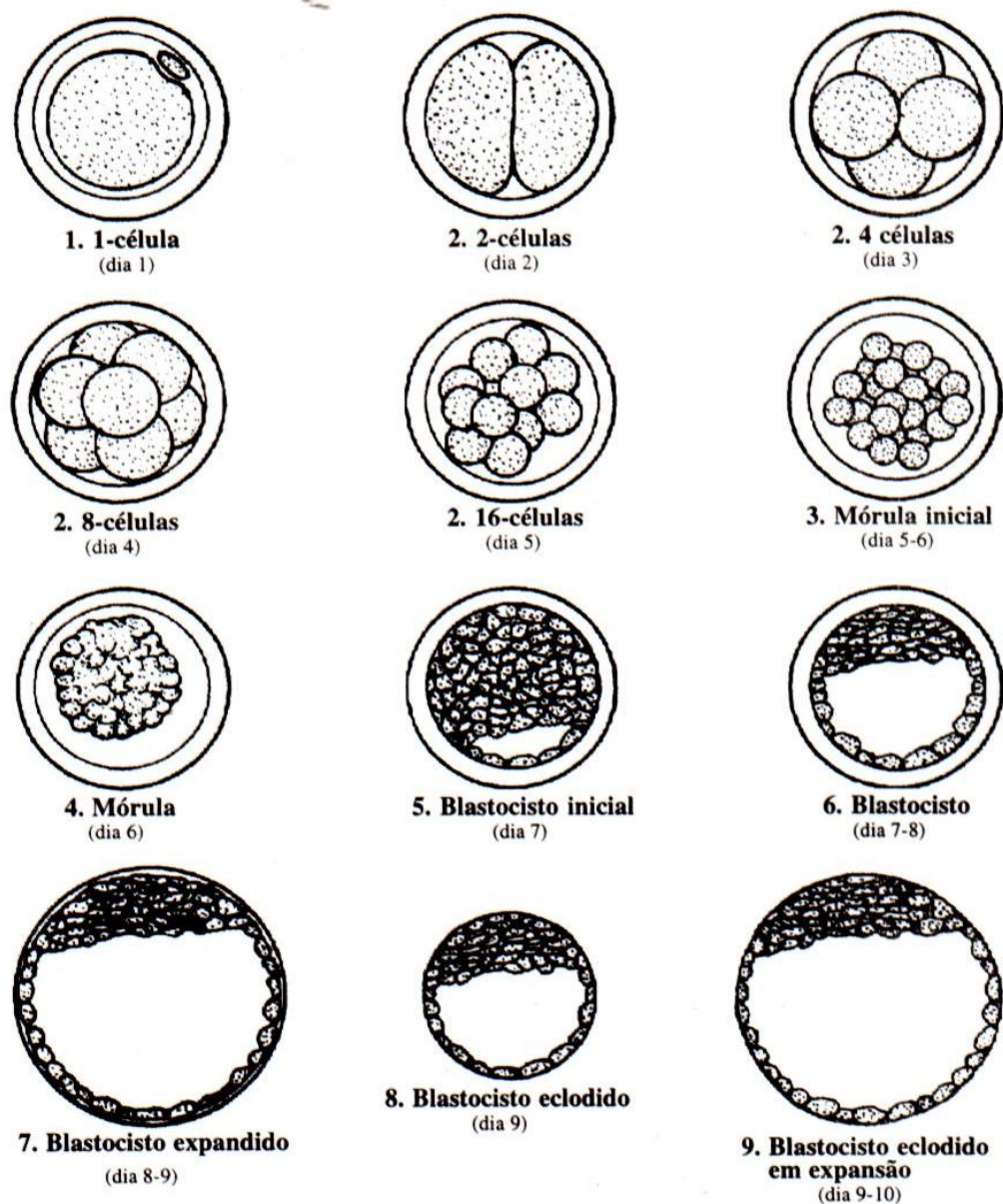


Figura 1. Esquema de desenvolvimento embrionário. IETS (1998)

Além da avaliação para a identificação do estágio de desenvolvimento, ainda é realizada uma avaliação qualitativa dos embriões, baseada na integridade morfológica dos mesmos, a IETS (1998) estabeleceu códigos, de 1-4, para essa avaliação:

1. Excelente ou bom: Embrião esférico, blastômeros apresentam formas bem definidas, cor e textura uniformes, consistente com o estágio de desenvolvimento esperado. Ao menos 85% da massa embrionária deve estar viável e intacta.

2. Regular: irregularidades moderadas, ao menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável intacta.
3. Pobre: irregularidades de maior forma, ao menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável e intacta.
4. Morto ou degenerado: embriões em degeneração, oócitos não fecundados.

4. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A técnica de produção *in vitro* de embriões compreende várias etapas fundamentais para o desenvolvimento de embriões em laboratório, a saber: obtenção, rastreamento e classificação de complexo oócito - cumulus (COCs), maturação *in vitro* (MIV) dos COCs; capacitação e seleção espermática; fertilização *in vitro* dos COCs (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) até o estágio de mórulas e blastocistos, que é quando esses embriões podem ser transferidos ou criopreservados (Varago *et al.*, 2008).

A recuperação de COCs pode ser feita *in vitro*, com ovários de animais *post-mortem*, e *in vivo* por métodos cirúrgicos, ou por ultrassonografia transvaginal. Para a recuperação *in vitro* de oócitos é necessário que os ovários sejam transportados para o laboratório em solução salina aquecida a 35°C, e pode ser feita por dissecação, fatiamento dos ovários ou por punção de folículos ovarianos, que é a mais utilizada. A punção geralmente é realizada com agulha e seringa, ou com uma agulha acoplada em uma bomba à vácuo, e o objetivo é aspirar todos os folículos antrais com tamanho entre 2,0 e 8,0 mm de diâmetro (Dode *et al.*, 2001). O método mais utilizado em bovinos para a recuperação *in vivo* de oócitos é denominado aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*ovum pick up* - OPU). Este método permite a recuperação de COCs de animais de várias idades e em diferentes estágios do ciclo estral (Goodhand *et al.*, 2000).

Independentemente do método de obtenção utilizado, os COCs e o líquido folicular são transferidos para tubos, onde ficam aquecidos e em repouso por no mínimo 10 minutos no banho-maria, após esse período são transferidos para uma placa de petri para busca e seleção dos COCs.

Nem todos os oócitos recuperados são colocados para a maturação, é feita uma classificação (entre graus 1-5) segundo a integridade do citoplasma do oócito e das células do *cumulus oophorus*. Somente os COCs com melhor

integridade morfológica são utilizados para a PIVE (Stojkovic *et al.*, 2001), esses têm a característica de maior número de camadas de células do cumulus circundando o oócito, além de um citoplasma homogêneo. Estas estruturas são então transferidas para um meio de maturação, que geralmente é TCM 199 suplementado com uma fonte proteica, hormônios e antibióticos, onde permanecem entre 22 e 24 horas em incubadora com ambiente controlado, onde a atmosfera pode ser de baixa ou alta tensão de oxigênio e temperatura de 38,5°C. Essas condições fornecem subsídios para que os oócitos retomem a meiose e progridam para o estágio de MII.

Para a fecundação *in vitro*, além de oócitos maduros são necessários espermatozoides capacitados. Os espermatozoides presentes no ejaculado precisam passar por um processo chamado capacitação espermática, que *in vivo* ocorre no trato genital da fêmea. *In vitro* há diversos métodos para preparação do sêmen, entre eles lavagem espermática por centrifugação, gradientes de densidade, filtração em colunas de fibra de vidro e migração ascendente, porém os mais utilizados são os gradientes de densidade, utilizando o percoll e a migração ascendente, denominada swim-up (Parrish *et al.*, 1985).

Para a FIV, oócitos maduros e espermatozoides capacitados (na concentração de 1 – 2 milhões de espermatozoides por mL de meio) são transferidos para o meio de fecundação, que geralmente é o fert-TALP (Gordon 2003), que contém heparina, glicosamino glicol, que estimulam a capacitação espermática em bovinos e a combinação de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) que atua sobre a atividade espermática. Os gametas são então novamente co-incubados em ambiente controlado por 18-22 horas (Gordon, 2003).

Após a fecundação os prováveis zigotos são transferidos para o cultivo embrionário, os meios mais utilizados nessa fase são o TCM 199, CR1 e CR2 e meio SOF, geralmente são acrescidos antibióticos, agentes fungicidas e uma fonte proteica. Os prováveis zigotos permanecem em ambiente controlado por sete dias, ou até atingirem o estágio de blastocisto, período em que estão aptos a serem transferidos para receptoras, ou serem criopreservados.

5. Gargalos da PIVE

Tecnologias que envolvem a manipulação de embriões *in vitro*, apesar dos avanços, ainda passam por entraves, como é o caso da produção de clones por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) e a produção de embriões através da fecundação *in vitro* (FIV).

