



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Aquidauana  
Programa de Pós - Graduação em Zootecnia

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA LISINA 4 DA  
HISTONA H3 EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* COM  
SÊMEN SEXADO E SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO**

Acadêmica: Mirela Brochado Souza

Aquidauana – MS

Maio / 2015



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Aquidauana  
Programa de Pós - Graduação em Zootecnia

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA LISINA 4 DA  
HISTONA H3 EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* COM  
SÊMEN SEXADO E SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO**

Acadêmica: Mirela Brochado Souza

Orientadora: Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

Co-orientadora: Dra. Evelyn Rabelo Andrade

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação 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

Maio / 2015

S716c Souza, Mirela Brochado  
Caracterização do padrão de metilação da lisina 4 da histona H3 em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos a criopreservação /Mirela Brochado Souza.  
Aquidauana, MS: UEMS, 2015.  
54p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, 2015.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana de Andrade Melo Sterza.

1. Epigenética 2. Oócitos 3. Embriões I. Título.

CDD 23.ed. 636.0821



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
PRODUÇÃO ANIMAL NO CERRADO-PANTANAL

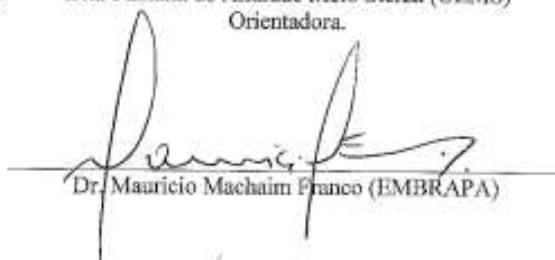


**MIRELA BROCHADO SOUZA**

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 26/03/2015.

  
Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza (UEMS)  
Orientadora.

  
Dr. Mauricio Machain Franco (EMBRAPA)

  
Dr. Erikis Nogueira (EMBRAPA)

*“Vai. E, se der medo, vai com medo mesmo”*

*Pedro Bial*

*“Tudo posso naquele que me fortalece”*

*Filipenses 4.13*

*“Não coloque limites em seus sonhos, coloque fé!”*

*Renato Santos*

Aos meus pais, Pedro e Márcia,  
meu irmão João Pedro,  
e meu noivo Nícolas.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora por dar força, fé, coragem e confiança para enfrentar todos os obstáculos encontrados pelo caminho.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Unidade Universitária de Aquidauana, e a todos os funcionários e professores do curso de mestrado em Zootecnia que tanto contribuíram na minha formação profissional. Principalmente, ao Renato (motorista da unidade), que estava sempre disposto às 5 horas da manhã para nos levar ao frigorífico.

À CAPES e FUNDECT pelo fomento da pesquisa, além da bolsa recebida.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Fabiana de Andrade Melo Sterza, obrigada por passar seus conhecimentos a mim de forma tão carinhosa e amável. Com a senhora aprendi tudo que sei até agora, e graças a senhora surgiram as melhores oportunidades da minha vida, auxiliando no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por sempre me incentivar nas frustrações dos protocolos, fazendo com que eu não desanimasse. Sua dedicação ao trabalho e aquilo que ama, nos inspira a cada dia. Obrigada por ser uma mãezona, e ótima orientadora.

Ao programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEMS. Agradeço a cada um dos professores, por me incentivar e ajudar no meu crescimento profissional, sempre passando todo o conhecimento necessário para tal. À secretária do programa, que estava sempre disposta a nos ajudar, além de toda a paciência.

À minha Co-orientadora Dra. Evelyn Rabelo Andrade, por transmitir seus conhecimentos e por estar sempre à disposição para ajudar.

À banca, Dr. Érikis Nogueira e Dr. Mauricio Machaim, além dos suplentes, por dispor do seu tempo para engrandecer meu trabalho. Ao prof. Splinter, que sempre estava pronto a me atender, e com muita paciência ajudar a executar protocolos e a ouvir as perguntas, além de responde-las com muita informação, tornando as coisas mais complicadas de fácil entendimento.

Ao Ralf Poehland por transmitir seus conhecimentos e não medir esforços em nos ajudar nos resultados.

Aos colegas de trabalho do GENTRA, Jonathan, Carol Ferreira, Jéssica, André, Christopher, Henrique, Mariane, Daniela, Giovana, Carol Bini, Willian (Bravo) e Elielton (Malícia) que me ajudaram nos protocolos, e coletas

de embrião. Obrigada também pelas conversas e discussões sobre assuntos sérios, além das festas, risadas e parcerias. Obrigada também ao veterinário Jair Sábio, que tanto contribuiu na conquista dos resultados, além de transmitir seu conhecimento de maneira simples.

As amigas Naiara, Bruna e Nathalia que mesmo de longe sempre se preocuparam em saber como estavam indo os experimentos e a vida. Obrigada por essa amizade de toda a vida. E também as meninas Allice Ferreira e Nayara Kussano que além da amizade, me ajudam sempre que solicitadas, com assuntos tão específicos! Obrigada Meninas.

À minha amiga e prima/irmã Fabiana Souza que sempre me apoia e está presente nos momentos bons e ruins da minha vida, você é muito importante pra mim. Amo você!

Aos meus familiares, Tia Augusta, Vó Maria, Tia Sandra, Tio Marco, Maria Fernanda, Vó Carmelita, Vô Osvaldo, Tia Maria Ângela, Tio Vanderlei, Giulia, Guilherme, Tio Moa, Tia Rose, Thaís, Eduardo, Gabrielle, Gustavo e Rosa pelas orações, apoio, confiança, incentivo e carinho durante toda a minha vida. Amo vocês!

À Cristina Gomide que se tornou uma grande amiga, e acompanhou todo o período de sofrimento e felicidade da faculdade e do mestrado, e uma grande parceira de tererê. Te Amo!

Aos amigos da família, Tio Ademar, Tia Alice, Tia Mariezinha, Tio Roque, Cleângela, além de vários outros. Que sempre rezaram por mim. E sempre estavam dispostos a atender meus pedidos de favores. Muito obrigada!

À família do meu noiva, Nícolas, Dona Mariza, João Pires, Douglas, Mike, Greissele, Carmen, Fran, Rael, e todos os outros, que me receberam tão bem nessa família. Sempre dispostos a ajudar e oferecer uma palavra amiga. Além da parceira de festas e diversões.

Aos meus pais, Aparecida Márcia e Pedro Lucio, por todo o amor, carinho e dedicação, pelo incentivo nos momentos bons e difíceis da faculdade. Por sempre me passarem a confiança de que tudo vai dar certo, me ensinando e aceitando minhas opiniões. Muito obrigada, amo vocês incondicionalmente!

Ao meu irmão João Pedro, pela amizade, parceria e apoio, pelas conversas durante o dia todo e quase todos os dias. Você é tudo pra mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado e fazer parte de todas as etapas da minha vida. Te amo!

Ao Nícolas Cáceres, meu namorado, meu noivo, meu namorado! Obrigada pelo amor, companheirismo, apoio, parceria e amizade. Obrigada por incentivar e me animar todas as vezes que eu queria desistir. Foi você que me ouviu nos momentos difíceis, você esteve ao meu lado na execução do experimento, nos momentos de comemoração e de felicidade, e nos sofridos também. Obrigada por ir comigo no laboratório aos domingos e feriados, ficar

na hora do almoço, esperando horas por um fim de protocolo, sem um final feliz. Nesse momento você era meu porto seguro, por causa de você conseguir chegar até o fim do experimento e olhar para esse lindo resultado. Obrigada por estar sempre ao meu lado. TE AMO!

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram durante esse período de mestrado. Foram dias de alegria, tristezas, conhecimentos, saudades, privação e trabalho, que jamais serão esquecidos por toda a vida.

**Muito Obrigada!!**

## SUMÁRIO

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| Resumo                                                     | xi  |
| Abstract                                                   | xii |
| CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais                          | 1   |
| 1. Introdução                                              | 1   |
| 1.1. Hipótese                                              | 2   |
| 1.2. Objetivo geral                                        | 2   |
| 1.3. Objetivos específicos                                 | 2   |
| 2. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas a pecuária   | 3   |
| 2.1. Produção de embriões                                  | 4   |
| 2.1.1. Mercado                                             | 5   |
| 2.1.2. MOET                                                | 5   |
| 3. O emprego do sêmen sexado nas biotécnicas da reprodução | 6   |
| 4. Criopreservação de embriões                             | 8   |
| 5. Referências Bibliográficas                              | 11  |
| CAPÍTULO 2 - Artigo de Revisão                             | 17  |
| 1. Introdução                                              | 19  |
| 2. Metilação de histonas                                   | 20  |
| 3. Metilação das histonas em oócitos de mamíferos          | 22  |
| 4. Metilação das histonas em embriões de mamíferos         | 23  |
| 5. Considerações finais                                    | 25  |
| 6. Referências Bibliográficas                              | 26  |
| CAPÍTULO 3 - Artigo Científico                             | 28  |
| 1. Introdução                                              | 30  |
| 2. Material e métodos                                      | 31  |
| 3. Resultados                                              | 34  |
| 4. Discussão                                               | 38  |
| 5. Conclusão                                               | 40  |
| 6. Referencias Bibliográficas                              | 40  |
| CAPÍTULO 4 – Considerações finais                          | 42  |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### CAPÍTULO 3 – Artigo científico

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Viabilidade de embriões produzidos in vivo com sêmen convencional ou sexado.                                                                                                                                                                                                                                          | 34 |
| Tabela 2 | Estágios de desenvolvimento dos embriões obtidos após a lavagem uterina, realizada sete dias após a inseminação artificial, produzidos com sêmen sexado ou convencional. Mórula (Mo), Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl) e Blastocisto expandido (Bx).                                                        | 34 |
| Tabela 3 | Intensidade do sinal (pixels) em Mórulas e Blastocistos (embrioblasto) produzidos in vivo com uso do sêmen sexado, antes e após da criopreservação.                                                                                                                                                                   | 37 |
| Figura 1 | Identificação da H3K4 me3 em Mórulas obtidas após a lavagem uterina realizada 7 dias após a inseminação artificial com sêmen convencional ou sexado,. Imagens 3D da análise de imunofluorescência por microscopia confocal. Azul: anticorpo anti-H3K4me3, verde: Syber Green, mixed: anti H3K4me3 + Syber Green.      | 35 |
| Figura 2 | Identificação da H3K4 me3 em Blastocistos obtidas após a lavagem uterina realizada 7 dias após a inseminação artificial com sêmen convencional ou sexado,. Imagens 3D da análise de imunofluorescência por microscopia confocal. Azul: anticorpo anti-H3K4me3, verde: Syber Green, mixed: anti H3K4me3 + Syber Green. | 36 |

## RESUMO

O Brasil figura como o maior produtor de embriões bovinos do mundo, mas alguns gargalos, como o uso do sêmen sexado e a criopreservação eficiente de embriões ainda tem que ser trabalhados para que a produção e a exportação do material genético sejam otimizadas. A criopreservação de embriões produzidos in vivo é considerada eficiente e o conhecimento de sua biologia básica pode ser utilizado como parâmetro para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na baixa eficiência da criopreservação dos embriões produzidos in vitro. O objetivo desse estudo foi avaliar as modificações da trimetilação da lisina 4 na Histona 3 (H3K4me3) em embriões bovinos produzidos in vivo com sêmen sexado e submetidos a criopreservação. Vacas da raça Girolando (n=5) foram superovuladas e inseminadas com sêmen sexado ou convencional. Após a coleta de embrião (D7), parte dos embriões coletados foram armazenados em Paraformaldeído logo após a coleta, e outra parte armazenada em Paraformaldeído após a criopreservação/descongelamento. Todos os embriões (frescos/sêmen convencional; frescos/sêmen sexado; criopreservados/sêmen convencional e criopreservados/sêmen sexado) foram avaliados por imunofluorescência sob microscopia confocal, para identificação da H3K4me3. Das 190 estruturas coletadas, 100 foram produzidas com sêmen convencional e 90 com sêmen sexado. O uso do sêmen convencional proporcionou a produção de embriões viáveis (72%), sendo a maioria (52,77%) em fases mais avançadas do desenvolvimento (blastocistos expandidos; 52,77%). Por outro lado, os embriões produzidos com sêmen sexado apresentaram menores taxas de viabilidade (36,7%) e a maioria foi coletada em estágios mais precoces de desenvolvimento (Mórula e Blastocisto; 42,42%;  $p<0,05$ ). Embriões na fase de mórula ( $209,26\pm10,95$ ), independente da criopreservação ou do uso de sêmen sexado, apresentaram maior intensidade do sinal da trimetilação da H3K4 quando comparada com o embrioblasto de blastocistos ( $160,35\pm10,52$ ) ( $p<0,05$ ). Os resultados demonstraram que fêmeas da raça Girolando produzem embriões em fases mais avançadas do desenvolvimento após lavagem uterina. Esses são os primeiros resultados que descrevem o perfil epigenético de embriões bovinos produzidos in vivo. Como esperado, todos os embriões apresentam metilação da H3K4, no entanto em mórulas essa característica foi mais acentuada.

