

ANGELICA CAMARGO DOS SANTOS

**Efeito da microvibração sobre a produção *in vitro* de
embriões bovinos**

SÃO CARLOS, 2022

ANGELICA CAMARGO DOS SANTOS

**Efeito da microvibração sobre a produção *in vitro* de
embriões bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Genética e Evolução

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

SÃO CARLOS, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Angélica Camargo dos Santos, realizada em 07/11/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti (UFSCar)

Prof. Dr. Mateus José Sudano (UFSCar)

Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto (UFABC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico este trabalho a DEUS, por sempre ter me sustentado, e a minha família, pelo apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre ter me sustentado. A minha família, pelo apoio e amor incondicionais; pois mesmo se pudesse, não mudaria nada do que vivi até hoje, porque tudo foram apenas etapas para ter essa família linda.

Ao Professor Dr. Marcos Roberto Chiaratti, meu orientador, por ser um exemplo de pesquisador e grande incentivador para produzirmos trabalhos cada vez melhores. Obrigada, Professor, por todo apoio, ajuda, compreensão, paciência e ensinamentos.

Aos amigos incríveis que me acompanharam presencialmente durante essa jornada: Lindomar, Djaci, Pelé, Paula, Isabela, Witer, Fabrício, Diana, Fabrícia, Katiane, Carol, Mateus, Maria, Rachel, Renan, Jaiane, Júlio, Vitória, Pâmela. Muitos destes são parte e já foram parte do grupo de pesquisa incrível que é o Lagenbio.

Ao Daniel C. Joaquim, por todo trabalho e dedicação no desenvolvimento desse projeto.

A Vitrogen – Biotecnologia em Reprodução animal- e WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada, pela parceria para realização desse projeto.

A pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos que proporcionou recursos e infraestrutura necessária para realização desta pesquisa.

Aos membros da banca, titulares e suplentes. Obrigada por aceitarem este convite.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo nº 2012/50231-6, 2017/04372-0, 2017/21472-9 e 2020/15412-6), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil – código de financiamento 001) pelo financiamento.

SANTOS, A. C. Effect of micro-vibration on *in vitro* production of bovine embryos. [Efeito da microvibração sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos]. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

RESUMO

Muito esforço tem sido empregado para melhorar a qualidade dos embriões obtidos por produção *in vitro* (PIVE), dada a relevância desta tecnologia para os sistemas pecuários atuais. Nesse contexto, sistemas dinâmicos de PIVE têm se mostrado benéficos para o embrião, uma vez que mimetizam fluxos de fluidos e forças mecânicas resultantes do movimento das células ciliadas e da contração muscular no trato reprodutivo. No presente estudo, procurou-se confirmar esses achados iniciais, bem como avaliar possíveis consequências moleculares para o embrião, aplicando microvibração (45 Hz por 5 segundos uma vez a cada 60 minutos) durante a maturação de oócitos e cultivo de embriões bovinos. Como resultado, a microvibração levou a blastocistos mais criotolerantes, conforme indicado pela menor incidência de apoptose após vitrificação-descongelamento. Análises posteriores revelaram alterações epigenéticas e transcricionais em blastocistos derivados do tratamento de microvibração, com um total de 502 genes diferencialmente expressos. As análises de enriquecimento ligaram genes diferencialmente expressos à “fosforilação oxidativa”, “interação do receptor citocina-citocina” e “vias de sinalização que regulam a pluripotência das células-tronco”. No entanto, uma meta-análise indicou que a alteração transcricional induzida pela microvibração não foi em direção ao perfil transcricional de embriões produzidos *in vivo*. Em conclusão, a microvibração resulta em embriões bovinos mais resistentes a criopreservação, mas deve-se ter cautela ao considerar a microvibração durante a PIVE devido às consequências pouco claras das anormalidades epigenéticas e transcricionais induzidas pelo tratamento.

Palavras-chave: bovinos, oócito, PIVE, blastocisto, epigenética, RNAseq.

SANTOS, A. C. Effect of micro-vibration on *in vitro* production of bovine embryos. 2022.

Master thesis (Master in Evolutionary Genetics and Molecular Biology) – Federal University of São Carlos, São Carlos, 2022

ABSTRACT

Much effort has been employed to improve the quality of embryos obtained by *in vitro* production (IVP) given the relevance of this technology to current livestock systems. In this context, dynamic IVP systems have been shown to be beneficial to the embryo once they mimic fluid flows and mechanical forces resulting from the movement of ciliated cells and muscle contraction in the reproductive tract. In the present study we sought to confirm these initial findings as well as assess potential molecular consequences to the embryo by applying micro-vibration (45 Hz for 5 seconds once per 60 minutes) during both oocyte maturation and embryo culture in cattle. As a result, micro-vibration led to cryotolerant blastocysts as indicated by the lower incidence of apoptosis following vitrification-thawing. Further analyses revealed epigenetic and transcriptional changes in blastocysts derived from the micro-vibration treatment, with a total of 502 differentially expressed genes. Enrichment analyses linked differentially expressed genes to “Oxidative phosphorylation”, “Cytokine-cytokine receptor interaction”, and “Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells”. Yet, a meta-analysis indicated that the transcriptional change induced by micro-vibration was not toward that of *in vivo*-derived embryos. In conclusion, micro-vibration leads to bovine embryos of improved cryotolerance, but caution should be taken given the unclear consequences of epigenetic and transcriptional abnormalities induced by the treatment.

Keywords: cattle, oocyte, IVP, blastocyst, epigenetic, RNAseq

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACKR3	Receptor de Quimiocina Atípica 3
ATP	Adenosina trifosfato
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BMP2	Proteína morfogenética óssea 2
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4
CDX2	Homeobox 2 tipo caudal
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC	Complexo cumulus-oócito
CXCL5	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 5
CXCL12	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 12
CXCR1	Receptor de quimiocina de motivo C-X-C 1
CXCR2	Receptor de quimiocina de motivo C-X-C 2
CXCR7	Receptor de quimiocina de motivo C-X-C 7
CYCS	Citocromo C
DEGs	Genes diferencialmente expressos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EIF4B	Fator de iniciação de tradução eucariótica 4B
EIF4E	Fator de iniciação de tradução eucariótica 4E
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
FGF4	Fator de crescimento de fibroblastos 4
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FHS	Hormônio folículo estimulante
FRZB	Proteína relacionada ao frizzled
H3K9ac	Acetilação da lisina 9 da histona 3
H3K9me3	Tri metilação da lisina 9 da histona 3
H3K27me3	Tri metilação da lisina 27 da histona 3
HAND1	Proteína 1 expressa em derivados do coração e da crista neural
ISLI1	Proteínas de homeodomínio ISLI
JAK/STAT	Transdutor de sinal Janus quinase e ativador de transcrição

KLF4	Fator Krüppel-like 4
LIFR	LIF Receptor Subunidade Alpha
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
MEIS1	Homeobox Meis 1
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NANOG	Nanog homeobox
OTX1	Ortodentículo homeobox 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRA	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos
POU5F1	POU classe 5 homeobox 1
PP2A	Serina/treonina proteína fosfatase 2A
P13K-AKT	Fosfatidilinositol 3-quinase-proteína quinase B
RHEB	Homólogo de Ras, ligação mTORC1
RNA	Ácido ribonucleico
RPS6KB1	Proteína ribossomal S6 quinase B1
SFB	Soro fetal bovino
SMD1/5	Ribonucleoproteína nuclear pequena Sm D1
SOX17	Fator de transcrição SRY-box 17
TF	Trofectoria
TCF1	Fator de transcrição 1, específico para células T
TFCP2L1	Fator de transcrição CP2 like
TCF3	Fator de transcrição 3, específico para células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNFSF10	TNF superfamily member 10
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WNT	Via de sinalização

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A microvibração mitiga a incidência de apoptose após vitrificação-descongelamento de blastocistos.....	22
Figura 2. A microvibração não altera o número de células do blastocisto e a taxa de apoptose em embriões frescos.	26
Figura 3. A incidência de apoptose é reduzida em duas vezes após a vitrificação-descongelamento de blastocistos produzidos sob microvibração.	28
Figura 4. A microvibração leva à diminuição dos níveis de H3K9ac e H3K9me3 nos blastocistos.	30
Figura 5. A microvibração leva a uma profunda alteração transcriptômica nos blastocistos	31
Figura 6. O transcriptoma de blastocistos produzidos sob microvibração não é alterado em relação ao de embriões derivados in vivo.....	32
Figura 7. Análise de componentes principais para sequenciamento de RNA (RNAseq)	33
Figura 8. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes à "fosforilação oxidativa"..	34
Figura 9. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes à "interação do receptor citocina-citocina".....	35
Figura 10. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes a “Caminhos de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco”	36
Figura 11. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes à "via de sinalização PI3K-Akt".	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da microvibração na PIVE.	21
Tabela 2 . Efeito da microvibração na recuperação do blastocisto após a vitrificação	22
Tabela 3. Efeito da micro-vibração na PIVE.....	25
Tabela 4. Efeito da micro-vibração na recuperação do blastocisto após a vitrificação	27

SUMÁRIO

1.Introdução	1
2.Revisão da Literatura.....	3
2.1 Produção in vitro de embriões	3
2.2 Microvibração na PIVE	5
2.3 Indicadores de qualidade embrionária	7
2.3.1 Análise de expressão gênica.....	8
2.3.2 Modificações pós-traducionais nas caudas de histonas.....	9
3.Hipótese	11
4.Objetivos.....	12
4.1 Geral.....	12
4.2 Específicos	12
5.Metodologia.....	13
5.1. Reagentes	13
5.2. Design experimental	13
5.3. Produção de embriões <i>in vitro</i>	13
5.3.1. Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	13
5.3.2. Preparação de esperma e fertilização <i>in vitro</i>	14
5.3.3. Cultivo <i>in vitro</i> de presumíveis zigotos.....	15
5.4. Avaliação da qualidade do blastocisto.....	15
5.4.1. Vitrificação de blastocisto	15
5.4.2. Análise terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)	16
5.4.3. Imunodeteção de marcas epigenéticas.....	17
5.4.4. Avaliação transcriptômica por sequenciamento de RNA.....	17
5.5. Análise estatística	19
6. Resultados	20

6.1. A microvibração melhora a criotolerância do embrião	20
6.2A microvibração altera as marcas epigenéticas e o perfil transcriptômico dos blastocistos	29
7.Discussão	38
8.Conclusão	43
9.Referências bibliográficas.....	44

1.Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido amplamente empregada em bovinos visando maximizar a eficiência reprodutiva e disseminação de germoplasma, entre outros objetivos [1]. De fato, a PIVE provou ser uma ferramenta poderosa nos sistemas de pecuária atuais, especialmente quando combinada com sêmen sexado e seleção genômica [2]. No entanto, ainda existem alguns aspectos não resolvidos da PIVE que dificultam sua eficiência e aplicação mais ampla [3,4]. Anormalidades cromossômicas, número reduzido de células, expressão gênica aberrante e metabolismo desregulado são fenótipos comuns de embriões derivados de PIVE, levando a menores taxas de prenhez e bezerros de menor viabilidade [3,5-9].