A limitação mais conhecida relacionada a embriões PIVE é de neonatos macrossômicos, condição que em ruminantes geralmente é conhecida como síndrome da cria grande (Young *et al.*, 1998), além da menor quantidade de sítios de implantação placentários e desenvolvimento vascular anormal na fase intrauterina (Suzuki *et al.*, 2011; Maiorka *et al.*, 2015). Além das dificuldades quanto a criopreservação dos indivíduos (Maldonado *et al.*, 2015).

Considerando que os mecanismos epigenéticos regulam o desenvolvimento embrionário inicial, e que estes são altamente influenciados por fatores externos, é possível presumir que a manipulação e a exposição dos embriões aos meios de cultura ocasionam alterações epigenéticas.

Para a otimização da técnica, muitos estudos sobre a regulação epigenética e comportamento da transcrição tem sido realizados a fim de entender melhor os processos biológicos durante os estágios de desenvolvimento de embriões pré-implantação (Santos *et al.*, 2003; Kues *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011; Lunardelli *et al.*, 2016). Acredita-se que com base nessas informações seja possível elaborar soluções para os gargalos da PIVE.

6. Referências

ANDREU-VIEYRA, C. V. et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, Aug 17 2010. ISSN 1545-7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808952> >.

DIALYNAS, G. K.; VITALINI, M. W.; WALLRATH, L. L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. **Mutat Res**, v. 647, n. 1-2, p. 13-20, Dec 01 2008. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926834> >.

DODE, M. A. N. et al. OOCYTE RECOVERING FROM BOS INDICUS FEMALES. **Archivos de Zootecnia**, v. 50, p. 415-418, 2001. Disponível em: <
https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi0gNjm6NPTAhVCiZAKHcpFAQgQFggmMAA&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F279904.pdf&usq=AFQjCNG3xXKrwh_aoyAA02ArG_obTnlySw&sig2=tG8o5b5q20VgKnJTEbkiVw >.

ESTELLER, M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. **Curr Opin Oncol**, v. 17, n. 1, p. 55-60, Jan 2005. ISSN 1040-8746 (Print)

1040-8746 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608514> >.

GOODHAND, K. L. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Anim Reprod Sci**, v. 63, n. 3-4, p. 145-58, Nov 01 2000. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989225> >.

GRAF, A. et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 11, p. 4139-44, Mar 18 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591639> >.

GU, L.; WANG, Q.; SUN, Q. Y. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle**, v. 9, n. 10, p. 1942-50, May 15 2010. ISSN 1551-4005 (Electronic)

1551-4005 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436284> >.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

IETS, I. E. T. S.-. Manual da Sociedade Internacional de transferência de Embriões. p. 179, 1998.

JIANG, Z. et al. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, p. 756, Sep 04 2014. ISSN 1471-2164 (Electronic)

1471-2164 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185836> >.

KANKA, J.; KEPKOVA, K.; NEMCOVA, L. Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 572-83, Sep 01 2009. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501393> >.

KUES, W. A. et al. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19768-73, Dec 16 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064908> >.

LIU, X. et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. 558-562, Sep 22 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27626379> >.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137-52, Jan 07 2006. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289260> >.

LUNARDELLI, P. A. et al. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of Bos indicus cattle. v. 37, p. 3189-3200, 2016. Disponível em: <
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/23616/19819> >.

MAIORKA, P. C. et al. Vascular alterations underlie developmental problems manifested in cloned cattle before or after birth. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0106663, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584533> >.

MALDONADO, M. B. et al. Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 481-5, Dec 2015. ISSN 1090-2392 (Electronic)

0011-2240 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408849> >.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenology**, v. 24, n. 5, p. 537-49, Nov 1985. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726108> >.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-32, May 24 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522676> >.

ROSS, P. J. et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 777-85, Dec 2008. ISSN 1741-7899 (Electronic)

1470-1626 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784248> >.

SANTOS, F. et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Curr Biol**, v. 13, n. 13, p. 1116-21, Jul 01 2003. ISSN 0960-9822 (Print)

0960-9822 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842010> >.

SELVI, B. R. et al. Small molecule modulators of histone acetylation and methylation: a disease perspective. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 10-12, p. 810-28, Oct-Dec 2010. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888936> >.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred Bos indicus and Bos

taurus cows. **Anim Reprod Sci**, v. 151, n. 3-4, p. 119-25, Dec 30 2014. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465899> >.

SIRARD, M. A. et al. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reprod Suppl**, v. 61, p. 117-29, 2003. ISSN 1477-0415 (Print)

1477-0415 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635931> >.

SOUZA CACERES, M. B. et al. Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in vivo with sexed semen. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1944-52, Nov 2016. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515411> >.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v. 64, n. 3, p. 904-9, Mar 2001. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207207> >.

SUZUKI, J., JR. et al. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 84, n. 5, p. 947-56, May 2011. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248292> >.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, v. 32, 2008. Disponível em:

<
<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf> >.

WU, X. et al. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. **Zygote**, v. 19, n. 1, p. 31-45, Feb 2011. ISSN 1469-8730 (Electronic)

0967-1994 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20609268> >.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod**, v. 3, n. 3, p. 155-63, Sep 1998. ISSN 1359-6004 (Print)

1359-6004 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829550> >.

CAPÍTULO 2 – Revisão de Literatura (Animal Reproduction)

Influência dos sistemas de produção *in vitro* de embriões sobre mecanismos epigenéticos

Influence of *in vitro* embryo production systems on epigenetic mechanisms

RIBEIRO FERREIRA, M. G. C.¹, MELO-STERZA, F. A.¹

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Resumo

Os mecanismos epigenéticos são os responsáveis pela regulação da expressão gênica. Estes explicam o fato de um mesmo indivíduo apresentar diferentes tipos celulares mesmo contendo o mesmo material genético. Entre os mecanismos epigenéticos destaca-se a metilação do DNA e modificações pós traducionais de histonas na regulação do desenvolvimento normal de gametas e embriões. Estes mecanismos são influenciados por fatores externos e erros durante o seu estabelecimento podem ocasionar falhas de desenvolvimento e graves anomalias nos indivíduos. Essas anomalias podem estar influenciando os resultados dos sistemas de produção de embriões *in vitro*, que apesar de mostrarem bons resultados, ainda apresentam algumas limitações. O melhor entendimento desses mecanismos epigenéticos pode auxiliar no desenvolvimento de métodos que possam melhorar a eficiência das biotécnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Histona; Modificações pós–traducionais; cromatina

Abstract

Epigenetic mechanisms are responsible for the regulation of gene expression. These explain the fact that the same individual presented different cell types even containing the same genetic material. Epigenetic mechanisms are closely linked with the normal development of gametes and embryos, and are

regulated by DNA methylation and post-translational histone modifications. These mechanisms are influenced by external factors and errors during the establishment of these mechanisms may lead to developmental failures and severe anomalies in individuals. *In vitro* embryo production systems, although showing good results, still present some limitations. The better understanding of these epigenetic mechanisms can help in the development of methods that can improve the efficiency of assisted reproduction biotechniques.

Keywords: Histone; Post-translational modifications; Regulation of chromatin

Introdução

Uma das principais etapas para que haja a expressão de genes é o processo de transcrição, e este é influenciado por mecanismos epigenéticos (Jian *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017).

Os processos que regulam a expressão gênica em organismos eucariotos ainda não estão bem esclarecidos. O que já está bem documentado é que as diferenças genéticas podem explicar as divergências entre as espécies, mas não explicam o fato de mais de 200 tipos de células em um mesmo organismo se expressarem de formas diferentes. O controle desse fenômeno ocorre por meio das modificações epigenéticas, as quais permitem que tecidos possuam uma característica única, como se tivessem uma “assinatura gênica”, assumindo fenótipos e funções diferentes entre células com o mesmo conteúdo genético. Assim o termo “epigenética” é utilizado para definir o estudo dos processos reguladores da expressão genica que não estão associados com a sequência primária de DNA, porém são herdáveis entre as divisões celulares (Reik, 2007; Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

Os mecanismos epigenéticos ocorrem em nível de cromatina. Esta é organizada em nucleossomos, os quais consistem em um octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4, todas em pares) sustentadas pela histona de ligação (H1). O nucleossomo, que é envolto pela dupla fita de DNA, concede estabilidade estrutural e capacidade de regular a expressão gênica. As modificações epigenéticas podem ocorrer em função da metilação de DNA, das modificações pós-traducionais em histonas (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013), e da ação de de

RNAs não codificantes e remodeladores de cromatina (Bonasio *et al.*, 2010). Estes mecanismos atuam como marcas para a seleção de proteínas ou complexos de proteínas, e atuam regulando as funções da cromatina, tais como a expressão gênica, replicação de DNA e segregação cromossômica (Zhang e Reinberg, 2001). Erros nesse processo podem ocasionar graves anomalias de desenvolvimento nos organismos na fase pré e pós natal (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

Já foi relatado que fatores ambientais exercem influência sobre as marcas epigenéticas e consequentemente sobre os fenótipos (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). A utilização dos conhecimentos sobre epigenética como ferramenta para solucionar grandes problemas da sociedade atual, como a cura do câncer e doenças neurológicas, já vem mostrando eficiência (Esteller, 2005; Kilgore *et al.*, 2010; Machnes *et al.*, 2013). Um exemplo é o uso de nucleosídeos análogos ao DNA, como a Azacitidina para o tratamento de tumores relacionados a hipermetilação do DNA. O referido medicamento se incorpora ao DNA em replicação e reprime a sua metilação, reativando assim os genes silenciados previamente (Esteller, 2005).