**Palavras-chave:** epigenética, metilação de histonas, sexagem do semen, criopreservação, superovulação.

## ABSTRACT

The Brazil stands as the largest producer of embryos in the world, but some obstacles, such as the use of sexed semen and efficient cryopreservation of embryos has yet to be worked out so that the production and export of genetic material are optimized. Cryopreservation of embryos produced in vivo is considered efficient and the knowledge of its basic biology can be used as a parameter for better understanding of the mechanisms involved in the low efficiency of cryopreservation in embryos produced in vitro. The objective of this study was to characterize the modifications of tri-methylated lysine 4 on histone 3 (H3K4me3) in bovine embryos produced in vivo with sex-sorted semen and subjected to cryopreservation. Girolando cows (a common brasilian dairy breed, crossbreed Gir x Holsteins; n = 5) were superovulated and inseminated with sex-sorted or conventional semen. After the embryo collection (n = 4), aliquots of the collected embryos were stored in Paraformaldehyde immediately after collection, or stored in Paraformaldehyde after cryopreservation / thawing. All embryos (fresh / conventional semen, fresh / sexed semen; cryopreserved / conventional semen and cryopreserved / sexed semen) were evaluated by immunofluorescence in confocal microscopy to identify the H3K4me3. From 190 embryos collected, 100 were produced with conventional semen and 90 with sexed semen. The use of conventional semen provided 72% of viable embryos, the majority (52.77%) of them was in more advanced stages of development (expanded blastocysts; 52.77%). In contrast, embryos produced with sexed semen showed lower viability rate (36.7%) and earlier stages of development at time of collection (morula and blastocyst, 42.42%; p <0.05). Embryos in morula stage, regardless of cryopreservation or the use of sexed semen, showed the most prevalent signal of the H3K4me3 compared to blastocysts ( $209.26 \pm 10.95$  vs.  $160.35 \pm 10.52$  intensity channels; p <0.05). Furthermore our results demonstrated those after uterine flushing of Girolando cows the embryos are in more advanced stages of development. These are the first results that describe the H3K4me3 profile of bovine embryos produced in vivo. As expected, all embryos show methylation of H3K4, but in morula the abundance was more pronounced.

**Keywords:** epigenetics, histone methylation, sexing of semen, cryopreservation, superovulation.

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **1. Introdução**

O Brasil é líder mundial na produção de embriões bovinos, sendo responsável por 86% da produção mundial de embriões produzidos in vitro (PIV) (IETS, 2013). Porém o uso da MOET, biotécnica da reprodução que consiste na realização de múltipla ovulação e transferência de embriões, foi reduzido devido ao protocolo necessitar da utilização de hormônios e ser mais arriscada, e aos poucos, substituída pela PIV. A PIV permite o aumento do potencial de exploração zootécnico do animal em um menor período de tempo, uma vez que as sessões de aspiração folicular podem ser realizadas com intervalos de 15 dias sem prejuízo à vida reprodutiva do animal. Porém existem alguns desafios da indústria nacional de embriões que precisam ser superados para a produção em grande escala, especialmente no que diz respeito à exportação desses embriões. Ressalta-se nesse sentido, a necessidade de protocolos mais eficientes para produção de embriões a partir do uso de sêmen sexado (LU et al., 1999; WILSON et al., 2006) e para a criopreservação eficiente desses embriões (VAJTA et al., 1998).

Apesar do cenário promissor do uso de sêmen sexado para produção in vitro de embriões bovinos, um importante obstáculo tem limitado esta biotécnica: a criopreservação de mórulas e blastocistos gerados in vitro (DINNYES et al., 2006). O embrião congelado representa a maneira mais simples, eficiente, segura e de baixo custo para o transporte de material genético, tanto para o mercado interno quanto para o externo. Embora os embriões obtidos in vivo, pela lavagem uterina, possam ser criopreservados satisfatoriamente, o mesmo não ocorre para os embriões gerados in vitro (MUCCI et al., 2006). Sendo assim, embora o Brasil figure como o país com a maior tecnologia de produção in vitro de embriões bovinos, todo esse potencial permanece extremamente limitado, tanto para o uso em nosso país quanto para muitos países interessados na genética brasileira.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar a criotolerância dos embriões in vitro, mas poucos avanços foram observados na

última década. Nesse sentido estudos moleculares têm sido realizados com a intenção de entender melhor a biologia desses embriões.

As avaliações das modificações epigenéticas têm por objetivo fornecer conhecimentos básicos da biologia celular dos gametas que possam fornecer subsídios para identificação das alterações que possam ocasionar a menor viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* após a descongelação, com sêmen sexado. O estudo da epigenética pode ser feito por meio da avaliação da modulação gênica, seja pela metilação do DNA, por interações bioquímicas entre histonas e DNA ou, finalmente, pela remodelação da cromatina (MELLOR, 2006). A partir desse mapeamento, poderão ser propostos e avaliados protocolos alternativos de fecundação, cultivo e preservação que viabilizem a técnica de criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, ao ponto de que passe a ser economicamente viável e possa ser empregada de forma rotineira.

Considerando que nos últimos anos, apesar de muitos esforços terem sido realizados na busca de melhorar os resultados da criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, poucos avanços foram observados, é fundamental que as diferenças biológicas existentes entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, bem como dos gametas envolvidos na sua produção sejam mais bem estudados e entendidos.

### **1.1. Hipótese**

A metilação tripla da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) é menos frequente em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e criopreservados.

### **1.2. Objetivo Geral**

Avaliar o perfil epigenético de embriões bovinos produzidos *in vivo*, por meio da observação do padrão de metilação da H3K4me3.

### **1.3. Objetivos Específicos**

Avaliar as modificações epigenéticas em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e convencional.

Avaliar as modificações epigenéticas em embriões bovinos produzidos *in vivo* antes e após a criopreservação.

## **2. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à pecuária**

As biotecnologias da reprodução animal apresentam-se como uma etapa fundamental para a multiplicação tanto de animais para a produção de carne ou leite (FAO, 2002), como para garantir a preservação de material genético de animais em vias de extinção.

A eficiência da produção animal é dependente dos processos produtivos inerentes ao macho e à fêmea. Couter (1986) preconizou que, economicamente, a eficiência reprodutiva é cinco vezes mais importante do que o desempenho no desenvolvimento ponderal ou na qualidade do produto. Desse modo, justificam-se estudos visando desenvolver e aprimorar biotecnologias que possibilitem aumentar a eficiência reprodutiva.

A criopreservação de espermatozoides foi essencial para a viabilização do melhoramento genético, pois permitiu o uso da inseminação artificial, tornando possível a expansão do uso de reprodutores de qualidade genética superior no mundo todo (GORDON, 2004; HOLT, 2000). Com o sucesso da criopreservação espermática, surgiram as buscas por novos métodos de reprodução assistida.

Logo, o conhecimento da dinâmica folicular de fêmeas bovinas por meio da ultrassonografia, foi portanto, a base para o desenvolvimento de protocolos de controle do ciclo estral. Atualmente, o controle do ciclo estral tem sido realizado de maneira eficiente com a utilização de hormônios exógenos, e tem possibilitado incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos por meio da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação de doadoras, transferência de embriões em tempo fixo (TETF), entre outras biotécnicas da reprodução animal.

A Inseminação Artificial (IA) foi um avanço tecnológico no tradicional método seletivo de reprodução e importante ferramenta para o desenvolvimento da indústria de produção animal (COWAN, 2010). Porém apenas 6 a 7% das fêmeas bovinas, em idade reprodutiva, são inseminadas no

Brasil. Isso ocorre devido a limitações como falhas na detecção do estro, puberdade tardia e o longo período de anestro pós-parto, principalmente em gado de corte (SÁ FILHO et al., 2008; VIEIRA et al., 2004). A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) surgiu na tentativa de superar as limitações fisiológicas das fêmeas bovinas (MAPLETOFT et al., 2008). Na atualidade essa biotécnica encontra-se em expansão, e assim buscam-se protocolos cada vez mais eficientes para tipos determinados de animais.

Aliado a inseminação artificial, a biotécnica do sêmen sexado vem revolucionando o manejo reprodutivo do Brasil, pois apesar das limitações do país, no que diz respeito ao manejo de grandes rebanhos, logística para atendimento comercial às propriedades, entre outros, nos últimos anos observou-se uma aumento de 0,27% (2009 – 2013) do uso da IA no país (ASBIA, 2013). Esse mercado tem movimentado em média 6 milhões de reais anualmente (ASBIA, 2013) e tem sido a base da profissionalização no campo, bem como de sua melhor remuneração. Dessa forma, tem promovido não somente a melhoria do desempenho da pecuária nacional, mas também contribuindo para a melhoria da vida do homem no campo.

A biotécnica da sexagem do sêmen é disponível como método realizável com repetibilidade, promovendo a seleção espermática que resulta em produtos saudáveis e reprodutivamente funcionais (TUBMAN et al., 2004). O surgimento do sêmen sexado proporcionou a possibilidade de um ganho econômico, devido a produção de fêmeas ou machos de acordo com a demanda do mercado, promovendo assim um ganho na produtividade animal. Porém, esse tipo de sêmen é mais sensível, provavelmente em função do estresse do processo ao qual é submetido e produz menores taxas de prenhez quando comparado com sêmen convencional (VIEIRA, 2012). Diante disso, a busca pela melhor eficiência desse tipo de sêmen aplicado as biotecnologias, se faz necessária, para obter ganhos ainda maiores.

Por fim é importante ressaltar que o avanço dessas biotécnicas tem impactado diretamente as biotécnicas para produção de embriões.

## **2.1. Produção de embriões**

### **2.1.1. Mercado**

O Brasil é líder mundial na produção de embriões bovinos *in vitro*, sendo responsável por 86% da produção mundial de embriões PIV (IETS, 2013). A partir de 2003 houve um aumento acentuado e significativo na produção desses embriões (VIANA, 2012). E entre 2006 e 2011, observou-se além do crescimento no número de embriões bovinos PIV (28%) produzidos, uma diminuição acentuada na produção de embriões bovinos *in vivo* (73%; SILVA, 2012). Em decorrência de grande demanda por genética brasileira e a dificuldade de exportação dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, houve uma expansão dos laboratórios de PIVE brasileiros no mundo, estando hoje distribuídos em países com Índia, Colômbia, Paraguai, entre outros. Segundo a SBTE (2009), o Brasil possui potencial para continuar liderando o mercado de embriões PIV. Porém esse crescimento dependerá de fatores, como a criopreservação eficiente desses embriões produzidos *in vitro*. Com esse entrave solucionado o Brasil, provavelmente, manterá um crescimento entre 5 e 7% por ano, estabilizando sua produção e consolidando o mercado ainda mais.

### **2.1.2. MOET**

Sabe-se que a utilização da superovulação (SOV), associada a transferência de embrião (TE), aumenta significativamente o potencial de produção de fêmeas bovinas (MORRIS et al., 2001), possibilitando que uma fêmea produza um número muito superior de descendentes. Estima-se a produção de 6,2 embriões viáveis por coleta, que com média de 43% de prenhez (IETS, 2012), pode gerar em média 2,6 produtos por coleta. Considerando a possibilidade de coleta a cada 35 dias, pode-se obter 26 produtos/ano. Entretanto, para produção comercial, ainda existem alguns obstáculos a serem superados, como a alta variabilidade de resposta das doadoras aos fármacos (BARROS E NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2006) e o custo desse tipo de procedimento. A criopreservação do embrião bovino produzido *in vivo* é uma realidade, permitindo que a SOV seja realizada

a qualquer momento, sem a necessidade de preparo prévio de receptoras, podendo esse embrião ser utilizado em um momento mais oportuno.

Limitações da MOET, como o alto custo por embrião (R\$ 85,21/embrião viável; SILVA et al., 2014), baixa produção média (n=6) e alta variabilidade do número de embriões produzidos (0 a 15 embriões/vaca/coleta; VIANA, 2012; CAPOVILLA et al, 2000; BARUSELLI et al., 2007 e 2008), explicam a sua substituição pela produção in vitro de embriões, uma biotécnica relativamente mais barata e de fácil aplicação. A PIV surgiu como uma opção para a multiplicação animal, não só por atender a tendência de mercado, melhoramento genético, visto sua eficiência em produzir uma grande quantidade de embriões em um curto espaço de tempo, mas também por possibilitar a utilização de várias categorias animais (MARSON et al., 2003). Projeta-se um rendimento médio de 2,7 gestações por sessão de aspiração (IETS, 2012), quando os embriões são transferidos a fresco. A taxa de prenhez obtida com embriões PIVE criopreservados tem sido insatisfatória (10 a 43%; VAJTA et al., 1996; DONNAY et al., 1998; LAZAR, 2000; MASSIP, 2001), por isso em programas de PIVE/TETF um maior número de receptoras deve ser preparado.