Durante as últimas décadas, anormalidades embrionárias resultantes de sistemas PIVE vêm sendo abordadas pelo desenvolvimento de sistemas de cultivo melhorados [10]. Para tanto, sistemas de cultivo vêm sendo desenvolvidos para imitar o ambiente reprodutivo *in vivo* no qual os oócitos são gerados, fecundados e se desenvolvem até o estágio de blastocisto [11]. Assim, há um crescente debate sobre as condições estáticas nas quais os oócitos e embriões são mantidos durante a PIVE [12]. Principalmente após a ovulação, oócitos e embriões são expostos a fluxos de fluidos e forças mecânicas resultantes do movimento das células ciliadas e da contração muscular no oviduto e no útero. Acredita-se que esses estímulos ativem vias intracelulares que regulam o desenvolvimento embrionário pré-implantação, além de contribuir com a difusão de substâncias (por exemplo, gases, nutrientes, espécies reativas de oxigênio e materiais residuais) no trato reprodutivo [11,16-18]. Ainda, estudos com humanos, camundongos, vacas e porcos indicam um efeito positivo de sistemas dinâmicos de PIVE, aumentando a qualidade embrionária, taxas de desenvolvimento e criotolerância [10,12].

Os sistemas dinâmicos de PIVE podem abranger o uso de microcanais [19-21], microfunis [22], sistemas de cultura de embriões inclinados [23-26] e sistemas de microvibração [12,27-31]. Em acordo com embriões *in vivo* serem expostos a microvibração variando de 5 a 20 Hz [13-15], Isachenko et al. [12,27] descobriram que o estímulo mecânico durante o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões humanos pode levar a um aumento das taxas de desenvolvimento. Da mesma forma, Mizobe et al. [28] relataram um efeito benéfico da microvibração quando aplicada durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos suínos. Mais

tarde, esses achados foram confirmados por outros estudos em humanos, camundongos e bovinos [29-32], mas ainda não está claro em que extensão a microvibração afeta o embrião.

Aqui, o emprego de microvibração durante a MIV e a CIV resultou em blastocistos bovinos mais tolerantes a vitrificação, embora as taxas de desenvolvimento pré-implantacional não tenham sido melhoradas. Além disso, o tratamento levou a várias alterações epigenéticas e transcricionais, revelando o profundo impacto da microvibração no embrião.

2.Revisão da Literatura

2.1 Produção *in vitro* de embriões

A PIVE consiste na produção de embriões fora do organismo materno. Nos anos 80, a possibilidade comercial da transferência de embriões impulsionou a reprodução assistida em bovinos, nascendo em 9 de junho de 1981 o primeiro bezerro oriundo de fecundação *in vitro* (FIV) [33]. Atualmente, essa biotécnica é composta pela combinação de vários processos interdependentes, desde a obtenção dos oócitos imaturos até a transferência de embriões para as fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo [34]. A PIVE é utilizada com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva dos animais, sem que haja comprometimento da vida reprodutiva dos mesmos [35], e pode propiciar inúmeras vantagens, como aceleração do melhoramento genético animal, diminuição do intervalo entre gerações, prolongamento da vida reprodutiva de animais de alto valor genético portadores de alterações adquiridas, utilização de animais jovens, gestantes ou lactantes em programas de reprodução, entre outros [33,36]. Essa biotécnica é considerada estabilizada, possibilitando a obtenção de centenas de bezerros ao longo da vida de uma única doadora de oócitos [37]. Há também um amplo interesse científico nesta biotécnica já que, além de ser um recurso para o estudo da biologia reprodutiva, a PIVE constitui importante ferramenta para a execução de outras biotecnologias tais como clonagem, transgenia e pesquisa com células tronco [38-40].

A primeira etapa da PIVE consiste na recuperação dos oócitos, seja de animais vivos, através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou a partir de ovários de animais abatidos [41]. A partir daí, são necessárias três etapas até a obtenção dos embriões propriamente ditos: MIV, FIV e CIV (42,38). *In vivo*, a maturação é induzida pelo pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH). Já *in vitro*, esse processo tem início com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano [40]. Isso ocorre porque a aspiração folicular rompe a interação do complexo cumulus-oócito (COC) com o restante das células foliculares (e.g., células murais da granulosa), resultando em alterações moleculares que culminam na retomada da meiose no oócito. Apesar disso, os oócitos obtidos por aspiração de folículos antrais (e.g., com diâmetro de 3-8 mm) não se encontram aptos para serem fecundados e nem são competentes para suportarem o desenvolvimento embrionário inicial. Para adquirirem tais capacidades é

necessária uma série de transformações nucleares e citoplasmáticas, as quais são coletivamente denominadas de maturação oocitária [43,44]. Para que a maturação oocitária tenha sucesso *in vitro* é fundamental que os meios utilizados durante a MIV se assemelhem as condições do ambiente *in vivo* de maturação [45]. Assim, são utilizados suplementos como o soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas como o hormônio folículo estimulante (FSH), o LH e o estradiol, além de condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura [46]. São necessárias de 18 a 22 horas para que o oócito mature. Ao término da MIV, o oócito maturado em estágio de metáfase II é caracterizado pela presença do primeiro corpúsculo polar. Oócitos que se encontram neste estágio normalmente estão aptos para serem fecundados e iniciarem o desenvolvimento embrionário [42,47].

A FIV envolve a incubação conjunta, por cerca de 22 horas, dos oócitos maduros com espermatozoides capacitados para que a fecundação ocorra [48,44]. Anteriormente à FIV, os espermatozoides devem ser adequadamente preparados para possibilitar a fecundação [49]. Normalmente são utilizados espermatozoides armazenados em nitrogênio líquido dentro de palhetas de sêmen. Assim, os espermatozoides devem ser separados de crioprotetores e outros componentes utilizados durante o congelamento uma vez que esses são prejudiciais à FIV. O método mais comum para a obtenção de espermatozoides vivos e livres desses componentes é a separação por gradiente de Percoll [50]. Após, a concentração e viabilidade de espermatozoides é determinada, seguido pela incubação dos mesmos em meio de FIV adequado para a capacitação espermática [51]. Ao término da FIV, os potenciais zigotos são desnudados das células do cumulus residuais e incubados em meio de CIV para possibilitar o desenvolvimento pre-implantacional até blastocisto [44].

A CIV em bovinos se estende por um período de sete dias. Durante esse período, o sistema de cultivo empregado deve propiciar condições adequadas para as primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário e, conseqüente, desenvolvimento até blastocisto [49]. O blastocisto representa a primeira diferenciação celular, sendo composto pela massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TE). A MCI é precursora dos três folhetos germinativos e alguns anexos embrionários, enquanto o TE origina somente anexos embrionários [38]. No dia 7 da CIV, os blastocistos são selecionados principalmente com base na morfologia e utilizados para a transferência de embriões *a fresco* ou para a congelação/vitrificação [42].

Embora o aprimoramento das condições de cultivo de embriões *in vitro* e das técnicas de recuperação de oócitos tenham tornado viável a aplicação da PIVE em escala comercial [49],

há relativa baixa eficiência da técnica e menor qualidade embrionária quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. A taxa de prenhez é menos eficiente, variando entre 22 a 33%, enquanto o da produção *in vivo* varia entre 41 a 55%. Além disso, aproximadamente 30% a 40% dos oócitos inicialmente utilizados na MIV se desenvolvem até o estágio de blastocisto [52]. Os embriões produzidos *in vitro* diferem dos produzidos *in vivo* em diversas características, tais como alterações cromossômicas, número de células, aspectos morfológicos e metabólicos, e expressão de genes específicos [53-55]. Provavelmente essas diferenças estabeleçam o começo de uma série de problemas que levam a redução de eficiência da PIVE, além de fenótipos indesejáveis (e.g., síndrome da cria grande) no bezerro ao nascimento [56]. A vista disso, estudos avaliando individualmente/conjuntamente as etapas da PIVE têm sido realizados com o objetivo de obtenção de melhores resultados [57]. Uma das estratégias que tem sido proposta para otimização da PIVE, mimetizando as condições *in vivo* de desenvolvimento embrionário, é a microvibração mecânica, uma vez que no oviduto o embrião é constantemente exposto a movimentos ciliares advindos das células epiteliais [12].