Acredita-se que a manipulação *in vitro* de embriões possa estar causando modificações epigenéticas e dificultando a solução de algumas limitações de técnicas da reprodução. O objetivo dessa revisão é relatar como as modificações de histonas interferem no desenvolvimento embrionário de mamíferos e como este conhecimento pode ser aplicado para a busca de soluções para os gargalos da produção de embriões *in vitro*.

Modificações pós-traducionais de histonas (MPTs)

As histonas consistem em proteínas básicas com uma forma globular e uma cauda amino terminal, capaz de lançar-se do seu nucleossomo e comunicar-se com nucleossomos próximos (Beaujean, 2014). Regiões de regulação de genes respondem a estímulos ambientais e são marcadas por modificações pós-traducionais (MPTs) em suas caudas amino terminais, e regulam a comunicação entre o nucleossomo e o DNA, resultando na compactação ou relaxamento da cromatina (Tamaru, 2010). Nos locais não compactados, o DNA está mais apto à replicação e/ou transcrição, ou seja,

apresenta um estado de cromatina mais permissivo à atividade transicional (eucromatina). Nos locais onde há uma maior compactação da cromatina os genes estão transcricionalmente reprimidos (heterocromatina) (Boland *et al.*, 2014). As principais MPTs das caudas das histonas são acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (Gardner *et al.*, 2011). A acetilação e metilação das histonas estão envolvidas de maneira acentuada na permissão ou repressão da expressão de genes durante os processos de foliculogênese e embriogênese, regulando o estabelecimento adequado da expressão gênica para o desenvolvimento embrionário (Seneda *et al.*, 2008; Andreu-Vieyra *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

De modo geral a acetilação está relacionada com a eucromatina, sendo que esta marca neutraliza a carga basal das lisinas contidas nas caudas das histonas, intensificando a interação eletrostática entre histonas e DNA, tornando a cromatina menos resistente e consequentemente proporcionando um melhor acesso ao DNA pelas proteínas envolvidas com a transcrição. Portanto é o evento com maior competência para descompactar a cromatina (Hasan e Hottiger, 2002). A acetilação é um processo reversível, e controlada por duas classes de enzimas: acetiltransferases (ATH) e desacetilases de histonas (HDAC). E ocorre principalmente nas lisinas (K) K9, K14, K18, K27 das histonas H3 e K5, K8, K12 e K16 das histonas H4 (Bjerling *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2010).

O grupo metil desempenha uma rotatividade mais lenta que as demais modificações de histonas, devido a isto, a metilação já foi considerada uma modificação estável (Duerre e Lee, 1974). A reversão da metilação foi provada com a descoberta da desmetilase LSD1, que é responsável pela retirada do grupo metil da lisina 4 da H3 (Shi *et al.*, 2004). Já são conhecidos 33 tipos de desmetilases de histonas (Allis *et al.*, 2007; Pedersen e Helin, 2010).

Em geral, a metilação de H3K9, K27 e K20 está associada com condensação da cromatina, enquanto a metilação de H3K4, K36 e K79 está relacionada com a descondensação da cromatina (Ciccone e Chen, 2009). Há variações na intensidade de metilação das histonas, podendo ser mono (me1), dupla (me2) ou tripla (me3), as quais estão envolvidas com a conformação da cromatina, de forma que quanto maior a intensidade da metilação, mais a função da modificação será reforçada, por exemplo H3K4me3, em comparação com a

H3K4me1, é mais eficiente para descondensar a cromatina, deixando assim o DNA mais acessível a transcrição (Wolffe, 1998).

Modificações epigenéticas em gametas e embriões

Os principais eventos epigenéticos relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial são o *Imprinting* genômico, a inativação do cromossomo X e a reprogramação de genomas haploides parentais em um genoma diploide (Hales *et al.*, 2011). Estes mecanismos são necessários ao desenvolvimento embrionário inicial, os quais são regidos pelos padrões de metilação de DNA e MPTs de histonas.

O *Imprinting* genômico é um evento controlado por fatores genéticos que apresentam expressão monoalélica, tendo um alelo silenciado por metilação, de forma que a presença da metilação tem como consequência a condensação da cromatina e resistência à transcrição (Reik *et al.*, 2001). A explicação mais aceita para *imprinting* genômico é a chamada “Teoria do conflito genético”, teoria embasada em observações da participação de genes *imprinting* relacionados aos seus efeitos divergentes no desenvolvimento do embrião e anexos embrionários (Haig e Graham, 1991). Um exemplo da ação dos genes *imprinting* é o gene paternal expresso IGF2, que estimula o crescimento fetal, enquanto que o gene maternal expresso IGF2R, tende a diminuir o crescimento fetal, participando assim da regulação do IGF2 (Reik *et al.*, 2001).

A ICX é um ótimo exemplo de como os vários mecanismos epigenéticos, atuando juntos, controlam a expressão de genes através da modificação da cromatina. Trata-se de um modo de compensação de dose da expressão gênica entre fêmeas (XX) e machos (XY) (Lyon, 1961). Previamente à implantação do embrião, um dos cromossomos X, materno ou paterno, é escolhido casualmente para ser inativado (Boland *et al.*, 2014). A aquisição de *imprints* materno durante o crescimento dos oócitos é incumbido pela inativação do cromossomo X (Goto e Takagi, 2000; Tada *et al.*, 2000). Em Camundongos foi descrito que a inativação do cromossomo X ocorre entre o estágio de 4 (Okamoto *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2005) e 8 células (Huynh e Lee, 2003; Mak *et al.*, 2004). Em embriões bovinos produzidos *in vitro* esse evento foi descrito primeiramente no estágio de blastocisto (De La Fuente *et al.*, 1999), porém pesquisas mais

recentes, também com embriões *in vitro*, mostraram que a inativação ocorre no estágio de mórula, onde o X paterno está inativo, e no estágio de blastocisto ocorre uma reativação, que provavelmente é necessária para a ocorrência de um segundo ciclo de inativação aleatória nas células da massa celular interna (Ferreira *et al.*, 2010).

As células germinativas primordiais necessitam passar por uma ampla reprogramação epigenética para se tornarem gametas viáveis e aptos à formação de um novo indivíduo (Reik, 2007). As MPTs de histona estão altamente envolvidas neste processo, com destaque para a acetilação e metilação.

A acetilação é um dos mecanismos envolvidos na regulação dos eventos de totipotência e proliferação durante a reprogramação de células e desenvolvimento embrionário (Wang *et al.*, 2007), e a metilação de histonas contribui com os processos de estabelecimento e manutenção dos genes *Imprinting* e inativação do cromossomo X além da regulação da expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento embrionário inicial (Ciccone e Chen, 2009).

Em oócitos as MPTs controlam os eventos nucleares (Gu *et al.*, 2010), como a quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico. Estes eventos são essenciais para que ocorra a maturação oocitária (Meinecke *et al.*, 2001).

Há relatos de que seja necessária uma redução global da transcrição em oócitos para que o processo de meiose seja retomado e finalizado, durante o processo de maturação (Andreu-Vieyra *et al.*, 2010). A acetilação de lisinas nas histonas H3 e H4 se apresentam em maiores concentrações na fase de GV (vesícula germinativa) e GVBD, associada a uma alta atividade transcrricional. Uma redução acentuada da acetilação das histonas é observada nas fases de MI e MII, sendo a transcrição cessada com a condensação da cromatina. Dessa forma a desacetilação dessas proteínas possui um papel importante na aquisição de competência do oócito durante a maturação, fato demonstrado em suínos e bovinos (Endo *et al.*, 2005; Racedo *et al.*, 2009).

Comparada com a acetilação, a metilação de histonas parece um evento relativamente estável durante o desenvolvimento oocitário (Gu *et al.*, 2010). Foi

observado em suínos e bovinos que a H3K9me2, envolvida com a formação da heterocromatina, apresenta um comportamento constante durante a maturação dos oócitos (Endo *et al.*, 2005; Racedo *et al.*, 2009), estando relacionado com a manutenção de um perfil de expressão definido durante a fase final de crescimento dos oócitos e no processo de maturação (Racedo *et al.*, 2009).