Diante disso, a criopreservação do embrião produzido in vitro não tem sido alvo de muitas pesquisas básicas e aplicadas.

### **3. O emprego do sêmen sexado nas biotécnicas da reprodução**

Na bovinocultura o sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o desempenho do agronegócio. A possibilidade de produzir sêmen com espermatozoides portadores do cromossomos X ou Y aumenta os benefícios da utilização da inseminação artificial e das biotécnicas da reprodução relacionadas. Essa tecnologia otimiza a produtividade, por permitir um avanço genético a um menor custo, já que são produzidos principalmente animais do sexo desejado (FREITAS, 2007; SEIDEL, 2007).

A criopreservação do sêmen é uma realidade amplamente utilizada, e com o sêmen sexado não é diferente. Apesar desse processo causar danos às células, os espermatozoides mais fortes resistem ao processo, produzindo

taxas de prenhez satisfatórias quando utilizado em programas de IA (35 a 45% de concepção; DUARTE et al., 2007; MEIRELLES et al, 2008; RÉGIS & COSTA, 2008), mas que variam de acordo com a raça (Girolando - 17,86% de concepção, GERHARDT et al., 2012; Nelore - 46,10% de prenhez, DUARTE et al., 2007), categoria animal (Vacas lactantes - 21% de concepção, ANDERSSON et al., 2006; Novilhas - 47% de concepção, DEJARNETTE et al., 2009; Vacas não lactantes - 12% gestação, SCHENK et al. 2009), tipo de protocolo (GERHARDT et al., 2012; SALLES et al., 2010), manejo da propriedade, entre outros fatores. No entanto é inegável o seu benefício de produzir maior número de produtos do sexo desejado (93,02%, MEIRELLES et al., 2008, 90%, BARUSELLI et al., 2007 e 2008).

Gerhardt et al. (2012) trabalhando com animais da raça Girolando inseminadas com sêmen sexado observou que quando inseminadas 12 horas após a observação de cio apresentaram taxa de concepção de 37,04% (10/27) e as inseminadas 15 horas após, a taxa foi de 50% (14/28). Baruselli et al. (2008) realizaram MOET com sêmen sexado, sendo a IATF realizada 12 e 24 horas e 18 e 30 horas após a administração de LH. O grupo inseminado com 18/30 horas produziu um maior número de embriões (10,42 versus 8,17). Sugerindo que para um melhor desempenho do sêmen sexado a inseminação deve ser mais próxima ao momento da ovulação.

Uma alta variabilidade individual tem sido observada na produção de embriões de doadoras submetidas a MOET. A média de embriões obtidos por essa técnica é maior quando o sêmen convencional é utilizado (5,9 a 9,9 versus 3,8 a 8,4; KAIMIO et al., 2013; LARSON et al., 2010; BARUSELLI et al, 2007). Já foi relatada a superioridade de produção de embriões por novilhas em relação às vacas (KAIMIO et al., 2013).

Em uma extensa revisão, Araújo et al. (2013), observou que vários fatores podem influenciar os resultados da PIV com sêmen sexado, destacando-se baixas taxas de fecundação, clivagem, blastocistos, gestações, bem como a variação entre touros. Para a fecundação in vitro de oócitos bovinos é necessário apenas um pequeno número de espermatozoides, o que permite a utilização de sêmen sexado (GARNER & SEIDEL JR., 2008). Por meio dessa

técnica tem sido obtidas taxas de clivagem entre 23% e 63% e de blastocistos entre 13% e 47% (TONELLO et al., 2005; LOIOLA, 2013; CARVALHO NETO, 2009). O uso de sêmen sexado fresco resultou em 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento embrionário (LU et al, 1999).

Bodmer et al (2005) observaram menor taxa de clivagem (33% x 23,5%) e maior perda embrionária (15,8% x 2,9%) nos procedimentos de PIVE realizados com sêmen sexado. As perdas embrionárias foram maiores tanto em vacas como em novilhas com o uso do sêmen sexado (17,2% e 11,1% respectivamente) quando comparadas com sêmen convencional (0% e 5,6%). A alta taxa de abortamento no 2º ou 3º mês de gestação foi relacionada consequências de danos causados no DNA dos espermatozoides durante o processo de citometria de fluxo (BODMER et al., 2005).

É importante ressaltar que existe grande variação individual na fertilidade de touros submetidos ao processo de sexagem, mostrando que ainda há necessidade de mais estudos que levem a melhor eficiência da técnica.

Essa situação mostra a importância de um melhor entendimento das alterações da biologia básica que espermatozoides e embriões sofrem quando submetidos a tais biotécnicas. O estudo do perfil epigenético dessas estruturas pode explicar tais diferenças e subsidiar o desenvolvimento de novas ferramentas que incrementem a eficiência das biotécnicas que utilizam o sêmen sexado.

#### **4. Criopreservação de embriões**

A criopreservação tem como objetivo viabilizar economicamente a biotecnologia da transferência de embriões produzidos in vivo ou in vitro, pois permite a difusão de material genético em larga escala. Além disso, favorece o armazenamento dos embriões por longos períodos com reduzida perda da capacidade de desenvolvimento (NICACIO et al., 2008).

Para manter a viabilidade dos embriões criopreservados, crioprotetores internos e externos são utilizados para proteger as células dos danos causados pela congelação. Os crioprotetores internos são aqueles que reduzem a formação de gelo no interior da célula durante o processo. Os crioprotetores

externos podem ser macromoléculas de alto ou baixo peso molecular. As moléculas de alto peso molecular promovem a desidratação da célula, e as de baixo peso molecular, são eficientes na reparação de danos de membrana celular, minimizando o efeito das altas concentrações de solutos durante a desidratação das células (VISITIN et al., 2002).

O método eleito para a criopreservação de embriões produzidos in vivo é o congelamento convencional ou congelamento lento, que é baseado na diminuição da temperatura de forma gradativa (de 1 a 10°C/ hora) até que se atinja a temperatura do nitrogênio líquido, usando um congelador programável, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (SANTOS, 2000). Este é um método eficaz que tem apresentado resultados satisfatórios de prenhez (45 a 55%; BARUSELLI et al., 2000; PIERONI, 2009; ALVAREZ, 2008).

O congelamento clássico tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, entretanto permite a formação de cristais de gelo (efeito solução), que em maior ou menor escala, resultarão em lesões às membranas e organelas. A queda da temperatura é controlada mantendo-se uma curva constante até atingir a temperatura de -32°C, quando as palhetas contendo os embriões são mergulhadas no nitrogênio líquido (DODE et al, 2013).

Porém, esse tipo de congelação não é eficiente para embriões produzidos in vitro. Nesse sentido, após vários estudos sem sucesso (SERAPIÃO et al., 2005; ARAÚJO et al., 2005), optou-se pela vitrificação, método de congelamento ultra-rápido com altas concentrações de crioprotetor (PAPADOPOULOS et al., 2002). As altas concentrações de crioprotetor têm a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI et al., 2002). As taxas de resfriamento são de aproximadamente 2500°C/min (PALASZ & MAPLETOFT, 1996), velocidade que reduz a toxicidade dos crioprotetores e diminui o tempo de exposição da célula a temperaturas críticas (ARAV et al., 1993). Apesar de diversos esforços estarem sendo realizados para aprimorar os resultados da vitrificação, os resultados obtidos (Taxa de prenhez de 10 a 43%; VAJTA et al., 1996;

DONNAY et al., 1998; LAZAR, 2000; MASSIP, 2001) ainda estão aquém do desejado. Além disso, essa técnica apresenta uma limitação para utilização no campo, pois o método exige muita habilidade técnica laboratorial, tanto para a vitrificação como para a "desvitrificação".

Apesar do surgimento da vitrificação, os tecidos e células sofrem injúrias decorrentes da criopreservação. Entretanto, tais lesões parecem estar potencializadas no gameta feminino. Isso porque o ócito é uma célula muito grande e volumosa, possuindo grande quantidade de água facilitando a formação de cristais de gelo. Além disso, o ócito está sujeito a danos morfológicos e funcionais (HYTTEL et al., 2000), com lesões na maquinaria meiótica, como desorganização de fusos e perdas de microtúbulos, além de outras alterações ultraestruturais (BOISO et al., 2002; MORATO et al., 2008; LUCIANO et al., 2009). Vários estudos para melhora da eficiência da criopreservação em diferentes estágios da meiose vêm sendo realizados (SPRIGICIO, 2011; CAMARGO et al., 1997; COSTA et al., 2002; MEZZALIRA et al., 2002; PASCHOAL et al., 2012).

Embriões PIV são menos resistentes à criopreservação do que os *in vivo*, e isso tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (ABE et al., 2002). Entre essas diferenças pode-se mencionar maior quantidade de vacúolos, comunicações intercelulares reduzidas, menor compactação, disco embrionário geralmente menor com menos células, menor quantidade de células totais e zona pelúcida mais frágil (CROSIER et al., 2001). Além disso, embriões PIV possuem um grande acúmulo intracelular de lipídeos e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões "*in vivo*" (CROSIER et al., 2001; FARIN et al., 2004).

Assim, vários testes vêm sendo feitos para tentar minimizar as diferenças entre os embriões. A manipulação do sistema de PIVE, por meio da retirada do soro fetal bovino (SFB) do meio de cultivo reduz a quantidade de lipídeos, mas também reduz a produção de blastocistos. Entretanto, alternativas como a redução na concentração do SFB e a delipidação química foram testadas com sucesso e podem ser utilizadas isoladas ou em combinação nos sistemas de

cultivo de embriões PIV (DODE et al., 2013).

## 5. Referências Bibliográficas

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.
- ALVAREZ, R.H.; MENEGHEL, M.; MARTINEZ, A.C.; PIRES, R.M.L.; SCHAMMASS, E.A. Transfer of bovine blastocysts derived from short-term in vitro culture of low quality morula produced in vivo. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p.257-260, 2008.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.95-97, 2006.
- ARAUJO, M.C.C.; VALE FILHO, V.R.; FERREIRA, A.M.; AS, W.F.; BARRETO FILHO, J.B.; CAMARGO, L.S.A.; SARAPIAO, R.V.; SILVA, M.V.G.B. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. **Arquivo Brasileira Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.751-756, 2005.
- ARAUJO, M.S.; VOLPATO, R.; LOPES, M.D. Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.11, n.3, p.08–15, 2013.
- ARAV, A.; SHEHU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v.99, p.353-358, 1993.
- ASBIA – **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Importação, exportação e comercialização de sêmen. Relatório anual 2013. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2013.pdf>. Acesso em: out/2014.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; JACOMINI, J.O.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: III Simpósio Internacional de Reprodução Animal, Proceedings, **Anais...** v.1, p.380, 2008.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, p. 218, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S.; AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R.P.

- Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.374-381, 2007.
- BODMER, M.; JANNET, F.; HASSIG, M.; DEN DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sexsorted and non-sorted sperm under field condition. **Theriogenology**, v.64, p.1647-1655, 2005.
- BOISO, I.; MARTI, M.; SANTALO, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. A. Confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. **Human Reproduction**, v.17, p.1885-91, 2002.
- CAMARGO, L.S.A.; AS, W.F.; FERREIRA, A.M.; ALBUQUERQUE, F.T.; COSTA, E.P.; VIANA, J.H.M. Criopreservação de ovócitos bovinos imaturos com 1,2 propanediol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.12, p.i325-i331, 1997.
- CARVALHO NETO, J.O. **Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservados após a sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões**. Dissertação de mestrado em ciências animais – Universidade de Brasília. 2009.
- CAPOVILLA, L.C.T.; KOZICKI, L.E.; VELLIOS, M.S.; CABRAL, M.M. Viabilidade técnica e econômica da produção de gêmeos em vacas da raça nelore pela transferência de embriões. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.117-127, 2000.
- COSTA, E.P.; GUIMARAES, J.D.; TORRES, C.A.; FAGUNDES, L.M.; GIOSO, M.M. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1122-1129, 2002.
- COUTER, G.H. Puberty and postpuberal development of beef bulls. In: MORROW, D.A. (Ed.), **Theriogenology**. Philadelphia: Saunders company, 1986. p.142-148.
- COWAN, T. **Biotechnology in Animal Agriculture: Status and Current Issues**. Congressional Research Service, Analyst in Natural Resources and Rural Development. 2010. Disponível em: <http://www.cnire.org/NLE/CRSreports/10Oct/RL33334.pdf>. Acesso em out/2014.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 2001.
- DEJARNETTE, J.M.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, v.71, p.49-58, 2009.
- DINNYES, A.; MENG, O.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.171-190, 2006.
- DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRIGICIO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.145-150, 2013.
- DONNAY, I.; AUQUIER, Ph.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. Vitrification of in vitro produced bovine

- blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v.52, p.93-104, 1998.
- DUARTE, A.M.; DINIZ, E.G.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; TAVARES, M.; FRANCO, R.V.R. Pregnancy rates in heifers inseminated with semen of nelore bulls sexed by flow cytometry. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 567-573, 2007.
- FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal Animal Science**, v.82, p.E53-E62, 2004.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO/GIEWS – Food Outlook**, v.2, n.13, 2002.
- FREITAS, C.P. **Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado**. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2007.
- GARNER, D.L.; SEIDEL JR, G.E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v.69, p.886–895, 2008.
- GERHARDT, B.T.; SINEDINO, L.D.P.; DOURADO, A.P.; ALVES, P.A.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Taxa de concepção com sêmen sexado ou convencional e viabilidade econômica em vacas Girolandas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.2, p.128-132, 2012.
- GORDON, I. **Reproductive technologies in farm animals**. Wallingford, UK: CAB International, 2004. 332p.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, n.1, p.80-88, 2000.
- International Embryo Transfer Society (IETS). **Embryo Transfer Newsletter**. 2013. Disponível em: <http://www.iets.org>. Acesso em out/2014.
- International Embryo Transfer Society (IETS). **Embryo Transfer Newsletter**. 2012. Disponível em: <http://www.iets.org>. Acesso em out/2014.
- KAIMIO, I.; MIKKOLA, M.; LINDEBERG, H.; HEIKKINEN, J.; HASLER, J.F.; TAPONEN, J. Production of embryos with sex sorted semen superovulated dairy heifers and cows. **Theriogenology**, v.8, p.950-954, 2013.
- KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Human Reproduction**, v.17, n.7, p.1863-1874, 2002.
- LARSON, J.E.; CORDEIRO, G.C.; FUNELL, B.J.; PÁSSARO, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J.C. Embryo production in superovulated Angus cows four times inseminated with thawed semen thawed-ordered or conventional. **Theriogenology**, v.73, n.5, p.696-703, 2010.
- LAZAR, L. The vitrification of in vitro fertilized cows blastocysts by open pulled straw method. **Theriogenology**, v.54, p.571-578, 2000.
- LOIOLA, M.V.G. **Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias**. Dissertação de Mestrado - Programa Ciência Animal nos Trópicos – Universidade Federal da Bahia. 2013.

- LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In Vitro Fertilization with Flow Cytometrically-sorted bovine Sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1393-1405, 1999.
- LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v.59, p.90-5, 2009.
- MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; ADAMS, GP. Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. *Biotechnologia da Reprodução em Bovinos*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, **Anais...** Londrina-PR. p.15-25, 2008.
- MARSON, E.P.; PREVEIRO, T; FERRAZ, J.B.S. As biotecnologias aplicadas à Reprodução e Melhoramento Animal: Inseminação Artificial, Transferência de embriões, Fertilização in vitro e Clonagem – Parte 2. **Beef Point**, 2003.
- MASSIP, A. Cryopreservation of embryo of farm animals. **Domestic Animal**, v.36, p.49-55, 2001.
- MEIRELLES, C.; FARIA, V.R.; SOUZA, A.B.; WEISS, R.R.; SEGUI, M.S.; KOZICKI, L.E. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.2, p.98-103, 2008.
- MELLOR, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in Genetics**, v.22, p.320-329, 2006.
- MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; BARBIERI, D.P.; MACHADO, M.F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Vitrificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos à citocalasina B. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, p.260-265, 2002.
- MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Embryo development and structural analysis of in vitro matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. **Theriogenology**, v.70, p.1536-43, 2008.
- MORRIS, DG; DISKIN, M.G.; SREENAM, J.M. Biotechnology in cattle reproduction. **Beef Production**, series nº 39, 2001.
- MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, p.1551-1562, 2006.
- NICACIO, A.C. **Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro**. Tese de doutorado em ciência Animal - Universidade de São Paulo. 2008.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p. 127-149, 1996.
- PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.35-44, 2002.

- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; DIAS MAZIERO, R.R.; CROCOMO, L.F.; ONA MAGALHAES, L.C.; RASCADO, T.S.; MARTINS, A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, p.1-12, 2012.
- PIERONI, J. S. P. **Influência do local de inovulação de embriões produzidos in vivo e in vitro sobre as taxas de concepção de fêmeas bovinas e sua relação com a morfologia uterina**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp. 2009.
- REGIS, A.C.A.; COSTA, D.S. **Avaliação econômica da utilização de sêmen sexado para produção de touros nelore no estado de Mato Grosso do Sul**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2008.
- SÁ FILHO, M.F.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; BARUSELLI, P.S. **Avanços nos protocolos reprodutivos em fêmeas bovinas utilizando sêmen sexado**. Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-Universidade São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2008.
- SALLES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Timing of insemination with sexed or nonsexed semen on pregnancy rates of jersey heifers detected in heat by radiotelemetry. **Reproduction Fertility Development**, v.22, p.178, 2010.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, ed. especial, p. 70-84, 2000.
- SCHENK, J.L.; CRAN, D.G.; EVERETT, R.W.; SEIDEL JR, G.E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v.71, p.717-728, 2009.
- SEIDEL JR. G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.443-446, 2007.
- SERAPIÃO, R.V.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; GILARDI, S.G.T.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; NOGUEIRA, L.A.G. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.12, n.1/3, p.58-61, 2005.
- SILVA, J.D. **Análise mercadológica de embriões zebuínos produzidos a partir da técnica de fertilização in vitro – FIV**. 2012. Disponível em: <http://simaoedias.com/Mercado%20de%20embri%C3%B5es.pdf>. Acesso em out/2014.
- SILVA, W.A.L.; CARDOSO, C.J.T.; ARRUDA, E.D.S.; SOUZA, M.B.; MEDEIROS, C.F.; FIALHO, A.L.L.; KISCHEL, H.; MELO-STERZA, F.A. Análise econômica da produção in vivo de embriões bovinos da raça Girolando In: V Semana da Zootecnia e IV Encontro Científico da Zootecnia, 2014, Aquidauana. **Anais...** 2014.
- Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). **Relatório da Reunião Anual**. 2009. Disponível em: <http://www.sbte.org.br/>. Acesso em out/2014.
- SPRIGICIO, J.F.W. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo método de cryotop: avaliação de danos morfológicos,**

- funcionais e moleculares.** Dissertação de Mestrado em Ciências Animais – Universidade de Brasília. 2011.
- TONELLO, T.T.M.; ACCORSI, M.F.; FERRAZ, M.L.; WATANABE, M.R.; MEIRELLES, F.D.P.; MEIRELLES, F.V.; WATANABE, Y.F. Produção in vitro de embriões bovinos a partir de sêmen sexado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, 2005.
- TUBMAN, L.M.; BRINK, Z.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. **Journal Animal Science**, v.82, p.1029-1036, 2004.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.191-200, 1996.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.51, p.53–58, 1998.
- VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, n.1, p.12-18, 2012.
- VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.55-65, 2012 – Edição Especial.
- VIEIRA, R.J; CHOW, L.A; SOUSA, A.O. Sincronização do ciclo estral em vacas mestiças pela administração do fator liberador de Gonadotrofina (GnRH) em associação com prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.215-220, 2004.
- VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICACIO, A.C.; ASSUMPCAO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really diferente. **Theriogenology**, v.57, p.345-359, 2002.
- WILSON, R.D.; FRICKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J.J.; PENFIELD, C.M.; WEIGEL, K.A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, p.1007-1015, 2006.

## **CAPÍTULO 2 – Artigo de Revisão (Revista Brasileira de Reprodução Animal)**

### **Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos**

SOUZA, M.B.<sup>1</sup>; MELO-STERZA, F.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana-MS, Brasil

#### **RESUMO**

A epigenética consiste no estudo das mudanças hereditárias na expressão gênica que independem de mudanças na sequência primária do DNA. As mudanças epigenéticas desempenham um importante papel no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características estáveis diferentes apesar de conterem o mesmo material genômico. Alguns resultados sugerem que as modificações epigenéticas estão associadas com a aquisição de competência para o desenvolvimento do oócito. O desenvolvimento oocitário e embrionário envolvem uma série de modificações epigenéticas importantes, incluindo o remodelamento das histonas, que são imprescindíveis para o desenvolvimento normal do embrião. As histonas não são somente proteínas estruturais, mas também são fundamentais, para as modificações pós-traducionais, para controle da expressão gênica, ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X. As alterações das histonas podem estar associadas à diferenças na regulação da transcrição, o que pode levar a alterações no desenvolvimento do oócito e embrião, podendo culminar com a perda embrionária.

**Palavras-chave:** epigenética, histona, metilação, oócitos, embriões

**26 ABSTRACT**

27 Epigenetics is the study of heritable changes in gene expression that are independent of  
28 changes in the primary sequence of DNA. Epigenetic changes perform an important role  
29 in cellular differentiation process, allowing the cells to keep different stable  
30 characteristics despite containing the same genomic material. Some results suggest that  
31 epigenetic modifications are associated with the acquisition of developmental  
32 competence of the oocyte. The oocyte and embryo development involve a number of  
33 important epigenetic modifications, including the remodeling of histones, which are  
34 essential for normal development of the embryo. Histones are not only structural  
35 proteins, but are also crucial for the post-translational modifications, for control of gene  
36 expression, genome activation, DNA methylation and inactivation of the X  
37 chromosome. Changes of histones may be associated with differences in the regulation  
38 transcription, which may lead to changes in the oocyte and embryo development, and  
39 may lead to pregnancy loss.

40 **Keywords:** epigenetics, histone, methylation, oocytes, embryos

41

## 1. Introdução

As proteínas histonas desempenham papéis importantes na estrutura da cromatina (HUANG et al., 2006). O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, o qual é composto de 147 pares de base de DNA super-helicoidal enrolado em 1,75 voltas em torno de um octâmero de quatro proteínas, as histonas centrais (H2A, H2B, H3, e H4) (KORNBERG et al., 1999; MELLOR, 2006).

Há diferentes mecanismos que podem modular a cromatina, são eles: metilação do DNA, modificações covalentes nas histonas e fatores remodeladores da cromatina. A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil à base citosina na fita de DNA, que promove a repressão da transcrição, especialmente em mamíferos (BIRD, 2007). A regulação da transcrição pode ser realizada por meio de modificações nas regiões amino terminais da histona tais como metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação (MELLOR, 2006).

A metilação do DNA é a mais bem estabelecida marca epigenética que é determinada para a expressão dos alelos específicos dos genes *imprinted* (WEAVER et al, 2009) e sua relação com a reprodução foi revisada por Ferreira e Franco (2012).

A metilação de histonas representa uma importante marca epigenética e é caracterizada pela ligação de um, dois ou três radicais metil na cauda amino terminal da histona. Essas marcas podem ter significado biológico diferente (BOTTOMLEY, 2004), constituindo um verdadeiro “código de histona”, que são interpretados por diferentes fatores celulares (EGGER et al., 2004; KOUZARIDES, 2007). Estas modificações estão associadas a uma maior compactação dos nucleossomos, a heterocromatina, e a menos compactada, eucromatina. Quando as alterações pós-traducionais das histonas favorecem a uma maior compactação da cromatina, deixam inacessíveis os sítios de

ligação dos fatores de transcrição. Os genes são geralmente silenciados na heterocromatina e ativos na eucromatina (MISTELI, 2007; MELLOR, 2006).

Na reprodução a epigenética pode auxiliar no entendimento sobre as diferenças observadas entre a qualidade de embriões bovinos produzidos in vivo e in vitro. Busca-se, com essa revisão, descrever o perfil da metilação de histonas em oócitos e embriões de mamíferos.

## 2. Metilação de histonas

A metilação covalente das histonas ocorre nos resíduos de arginina e lisina. Resíduos de lisina podem estar mono, di ou trimetilados, enquanto os de arginina podem estar monometilados (BOTTOMLEY, 2004). As duas modificações da H3 mais associadas com metilação do DNA são a metilação da lisina 4 e a da lisina 9 (H3K4me e H3K9me). Estes dois sítios de modificações da histona parecem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e na diferenciação celular em mamíferos. Especificamente, a metilação do DNA está associada com a ausência de metilação da H3K4 e a presença de metilação na H3K9 (EISSENBERG et al., 2010), reprimindo a transcrição.

Em geral, a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20, está associada com a condensação e repressão da cromatina, enquanto a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79, está correlacionada com a descondensação e o estímulo da transcrição (CICCONE E CHEN, 2009; CORREIA E CORREIA, 2010). As regiões da cromatina ativamente transcritas são ricas em H3K4 mono-, di- ou trimetilada, em H3K36 trimetilada e H3K9, H3K27 e H4K20 monometiladas, sendo a distribuição destas marcas ao longo das regiões dos genes transcritos, desigual, com a extremidade 5' deste

enriquecida em H3K4 trimetilada enquanto a extremidade 3' é rica em H3K36 metilada (CORREIA E CORREIA, 2010).