2.2 Microvibração na PIVE

Na busca por maior eficiência na PIVE, diversos estudos têm sido realizados visando mimetizar o ambiente fisiológico de desenvolvimento oocitário/embrionário e proporcionar condições de mínimo estresse osmótico, oxidativo, térmico, nutricional e mecânico [58]. Em diferentes organismos, o efeito estimulante da microvibração é bem conhecido e desempenha papel relevante na transdução mecânica, essencial para a sobrevivência das células e dos organismos superiores [59]. Especificamente na reprodução, etapas como a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial ocorrem no oviduto, um órgão multifuncional e mecanicamente ativo [60]. Dentre os tipos celulares do oviduto, incluem-se as células ciliadas [61], cujos cílios têm ação vibratória ou pulsante, com movimento orientado em direção ao útero [62]. Assim, oócitos ovulados e embriões são transportados ativamente em direção ao útero por meio de batimentos ciliares, além de contrações musculares [63,11]. Como resultado, oócitos e embriões são expostos no oviduto a microvibração de 5 a 20 Hz [14]. Além de induzir a ativação de várias cascatas intracelulares com importante papel na regulação do desenvolvimento embrionário pré-implantacional, este efeito microvibratório contribui com a

difusão mais eficiente de nutrientes no lúmen do oviduto [23,64]. Em comparação com o desenvolvimento *in vivo*, oócitos e embriões são cultivados durante a PIVE em ambiente estático utilizando placas de Petri ou micropoços e incubadoras de CO₂ ou mistura gasosa contendo CO₂, O₂ e N₂ [65]. Esse contraste de condições pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo menor potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*. Neste contexto, sistemas dinâmicos vêm sendo desenvolvidos para realização da PIVE, os quais incluem a utilização de microfunis [22], inclinação [23] e microvibração [27,28]. De acordo com estes trabalhos, sistemas dinâmicos resultam em um efeito positivo sobre a PIVE, aumentando a qualidade embrionária, taxas de desenvolvimento e criotolerância.

Isachenko et al [59], utilizando microvibração a frequência de 44 Hz, por 5 segundos a cada 60 minutos, durante o cultivo *in vitro* de embriões humanos, forneceram evidências de aumento da taxa de nascidos vivos em pacientes com 30 anos ou mais. Também em humanos, Yang et al [65] utilizando oócitos e aplicando microvibração a 26,3 Hz por 5 segundos a cada 60 minutos durante a MIV e microvibração de 41,2 Hz por 5 segundos a cada 60 minutos durante a CIV, obtiveram taxas significativamente maiores de embriões humano de boa qualidade, com pelo menos 6 células no dia 4. As taxas de gravidez clínica e nascidos vivos também foram maiores. Ainda em humanos, e também em camundongos, Hur et al [30] aplicaram microvibração em zigotos a frequência de 42 Hz por 5 segundos a cada 60 minutos. Em camundongos o número de células dos blastocitos foi significativamente maior no grupo submetido a microvibração, enquanto em humanos a microvibração aumentou as taxas de gravidez e implantação.

Em bovinos, oócitos/embriões foram cultivados utilizando um sistema de microvibração (com frequência de 20, 40 ou 80 Hz, por 5 segundos a cada 60 minutos) durante a MIV e CIV. Quando comparado com o grupo controle sem vibração, houve aumento da taxa de desenvolvimento a blastocisto quando empregado a microvibração de 40 Hz [31]. Já em suínos, um estudo utilizando microvibração durante a MIV indicou melhora da maturação citoplasmática, com consequente efeito positivo sobre a taxa de produção de blastocistos [28].

Portanto, são crescentes as evidências de que o emprego da microvibração durante a MIV e/ou CIV tem impacto benéfico sobre os índices da PIVE em bovinos, suínos, murinos e humanos, no entanto, ainda não está claro em que extensão a microvibração afeta o oócito/embrião.

2.3 Indicadores de qualidade embrionária

A viabilidade econômica da PIVE não está relacionada somente à taxa de produção dos embriões, mas também com a qualidade do embrião, a capacidade de estabelecer a gestação, e o desenvolvimento fetal e placentário normais, além da obtenção de gestações a termo e nascimento de crias viáveis e saudáveis [66]. Portanto, quanto melhor a competência do embrião selecionado para a transferência, maiores são as chances de estabelecimento e manutenção de gestação, com subsequente redução dos custos envolvidos [67]. No entanto, a determinação da competência embrionária é ainda bastante incipiente e comumente envolve avaliações morfológicas, determinação do número de células do blastocisto, número de células apoptóticas e análise da expressão gênica [67].

A avaliação morfológica é uma avaliação visual, feita utilizando um estereomicroscópio, na qual são considerados parâmetros como idade do embrião, brilho, presença de blastômeros irregulares, extrusão celular, vacuolização, morte ou fragmentação, alteração de cor ou tamanho, ausência de compactação e danos na zona pelúcida [68]. Essas características morfológicas são utilizadas para classificar os embriões produzidos *in vitro* em graus que variam de I a IV. O embrião de grau I é o que apresenta maior potencial de desenvolvimento, e o de grau IV o menor [69]. Esta é uma técnica não invasiva e por isso bastante utilizada para avaliar a competência embrionária. No entanto, por ser uma análise subjetiva, há variabilidade entre técnicos. Devido a isso, outras análises são comumente realizadas com o objetivo de complementar a avaliação morfológica.

A determinação do número total de células tem sido utilizada como indicador de qualidade do blastocisto pois embriões com maior número de células têm maior probabilidade de estabelecimento e manutenção da gestação [70-72]. Para tanto, são empregadas técnicas de coloração com reagentes com afinidade por ácidos nucleicos (e.g., Hoechst ou Dapi) e visualização em microscópio epifluorescente [73-75]. Por outro lado, embriões em mesmo estágio de desenvolvimento podem variar em tamanho e número de células, sem efeito sobre a competência. Por esse motivo, é comum que o número de células do blastocisto seja também determinado de acordo com a sua origem [67]. No dia 7 da embriogênese, o embrião bovino contém dois tipos celulares, a MCI que dá origem ao feto propriamente dito e partes dos tecidos extraembrionários, assim como o TE, que é responsável por produzir a maioria dos anexos embrionários incluindo a placenta [76,77]. Embriões que apresentam proporção de 20-40% de

MCI em relação ao total de células são considerados de boa qualidade [78,79]. Entretanto, embriões que apresentam essa proporção abaixo de 20%, ou acima de 40%, são considerados de baixa qualidade [80,81].

Ja a apoptose é um tipo de morte celular programada [82] que tem por objetivo a remoção de células danificadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam a função no organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação [83]. No cultivo *in vitro* de embriões, a apoptose também pode ser causada por condições subótimas de cultivo, podendo ser utilizada como um critério funcional de análise da qualidade embrionária [84]. Elevadas taxas de apoptose resultam em embriões de menor qualidade e, conseqüentemente, com baixa probabilidade de gerar prenhez [85].

2.3.1 Análise de expressão gênica

A análise da expressão gênica é uma ferramenta promissora para a compreensão do desenvolvimento embrionário e estudo dos efeitos de diferentes tratamentos na PIVE [86]. Quando comparados, embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* apresentam diferenças marcantes quanto a abundância relativa de transcritos [87,88]. Essas diferenças no transcriptoma refletem em parte diferenças na competência embrionária como resultado dos diferentes ambientes em que os embriões foram produzidos, *in vivo* vs. *in vitro* [87-89]. Estudos que caracterizaram padrões de expressão gênica ao longo do desenvolvimento embrionário destacam a importância da regulação da expressão gênica para mediar as respostas dos embriões aos estímulos proporcionados pelas condições de cultivo. Esse fato sugere que as diferenças encontradas nos níveis de expressão dos genes de embriões manipulados podem estar associadas a insuficiências nas condições de cultivo [90-92]. Assim sendo, indentificar como as condições de cultivo afetam a maturação de oócitos, fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário, incluindo seu efeito sobre o padrão de expressão gênica dos embriões, é essencial para aproximar as características do embrião derivado de PIVE daqueles produzidos *in vivo*.

Uma vez que a expressão gênica é regulada por alterações na estrutura da cromatina, a análise de marcas epigenéticas também é bastante informativa quando se investiga os efeitos da PIVE sobre o embrião. Os mecanismos de controle epigenético regulam funções celulares importantes para a diferenciação e plasticidade celular. Funções que estão envolvidas na garantia da estabilidade do genoma, inativação do cromossomo X, realização e manutenção do

imprinting genômico, silenciamento de elementos de transposição do DNA, plasticidade em resposta a fatores ambientais diversos, entre outros [93,94]. Durante o desenvolvimento embrionário há uma série de modificações epigenéticas importantes, sendo que cada estágio do desenvolvimento é caracterizado por um padrão epigenético específico [95-97]. Assim sendo, as modificações epigenéticas nos embriões devem ocorrer de forma orquestrada e correta para garantir o sucesso da embriogênese [95].

Sabe-se que os mecanismos epigenéticos são vulneráveis aos fatores ambientais [91,98], e que durante o desenvolvimento pré-implantacional esses fatores são cruciais para a regulação epigenética [99]. Em vista disso, o ambiente em que gametas e embriões são expostos interfere nos mecanismos epigenéticos e pode influenciar o padrão de expressão de genes relacionados a viabilidade do embrião [91,100,101,97]. Ademais, existem evidências de que a baixa taxa de desenvolvimento embrionário na PIVE esteja relacionada com alterações dos mecanismos epigenéticos. Os mecanismos epigenéticos mais conhecidos são: a metilação de DNA, modificações pós-traducionais nas caudas de histonas e alterações na expressão dos RNAs não-codificadores [102,103].

2.3.2 Modificações pós-traducionais nas caudas de histonas

As histonas são os componentes básicos dos nucleossomos, compostas por um domínio C-terminal globular e uma cauda N-terminal flexível. Cada nucleossomo é formado por um octâmero de histonas contendo pares de cada histona, H2A, H2B, H3 e H4, circundados por 146-147 pares de bases de DNA [104]. Alguns grupos químicos podem ser adicionados a cauda N-terminal da histona, modificando sua estrutura. Conforme a modificação, o nucleossomo pode se abrir, o que facilita o acesso de fatores de transcrição ao DNA, ou pode se fechar, impedindo esse acesso [105]. Considerando que o acesso de fatores de iniciação e transcrição as regiões de controle (e.g., promotores) do DNA irá determinar a expressão gênica, a regulação da estrutura da cromatina é essencial para garantir a correta expressão de genes, determinando a repressão ou ativando a transcrição gênica em nível adequado [105].