A metilação da H3K4, que é relacionada com a eucromatina, se apresenta em níveis constantes e elevados durante a maturação dos oócitos, assim, mesmo esse processo sendo marcado pela redução da transcrição, desde o momento da retomada da meiose (Wu *et al.*, 1996), ainda ocorrem alterações na estrutura da cromatina (Kageyama *et al.*, 2007).

Quanto a espermatogênese, as histonas são substituídas parcial ou integralmente por nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, conhecidas como protaminas ou proteínas queratinosas, as quais possuem um caráter mais básico, ricas em arginina e cisteína oxidada (Bloch, 1969). Estudos mais recentes encontraram histonas no núcleo espermático humano, em regiões contendo sequência de nucleossomos, com DNA hipometilado, intercaladas entre as estruturas toroidais da cromatina espermática. Estas regiões provavelmente possuem uma importante função no desenvolvimento embrionário inicial e na herança epigenética paterna (Johnson *et al.*, 2011; Carrell, 2012).

Durante a embriogênese também ocorre uma ampla alteração epigenética. A importância das modificações da metilação da H3K4 e H3K9 na diferenciação celular durante a embriogênese já foi bem reportada (Santos *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Após a fecundação ocorre uma perda global da metilação de histonas (Yang *et al.*, 2007), fenômeno essencial para as primeiras divisões embrionárias. No entanto, uma metilação residual em aminoácidos específicos é necessária durante o desenvolvimento pré-implantacional. (Thomson *et al.*, 1998). A H3K4me3 tem forte ligação com a diferenciação e ativação do genoma embrionário, fato demonstrado em suínos (Gao *et al.*, 2010), humanos (Zhang *et al.*, 2012) e bovinos (Wu *et al.*, 2011). A importância da H3K4me3 já foi relatada em fases posteriores do desenvolvimento embrionário em bovinos produzidos *in vivo* (Souza Caceres *et al.*, 2016) e *in vitro* (Lunardelli *et al.*, 2016).

A H3K9me está relacionada com a repressão da transcrição, e nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, em camundongos, se comporta como os padrões de metilação de DNA, ou seja, reduzido nas fases de 2 a 4 células, aumentando nos estágios de 8 células. Na fase de blastocisto, tanto o DNA quanto a H3K9 estão mais metilados nas células da massa celular interna e menos metilados nas células do trofoblasto (Santos *et al.*, 2002). A H3K9me ainda está relacionada com os genes H19 e MEST, que são de grande importância para o desenvolvimento embrionário, crescimento fetal e função placentária, de forma que há uma redução da H3K9me, como supressor dos genes e aumento da H3K9ac, como ativador dos genes (Jahangiri *et al.*, 2014).

Efeitos ambientais sobre as marcas epigenéticas do desenvolvimento de embriões pré-implantação

Estudos demonstram que o desequilíbrio nutricional e metabólico de fêmeas gestantes afeta a saúde do conceito, e tais alterações podem ser transmitidas para a próxima geração (Attig *et al.*, 2010). Apesar da PIVE ser utilizada em larga escala por laboratórios comerciais, ainda apresenta alguns gargalos, como por exemplo, como a menor criotolerância do embriões comparados a indivíduos produzidos *in vivo* (George *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2008; Stinshoff *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2015). Indivíduos produtos de clonagem por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) apresentam anormalidades como alterações no desenvolvimento placentário, fetal e morte perinatal (Young e Beaujean, 2004).

Em embriões produzidos através de TNCS, é necessário que um indivíduo doador forneça uma célula somática que terá o núcleo transferido para um oócito enucleado. Este oócito então é ativado para que inicie o desenvolvimento embrionário. Para o sucesso da biotécnica é necessário que as alterações epigenéticas ocorram adequadamente, de forma que o núcleo seja reprogramado para padrões zigóticos (Jouneau e Renard, 2003). Embriões produzidos através dessa biotécnica tem mais dificuldades durante o processo de reprogramação epigenética, pois o oócito receptor é apto para redefinir padrões maternos e não de células somáticas (Keefer, 2015).

Apesar de haver uma certa flexibilidade natural do epigenoma, a estrutura da cromatina e a transcrição não são reprogramadas de maneira uniforme após

a transferência nuclear (Long *et al.*, 2014). As anomalias estão vinculadas com a reprogramação incompleta do genoma doador e padrões irregulares de metilação de DNA e MPT's de histonas em embriões de TNCS (Golding *et al.*, 2011).

Durante o processo de formação de gametas e embriões, as marcas epigenéticas demandam um longo tempo para serem estabelecidas, porém na TNCS os padrões epigenéticos das células adultas já estão muito estáveis, e dispõe de um curto período de tempo para a reprogramação (Reik *et al.*, 2001; Jouneau e Renard, 2003). Esses tipos de falhas na reprogramação podem ocasionar padrões aberrantes de ICX (Xue *et al.*, 2002), e no estabelecimento de genes *imprinted* (Young *et al.*, 2003). Ocasionalmente alterações fenotípicas em todos os estágios da gestação.

Para melhorar a eficiência da TNCS, pesquisadores testaram a adição da Tricostatina-A, durante 10 h após a ativação do oócito, para a inibição da enzima histona desacetilase (HDAC) promovendo um aumento da acetilação de histonas. Esta metilação aumentou a eficácia da técnica, sendo possível supor que a menor acetilação de histonas pode ser um dos agravantes do desenvolvimento de embriões oriundos de TNCS (Kishigami *et al.*, 2006).

A “síndrome da cria grande” foi um dos problemas registrados no início da PIVE, sua característica é o nascimento de produtos maiores do que o esperado para a espécie e/ou raça (Young *et al.*, 1998). Essa anomalia foi vinculada a erros no padrão de expressão de genes *imprinted*, pois verificou-se que o soro-fetal-bovino, utilizado na composição dos meios de cultura, alterava os padrões de metilação do gene IGF2R, o qual se expressa de forma errônea resulta em um hipo ou hipercrecimento (Young *et al.*, 2001). Porém modificações e melhorias nos meios de cultivo praticamente extinguiram essa anomalia (Keefer, 2015).

Outro grupo de pesquisa também investigou o comportamento da H3K27me3 em embriões bovinos produzidos *in vitro*, esta marca que é relacionada com a compactação da cromatina e consequentemente repressão da expressão gênica. Para o estudo Marinho (2015) acrescentou 3-Deazaneplanocin A (DZNep) ao meio de cultivo para inibir o complexo repressivo 2 de Polycomb, grupo proteico importante para manter o estado de H3K27me3. O estudo citado demonstrou que o grupo tratado com DZNep

apresentou menor taxa de blastocistos, menor, qualidade morfológica do embrião, e menor velocidade de desenvolvimento.

Quanto ao desafio da criopreservação, vários grupos de pesquisa têm se dedicado à busca de soluções que melhorem a eficiência a criopreservação de embriões PIVE (Stinshoff *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2015; Souza Caceres *et al.*, 2016), no entanto os avanços ainda são limitados. Souza Caceres *et al.* (2016), verificaram que embriões produzidos *in vivo* apresentam o mesmo padrão de H3K4me3 quando submetidos ou não a criopreservação lenta. Em contrapartida Maldonado *et al.* (2015) verificaram que blastocistos produzidos *in vitro* e submetidos ao método de criopreservação convencional possuem níveis de H3K4me3 reduzidos. Essa diferença dos padrões de metilação, entre embriões *in vivo* e *in vitro* submetidos a criopreservação nos permite supor que os meios de cultivo possam estar alterando a conformação da cromatina através das MPT's de histonas, e este fato pode estar ligado a diferença de eficiência da criotolerância desses embriões

Considerações finais

Está claro que os meios de cultivo alteram o perfil epigenético de embriões PIVE. No entanto ainda são necessários mais estudos na área de conhecimento básico, para que seja possível transformar essas informações em ferramentas de otimização da técnica e melhora das taxas de produção, redução das anomalias dos anexos embrionários e de indivíduos pós natal, além de melhorar sua resistência a criopreservação.

Referências

- ALLIS, C. D. et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 633-6, Nov 16 2007.
- ANDREU-VIEYRA, C. V. et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, Aug 17 2010.
- ATTIG, L.; GABORY, A.; JUNIEN, C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. **Proc Nutr Soc**, v. 69, n. 2, p. 221-31, May 2010.

BEAUJEAN, N. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 2, p. 100-12, Feb 2014.

BERNSTEIN, B. E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315-26, Apr 21 2006.

BJERLING, P. et al. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 7, p. 2170-81, Apr 2002.

BLOCH, D. P. A catalog of sperm histones. **Genetics**, v. 61, n. 1, p. Suppl:93-111, 1969.