As modificações covalentes nas histonas são mediadas por enzimas e consistem na adição ou remoção de grupos químicos capazes de interferir na coesão do DNA com as histonas, basicamente por modificações de cargas elétricas (SENEDA E BORDIGNON, 2007).

Histona acetiltransferase (HATs) e histona metiltransferases (HMTs) adicionam grupos acetil e metil, respectivamente, já as histonas descetilases (HDACs) e as histonas desmetilases (HDMs) atuam removendo esses grupos (SHI, 2007; HABERLAND et al., 2009). Estas metiltransferases e desmetilases agem como parte de um grande complexo multiprotéico que normalmente envolvem também acetilases e desacetilases, assim como receptores nucleares que regulam a transcrição gênica (GASPAR, 2013).

Existem fortes evidências de que as modificações de histona são herdadas durante as divisões celulares, porém essa transmissão é muito mais complexa que a vista para a metilação do DNA, principalmente devido à replicação independente das moléculas de histonas. Existem evidências que grupos protéicos importantes para a transmissão de estados de cromatina silenciada (grupo Polycomb) ou ativa (grupo Trithorax) durante o desenvolvimento estejam relacionados, por exemplo, com a manutenção das modificações em H3K27 e H3K4, porém pouco se sabe dos mecanismos de heranças das modificações de histona (SCHUETTENGROBER et al., 2007; KIM et al., 2009).

A literatura sugere três modelos da interdependência entre a metilação das histonas e a metilação do DNA. O primeiro modelo relata que as DNA metil transferase (DNMTs) ao metilarem o DNA, recrutam proteínas ligantes à metil-CpG, e logo as histonas são desacetiladas por enzimas histonas desacetilases (HDAC), e podem ser

metiladas por histonas metiltransferases (HTM). O segundo modelo sugere que a metilação das histonas (metilação na lisina 9 da histona H3) ligadas a proteínas de heterocromatina podem recrutar DNMTs e metilar o DNA (JACKSON et al., 2002; BANNISTER E KOUZARIDES, 2011). O terceiro modelo sugere que as proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP e da atividade de DNA helicase aumentem o acesso da estrutura do nucleossomo e facilitem a metilação do DNA e modificações das histonas por ação das DNMTs, HDACs e HTMs (ALLIS et al., 2007; revisado por LI, 2002).

### **3. Metilação das histonas em oócitos de mamíferos**

Folículos desenvolvem-se do nascimento até a puberdade, e os oócitos durante esse período permanecem estacionados na prófase da primeira divisão meiótica, e aumentam em tamanho, e são transcricionalmente ativos até o estágio peri-ovulatório, quando a transcrição silencia. A transcrição do genoma do oócito serve para estabelecer uma reserva de componentes maternos que são requeridos para o desenvolvimento embrionário precoce. Acredita-se que o silenciamento global da transcrição em oócitos seja necessário para que a meiose seja reiniciada e finalizada, além de estar envolvida com a condensação dos cromossomos e o seu rearranjo ao redor do nucléolo. (ANDREU-VIEYRA et al, 2010). Alguns resultados sugerem que as modificações epigenéticas estão associadas com a aquisição de competência para o desenvolvimento do oócito (SCHULTZ, 2002).

Embora a transcrição diminua durante o crescimento oocitário, a acetilação de histonas e a metilação de H3K4, que estão associadas com expressão gênica ativa, aumentam. A configuração da cromatina é alterada durante o crescimento do oócito

(KAGEYAMA et al, 2007).

Estudos anteriores mostraram que a metilação de H3K4 é menor em oócitos imaturos (meioticamente incompetentes) em relação aos oócitos em estágio periovulatório (meioticamente competentes). Outros estudos sugerem que diferentes enzimas - metiltransferases (KMTs) e lisinas desmetilases (KDMs), entre outras - estão envolvidas na metilação dos oócitos nos vários estágios de desenvolvimento (ANDREU-VIEYRA et al., 2010; CICCONE E CHEN, 2009).

#### **4. Metilação das histonas em embriões de mamíferos**

O desenvolvimento embrionário também envolve uma série de modificações epigenéticas importantes, incluindo o remodelamento das histonas, que são imprescindíveis para o desenvolvimento normal do embrião. Em linhas gerais, durante o desenvolvimento embrionário de bovinos, uma perda global na metilação de histonas é observada logo após a fecundação (YANG et al., 2007). No entanto, durante o desenvolvimento pré-implantacional uma metilação residual em aminoácidos específicos é observada e necessária. A tri-metilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) ocorre em grande quantidade em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, mas diminui significativamente no estágio de 8 células voltando a aumentar, gradativamente nos estádios de mórula e blastocisto em camundongos (WU et al., 2012). A desmetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me2), uma modificação repressiva, é baixa em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, e começa a aumentar no estágio de 8-16 células (WU et al., 2012; SANTOS et al., 2003).

Em mamíferos, mRNAs derivados de oócitos são degradados rapidamente depois da fecundação, por isso acabam por influenciar apenas as primeiras divisões celulares

(THOMPSON et al, 1998). Nesse sentido acredita-se que a ativação do genoma do zigoto (AGZ) ocorra muito precocemente nos mamíferos. Existem relatos de que AGZ ocorra entre o desenvolvimento embrionário de 1 a 2 células em camundongos e entre 4 e 8 ou 8 e 16 células em outros mamíferos (SCHULTZ, 2002; KANKA, 2003).

A finalização da AGZ é essencial para que cada blastômero assuma sua característica de totipotência, perfil indispensável para continuação do desenvolvimento do embrião, em especial da organogênese (BULTMAN et al., 2006).

. O genoma materno e paterno de embriões de camundongo de 1 célula exibem distribuições assimétricas das formas di e tri-metiladas de H3K9, H3K4, H3K27 e H3K20 (ANDREU-VIEYRA et al, 2010). Ou seja, nessa fase de desenvolvimento não existe transcrição, sendo a mesma bloqueada pelas metilações na histona 3 em diferentes lisinas.

Os genes imprinted são mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Embora esse genes representem um pequeno conjunto no genoma mamífero, eles são essenciais para o desenvolvimento normal do indivíduo. Os mecanismos regulatórios que promovem o imprinting são complexos e tem sido objetos de muitas investigações. Dados sugerem que a metilação das histonas participa dos processos de estabelecimento e manutenção imprinting genômico. A maioria, se não todos, os genes imprinted estão associados com uma ou mais regiões que são diferentemente metiladas em alelos maternos ou paternos. Em embriões em fase de pró-núcleo, o genoma materno e o paterno sofrem uma onda de desmetilações, o que apaga a maioria das marcas de metilação herdadas dos pais (CICCONE E CHEN, 2009).

Murata et al. (2010) injetaram núcleo de células somáticas em oócitos em fase de

Vesícula Germinativa (VG) com o objetivo de avaliar a reprogramação nuclear. Algumas modificações, como o aumento da fosforilação e a redução da acetilação de histonas, parecem estar relacionadas com características de ativação geral da transcrição de oócitos em VG. Porém, a metilação de H3K4 está especialmente relacionada com a ativação da pluripotência dos genes.

Estudos têm demonstrado que modificações de histonas são afetadas pela manipulação dos embriões e pelo cultivo in vitro (SANTOS et al., 2003). Santos et al. (2003) demonstraram que embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) apresentam hipermetilação da histona H3K9. Um estudo também relatou que a acetilação da lisina 5 na histona H4 (H4K5ac) parece ser alterada dramaticamente durante o desenvolvimento embrionário inicial de embriões produzidos in vitro, mas permanece constantemente elevada em embriões bovinos produzidos por TNCS (KANG et al., 2002). Estas e outras alterações poderiam explicar a expressão alterada de genes vitais ao desenvolvimento. Células bovinas cultivadas também apresentam padrão epigenético alterados (ENRIGHT et al., 2003).

## **5. Considerações Finais**

As alterações de histonas estão associadas a diferenças na regulação da transcrição e consequente expressão gênica podendo afetar o desenvolvimento de oócitos e embriões e levando até mesmo a perda embrionária. Novos estudos são necessários para determinar como as variações na modificação de histonas, podem afetar o desenvolvimento embrionário, e como manipular essas variações de forma a melhorar a produção in vitro de embriões, a criopreservação de oócitos e embriões, e demais biotecnologias.

## 210 6. Referências Bibliográficas

- 211 **Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros MLE.** Epigenetics. New York: Cold  
 212 Spring Harbor, 2007. 502p.
- 213 **Andreu-Vieyra CV, Chen R., Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF,**  
 214 **Matzuk MM.** MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation  
 215 and transcriptional silencing. *Plos Biology*, v.8, n.8, 2010.
- 216 **Bannister AJ, Kouzarides T.** Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell*  
 217 *Research*, v.21, n.3, p.381-395, 2011.
- 218 **Bird A.** Perceptions of epigenetics. *Nature*, v.7, p.396-398, 2007.
- 219 **Bottomley MJ.** Structures of protein domains that create or recognize histones  
 220 modifications. *EMBO Rep*, v.5, p.464-469, 2004.
- 221 **Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T.** Maternal  
 222 BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev*, v.20, p.1744-  
 223 1754, 2006.
- 224 **Ciccone DN, Chen T.** Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics*,  
 225 v.4, p.216–220, 2009.
- 226 **Correia JHRD, Correia AAD.** Epigenética nos animais. 2010. Disponível em:  
 227 [www.omv.pt/download/90cepigeneticanosanimais3ks.pdf](http://www.omv.pt/download/90cepigeneticanosanimais3ks.pdf). Acesso em nov/2014.
- 228 **Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA.** Epigenetics in human disease and prospects  
 229 for epigenetic therapy. *Nature*, v.429, n.6990, p.457-463, 2004.
- 230 **Eissenberg JC, Shilatifard A.** Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in  
 231 development and differentiation. *Dev Biol*, v.339, p.240-249, 2010.
- 232 **Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC.** Epigenetic characteristics of bovine donor  
 233 cells for nuclear transfer: Levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, v.69, n.5, p.1525-  
 234 30, 2003.
- 235 **Ferreira AR, Franco MM.** Reprogramação epigenética em gametas e embriões de  
 236 mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.36, n.1, p.3-9, 2012.
- 237 **Gaspar RC.** Efeito das condições de cultivo no remodelamento das histonas de  
 238 embriões bovinos produzidos in vitro. Dissertação de mestrado em medicina veterinária  
 239 – Universidade Estadual Paulista. 2013.
- 240 **Haberland M, Montgomery RL, Olson EN.** The many roles of histone deacetylases in  
 241 development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews*  
 242 *Genetics*, London, v.10, p.32-42, 2009.
- 243 **Huang JC, Lei ZL, Shi LH, Miao YL, Yang JW, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY.**  
 244 Comparison of histone modifications in in vivo and in vitro fertilization mouse  
 245 embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.354, p.77–83,  
 246 2007.
- 247 **Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE.** Control of CpNpG DNA  
 248 methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, v.416, p.556-  
 249 560, 2002.
- 250 **Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F.** Alterations in  
 251 epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85-94,  
 252 2007.
- 253 **Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM.** Limited  
 254 demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation  
 255 embryos. *EMBO J*, v.21, n.5, p.1092-100, 2002.
- 256 **Kanka J.** Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo.

- 257 Theriogenology, v.59, p.3-19, 2003.
- 258 **Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S.** Epigenetic mechanisms in mammals. Cellular  
259 and molecular life sciences, Basel, v.66, n.4, p.596-612, 2009.
- 260 **Kouzarides T.** Chromatin modifications and their function. Cell, Cambridge, v. 128, p.  
261 693-705, 2007.
- 262 **Kronenberg MF, Menzel HJ, Ebersbach G, Wenning GK, Luginger E, Gollner M,**  
263 **Ransmayr G, Utermann G, Poewe W, Kronenberg F.** Dopamine D4 receptor  
264 polymorphism and idiopathic Parkinson's disease. European Journal of Human  
265 Genetics - Nature, v. 7, p.397-400. 1999.
- 266 **Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian  
267 development. Nature Review Genetics, v.3, p.662-673, 2002.
- 268 **Mellor, J.** Dynamic nucleosomes and gene transcription. Trends in Genetics, v.22,  
269 p.320-329, 2006.
- 270 **Misteli T.** Beyond the sequence: cellular organization of genome function. Cell, v.128,  
271 p.787-800, 2007.
- 272 **Murata K, Kouzarides T, Bannister AJ, Gurdon JB.** Histone H3 lysine 4  
273 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic  
274 nuclei by oocytes. Epigenetics & Chromatin, v.3, n.4, 2010.
- 275 **Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W,**  
276 **Dean W.** Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine  
277 preimplantation embryos. Current Biology, v.13, p.1116-1121, 2003.
- 278 **Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G.** Genome  
279 Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. Cell, v.128, p.735-745, 2007.
- 280 **Schultz RM.** The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the  
281 preimplantation embryo. Human Reproduction Update, v.8, p.323-331, 2002.
- 282 **Seneda MM, Bordignon V.** Novos conceitos em foliculogênese. Acta Scientiae  
283 Veterinariae, v.35, p.857-868, 2007.
- 284 **Shi Y.** Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and  
285 disease. Nature Reviews Genetics, v.8, p.829-833, 2007.
- 286 **Thompson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall**  
287 **VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science,  
288 v.6, n.282 (5391), p.1145-1147, 1998.
- 289 **Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'alessio AC, Sharma S, Seckl JR,**  
290 **Dymov S, Szyf M, Meaney M.J.** Epigenetic programming by maternal behavior.  
291 Nature Neuroscience, v.7, n.8, p.847-854, 2004.
- 292 **Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, Wang R, Li WY.**  
293 Differences in H3K4 trimethylation in in vivo and in vitro fertilization mouse  
294 preimplantation embryos. Genetics and Molecular Research, v.11, n.2, p.1099-1108,  
295 2012.
- 296 **Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T.** Nuclear  
297 reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. Nature  
298 Genetics, v.39, n.3, p.295-302, 2007.