Modificações de caudas de histona incluem acetilação de resíduos de lisina, metilação de resíduos de lisina e arginina, ubiquitinação de resíduos de lisina, fosforilação de resíduos de serina e treonina, entre outros. A acetilação de lisinas está associada a estados de transcrição de genes ativos, enquanto a metilação de lisinas e argininas, embora geralmente associada ao

silenciamento gênico, também podem levar a ativação da transcrição gênica, dependendo da região da cauda da histona e da quantidade de metilações (uma, duas ou três) [106]. A acetilação e metilação das histonas H3 e H4 estão entre as modificações pós-traducionais de histonas mais abundantes e, portanto, são as mais estudadas [106]. A tripla metilação das lisinas 9 ou 27 na histona 3 (H3K9me3 e H3K27me3, respectivamente) estão relacionadas à redução da transcrição e à formação de heterocromatina (forma compacta da cromatina) [107,108], enquanto a acetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9ac) está associada com a cromatina ativa [109] e com a transcrição [110].

Em bovinos, os níveis de acetilação e metilação de caudas de histonas são determinados durante o início do desenvolvimento embrionário. Logo após as primeiras clivagens há redução na acetilação da lisina 9 e 18 da histona H3, H3K9ac e H3K18ac, respectivamente; são observados níveis mais baixos no estágio de 8-16 células. Após, ocorre um aumento na acetilação dessas lisinas até o estágio de blastocisto, sendo os níveis de H3K18ac maiores nas células do TE do que na MCI. Já a acetilação das lisinas 5 e 8 da histona 4, H4K5ac e H4K8ac, respectivamente, mantém níveis estáveis desde as primeiras clivagens até o estágio de 8-16 células, sendo observado aumento após este estágio e sem diferença entre células do TE e da MCI [111].

Também, para os níveis de metilação de histonas em embriões bovinos, foi descrito que após as primeiras clivagens, há redução de trimetilação da lisina 9 da H3 (H3K9me3) até o estágio de 8-16 células, enquanto os níveis de dimetilação desta lisina (H3K9me2) permanecem constantes. Essa marca está relacionada ao silenciamento de Xist (responsável por iniciar o silenciamento de uma das cópias do cromossomo X) e repetições terminais longas (LTRs) em embriões de mamíferos [112,113]. Depois do estágio de 8-16 células, há um aumento de H3K9me2 e H3K9me3 até o estágio de blastocisto [112,113]. A metilação da H3K9 é particularmente importante porque parece seguir o mesmo perfil observado para a metilação do DNA, ambos mecanismos epigenéticos capazes de reduzir a transcrição gênica [114]. Outras importantes marcas repressivas de histonas identificadas em embriões bovinos são a trimetilação da lisina 27 e 64 da histona H3 e da lisina 20 da histona H4, H3K27me3, H3K64me3 e H4K20me3, respectivamente. Essas marcas demonstram o mesmo perfil de reprogramação durante o desenvolvimento, sendo consideravelmente reduzidas após a fecundação e durante as primeiras clivagens, aumentando, porém, no estágio de blastocisto [115-118].

3.Hipótese

Considerando que oócitos e embriões são expostos a fluxos de fluídos e forças mecânicas resultantes do movimento das células ciliadas e da contração muscular no ovário, oviduto e útero. E que esses estímulos ativam vias intracelulares que regulam o desenvolvimento embrionário pré-implantação, além de contribuir com a difusão de substâncias como gases, nutrientes, espécies reativas de oxigênio e materiais residuais. A hipótese deste trabalho é que a qualidade dos embriões bovinos produzidos na PIVE é melhorada quando um tratamento de microvibração é empregado durante a MIV e a CIV.

4.Objetivos

4.1 Geral

Avaliar os efeitos da microvibração aplicada durante a MIV e a CIV sobre o embrião bovino derivado de PIVE.

4.2 Específicos

1. Avaliar os efeitos da microvibração sobre a PIVE por determinação das taxas de clivagem e de blastocisto;
2. Avaliar os efeitos da microvibração sobre a qualidade do embrião por análise nos blastocistos do número total de células e número de células apoptóticas;
3. Avaliar o efeito da microvibração sobre a criotolerância dos embriões por análise da taxa de blastocisto, número total de células e incidência de apoptose após a vitrificação;
4. Avaliar os efeitos da microvibração sobre a cromatina por análise dos blastocistos quanto aos níveis de H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3;
5. Avaliar os efeitos da microvibração sobre o padrão de expressão gênica dos blastocistos.

5. Metodologia

5.1. Reagentes

Salvo indicação em contrário, todos os produtos químicos e reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

5.2. Design experimental

Em uma primeira série de experimentos, a microvibração (45 Hz por 5 segundos) foi aplicada a cada 30 (V30) ou 60 (V60) minutos para avaliar seu efeito sobre as taxas de desenvolvimento, número total de células, incidência de apoptose e criotolerância em comparação a embriões produzidos em condição estática (Controle). Essas condições foram escolhidas com base em trabalhos anteriores [12,28–32], com a microvibração sempre sendo aplicada tanto durante a MIV quanto durante a CIV, mas nunca durante a FIV. Com base nos resultados obtidos, apenas os grupos Controle e V60 foram considerados em uma segunda série de experimentos, os quais foram avaliados quanto as taxas de desenvolvimento, número total de células, incidência de apoptose, criotolerância, marcas epigenéticas e perfil transcricional. Para ajustar a microvibração de acordo com as necessidades específicas de cada experimento foi utilizada uma incubadora, que é um protótipo em desenvolvimento pela WTA Watanabe Tecnologia Aplicada (Cravinhos, SP, Brasil), baseado na incubadora EVE (WTA). As vibrações mecânicas foram produzidas utilizando um motor vibratório com seu eixo desbalanceado fixado externamente à base da incubadora. Um feixe de luz (LED) conectado a um medidor de frequência foi usado para determinar a intensidade da corrente elétrica necessária para produzir uma frequência de vibração de 45 Hz.

5.3. Produção de embriões *in vitro*

5.3.1. Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Oócitos utilizados para PIVE foram obtidos *post-mortem* de ovários de vacas mestiças nelore (*Bos indicus*) abatidas em abatedouro local. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução salina 0,9% a 25-30°C dentro de 2 horas e os folículos antrais medindo entre 3 e 8 mm de diâmetro foram aspirados com uma agulha de calibre 18 acoplada a uma seringa de 10 ml. O fluido folicular recuperado foi transferido para um tubo de 50 ml e o *pellet* decantado inspecionado quanto à presença de COCs de graus 1, 2 e 3, de acordo com Stojkovic et al. [119]. Em resumo, os oócitos selecionados apresentaram citoplasma homogêneo ou levemente heterogêneo com pelo menos dois terços de sua circunferência circundados por no mínimo três camadas de células do cumulus.

Os COCs selecionados foram lavados em meio de cultura de tecidos tamponado com HEPES-199 (TCM-199; GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), à 37°C, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; GIBCO BRL), 22 µg/ml de piruvato de sódio e 50 mg/ml de amicacina. Para MIV [120], ~25 COCs/poço foram incubados por 22-24 h em placas de cultura de 5 poços (WTA) com 500 µl (coberto com óleo mineral) de TCM-199 tamponado com bicarbonato de sódio suplementado com 10% de FBS, 22 µg/ml de piruvato de sódio, 50 µg/ml de amicacina, 5 µg/ml de FSH (Pluset, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e 50 µg/ml de LH (Vetecor, Ceva Saúde Animal Ltda). A incubadora (EVE) foi regulada para 38,5°C, umidade máxima e atmosfera de 6% CO₂, 5% O₂ e 89% N₂.

5.3.2. Preparação de espermatozoides e fertilização *in vitro*

Após a MIV, os oócitos foram submetidos à FIV [120]. Para tanto, palhetas de um único touro Nelore com fertilidade comprovada foram descongeladas em banho-maria à 36°C por 30 segundos. O sêmen foi depositado em um gradiente de Percoll de 45-90% preparado com meio de Tyrode modificado (TALP) e centrifugado a 800 x g por 6 minutos. Os espermatozoides peletizados foram ressuspensos em meio de FIV composto de TALP com 10 µg/ml de heparina, 22 µg/ml de piruvato de sódio, 50 µg/ml de amicacina, 6 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA) livre de ácidos graxos, 2 µM de penicilamina, 1 µM hipotaurina e 0,25 µM epinefrina. Em seguida, ~106 espermatozoides móveis/ml foram incubados em gotas de 70 µl de meio de FIV, cobertas com óleo mineral junto com ~25 COCs por 20-22 horas. A incubadora (3130, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, EUA) foi ajustada à 38,5°C com umidade máxima e 5% de CO₂.

5.3.3. Cultivo *in vitro* de presumíveis zigotos

Presumíveis zigotos foram desnudados das células do cumulus por pipetagem após a FIV e, em seguida, submetidos a CIV por incubação (~25 embriões/poço) em placas de cultura de 5 poços com 500 µl de meio CR2aa modificado (coberto com óleo mineral) suplementado com 50 µg/ml amicacina, 2% de FBS e 30 mg/ml de BSA sem ácidos graxos [120]. A CIV foi realizada por sete dias em uma incubadora (EVE) ajustada a 38,5°C com umidade máxima e atmosfera de 6% CO₂, 5% O₂ e 89% N₂. Tanto no Dia 3 (D3) quanto no D5, metade do meio de cultura foi substituído pela mesma quantidade de meio fresco. As taxas de clivagem (D3) e de blastocisto (D7) foram estimadas dividindo-se o número de estruturas em cada dia pelo número de zigotos presumíveis submetidos a CIV. Os blastocistos foram classificados como iniciais, regulares, expandidos e eclodidos [121]. Blastocistos expandidos em D7 foram vitrificados ou coletados para análise molecular. Neste último caso, *pools* de cinco blastocistos foram transferidos para tubos de 0,2 ml em 1 µl de solução tamponada com fosfato (PBS) com 0,01% (p/v) de polivinil-pirrolidona (PVP), congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C até o uso. Alternativamente, a CIV foi estendida até o D10 para avaliar a taxa de blastocistos eclodidos, a qual foi calculada dividindo-se o número de embriões eclodidos pelo número total de blastocistos no D10.