BOLAND, M. J.; NAZOR, K. L.; LORING, J. F. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. **Circ Res**, v. 115, n. 2, p. 311-24, Jul 07 2014.

BONASIO, R.; TU, S.; REINBERG, D. Molecular signals of epigenetic states. **Science**, v. 330, n. 6004, p. 612-6, Oct 29 2010.

CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. **Fertil Steril**, v. 97, n. 2, p. 267-74, Feb 2012.

CICCONE, D. N.; CHEN, T. Histone lysine methylation in genomic imprinting. **Epigenetics**, v. 4, n. 4, p. 216-20, May 16 2009.

DE LA FUENTE, R. et al. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biol Reprod**, v. 60, n. 3, p. 769-75, Mar 1999.

DUERRE, J. A.; LEE, C. T. In vivo methylation and turnover of rat brain histones. **J Neurochem**, v. 23, n. 3, p. 541-7, Sep 1974.

ENDO, T. et al. Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 71, n. 1, p. 123-8, May 2005.

ESTELLER, M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. **Curr Opin Oncol**, v. 17, n. 1, p. 55-60, Jan 2005.

FERREIRA, A. R. et al. Allele-specific expression of the MAOA gene and X chromosome inactivation in in vitro produced bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 7, p. 615-21, Jul 2010.

GAO, Y.; HYTTEL, P.; HALL, V. J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 6, p. 540-9, Jun 2010.

GARDNER, K. E.; ALLIS, C. D.; STRAHL, B. D. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. **J Mol Biol**, v. 409, n. 1, p. 36-46, May 27 2011.

GEORGE, F. et al. Freezing of in vitro produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1381-90, Sep 15 2006.

GOLDING, M. C. et al. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. **Mol Reprod Dev**, v. 78, n. 5, p. 306-17, May 2011.

GOTO, Y.; TAKAGI, N. Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. **Chromosome Res**, v. 8, n. 2, p. 101-9, 2000.

GU, L.; WANG, Q.; SUN, Q. Y. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell Cycle**, v. 9, n. 10, p. 1942-50, May 15 2010.

HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1045-6, Mar 22 1991.

HALES, B. F. et al. Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 91, n. 8, p. 652-65, Aug 2011.

HASAN, S.; HOTTIGER, M. O. Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. **J Mol Med (Berl)**, v. 80, n. 8, p. 463-74, Aug 2002.

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 857-62, Dec 18 2003.

INBAR-FEIGENBERG, M. et al. Basic concepts of epigenetics. **Fertil Steril**, v. 99, n. 3, p. 607-15, Mar 01 2013.

JAHANGIRI, M.; SHAHHOSEINI, M.; MOVAGHAR, B. H19 and MEST gene expression and histone modification in blastocysts cultured from vitrified and fresh two-cell mouse embryos. **Reprod Biomed Online**, v. 29, n. 5, p. 559-66, Nov 2014.

JIAN, W. et al. Histone deacetylase 1 activates PU.1 gene transcription through regulating TAF9 deacetylation and transcription factor IID assembly. **FASEB J**, Jun 01 2017.

JOHNSON, G. D. et al. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 21-36, Jan 2011.

JOUNEAU, A.; RENARD, J. P. Reprogramming in nuclear transfer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 5, p. 486-91, Oct 2003.

KAGEYAMA, S. et al. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 85-94, Jan 2007. I

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 29, p. 8874-8, Jul 21 2015.

KILGORE, M. et al. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.

Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 4, p. 870-80, Mar 2010.

KISHIGAMI, S. et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 1, p. 183-9, Feb 03 2006.

LONG, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; GOLDING, M. C. Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 2, p. 183-93, Feb 2014.

LUNARDELLI, P. A. et al. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of Bos indicus cattle. v. 37, p. 3189-3200, 2016.

LYON, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). **Nature**, v. 190, p. 372-3, Apr 22 1961.

MACHNES, Z. M. et al. DNA methylation mediates persistent epileptiform activity in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76299, 2013.

MAK, W. et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 666-9, Jan 30 2004.

MALDONADO, M. B. et al. Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 481-5, Dec 2015.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v. 36, n. 3-4, p. 183-8, Aug 2001.

OKAMOTO, I. et al. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. **Nature**, v. 438, n. 7066, p. 369-73, Nov 17 2005.

OKAMOTO, I. et al. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 644-9, Jan 30 2004.

PEDERSEN, M. T.; HELIN, K. Histone demethylases in development and disease. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 11, p. 662-71, Nov 2010.

RACEDO, S. E. et al. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, n. 6, p. 738-48, 2009.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-32, May 24 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-93, Aug 10 2001.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reprod Domest Anim**, v. 43 Suppl 4, p. 44-50, Oct 2008.

SANTOS, F. et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol**, v. 241, n. 1, p. 172-82, Jan 01 2002.

SANTOS, F. et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Curr Biol**, v. 13, n. 13, p. 1116-21, Jul 01 2003.

SENEDA, M. M. et al. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. **Reproduction**, v. 135, n. 6, p. 829-38, Jun 2008.

SHI, Y. et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941-53, Dec 29 2004.

SOUZA CACERES, M. B. et al. Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in vivo with sexed semen. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1944-52, Nov 2016.

STINSHOFF, H. et al. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433-41, Nov 2011.

TADA, T. et al. Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. **Development**, v. 127, n. 14, p. 3101-5, Jul 2000.

TAMARU, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. **Genes Dev**, v. 24, n. 14, p. 1465-78, Jul 15 2010.

TAN, W. et al. Methylation dictates PI.f-specific CYP19 transcription in human glial cells. **Mol Cell Endocrinol**, May 27 2017.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, Nov 06 1998.

WANG, F. et al. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. **Biol Reprod**, v. 77, n. 6, p. 1007-16, Dec 2007.

WOLFFE, A. P. Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. **J Exp Zool**, v. 282, n. 1-2, p. 239-44, Sep-Oct 1 1998.

WU, B. et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 45, n. 4, p. 560-5, Dec 1996.

WU, X. et al. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. **Zygote**, v. 19, n. 1, p. 31-45, Feb 2011.

XUE, F. et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nat Genet**, v. 31, n. 2, p. 216-20, Jun 2002.

YANG, X. et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nat Genet**, v. 39, n. 3, p. 295-302, Mar 2007.

YOUNG, L. E.; BEAUJEAN, N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 61-78, Jul 2004.

YOUNG, L. E. et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nat Genet**, v. 27, n. 2, p. 153-4, Feb 2001.

YOUNG, L. E. et al. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mech Dev**, v. 120, n. 12, p. 1433-42, Dec 2003.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod**, v. 3, n. 3, p. 155-63, Sep 1998.

ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation: beyond histones. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 44, n. 1, p. 14-27, Jan 2012.

ZHANG, Y.; REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes Dev**, v. 15, n. 18, p. 2343-60, Sep 15 2001.

CAPÍTULO 3 – Artigo Científico (Theriogenology)

Profile of H3K4me3 and the global methylation of H3K9 from bovine embryos produced *in vitro* at different stages of development

RIBEIRO FERREIRA, M. G. C. R.¹; SOUZA CACERES, M. B.³;
POEHLAND, R.⁴; SILVA, W. A. L.⁵; LIMA, A. C. B.⁶; SILVA, J. R.⁶; CARDOSO,
C. J. T.²; SILVA, R. F.⁶; MELO STERZA, F. A.^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Aquidauana. Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina. Londrina. Brasil

⁴ Institute for Farm Animal Biology Leibniz – Dummerstorf - Alemanha

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Brasil

⁶Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Aquidauana. Brasil

Abstract

Post-translational histone modifications participate in the regulation of gene expression during embryogenesis. H3K4me3 is involved with the permission of gene transcription, while the global methylation of H3K9 is involved in gene repression. The aim of the present study was to characterize the H3K4me3 modifications and global methylation of H3K9 during the *in vitro* development of bovine embryos. The embryos were produced *in vitro* and conditioned at different stages of development for the investigation of said histone modifications by Immunofluorescence analysis under confocal microscopy. In all

stages of development investigated, both H3K4me3 and the global methylation of H3K9 were present. Before the initial blastocyst stage (Bi) a greater amount of the global methylation of H3K9 was observed than of H3K4me3, situation reversed after that stage. In the Bi stage there was no statistical difference between the epigenetic marks studied, suggesting a state of preparation of the embryos for a period of great modifications and cellular differentiation. These tags may be related to the regulation of pluripotency of cells in this period. The hatching blastocyst stage was the one with the highest H3K4me3 activity, suggesting that the blastocyst hatching demands high gene activity. It is concluded that H3K4me3 and the global methylation of H3K9 are very important for the development of pre-implantation bovine embryos. H3K4 has more dynamic behavior, presenting important peaks in the phases of blastocyst and blastocyst in hatching.