# **CAPÍTULO 3 – Artigo Científico (Theriogenology)**

## **Características da H3K4 me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos à criopreservação**

### **Characteristics of H3K4 me3 in bovine embryos produced *in vivo* with sexed semen and submitted to cryopreservation**

SOUZA, M.B.<sup>1</sup>; MELO-STERZA, F.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana-MS, Brasil

#### **RESUMO**

A criopreservação de embriões produzidos *in vivo* é considerada eficiente e o conhecimento de sua biologia básica pode ser utilizado como parâmetro para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na baixa eficiência da criopreservação dos embriões produzidos *in vitro*. O objetivo desse estudo foi avaliar as modificações da trimetilação da lisina 4 na Histona 3 (H3K4me3) em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos a criopreservação. Vacas da raça Girolando (n=5) foram superovuladas e inseminadas com sêmen sexado ou convencional. Após a coleta de embrião (D7), parte dos embriões coletados foram armazenados em Paraformaldeído logo após a coleta, e outra parte armazenada em Paraformaldeído após a criopreservação/descongelamento. Todos os embriões (frescos/sêmen convencional; frescos/sêmen sexado; criopreservados/sêmen convencional e criopreservados/sêmen sexado) foram avaliados por imunofluorescência sob microscopia confocal, para identificação da H3K4me3. Das 190 estruturas coletadas, 100 foram produzidas com sêmen convencional e 90 com sêmen sexado. O uso do sêmen convencional proporcionou a produção de embriões viáveis (72%), sendo a maioria (52,77%) em fases mais avançadas do desenvolvimento (blastocistos expandidos; 52,77%). Por outro lado, os embriões produzidos com sêmen sexado apresentaram menores taxas de viabilidade (36,7%) e a maioria foi coletada em estágios mais precoces de desenvolvimento (Mórula e Blastocisto; 42,42%;  $p < 0,05$ ). Embriões na fase de mórula ( $209,26 \pm 10,95$ ), independente da criopreservação ou do uso de sêmen sexado, apresentaram maior intensidade do sinal da trimetilação da H3K4 quando comparada com o embrioblasto de blastocistos ( $160,35 \pm 10,52$ ) ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstraram que fêmeas da raça Girolando produzem embriões em fases mais avançadas do desenvolvimento após lavagem uterina. Esses são os primeiros resultados que descrevem o perfil epigenético de embriões bovinos produzidos *in vivo*. Como esperado, todos os embriões apresentam metilação da H3K4, no entanto em mórulas essa característica foi mais acentuada.

**Palavras-chave:** epigenética, metilação de histonas, sexagem do semen, criopreservação, superovulação.

**ABSTRACT**

Cryopreservation of embryos produced in vivo is considered efficient and the knowledge of its basic biology can be used as a parameter for better understanding of the mechanisms involved in the low efficiency of cryopreservation in embryos produced in vitro. The objective of this study was to characterize the modifications of trimethylated lysine 4 on histone 3 (H3K4me3) in bovine embryos produced in vivo with sex-sorted semen and subjected to cryopreservation. Girolando cows (a common Brazilian dairy breed, crossbreed Gir x Holsteins; n = 5) were superovulated and inseminated with sex-sorted or conventional semen. After the embryo collection (n = 4), aliquots of the collected embryos were stored in Paraformaldehyde immediately after collection, or stored in Paraformaldehyde after cryopreservation / thawing. All embryos (fresh / conventional semen, fresh / sexed semen; cryopreserved / conventional semen and cryopreserved / sexed semen) were evaluated by immunofluorescence in confocal microscopy to identify the H3K4me3. From 190 embryos collected, 100 were produced with conventional semen and 90 with sexed semen. The use of conventional semen provided 72% of viable embryos, the majority (52.77%) of them was in more advanced stages of development (expanded blastocysts; 52.77%). In contrast, embryos produced with sexed semen showed lower viability rate (36.7%) and earlier stages of development at time of collection (morula and blastocyst, 42.42%; p < 0.05). Embryos in morula stage, regardless of cryopreservation or the use of sexed semen, showed the most prevalent signal of the H3K4me3 compared to blastocysts ( $209.26 \pm 10.95$  vs.  $160.35 \pm 10.52$  intensity channels; p < 0.05). Furthermore our results demonstrated those after uterine flushing of Girolando cows the embryos are in more advanced stages of development. These are the first results that describe the H3K4me3 profile of bovine embryos produced in vivo. As expected, all embryos show methylation of H3K4, but in morula the abundance was more pronounced.

**Keywords:** epigenetics, histone methylation, sexing of semen, cryopreservation, superovulation.

## 1. Introdução

Uma fêmea bovina possui cerca de dezenas de milhares de oócitos capazes de serem fecundados, contudo em condições naturais, produz em média quatro a cinco produtos na vida. Assim com a utilização da superovulação (SOV), associada à transferência de embrião (TE), o potencial de produção dessas fêmeas aumentam significativamente [1], possibilitando a produção de um número muito superior de descendentes por animal.

A criopreservação do embrião produzido *in vivo* é uma realidade, produzindo embriões viáveis após o descongelamento, e permitindo que a SOV seja realizada a qualquer momento, sem a necessidade de preparo prévio de receptoras, podendo esse embrião ser utilizado em um momento mais oportuno. Fato que não ocorre com os embriões produzidos *in vitro*.

Já na produção *in vivo* de embriões, a utilização das técnicas de superovulação e transferência de embrião associada ao uso do sêmen sexado, pode aumentar ainda mais a produtividade animal. O uso do sêmen sexado proporciona um ganho na produtividade animal, devido a produção de fêmeas ou machos de acordo com a demanda do mercado. Porém, esse tipo de sêmen é mais sensível e produz menores taxas de prenhez quando comparado com sêmen convencional [2], devido ao estresse do processo ao qual é submetido.

Entretanto, os índices de produção de embriões viáveis com a utilização do sêmen sexado pelas metodologias convencionais, com duas inseminações, não apresentam resultados satisfatórios, havendo a necessidade de utilização de um maior número de doses por vaca superovulada [3]. Aparentemente a sexagem não afeta a capacidade do espermatozoide de fecundar os oócitos, mas sim a habilidade dos embriões de se desenvolverem normalmente após a fecundação.

O estudo das características epigenéticas de embriões produzidos *in vivo* com sêmen sexado e criopreservados pode auxiliar a esclarecer as suas particularidades. Os padrões de metilação genômica em células somáticas normalmente são estáveis e hereditários. Contudo, em mamíferos existem períodos de desenvolvimento em células germinativas e na pré-implantação de embriões em que há ampla reprogramação do genoma, gerando células com vasto potencial de desenvolvimento [4]. A reprogramação epigenética em embriões em estágios iniciais, assim como em células germinativas tem efeito sobre o imprinting, ou seja, sobre os genes que não virão a ser expressos.

Foram observadas que a metilação dupla e tripla de H3K4 são importantes para a reprogramação eficiente de genes de pluripotência em oócitos de anfíbios [5], e ainda sugere-se que a metilação da H3K4 possui um papel regulador essencial durante a foliculogênese [6]. Entretanto, o seu papel em embriões é pouco conhecido, especialmente em bovinos.

Logo, os conhecimentos gerados a partir da epigenética podem ser utilizados para subsidiar o desenvolvimento de novas ferramentas que incrementem a eficiência das técnicas da reprodução, em especial quando pouquíssimos genes ligados a características de importância econômica foram identificados no genoma bovino. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o padrão da metilação tripla da H3K4 (H3K4me3) de mórulas e blastocistos (embrioblasto) bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado, antes e após a criopreservação.

## 2. Material e métodos

### *Produção de embriões in vivo*

A produção de embriões *in vivo* foi desenvolvida no setor de bovinocultura de leite e no laboratório de biotecnologia da reprodução animal, pertencentes a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Unidade Universitária de Aquidauana (UEMS/UUA).

Foram utilizadas vacas da raça Girolando (n=5), não gestantes, solteiras e cíclicas, com idade média de 7 anos e condição corporal média 3 (escala de 1-5). Os animais foram mantidos em regime de pastejo rotacionado com capim Mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça) e Tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) com suplementação mineral à vontade contendo 9% de fosforo.

Todas as doadoras foram submetidas a exames de palpação e ultrassonografia transretal para confirmação da hígidez do trato genital.

Foram realizadas quatro sessões de superovulação, duas com sêmen sexado e duas com sêmen convencional, com intervalo médio de 60 dias. O protocolo hormonal iniciou pela manhã de um dia aleatório (D0) do ciclo estral com um dispositivo intravaginal de 1,9 g Progesterona - P4 e a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol - IM. Cinco dias após o início do tratamento, os animais receberam 200UI de extrato hipofisário suíno (FSH) - IM, em oito doses decrescentes, a cada 12 horas (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg). Quarenta e oito horas após o início da aplicação do FSH (D6 de

manhã), os animais receberam 25 mg de dinoprost trometamina - IM. No D7 foram aplicadas duas doses de 200 UI de eCG, com intervalo de 12h; na segunda aplicação de eCG os dispositivos de progesterona foram retirados; 24 horas depois de retirado o implante P4 realizou-se a aplicação de 12,5 mg de LH. Foram realizadas duas inseminações em tempo fixo, 12 e 24 h após a aplicação de LH, com sêmen convencional ou sexado para fêmea de um único touro (Girolando) de fertilidade comprovada. A mesma partida de sêmen foi usada em todos os procedimentos.

A colheita dos embriões foi realizada sete dias após a primeira inseminação pelo método não cirúrgico de lavagem uterina via transcervical, utilizando sondas de látex com duas vias posicionadas no corpo do útero conectadas em equipo em “Y” específico e copo coletor com filtros. O meio de colheita foi Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) acrescido de 5% soro fetal bovino previamente aquecido a 37°C. Após a colheita foi administrado 25mg de um análogo da PGF 2 $\alpha$  em cada doadora. O lavado uterino foi transferido para placas de Petri estéreis de 100 x 20 mm e a busca dos embriões foi realizada com o auxílio de um esteromicroscópio binocular no aumento de 5 vezes. As estruturas encontradas foram classificadas de acordo com suas características em: inviáveis (degenerados, não fecundados e partenotos), mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, segundo os critérios da “International Embryo Technology Society” [7]. Os embriões considerados viáveis (mórulas e blastocistos) foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos, de forma a reduzir o efeito do animal sobre os resultados.

Assim que eram classificados, parte dos embriões foram armazenados frescos (4°C) em PAF 3% acrescido de sacarose 2%, para posterior análise, e outra parte era criopreservada, separadamente mórulas e blastocistos. Os embriões foram criopreservados pelo método de congelação lenta, onde foram expostos à solução crioprotetora de etileno-glicol 1,5 M por 10 min. Durante este período, os embriões foram envasados em palhetas de 0,25mL, sendo a coluna central com embrião e as colunas adjacentes com Holding®. Em seguida, foram colocados na máquina de congelação. A taxa de resfriamento adotada foi de 2°C/min até -6°C por 15 min. A indução da cristalização foi realizada após os 5 min iniciais da estabilização. Em seguida, a taxa de resfriamento foi de 0,6°C/min até -30°C. Ao final do processo foram armazenados a -196°C. A descongelação foi realizada em água (35°C/segundos) e em seguida os embriões classificados em qualidade 1 a 3 após descongelação, foram armazenados (4°C) em PAF 3%, acrescido de sacarose 2%, para posteriores análises.

A partir desses procedimentos foi possível dividir os embriões em quatro grupos: frescos/sêmen convencional; frescos/sêmen sexado; criopreservados/sêmen convencional e criopreservados/sêmen sexado, além de separar mórulas e blastocistos.

#### *Investigação da metilação tripla da H3K4 em embriões bovinos por imunofluorescência*

As avaliações foram realizadas no Leibniz Institute for Animal Biology (FBN) - Dummerstorf – Alemanha. Quinze embriões de cada grupo foram utilizados, sendo 5 para controle negativo, e 10 para o grupo tratado.