5.4. Avaliação da qualidade do blastocisto

5.4.1. Vitrificação de blastocisto

A vitrificação foi realizada com base no que foi descrito em uma publicação anterior [122], com poucas modificações. Para tanto, os blastocistos expandidos foram primeiro lavados em TCM-199 tamponado com HEPES com 20% de FBS, 22 µg/ml de piruvato de sódio e 50 mg/ml de amicacina, depois incubados por 8 minutos em meio de vitrificação V1 (WTA) contendo 10% (v/v) etilenoglicol e 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO), e por 50 segundos em meio de vitrificação V2 (WTA) contendo 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO. Em seguida, dois blastocistos foram transferidos em volume mínimo de meio V2 para o topo da palha de vitrificação (Vitrific; WTA) e imediatamente imersos em N₂ líquido.

Os blastocistos foram aquecidos por incubação em três meios diferentes com concentrações decrescentes de sacarose (D1, D2 e D3; Vitrogen). Os embriões foram mantidos em meio D1 à 37°C por 45 segundos, em meio D2 à temperatura ambiente por 3 minutos e em meio D3 à temperatura ambiente por 5 minutos. Os blastocistos foram então lavados em meio CR2aa modificado suplementado como descrito acima e cultivado por 48 horas, conforme descrito para CIV. A taxa de blastocistos reexpandidos foi determinada após 6, 12, 24 e 48 horas de aquecimento, dividindo-se o número de blastocistos expandidos pelo número total de blastocistos em cultura. A taxa de blastocistos eclodidos foi determinada após 48 horas de aquecimento, dividindo-se o número de blastocistos eclodidos pelo número de blastocistos reexpandidos. Os blastocistos reexpandidos foram fixados por incubação por 40 minutos em temperatura ambiente em PBS com 4% (p/v) de paraformaldeído e 0,01% de PVP, e então armazenados à 4°C até o uso em PBS com 0,01% de PVP.

5.4.2. Análise terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

A fragmentação do DNA, um indicativo de morte celular por apoptose, foi avaliada em blastocistos utilizando o kit terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Bade-Vurtemberg, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, os embriões foram permeabilizados por 30 minutos à temperatura ambiente em PBS com 0,1% de PVP e 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e lavados em tampão WS (PBS com 0,1% de PVP e 0,1% de Triton X-100). Os embriões do controle positivo foram tratados por 1 hora à 37°C com 50 U/ml de DNase (Sigma-Aldrich) e lavados em tampão WS. Os embriões foram então incubados por 1 hora à 37°C em tampão contendo o dUTP conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Roche Molecular Biochemicals) e a enzima terminal deoxinucleotidil transferase (Roche Molecular Biochemicals); para embriões do controle negativo, a desoxinucleotidil transferase terminal foi omitida. Em seguida, os embriões foram lavados três vezes em WS e corados por 10 minutos em temperatura ambiente em WS com 10 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Finalmente, os embriões foram lavados em WS e montados em lâminas com lamínulas usando

o reagente Prolong Gold (Cat. # P36934; ThermoFisher Scientific, Waltman, MA, EUA). Os embriões foram visualizados sob um microscópio de fluorescência (Ti-S, Nikon Instruments Inc, Tóquio, Kanto, Japão) usando filtros apropriados para TUNEL (filtro B-2E/C; EX = 465-495, DM = 505, BA = 515-555) e Hoechst (filtro UV-2E/C; EX = 340-380, DM = 400, BA = 435-485). O *software* NIS-Elements Basic Research (Nikon) foi utilizado para processar as imagens e determinar o número de células positivas para TUNEL (TUNEL+) e Hoechst. A porcentagem de células TUNEL+ foi calculada dividindo-se o número de células TUNEL+ pelo número de células coradas para Hoechst 33342.

5.4.3. Imunodetecção de marcas epigenéticas

Os blastocistos expandidos foram avaliados quanto aos níveis de acetilação de H3K9ac (Cat. # H9286, Sigma-Aldrich) e metilação de H3K9me3 (Cat. # ab8898, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK) e H3K27 (H3K27me3; Cat # ab77256, Abcam) por imunodetecção, como descrito anteriormente [123]. Em resumo, os embriões foram permeabilizados por 30 minutos à temperatura ambiente em PBS com 0,1% de PVP e 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), lavados em tampão WS e bloqueados por 2 horas à temperatura ambiente em tampão WS com 1% de BSA e glicina 0,1 M. Os embriões foram então lavados em WB, incubados durante a noite à 4°C com anticorpos primários diluídos 1:200 em WB com 1% BSA e 0,1 M glicina, lavados seis vezes em WB e incubados por mais 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários (Cat. A11008 e A11005; ThermoFisher Scientific) diluídos 1:400 em WB com 1% BSA e 0,1 M glicina. Finalmente, os embriões foram lavados três vezes em WB, corados por 10 minutos à temperatura ambiente em WS com 10 µg/ml Hoechst 33342, lavados em PBS com 0,1% de PVP e montados em lâminas com lamínulas usando reagente Prolong Gold. Os embriões foram visualizados sob um microscópio confocal (LCM 780; Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) usando filtros de excitação e emissão a laser específicos para Hoechst 33342, Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 594. As imagens foram analisadas no software ImageJ para quantificação do fluoróforo emitido.

5.4.4. Avaliação transcriptômica por sequenciamento de RNA

Pools de cinco blastocistos expandidos foram avaliados quanto a diferenças

transcriptômicas com base na análise de sequenciamento de RNA (RNAseq). Para tanto, o RNA total foi extraído usando o Pico Pure RNA Isolation Kit (Cat. # KIT0204; ThermoFisher Scientific), tratado com DNase livre de RNase (Qiagen, Hilden, Rhine-Westphalia, Alemanha) e ressuspendido em 7 µl do Elution Buffer (que acompanha o Pico Pure RNA Isolation Kit). A integridade e as quantidades de RNA foram avaliadas por meio do chip RNA 6000 Pico Kit e do 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O kit SMART-Seq HT (Takara Bio Inc, Kusatsu, Kansai, Japão) foi usado para síntese e amplificação de cDNA, enquanto as bibliotecas foram preparadas usando o Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 (Illumina) levando em consideração leituras de 2x100 bp.

As leituras de RNAseq foram mapeadas utilizando o genoma de referência bovino por meio do alinhador Rsubread (versão 1.34.7), considerando leituras com *score* de sequenciamento ao longo do comprimento da leitura acima de 33. As leituras mapeadas foram resumidas no nível do gene de acordo com o Anotação ENSEMBL RefSeq (Bos.taurus. Ars 1.2 ucd genoma assembly) de uma maneira fita-específica. Para evitar genes pouco expressos, consideramos somente genes com mais de 3 contagens de leituras em pelo menos 3 bibliotecas. As contagens de transcritos e demais informações básicas foram obtidas com a função *featureCounts* do pacote Rsubread com a opção *strandSpecific* e configuração padrão. A análise da expressão gênica diferencial (DEG) foi realizada usando o pacote DESEQ2 R considerando o método de Benjamini-Hochberg ('BH', $FDR < 0,1$) e diferença de expressão maior (menor) que $\log_2 0,6$ (-0,6). As análises de enriquecimento foram baseadas na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) utilizando o pacote de software R ClusterProfiler [124] considerando BH ($FDR < 0,05$). Além disso, a função *filterByExpr* do pacote edgeR [125] foi usada para determinar os genes exclusivamente expressos, os quais somente foram considerados quando expressos em um grupo (pelo menos 3 contagens em todas as amostras) e não expressos no outro grupo (zero contagens em todas as amostras). Os Hubgenes foram estimados usando CeTF [126] com base no Fator de Impacto Regulatório (RIF) e na Correlação Parcial e Teoria da Informação (PCIT) [127,128]. As vias de interesse foram exploradas usando o Pathview [129]. Para auxiliar na interpretação dos resultados, foram feitas análises de componentes principais (PCA), heatmap, entre outros, usando o software R, no qual observamos principalmente a classificação, intensidade e diferença de expressão entre os grupos. Também realizamos uma meta-análise para permitir uma validação *in silico* dos

achados. Para tanto, as amostras foram baixadas do Gene expression Omnibus (GEO; GSE74675 [130]). As amostras selecionadas foram blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*. As amostras foram processadas conforme descrito acima para comparar os níveis de expressão gênica, com as amostras sendo normalizadas em conjunto com as sequenciadas no presente estudo e considerando o experimento como um fator no modelo estatístico.

5.4.5. Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo

O RNA foi extraído e convertido em cDNA a partir de pools de cinco blastocistos expandidos conforme descrito acima (5.4.4). Os níveis de transcrição foram avaliados conforme relatado anteriormente [37] usando PCR quantitativo (qPCR) no 7500 Fast Real-Time PCR e as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 15 min e 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Cada reação de qPCR consistiu em 15 µL contendo 1 µL de primers direto e reverso (3 µM cada), 7,5 µL LuminoCt SYBR Green qPCR Ready Mix, 2 µL de cDNA de amostra (diluição de 10 a 100 vezes) e 4,5 µL de H₂O ultrapura. Os valores de expressão calculados a partir da análise de RNAseq foram usados para selecionar alvos gênicos, incluindo dois genes up-regulated (CPXM2 e GNAT2), down-regulated (KRT1 e NPPA) e estáveis (ACTB e RPS18). Os primers (Tabela S1) foram projetados usando o software PrimerBLAST (NIH) e confirmados quanto à especificidade do fragmento amplificado por curvas de dissociação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para cada gene de interesse. Os valores de expressão foram calculados conforme relatado anteriormente e normalizados usando os valores de expressão (média geométrica) de ACTB e RPS18.