Key words: Embryogenesis, epigenetics, histones, blastocysts

1. Introduction

The transcript profile undergoes dynamic changes throughout the embryonic development, that is, at each stage of development, there are inherent patterns of expression, which are coordinated by epigenetic modifications [1]. It is noteworthy that most genes are transcribed near the time of activation of the embryonic genome (EGA), which in bovines occurs at the stage of 4-8 cells [2].

Post-translational modifications (PTMs) of histone are epigenetic events of great importance in the reorganization of chromatin, and are linked to the permission or repression of gene expression [3]. The methylation of lysines 4 and 9 in histone 3 (H3K4me and H3K9me) are being investigated for their relationship to cell differentiation during embryogenesis in mammals [4-7]. Said histone modifications have opposite functions, whereas H3K4me is related to a chromatin permissive to gene transcription, H3K9me is related to the repression of transcription [4, 7].

The relationship of H3K4me3 to the differentiation and activation of the embryonic genome has already been demonstrated in swine [8], humans [9], cattle [2] and mice [7]. In cattle the behavior of H3K4me3 was observed in phases after EGA, in morula and blastocysts produced *in vivo* [10]. The methylation of H3K9 has already been observed in bovine embryos produced *in vitro* and by

Nuclear Somatic Cell Transfer (NSCT), in various stages of embryonic development [4], besides being one of the modifications related to the expression of the genes involved with the fetal growth and placental function [11]. These reports show the importance of these modifications in early embryonic development.

For the critical role that histone methylation presents in the regulation of pre-implantation embryo genes, these potentially assume the determination and differentiation of the cellular destination. Most of the studies concentrate the investigations around the first periods of embryonic development, which correspond to the activation of the embryonic genome [1, 2, 4, 11], because it is a period of great transcriptional activity [1], and thus there are gaps on how histone methylations behave during the development of blastocysts until complete hatching.

More detailed investigations about the process of blastocyst formation, the stage where the information is generated for the period of embryo implantation, should aid in the improvement of techniques of assisted reproduction.

The aim of the present study was to characterize the trimethylation modifications of histone 3 lysine 4 (H3K4me3) methylation of lysine 9 in histone 3 (H3K9me) in bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*.

2. Materials and methods

In vitro embryo production

For *in vitro* embryo production, animal ovaries were used *Bos indicus* collected at a local slaughterhouse. These were transported in NaCl solution NaCl 0,9% plus antibiotics, at the temperature of 35 a 37°C. Follicles 3-8 mm in diameter were punctured and oocyte-cumulus complexes (COCs) recovered were classified according to the appearance and distribution of cumulus cells and cytoplasmic uniformity [12]. Only grade 1 and 2 oocytes were used in the *in vitro* maturation process IVM. After selection the selected COCs were washed and transferred to petri dishes containing TCM199 plus LH, FSH e E₂, fetal bovine serum (FBS), pyruvate and antibiotics, topped with mineral oil. The maturation occurred for 24 hours in an incubator at 38.5 ° C, 5% CO₂ and saturated moisture.

After IVM, mature COCs underwent *in vitro* fertilization (IVF) in fertilization medium containing heparin, the combination of penicillamine, hypotaurine and hepinephrine (PHE), pyruvate, bovine serum albumin (BSA) and antibiotics. For fertilization, conventional semen of a single Nelore bull, previously tested for IVF. The straws were thawed and the semen submitted to Percoll methodology [13]. For fertilization, the concentration 1×10^6 spermatozoa / mL. Fertilization was for 18-22 hours. After this period the probable zygotes were transferred to drops of SOF medium, containing MEM and BME amino acids, in addition to FBS, BSA and antibiotics. Probable zygotes remained in this environment for up to nine days. All steps of *in vitro* embryo production were made in an incubator at 38.5 ° C and 5% CO₂ atmosphere in air.

For the analyzes the embryos were collected on days 3, 5, 7, 8 and 9 considering day zero the IVF day, making it possible to obtain structures at different stages of development. The phases collected were: 4 cells, morulae (Mo), initial blastocyst (Bi), blastocyst (Bl), expanded blastocyst (Bx), blastocyst in hatching (Bn) and hatched blastocyst (Be). The obtained material was washed twice in PBS and then packed in 200µl of 3% paraformoldehyde and stored at 4 ° C until analysis.

Immunofluorescence Analysis

For this analysis, twenty embryos were used at each stage of development, for this analysis twenty embryos were used at each stage of development 5 for the negative control and 5 for fluorescence investigation, thus: H3K4me3 N = 70 and methylation of H3K9 N = 60.

The embryos were washed in specific medium (MLv), containing PBS, BSA and TritonX100 at room temperature (RT) and permeabilized with HEPES, Sucrose, NaCl, MgCl₂ e TritonX100 a 0°C for 5 minutes. After 3 washes in MLv (5 min each in RT) the embryos were blocked (Roti imunoBlock :50 em H₂O, Roth Germany) for 2 hours in RT. Subsequently, they were exposed to polyclonal antibody against H3K4me3 and H3K9me (Signaling ® celular 1:1000 in Roth ImunoBloth 1:100 in PBS + 0,2% de Tween 20), overnight at 4 ° C. After 5 washes in MLv (10 min each in RT) the embryos were incubated with the secondary antibody (anti-coelho Alexa 647, Invitrogen A21245, 1: 200 in Roti ImmunoBlock

1: 100 in PBS + 0,02% de Tween 20) for 5 hours at RT. After 5 washes in MLV (10 min each in RT) the nucleus was stained, for which it was used SYBR Green (Molecular Probes, Germany; 1:500) at 4 ° C for 15 minutes. Finally, after 4 washes in MLV (10 min min each in RT) the embryos were individually fixed on sheets and covered under coverslots.

The fluorescence analysis of the embryos was performed under confocal microscopy (5 Pascal, Zeiss, Germany). The methodology according to Souza-Cáceres et al. 2016, with the following settings: a distance of 1 µm between images in the z were recovered in double bands (Oil lenses 40 times): Track 1: Laser: Argome 30mW (488/488/514 nm) 488nm/12%; HFT/ NFT:488/545 nm; Filter BP 505-530 nm Channel 1 (channel 2 closed); track 2: Laser: HeNe 1 mW (543 nm) 543 nm/60%; HTF/NTF: 543/545 nm; Filter LP 560 nm Channel 2 (Channel 1 closed); Pinhole: 1AU, constant gain, with average 2.

Five embryos per embryonic stage and five as negative controls were analyzed, ie, they were prepared without the addition of the primary antibody. For localization and quantification of H3K4me3 and H3K9me, the intensities of the fluorescence signals were analyzed by three-dimensional densitometry (ImageJ), evaluating at least 15 cells per embryo (in 4-cell embryos 4 cells were counted). Regions of interest (ROIs) were defined around the relevant nuclei in the stack. For background correction, an additional ROI was established outside the nuclei, but within the embryo. The intensities measured in these ROIs were subtracted from the measurement intensities in the ROIs around the nuclei. The fluorescence intensity depends on the location in the z-direction on the cell. However, the intensity of nuclear staining (green channel, 228 lane 1) should be constant. Therefore, the incident intensity of nuclear color (green channel) in the z-direction was used to calculate fluorescence fading in the z-direction. The fading correction of the fluorophore intensity (red channel) in the z-direction was calculated using this result. Data were normalized to the controls (without the first antibody).

Statistical analyzes

The signal intensity in pixels was determined by the Image j program and the mean of the 15 cells evaluated by embryo was considered the signal intensity of each embryo. The mean signal intensity of the 5 embryos was considered the

signal intensity of the embryonic stage analyzed. The normality of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. Then, ANOVA was performed and when a significant difference was found, the Scott-knott test was applied at 5% probability (R Program version R-3.3.1).

3. Results

It was found that the signal intensity of H3K4me3 (Figure 1) increased significantly between the initial morula and blastocyst phases, with subsequent blastocyst phase decline. Less pronounced but significant increase was also observed in the blastocyst stage in hatching, with later fall in the blastocyst stage, thus demonstrating a dynamic behavior of this modification throughout the embryonic development.