Para a investigação da H3K4 trimetilada (H3K4me3), os embriões foram lavados em PBS em temperatura ambiente (TA). Em seguida foram permeabilizados (Hepes, Sacarose, NaCl, MgCl<sub>2</sub> e Triton x100) a 0°C por 1 hora e logo após, foram lavados (PBS, BSA e Triton x100) 3 vezes por 5 minutos cada (TA). Os embriões foram bloqueados (Roti-Immunoblock 1:50) por 2 horas em TA. Posteriormente, foram expostos ao anticorpo policlonal contra H3K4 tri-metilada (CellSignaling®; 1:1000 em Roti-BlockImunoblock 1:100, PBS e Tween 20), “over night” à temperatura de 4° C. Logo após as lavagens, foram incubados com anticorpo secundário (anti-Rabbit-Alexa 647; Invitrogen, A21245; 1:200 em Roti-Block Imunoblock 1:100, PBS e Tween 20), e então submetidos a coloração do núcleo (SYBR Green, Molecular Probes, Goettingen, Germany; 1:500). Por fim, os embriões foram colocados individualmente sobre lâminas e levemente pressionados com lamínula. A análise da imunofluorescência foi feita sob microscopia confocal (Zeizz).

#### *Análise estatística*

O delineamento experimental utilizado para número de embriões produzidos, foi o inteiramente casualizado. Foi realizada ANOVA e quando encontrada significância foi realizado um teste de Tukey a 5% de probabilidade (Programa R).

A intensidade do sinal foi analisada com auxílio do programa Image J. Independente do estágio de desenvolvimento embrionário avaliado, foram analisadas pelo menos 10 células por embrião. Nos blastocistos foram consideradas apenas as células da massa celular interna (embrioblasto). Para a intensidade do sinal foram levadas em consideração a correção para o controle negativo e as intensidades de fluorescência foram normalizadas para os controles. Para esses dados, o delineamento experimental utilizado foi fatorial triplo. Quando necessário realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade (Programa R).

### 3. Resultados

A produção de embriões viáveis com sêmen convencional (72%; 72/100) foi superior aos produzidos com sêmen sexado (36,7%; 33/90) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Considerando que a coleta foi realizada sempre em D7, os procedimentos realizados com sêmen sexado geraram mais embriões em fases iniciais de desenvolvimento (mórulas 21,21% (7/33), blastocistos iniciais 21,21% (7/33) X expandidos 33,33% (11/33)) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). A taxa de viabilidade dos embriões (grau 1 a 3) pós descongelamento foi de 78,9% (15/19) para os embriões produzidos com sêmen sexado e 88,2% (15/17) para os embriões produzidos com sêmen convencional ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1 – Viabilidade de embriões produzidos *in vivo* com sêmen convencional ou sexado.

|              | Viáveis             | Inviáveis           |
|--------------|---------------------|---------------------|
| Convencional | 72% a<br>(72/100)   | 28% b<br>(28/100)   |
| Sexado       | 36,70% b<br>(33/90) | 63,30% a<br>(57/90) |

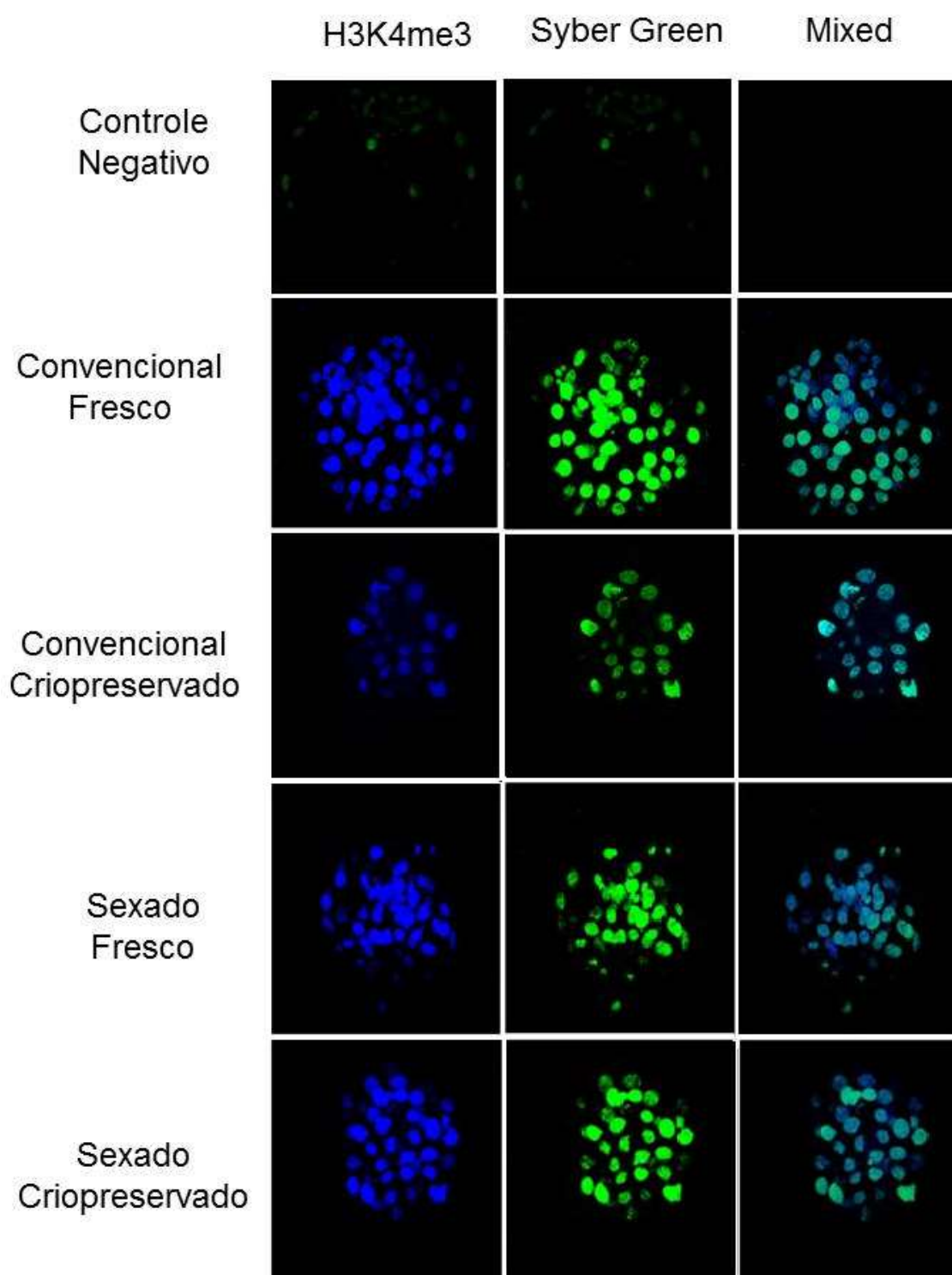
\*Letras minúsculas diferem entre si na coluna. ( $p < 0,05$ )

Tabela 2 – Estágios de desenvolvimento dos embriões (D7) obtidos após a lavagem uterina, realizada sete dias após a inseminação artificial, produzidos com sêmen sexado ou convencional. Mórula (Mo), Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl) e Blastocisto expandido (Bx).

|              | Estágios iniciais  |                     | Estágios avançados  |                     |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|              | Mo                 | Bi                  | Bl                  | Bx                  |
| Convencional | 4,16% b<br>(3/72)  | 13,88% b<br>(10/72) | 29,16% a<br>(21/72) | 52,77% a<br>(38/72) |
|              | 18,05 % (13/72)    |                     | 81,94 % (59/72)     |                     |
| Sexado       | 21,21% a<br>(7/33) | 21,21% a<br>(7/33)  | 24,24% a<br>(8/33)  | 33,33% b<br>(11/33) |
|              | 42,42% (14/33)     |                     | 57,57% (11/33)      |                     |

\*Letras minúsculas diferem entre si na coluna. ( $p < 0,05$ )

227



228

229 Figura 1 – Identificação da H3K4 me3 em Mórulas obtidas após a lavagem uterina  
 230 realizada 7 dias após a inseminação artificial com sêmen convencional ou sexado,  
 231 imagens 3D da análise de imunofluorescência por microscopia confocal. Azul:  
 232 anticorpo anti-H3K4me3, verde: Syber Green, mixed: anti H3K4me3 + Syber Green.

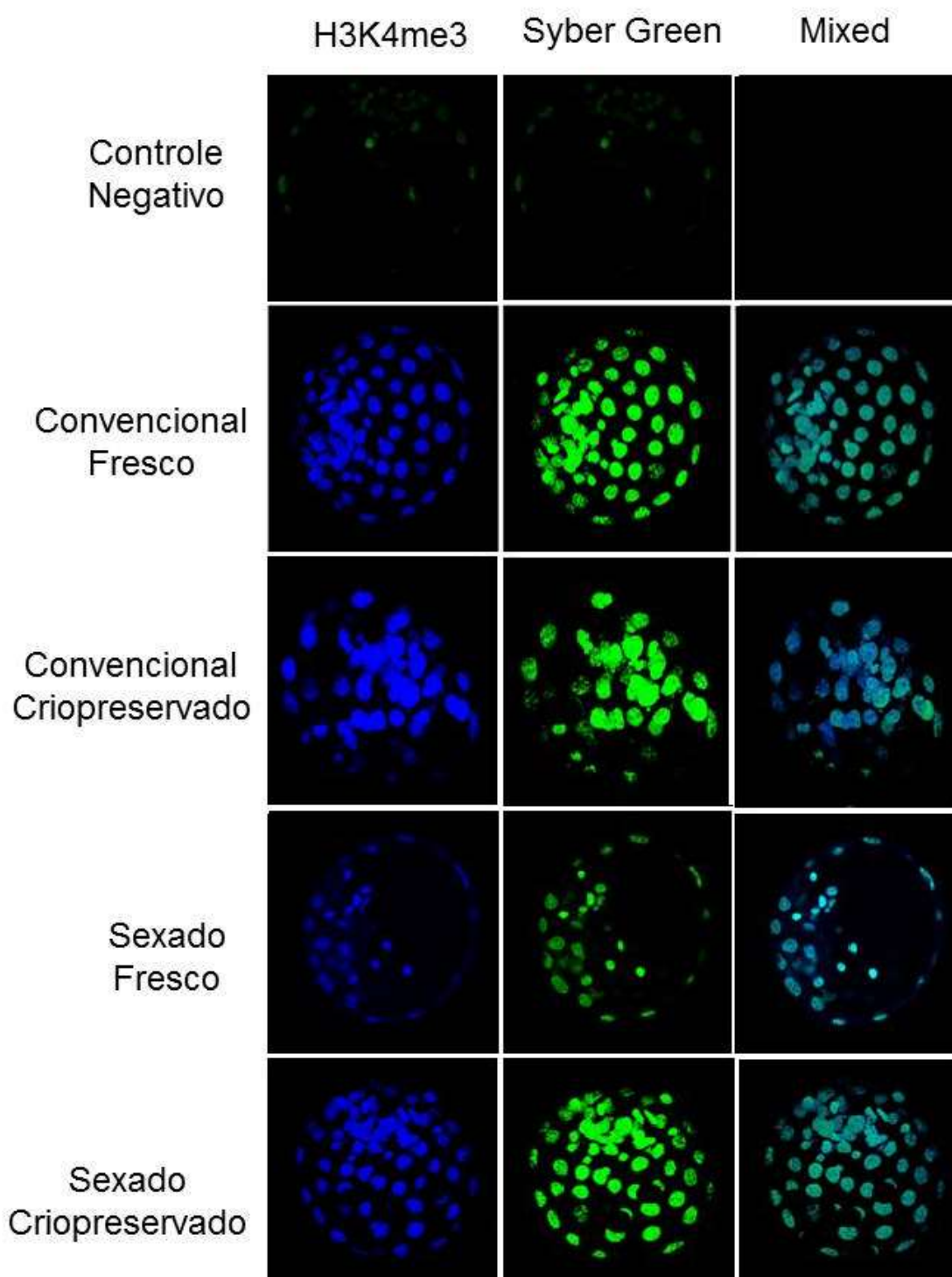


Figura 2 – Identificação da H3K4 me3 em Blastocistos obtidos após a lavagem uterina realizada 7 dias após a inseminação artificial com sêmen convencional ou sexado, imagens 3D da análise de imunofluorescência por microscopia confocal. Azul: anticorpo anti-H3K4me3, verde: Syber Green, mixed: anti H3K4me3 + Syber Green.