5.5. Análise estatística

Cada variável foi verificada quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, e os dados que não atendiam aos pressupostos da ANOVA foram transformados. Os dados binários foram analisados por ANOVA usando o procedimento Binary Logistic Regression do SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA). Os dados contínuos foram analisados por teste *t*-Student (dois grupos experimentais) ou One-Way ANOVA seguido pelo teste de médias de Tukey (três grupos experimentais) usando o SAS Studio. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. Os valores são

apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

6. Resultados

6.1. A microvibração melhora a criotolerância do embrião

Primeiro investigou-se o efeito da microvibração na PIVE realizando a MIV e a CIV sob condições estáticas (controle) ou de microvibração (45 Hz por 5 segundos), sendo a última aplicada a cada 30 (V30) ou 60 (V60) minutos. A FIV foi sempre realizada em condição estática. Para avaliar o efeito da microvibração na PIVE, embriões de quatro réplicas experimentais foram avaliados quanto às taxas de desenvolvimento conforme descrito em material e métodos (ver item 5.3.3). Em comparação com o controle não tratado, a microvibração resultou em discreta, mas significativa ($P < 0,05$), redução das taxas de clivagem e de blastocisto (Tabela 1) em ambas as condições testadas (V30 e V60). No entanto, a taxa de eclosão de blastocistos permaneceu inalterada pela microvibração (Tabela 1). Para investigar o efeito da microvibração sobre a qualidade do embrião, blastocistos expandidos em D7 foram submetidos a vitrificação-descongelamento e avaliados quanto à taxa de sobrevivência, número total de células e fragmentação de DNA. Como resultado, os embriões submetidos à microvibração mostraram-se mais resistentes a fragmentação de DNA (Figura 1B,1E,1H,1K,1L), apesar de não ter sido observado efeito sobre as demais análises (Tabela 2; Figura 1A,1D,1G,1J). Vale a pena notar que a fragmentação de DNA foi mais eficazmente mitigada em embriões V60 do que V30 (Figura 1E,1H).

Tabela 1. Efeito da microvibração na PIVE.

Grupo[†]	Oócitos	Clivados (D3)*	Blastocistos (D7)*	Eclodido (D10)[#]
Controle	347	290 (83,6%)	171 (49,3%)	46/49 (93,9%)
V30	349	242 (69,3%)	138 (39,5%)	29/33 (87,9%)
V60	343	243 (70,8%)	138 (40,2%)	32/34 (94,1%)
ANOVA		P < 0,0001	P = 0,01	P = 0,57
Controle x V30		P < 0,0001	P = 0,02	
Controle x V60		P < 0,0001	P = 0,04	
V30 x V60		P = 0,64	P = 0,83	

†PIVE foi realizada em condição padrão, exceto que a MIV e a CIV foram desenvolvidas sob condições estáticas (Controle) ou de microvibração (45 Hz por 5 segundos), com a microvibração aplicada a cada 30 (V30) ou 60 (V60) minutos.

*Porcentagem de oócitos que atingiram os estágios clivado e blastocisto nos dias 3 (D3) e 7 (D7), respectivamente. Os blastocistos foram inicialmente classificados como iniciais, regulares, expandidos, eclodindo e eclodidos. Dado que os grupos experimentais não atingiram diferença estatística quando analisados separadamente para cada classificação de blastocisto, estes foram então combinados em uma única categoria denominada “blastocistos”

[#]Porcentagem de blastocistos que atingiram o estágio de eclodidos no D10, calculado pela divisão do número de blastocistos eclodidos pelo número total de blastocistos.

Os grupos experimentais, dentro da coluna, foram comparados por ANOVA de uma via, seguido de comparação de médias pelo teste post-hoc de Tukey. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$.

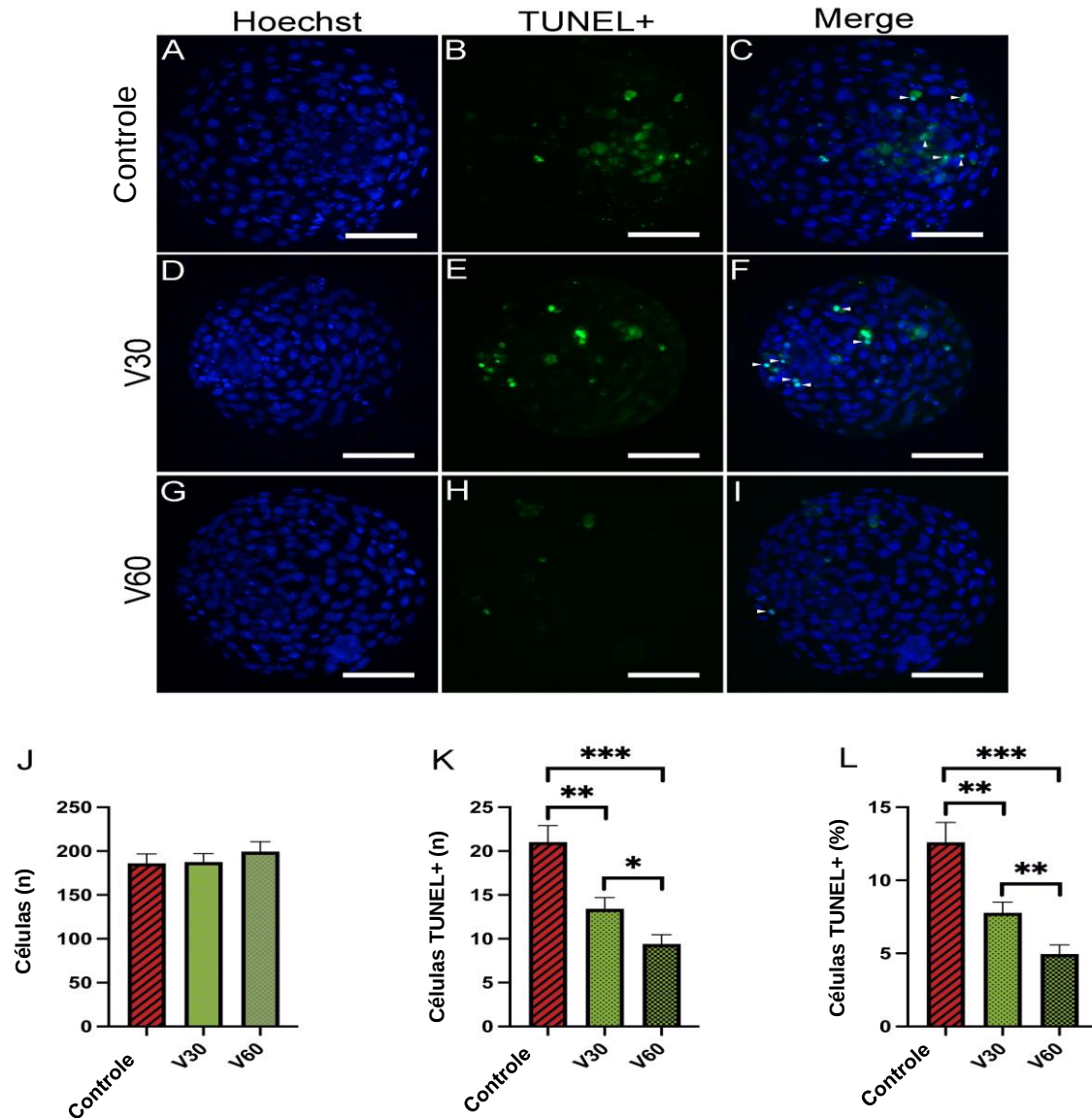


Figura 1. A microvibração mitiga a incidência de apoptose após vitrificação-descongelamento de blastocistos. Fotomicrografias de blastocistos reexpandidos (48 h após o descongelamento) corados usando Hoechst 33342 (A, D, G) e o kit de marcação de nick end dUTP mediado por deoxinucleotidil transferase Terminal (TUNEL; B, E, H). Imagens sobrepostas para Hoechst 33342 e TUNEL também são mostradas (C, F, I). Blastocistos foram produzidos sob condições estáticas (Controle; A-C) ou de microvibração (45 Hz por 5 segundos uma vez por 30 ou 60 minutos, V30 [D-F] e V60 [G-I], respectivamente). Barras = 100 μ m. As setas representam as células positivas para a marcação com TUNEL. O número total de células em blastocistos foi estimado com base em Hoechst 33342 (n = 57-63; J), enquanto células positivas para TUNEL (TUNEL+) foram usadas para estimar a incidência de apoptose (n = 34-63; K). A porcentagem de células TUNEL+ foi calculada dividindo o número de células TUNEL+ pelo número total de células em cada blastocisto (L). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. *P < 0,05. **P < 0,01. ***P < 0,0001.

Tabela 2 . Efeito da microvibração na recuperação do blastocisto após a vitrificação.

Grupo[†]	Embriões	Reexpandido (6 h)[*]	Reexpandido (12 h)[*]	Reexpandido (24 h)[*]	Reexpandido (48 h)[*]	Eclodidos (48 h)[#]
Controle	80	62 (77,5%)	67 (83,7%)	68 (85,0%)	78 (97,5%)	66 (82,5%)
V30	76	65 (85,5%)	70 (92,1%)	71 (93,4%)	74 (97,4%)	69 (90,8%)
V60	73	60 (82,2%)	63 (86,3%)	69 (94,5%)	69 (94,5%)	68 (93,1%)
ANOVA		P = 0,38	P = 0,76	P = 0,48	P = 0,10	P = 0,32

†PIVE foi realizada em condição padrão, exceto MIV e CIV que foram desenvolvidas sob condições estáticas (Controle) ou vibração (45 Hz por 5 segundos), com vibração aplicada a cada 30 (V30) ou 60 (V60) minutos.

*Porcentagem de blastocistos que reexpandiram após 6, 12, 24 e 48 horas de aquecimento, calculado pela divisão do número de blastocistos reexpandidos pelo número total de blastocistos em cultura.

#Porcentagem de blastocistos que atingiram o estágio de eclosão após 48 horas de aquecimento, calculado pela divisão do número de blastocistos eclodidos pelo número total de blastocistos reexpandidos.

Os grupos experimentais, dentro das colunas, foram comparados por ANOVA de uma via, mas não obtiveram diferença estatística ao considerar $P < 0,05$.

Considerando os resultados acima, realizamos mais quatro réplicas de PIVE para confirmar nossos achados. Dada a menor incidência de apoptose, apenas o tratamento V60 foi considerado nesta segunda série de experimentos. Comparado com um resultado prejudicial observado acima, nesses experimentos não encontramos nenhum efeito da microvibração sobre as taxas de desenvolvimento embrionário (Tabela 3), número total de células e taxa de fragmentação de DNA (Figura 2A-I). Após a vitrificação-descongelamento (Tabela 4), a sobrevivência do embrião e o número total de células de blastocistos reexpandidos permaneceram inalterados, enquanto a taxa de fragmentação de DNA confirmou estar reduzida em duas vezes nos blastocistos produzidos sob microvibração (Figura 3A-I).