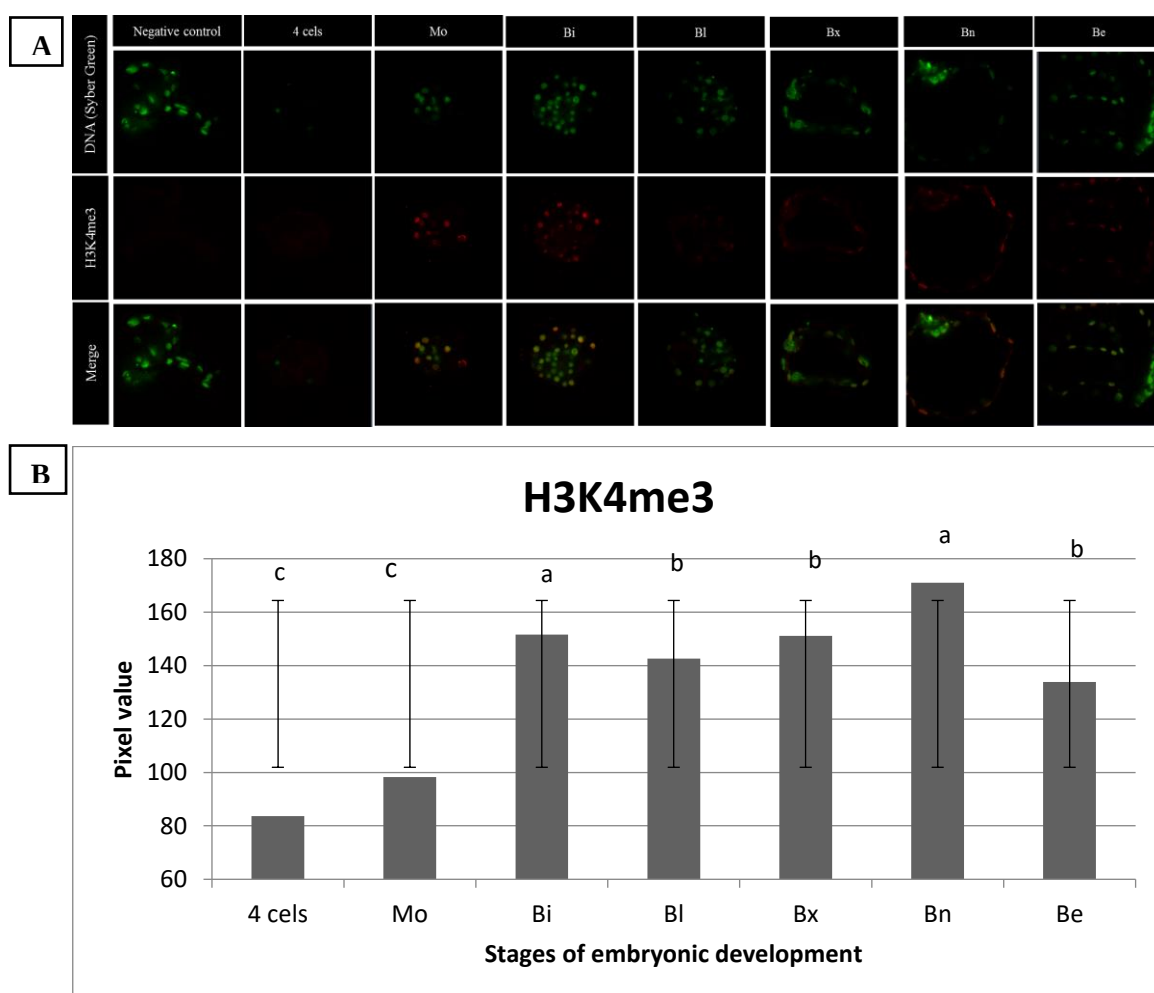


Figure 1: Signal intensity of H3K4me3 in pre-implantation bovine embryos at different stages of development. A: Images of H3K4me3 fluorescence in pre-implantation embryos. B: Chart of values for pixel count, lowercase letters differ by 5% probability (Scott-Knott). Mo: morula; Bi: Initial blastocyst; Bl: Blastocyst; Bx: Expanded blastocyst; Bn: Blastocyst in hatching; Be: Blastocyst hatched

The signal intensity of H3K9me (Figure 2) was elevated between the 4 cell phases and initial blastocyst, from the blastocyst stage this modification decreased and remained constant until the complete hatching.

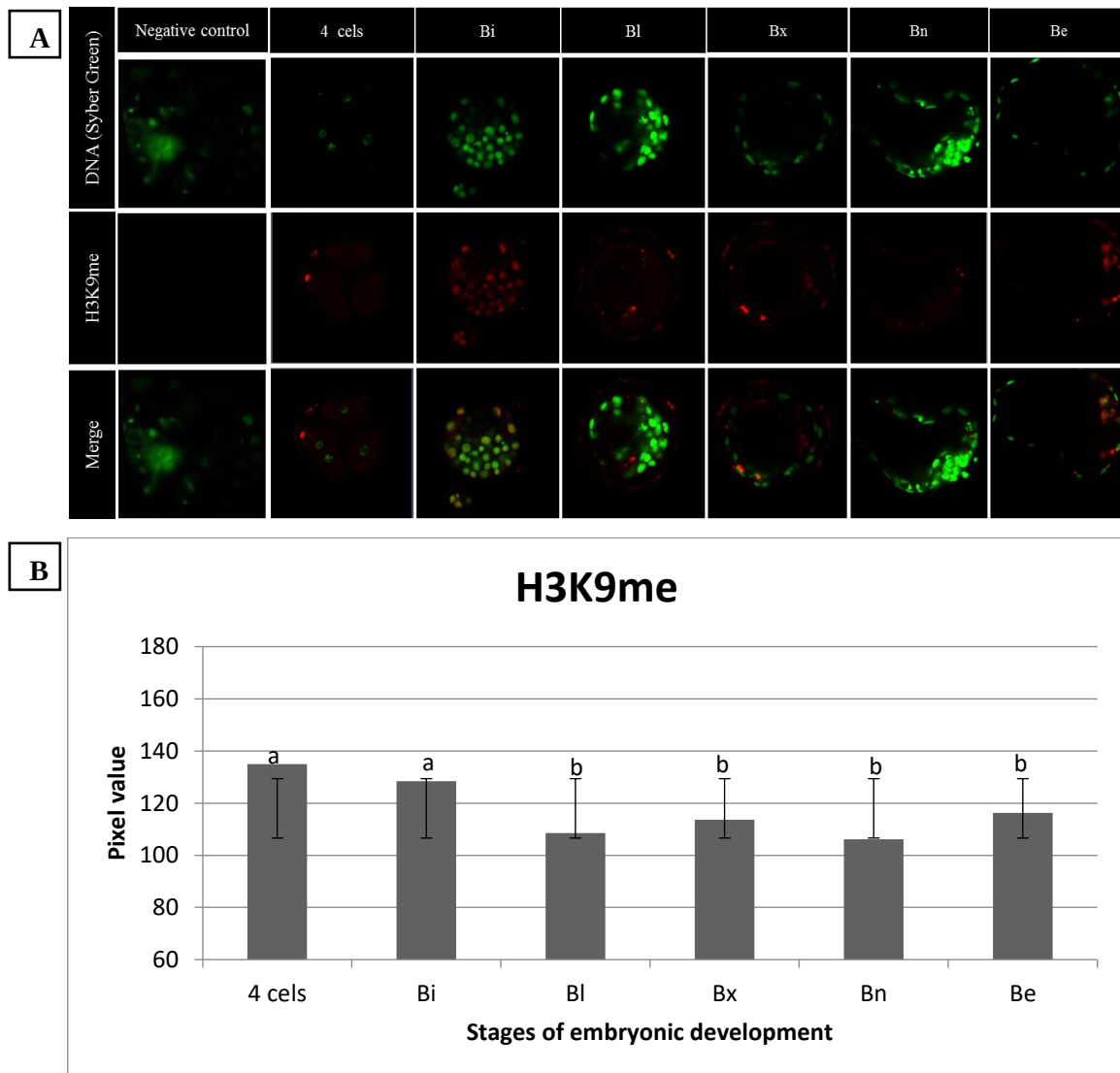


Figure 2: Signal strength of the global methylation of H3K9 in pre-implantation bovine embryos at different stages of development. A: Images of H3K9me fluorescence in pre-implantation embryos. B: Chart of values for pixel count, lowercase letters differ by 5% probability (Scott-Knott). Bi: Initial blastocyst; Bl: Blastocyst; Bx: Expanded blastocyst; Bn: Blastocyst in hatching; Be: Blastocyst hatched

In all stages of development of the pre-implantation embryos the two epigenetic modifications were present, demonstrating their importance in that period.

Comparing the difference in the intensity of H3K4me3 and H3K9me (Figure 3), there was a higher signal intensity of H3K9me in the 4-cell phase and

a higher signal intensity of H3K4me3 from the BI phase. In the initial Blastocyst phase there was no statistical difference between the two epigenetic modifications, suggesting this phase as a transitional period of important embryogenesis events.