A H3K4me3 foi identificada junto ao DNA tanto em mórulas (Figura 1) como em

Blastocistos (Figura 2). A maior intensidade de sinal de H3K4me3 foi observada em mórulas, em todos os grupos, e não houve influência da criopreservação ou do uso de sêmen sexado sobre H3K4me3 ( $p>0,05$ ). Não houve interação entre tratamentos ( $p>0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Intensidade do sinal (pixels) em Mórulas e Blastocistos (embrioblasto) produzidos in vivo com uso do sêmen sexado, antes e após a criopreservação.

| Sêmen                      | Pixels         | Valor P |
|----------------------------|----------------|---------|
| Sexado                     | 178,51±32,89   | 0,4321  |
| Convencional               | 191,10±25,26   |         |
| Conservação                |                |         |
| Fresco                     | 180,67±25,95   | 0,6049  |
| Criopreservado             | 188,94±33,26   |         |
| Estágio                    |                |         |
| Mórula                     | 209,26±10,95 a | 0,0041* |
| Blastocisto (embrioblasto) | 160,35±10,52 b |         |
| Interação                  |                |         |
| Sêmen*Conservação          | -              | 0,7637  |
| Sêmen*Estágio              | -              | 0,7285  |
| Conservação*Estágio        | -              | 0,6370  |
| Sêmen*Conservação*Estágio  | -              | 0,8522  |

\*Significativo a 5% de probabilidade

#### 4. Discussão

Durante anos, tem-se relatado a superioridade na taxa de viabilidade embrionária quando o sêmen convencional é utilizado em relação ao sêmen sexado (Holandesa [8;9]; Nelore [10]), independente da raça ou categoria animal. No entanto, apesar de o sêmen sexado produzir um menor número de embriões, a maior produção de bezerros do sexo desejado torna essa biotecnologia viável [11; 12]. Nesse estudo, o número e a viabilidade dos embriões foram menores quando o sêmen sexado foi utilizado (Tabela 1). Além disso, os embriões recuperados estavam em fases mais precoces de desenvolvimento (Tabela 2).

Em experimento realizado com bovinos taurinos (Holandês, Red Danish e

Jersey) foram avaliados 1495 embriões obtidos após superovulação e IA com sêmen convencional. Destes, 84,5% encontravam-se em estádios iniciais de desenvolvimento (5,8% Mo, 56,1% Mc e 22,5% Bi) e o restante em estádios mais avançados (10,3% Bl e 5,2% Bx) [13]. Da mesma forma, foram obtidos mais embriões em estádios iniciais de desenvolvimento em doadoras da raça Blond d'Aquitaine [14]. Porém, em zebuínos observou-se que 80% dos embriões coletados apresentam-se em estádios avançados de desenvolvimento [15].

Esta diferença pode estar relacionada a algumas diferenças endócrinas. Pois, os zebuínos possuem a onda pré-ovulatória de LH mais próximo da ovulação [16], do que em fêmeas taurinas [17], ou seja, animais zebuínos ovulam mais precocemente. Consequentemente, a fecundação é mais precoce, dando maior tempo e condições para os embriões se desenvolverem [15], o que sugere a proximidade dos animais mestiços deste experimento com animais zebuínos.

Apesar de manter o padrão da raça, produzindo mais embriões em estágios avançados do desenvolvimento embrionário aos sete dias após a IA, é significativa a superioridade de mórulas obtidas quando o sêmen sexado foi utilizado. Foram obtidos uma maior taxa de prenhez em vacas mestiças (Nelore/Simental) quando embriões em fases de desenvolvimento mais avançado (Bl e Bx) foram transferidos [18]. Provavelmente os embriões produzidos in vivo com sêmen sexado produziram menores taxas de prenhez que os embriões produzidos com sêmen convencional.

A técnica de sexagem por citometria de fluxo pode gerar alguns danos morfológicos e principalmente no DNA dos espermatozoides, provavelmente em razão da exposição ao laser, da grande pressão na passagem pelo citômetro, da queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e da permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes do processamento [19, 20]. Permitindo-nos especular que danos provocados no DNA do espermatozoide durante a citometria de fluxo podem reduzir a capacidade dos embriões alcançarem fases mais avançadas do desenvolvimento, justificando a maior taxa de estruturas inviáveis observadas quando o sêmen sexado foi utilizado.

Durante a espermiogênese dos mamíferos, as histonas são substituídas, em parte ou totalmente, por nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, denominadas protaminas, as quais possuem um caráter mais estrutural [21]. Essa informação permite o questionamento da importância das histonas paternas no embrião em fases iniciais de seu desenvolvimento. Foram encontradas H3 em espermatozoides humanos e no pro-

núcleo masculino de zigotos [22]. Assim acredita-se que alterações epigenéticas na H3 do espermatozoide possam exercer influência sobre o desenvolvimento embrionário.

Em bovinos ainda faltam informações a esse respeito, no entanto, considerando a pequena quantidade de histonas identificadas, espera-se pouca ou nenhuma influência das histonas paternas no desenvolvimento embrionário [23; 24]. Os resultados do presente estudo demonstraram não haver diferença da trimetilação de H3K4 entre os embriões produzidos com sêmen sexado ou convencional, sugerindo que a presença de histonas em espermatozoides não são responsáveis por eventuais alterações no desenvolvimento embrionário.

Em embriões de camundongo produzidos *in vivo* foram observadas baixa intensidade dos sinais de histonas envolvidas na repressão da transcrição (H4ac, H3K9me e H3S10ph) entre os estágios de zigoto a blastocisto [25], período no qual a transcrição é altamente demandada em função da ativação precoce do genoma dos zigotos de camundongo [26]. No presente estudo a o DNA possivelmente estaria disponível a transcrição, de mórulas e blastocistos bovinos, confirmada por meio da identificação da H3K4me3.

A técnica do congelamento tradicional para embriões produzidos *in vivo* é bem estabelecida, atingindo taxas de sobrevivência embrionária, prenhez e nascimento próximas às alcançadas por embriões frescos [27; 28]. No presente estudo o processo de criopreservação dos embriões produzidos *in vivo* não alterou a presença de H3K4me3 ou a disponibilização da sua atividade para transcrição, indicando que o processo de criopreservação lenta é viável para embriões *in vivo*.

Na literatura, foram encontrados sinais de H3K4me2 em todas as fases de desenvolvimento embrionário *in vitro* (duas células até blastocisto). O nível de H3K4me2 aumentou repentinamente na fase de 2 células e depois diminuiu marcadamente no estágio de 8 células voltando a aumentar até blastocisto [31]. Também foi observado que a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) é alta em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, mas diminui significativamente no estágio de 8 células, aumentando gradativamente nos estágios de mórula e blastocisto de camundongos [26].

No presente estudo os níveis de H3K4me3 foram maiores em mórulas do que em blastocistos. Esse é o primeiro estudo que avalia as características da H3K4me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo* e que considera apenas as células indiferenciadas do blastocisto (embrioblasto) na avaliação. Essas características podem justificar as

controvérsias com outros estudos [29,26].

## 5. Conclusão

Em animais da raça Girolando obtém-se principalmente embriões em estágios avançados de desenvolvimento, no entanto, essa característica é mais evidente em embriões produzidos com sêmen convencional.

A H3K4me3 de embriões bovinos produzidos in vivo não sofrem influência do uso do sêmen sexado e do processo de criopreservação.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] **Morris DG, Diskin MG, Sreenam JM.** Biotechnology in cattle reproduction. Beef Production. 39 (2001).
- [2] **Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, et al.** Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v.28, p. 218, 2000.
- [3] **Dell'Aqua Jr. J.A., Papa F.O., Araújo Jr. J.P., et al.** 2006. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. Acta Scientiae Veterinariae. 34 (Supl 1): 205-212.
- [4] **Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science. 2001;293(5532):1089–1093.
- [5] **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 & Chromatin. 3(4) (2010)
- [6] **Seneda MM, Silva KCF, Santos GMG, et al.** Foliculogênese em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, Anais... Londrina – PR (2008).
- [7] **International Embryo Transfer Society (IETS).** Embryo Transfer Newsletter. 1998. Disponível em: <http://www.iets.org>. Acesso em out/2014.
- [8] **Sartori R, Souza AH, Guenther JN, et al.** Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim Reprod. 1:86–90 (2004).
- [9] **Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, et al.** Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. Theriogenology. 71:68-73 (2009).
- [10] **Sá Filho MF, Nichi M, Soares GG, et al.** Sex-sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. Anim. Reprod., 11(3):217-224 (2014).
- [11] **Baruselli OS, Souza AH, Martins CM, et al.** Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 31:374-381 (2007).
- [12] **Baruselli OS, Jacomini JO, Sales JNS, et al.** Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: III Simpósio Internacional de Reprodução Animal, Proceedings, Anais... 1:380 (2008).
- [13] **Callesen H, Lovendahl P, Bak A, et al.** Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. J. Anim.

- 373 Sci.73:1539-1543 (1995).
- 374 [14] **Nagano AY, Weiss RR, Büchele JM, et al.** Bovine somatotropin –rbST- on  
375 females bovines superovulation. Archives of Veterinary Science. 9(2):101-106  
376 (2004).
- 377 [15] **Fonseca JF, Silva Filho JM, Pinto Neto A, et al.** Estádios de desenvolvimento  
378 embrionário de vacas zebuínas superovuladas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(6).  
379 (2001).
- 380 [16] **Henricks DM, Dickey JF, Niswender GD.** Serum luteinizing hormone and  
381 plasma progesterone levels during the estrous cycle in early pregnancy in cows.  
382 Biol. Reprod. 2:346-351. (1970).
- 383 [17] **Cavaliere J, Rubio I, Kinder JE, et al.** Synchronization of estrus and ovulation  
384 and associated endocrine changes in Bos indicus cows. Theriogenology. 47:801-  
385 814 (1997).
- 386 [18] **Scanavez AL, Campos CC, Santos RM.** Taxa de prenhez e de perda de gestação  
387 em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. Arquivo Brasileiro de  
388 Medicina Veterinária e Zootecnia. 65(3):722-728. (2013).
- 389 [19] **Peippo J, Vartia K, Kananen-anttila K, et al.** Embryo production from  
390 superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with  
391 frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. Animal Reproduction  
392 Science. 111:80–92 (2009).
- 393 [20] **Chastant-Maillard S, Druat X.** Sexagem de espermatozoide bovino. A Hora  
394 Veterinária, 143:43-48 (2005).
- 395 [21] **Bloch DP.** A catalog of sperm histones. Genetics. 61:93-111 (1969).
- 396 [22] **Van der heijden GW, Ramos L, Baart EB, et al.** Sperm-derived histones  
397 contribute to zygotic chromatin in humans. BMC Developmental Biology. 8:34  
398 (2008).
- 399 [23] **Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, et al.** The sperm nucleus:  
400 chromatin, RNA, and the nuclear matrix. Reproduction. 141:21-36. (2011).
- 401 [24] **Carrel DT.** Epigenetics of the male gamete. Fertil Steril. 97:267-274. (2012).
- 402 [25] **Huang JC, Lei ZL, Shi LH, et al.** Comparison of histone modifications in in vivo  
403 and in vitro fertilization mouse embryos. Biochemical and Biophysical Research  
404 Communications. 354:77–83 (2007).
- 405 [26] **Wu FR, Liu Y, Shang MB, et al.** Differences in H3K4 trimethylation in in vivo  
406 and in vitro fertilization mouse preimplantation embryos. Genetics and Molecular  
407 Research. 11(2):1099-1108 (2012).
- 408 [27] **Hasler JF.** The current status and future of commercial embryo transfer in cattle.  
409 Animal Reproduction Science. 79:245-264. (2003).
- 410 [28] **Dalcin L, Lucci CM.** Criopreservação de embriões de animais de produção:  
411 princípios criobiológicos e estado atual. Revista Brasileira de Reprodução Animal.  
412 34(3):149-159. (2010).
- 413 [29] **Shao GB, Ding HM, Gong AH, et al.** Inheritance of Histone H3 Methylation in  
414 Reprogramming of Somatic Nuclei Following Nuclear Transfer. Journal of  
415 Reproduction and Development. 54(3) (2008).
- 416

#### **CAPÍTULO 4 – Considerações Finais**

Pode-se notar que as alterações das histonas podem estar associadas à mudanças na transcrição, o que pode levar a uma alteração no desenvolvimento do embrião e consequente perda embrionária. A H3K4me3 de embriões produzidos in vivo com não sofrem influência do uso do sêmen sexado e do processo de criopreservação. É possível concluir que os embriões bovinos de estágios iniciais (Mórula) de desenvolvimento, possuem maiores níveis de H3K4me3 e consequentemente a cromatina aberta.

Diante da falta de pesquisas sobre metilação de histona em embriões bovinos, o presente trabalho traz resultados valiosos para a melhora da eficiência no uso do sêmen sexado e na criopreservação. Com base nesses resultados, estudos devem ser realizados para propor protocolos mais eficientes no uso de semen sexado e criopreservação embrionária.

Com esses resultados, surge as perspectivas de novos experimentos. A avaliação de gametas masculinos e feminos, e embrião produzidos in vitro nas diferentes fases de desenvolvimento. E claro, visando a criopreservação dos embriões produzidos in vitro, avalia-los antes e após a criopreservação.