Em resumo, os achados apontam para um efeito positivo da microvibração sobre a criotolerância do embrião.

Tabela 3. Efeito da microvibração na PIVE.

Grupo[†]	Oócitos	Clivados (D3)[*]	Blastocistos (D7)[*]	Eclodidos (D10)[#]
Controle	352	288 (81,8%)	146 (41,5%)	75/81 (92,6%)
V60	363	296 (81,5%)	163 (44,9%)	88/96 (91,2%)
ANOVA		P = 0,92	P = 0,35	P = 0,82

[†]PIVE foi realizada em condição padrão, exceto que a MIV e a CIV foram desenvolvidas sob condições estáticas (Controle) ou de microvibração (45 Hz por 5 segundos), com a microvibração aplicada a cada 30 (V30) ou 60 (V60) minutos.

^{*}Porcentagem de oócitos que atingiram os estágios clivado e blastocisto nos dias 3 (D3) e 7 (D7), respectivamente. Os blastocistos foram inicialmente classificados como iniciais, regulares, expandidos, eclodindo e eclodidos. Dado que os grupos experimentais não atingiram diferença estatística quando analisados separadamente para cada classificação de blastocisto, estes foram então combinados em uma única categoria denominada “blastocistos”

[#]Porcentagem de blastocistos que atingiram o estágio de eclodidos no D10, calculado pela divisão do número de blastocistos eclodidos pelo número total de blastocistos.

Os grupos experimentais, dentro da coluna, foram comparados por ANOVA de uma via, seguido de comparação de médias pelo teste post-hoc de Tukey. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$.

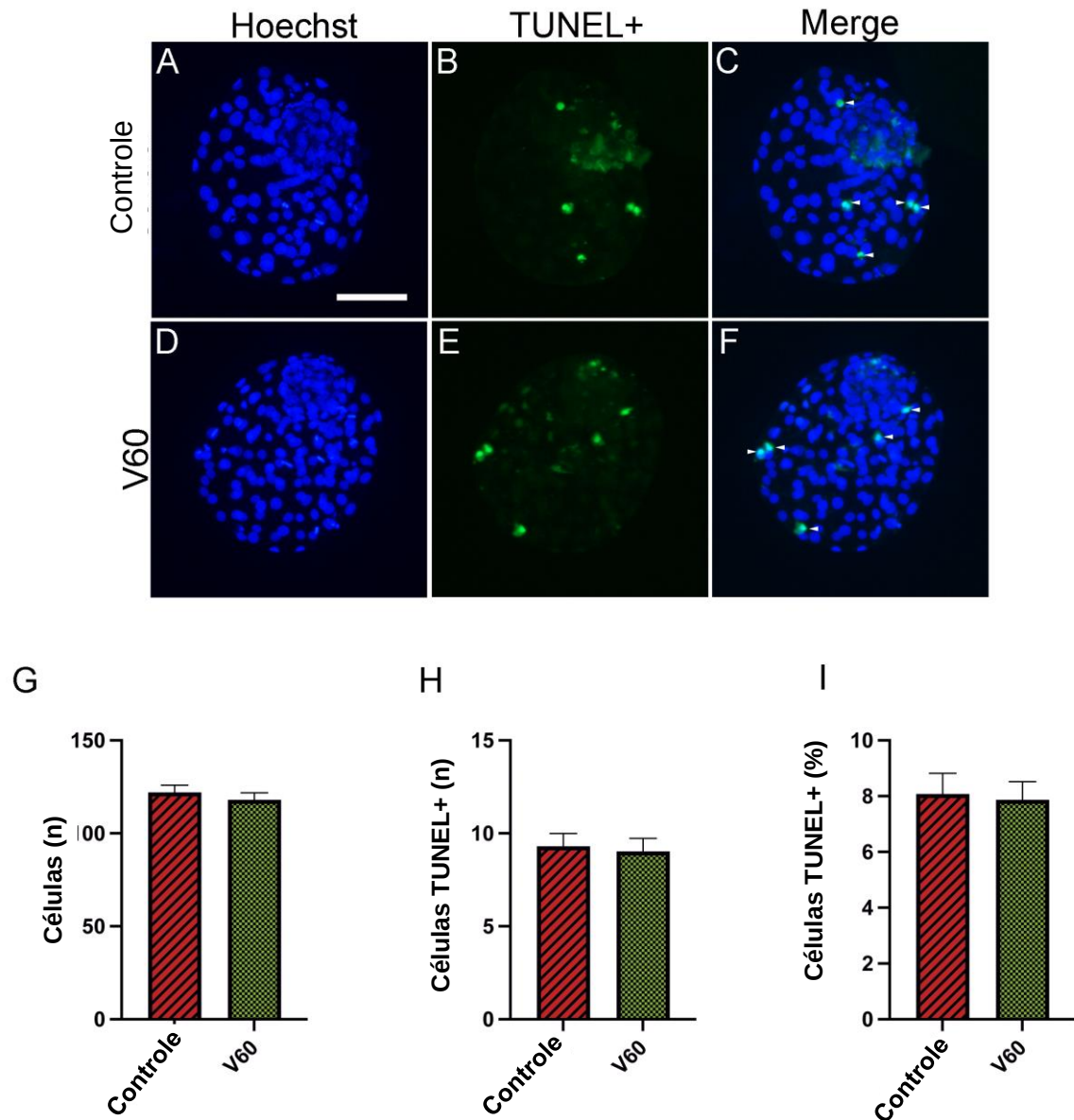


Figura 2. A microvibração não altera o número de células do blastocisto e a taxa de apoptose em embriões frescos. Fotomicrografias de blastocistos expandidos (Dia 7) corados usando Hoechst 33342 (A, D) e o kit de marcação de nick end dUTP mediado por deoxinucleotidil transferase Terminal (TUNEL; B, E). Imagens sobrepostas para Hoechst 33342 e TUNEL também são mostradas (C, F). Blastocistos foram produzidos sob condições estáticas (Controle; A-C) ou de microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; D-F). Barras = 100 μ m. As setas representam as células positivas para fragmentação de DNA (TUNEL). O número total de células em blastocistos foi estimado com base em Hoechst 33342 (n = 79-80; G), enquanto células TUNEL-positivas (TUNEL+) foram usadas para estimar a incidência de apoptose (n = 79-80; H). A porcentagem de células TUNEL+ foi calculada dividindo o número de células TUNEL+ pelo número total de células (I). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Nenhuma diferença estatística significativa foi detectada entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 4. Efeito da microvibração na recuperação do blastocisto após a vitrificação.

Grupo[†]	Embriões	Reexpandido (6 h)*	Reexpandido (12 h)*	Reexpandido (24 h)*	Reexpandido (48 h)*	Eclodidos (48 h)[#]
Controle	52	33 (63,5%)	44 (84,6%)	48 (92,3%)	47 (90,4%)	45 (86,5%)
V60	48	34 (70,8%)	42 (87,5%)	46 (95,8%)	46 (95,8%)	43 (89,6%)
ANOVA		P = 0,39	P = 0,97	P = 0,96	P = 0,95	P = 0,95

[†]PIVE foi realizada em condições padrão, exceto MIV e CIV que foram desenvolvidas sob condições estáticas (Controle) ou vibração (45 Hz por 5 segundos), com vibração aplicada a cada 60 minutos (V60).

*Porcentagem de blastocistos que reexpandiram após 6, 12, 24 e 48 horas de aquecimento, calculado pela divisão do número de blastocistos reexpandidos pelo número total de blastocistos em cultura.

[#]Porcentagem de blastocistos que atingiram o estágio de eclosão após 48 horas de aquecimento, calculado pela divisão do número de blastocistos eclodidos pelo número total de blastocistos reexpandidos.

Os grupos experimentais, dentro das colunas, foram comparados por ANOVA de uma via, mas não obtiveram diferença estatística ao considerar $P < 0,05$.