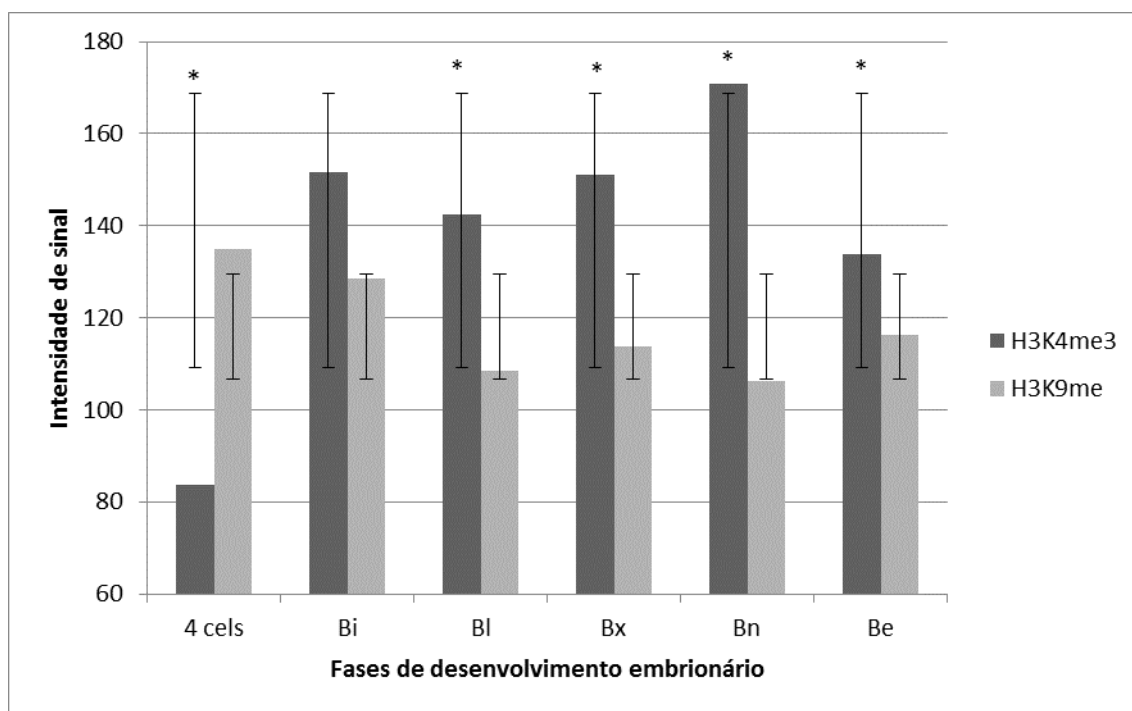


Figure 3: Comparison of H3K4me3 and overall methylation of H3K9 in early embryonic developmental stages. * $p < 0.05$. Bi: initial blastocyst; Bl: blastocyst; Bx: expanded blastocyst; Bn: blastocyst in hatching; Be: hatched blastocyst

4. Discussion

The phases corresponding to the various stages of blastocysts present a higher signal intensity of H3K4me3 compared to previous phases. It has already been demonstrated that blastocysts possess a greater amount of active genes than in the previous phases [14], fact that may explain the increased demand for H3K4me3, histone involved with permission to transcription and chromatin reorganization [3, 15, 16].

In the initial blastocyst stage similar activity of H3K4me3 and H3K9me was observed and soon thereafter, in the blastocyst phase, there was an inverse activity observed in the 4-cell phase, when the H3K9 intensity was higher. The increase in H3K4me3 activity may be related to the onset of cell differentiation, which demands greater gene activity [17, 18]. Another peak of H3K4me3 activity

was observed in the blastocyst stage at hatching, however in the next phase (blastocyst hatching) there was a significant decline of this modification, which indicates that to initiate the hatching process, the embryo demands a high gene activity.

The results of the present study demonstrated that H3K4me3 undergoes a significant elevation of the morula phase to the blastocyst stage, a result opposite to that observed in embryos produced *in vivo*, where morulae have a higher signal intensity of H3K4m3 compared to blastocysts [10]. The divergence between H3K4me3 patterns between individuals produced *in vivo* and *in vitro* demonstrates that the culture media may be altering the chromatin conformation at this stage. A fact that reinforces this hypothesis is that H3K4me3 standards do not present difference between cryopreserved or fresh *in vivo* embryos, but cryopreserved *in vitro* embryos have a lower H3K4me3 intensity than fresh *in vitro* embryos [19].

The H3K9me presented signal intensity lower than H3K4me3 and a constant behavior from the blastocyst phase. Similar behavior was observed during the maturation of swine and bovine oocytes [20-22]. It is believed that the stability of this tag is necessary for the maintenance of a defined gene expression profile during the final stage of oocyte growth [21].

H3K9me is associated with the regulation of H19 and MEST gene expression, which are of great importance for embryonic development, fetal growth, placental function and postnatal development [11]. Studies that investigated the methylation of H3K9 and acetylation of H3K9 in embryos *in vitro* of mice in the regulatory region of the genes mentioned above, found that there is a significant reduction in the methylation of H3K9 as suppressor of the gene expression and increase of the acetylation of H3K9 as activator of said genes [23].

Among the findings of this study it was found that, despite having a characteristic of suppressing gene expression, H3K9me shows a considerable signal intensity in embryonic phases that characteristically present high transcription (from 8 cells [1, 2]). Up to the time when the signal strength of H3K9me equals the signal strength of the H3K4me3 in the initial blastocyst stage. This fact shows signs that there may be regions of bivalent domains of these two post-translational modifications in the embryos, that is, there may be regions

harboring both a "repressive" and "permissive" chromatin modification of gene transcription. The occurrence of possible bivalence in this period may be related to the regulation of genes linked to cell differentiation.

The results found in the present study do not allow to affirm the bivalence between H3K4me3 and H3K9me in different stages of embryonic development, due to the type of analysis used. Studies of genes linked to embryonic development and pluripotency using techniques such as Chromatin Immunoprecipitation (CHIP), can be performed to confirm this information.

It is concluded that H3K4me3 and the global methylation of H3K9 are very important for the development of pre-implantation bovine embryos. The H3K4 has dynamic behavior, presenting important peaks in the phases of blastocyst and blastocyst in hatching. On the other hand, H3K9me has an important but stable behavior from the blastocyst stage. The initial blastocyst phase seems to represent the transition period between important embryogenesis events.

5. References

- [1] Kues WA, Sudheer S, Herrmann D, Carnwath JW, Havlicek V, Besenfelder U, et al. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:19768-73.
- [2] Wu X, Li Y, Xue L, Wang L, Yue Y, Li K, et al. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. *Zygote*. 2011;19:31-45.
- [3] Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circulation research*. 2014;115:311-24.
- [4] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current biology : CB*. 2003;13:1116-21.
- [5] Eissenberg JC, Shilatifard A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental biology*. 2010;339:240-9.
- [6] Gonzalez-Sandoval A, Gasser SM. Mechanism of chromatin segregation to the nuclear periphery in *C. elegans* embryos. *Worm*. 2016;5:e1190900.
- [7] Liu X, Wang C, Liu W, Li J, Li C, Kou X, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature*. 2016;537:558-62.
- [8] Gao Y, Hyttel P, Hall VJ. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. *Molecular reproduction and development*. 2010;77:540-9.
- [9] Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2012;44:14-27.

- [10] Souza Caceres MB, Leite da Silva WA, Bini de Lima AC, de Oliveira JS, Jr., Tavares Cardoso CJ, Dos Santos JV, et al. Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in vivo with sexed semen. *Theriogenology*. 2016;86:1944-52.
- [11] Liu JH, Zhu JQ, Liang XW, Yin S, Ola SI, Hou Y, et al. Diploid parthenogenetic embryos adopt a maternal-type methylation pattern on both sets of maternal chromosomes. *Genomics*. 2008;91:121-8.
- [12] Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of reproduction*. 2001;64:904-9.
- [13] Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:108.
- [14] Munch EM, Sparks AE, Gonzalez Bosquet J, Christenson LK, Devor EJ, Van Voorhis BJ. Differentially expressed genes in preimplantation human embryos: potential candidate genes for blastocyst formation and implantation. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33:1017-25.
- [15] Kiefer JC. Epigenetics in development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236:1144-56.
- [16] Ciccone DN, Chen T. Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics*. 2009;4:216-20.
- [17] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
- [18] Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biology of reproduction*. 1996;54:100-10.
- [19] Maldonado MB, Penteado JC, Faccio BM, Lopes FL, Arnold DR. Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. *Cryobiology*. 2015;71:481-5.
- [20] Endo T, Naito K, Aoki F, Kume S, Tojo H. Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*. 2005;71:123-8.
- [21] Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reproduction, fertility, and development*. 2009;21:738-48.
- [22] Park KE, Magnani L, Cabot RA. Differential remodeling of mono- and trimethylated H3K27 during porcine embryo development. *Molecular reproduction and development*. 2009;76:1033-42.
- [23] Jahangiri M, Shahhoseini M, Movaghar B. H19 and MEST gene expression and histone modification in blastocysts cultured from vitrified and fresh two-cell mouse embryos. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29:559-66.