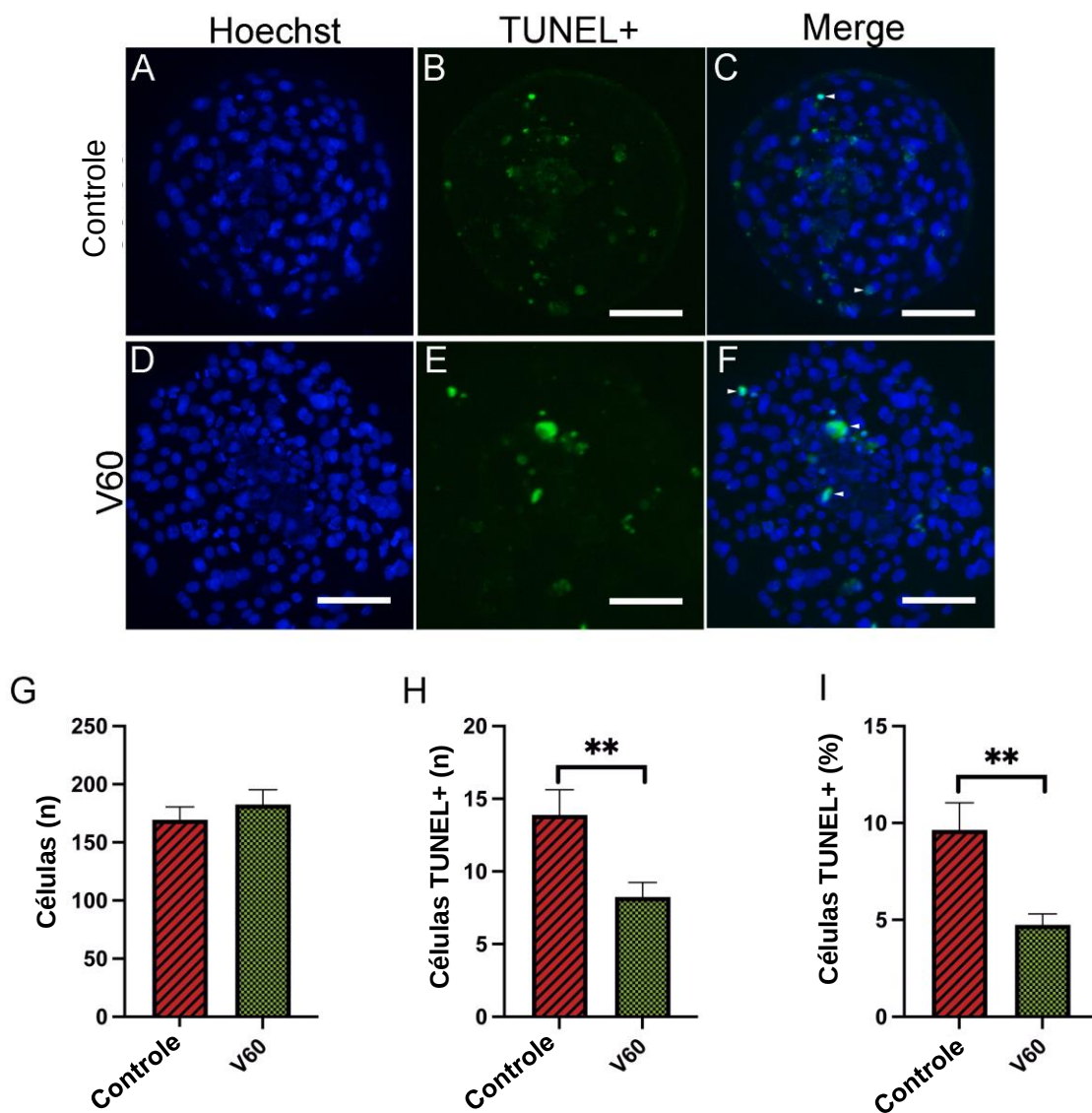


Figura 3. A incidência de apoptose é reduzida em duas vezes após a vitrificação-descongelamento de blastocistos produzidos sob microvibração. Fotomicrografias de blastocistos re-expandidos (48 h após o descongelamento) corados usando Hoechst 33342 (A, D) e o kit de marcação de nick end dUTP mediado por deoxinucleotidil transferase Terminal (TUNEL; B, E). Imagens sobrepostas para Hoechst 33342 e fragmentação de DNA (TUNEL) também são mostradas (C, F). Blastocistos foram produzidos sob condições estáticas (Controle; A-C) ou de microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; D-F). Barras = 100 μ m. As setas representam as células positivas para TUNEL (TUNEL+). O número total de células em blastocistos foi estimado com base em Hoechst 33342 (n = 37-38; G), enquanto células TUNEL+ foram usadas para estimar a incidência de apoptose (n = 37-38; H). A porcentagem de células TUNEL+ foi calculada dividindo-se o número de células TUNEL+ pelo número total de células (I). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. **P < 0,01.

6.2 A microvibração altera as marcas epigenéticas e o perfil transcriptômico dos blastocistos

Em seguida, buscou-se investigar o impacto da microvibração nas marcas epigenéticas avaliando-se blastocistos expandidos frescos (embriões D7, não submetidos à vitrificação) quanto aos níveis H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3. Após a análise de microscopia confocal de embriões imunomarcados (Figura 4), o tratamento de microvibração provou reduzir os níveis de H3K9ac (Figuras 4A-F e 4S) e H3K9me3 (Figuras 4G-L e 4T), mas não os de H3K27me3 (Figuras 4M-R e 4U).

Dada a estreita associação entre os níveis de H3K9ac/H3K9me3, estrutura da cromatina e expressão gênica [131-133], também investigamos uma possível alteração transcriptômica em embriões do tratamento V60. Para tanto, oito *pools* de blastocistos expandidos frescos, quatro por grupo experimental, cada *pool* contendo cinco embriões D7, foram avaliados por RNAseq. Como resultado, 502 (224 aumentados e 278 diminuídos) genes diferencialmente expressos (DEG) foram encontrados em V60 em relação aos embriões controle (Figura 5A), com agrupamento hierárquico (Figura 5B) e PCA (Figura 7) resultando em dois grupos distintos. Os dados transcriptômicos foram validados usando qPCR (Fig. S1). A análise de enriquecimento dos DEGs por KEGG revelou uma alteração em vias importantes, como “fosforilação oxidativa”, “interação do receptor citocina-citocina” e “vias de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco” (Figuras 5C, 5D, 8A, 9A e 10A).

Para verificar se o perfil transcricional dos embriões V60 se tornou mais parecido com o de embriões produzidos *in vivo*, realizou-se uma meta-análise usando dados de RNAseq publicamente disponíveis [130]. Como resultado, o PCA agrupou blastocistos V60 com embriões derivados de PIVE em vez de aproxima-los dos produzidos *in vivo* (Figura 6A). De fato, a análise de enriquecimento por KEGG indicou que embriões V60 e *in vivo* não compartilham muitas vias, embora o tratamento de microvibração tenha alterado significativamente o perfil transcricional em comparação com blastocistos produzidos *in vitro* (Figura 6B). Para ilustrar ainda mais as diferenças entre embriões V60 e *in vivo*, comparamos os DEGs (determinados com base em seus respectivos controles) para “fosforilação oxidativa”, “interação do receptor de citocina-citocina”, “caminhos de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco” e “via de sinalização PI3K-Akt” (Figuras 8-11). Em resumo, a microvibração levou a mudanças epigenéticas e transcricionais significativas, resultando em embriões com um perfil transcricional que não é muito semelhante ao dos embriões produzidos

in vivo.

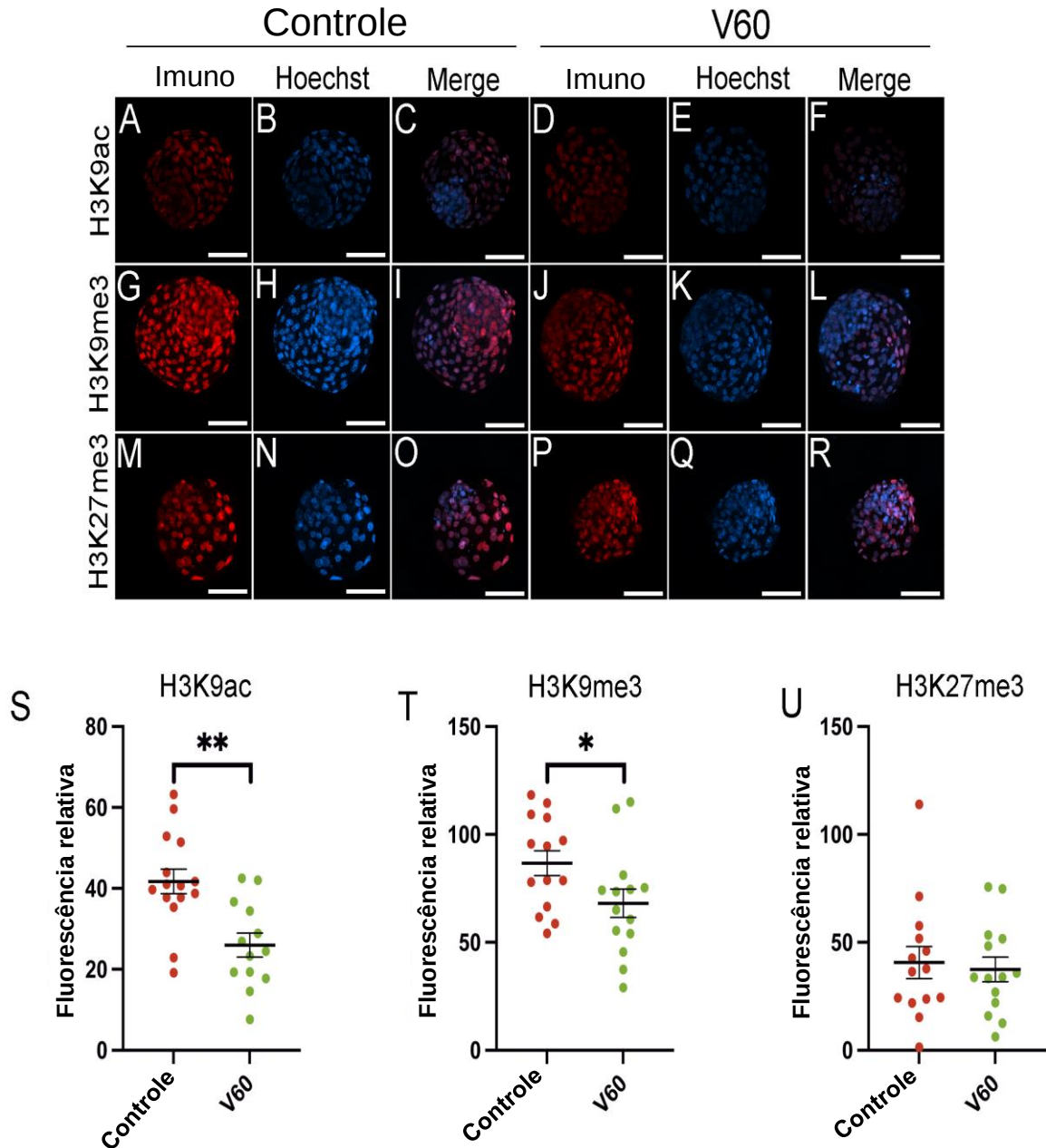


Figura 4. A microvibração leva à diminuição dos níveis de H3K9ac e H3K9me3 nos blastocistos. Fotomicrografias de blastocistos expandidos no Dia 7 corados para histona H3 lisina (resíduo 9) acetilação (H3K9ac; A, D) e trimetilação (H3K9me3; G, J), bem como lisina (resíduo 27) trimetilação (H3K27me3; M, P); Hoechst 33342 embriões contrastados (B, E, H, K, N, Q) e imagens mescladas (C, F, I, L, O, R). Barras = 100 μ m. Os níveis de H3K9ac (n = 13-15; S), H3K9me3 (n = 14; T) e H3K27me3 (n = 14; U) foram estimados conforme descrito em Material e métodos (item 2.4.3). Os blastocistos foram produzidos sob condições estáticas (Controle; A-C, G-I, M-O) ou microvibração (V60, 45 Hz por 5 s uma vez por 60 min; D-F, J-L, P-R). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *P < 0,05. **P < 0,01.

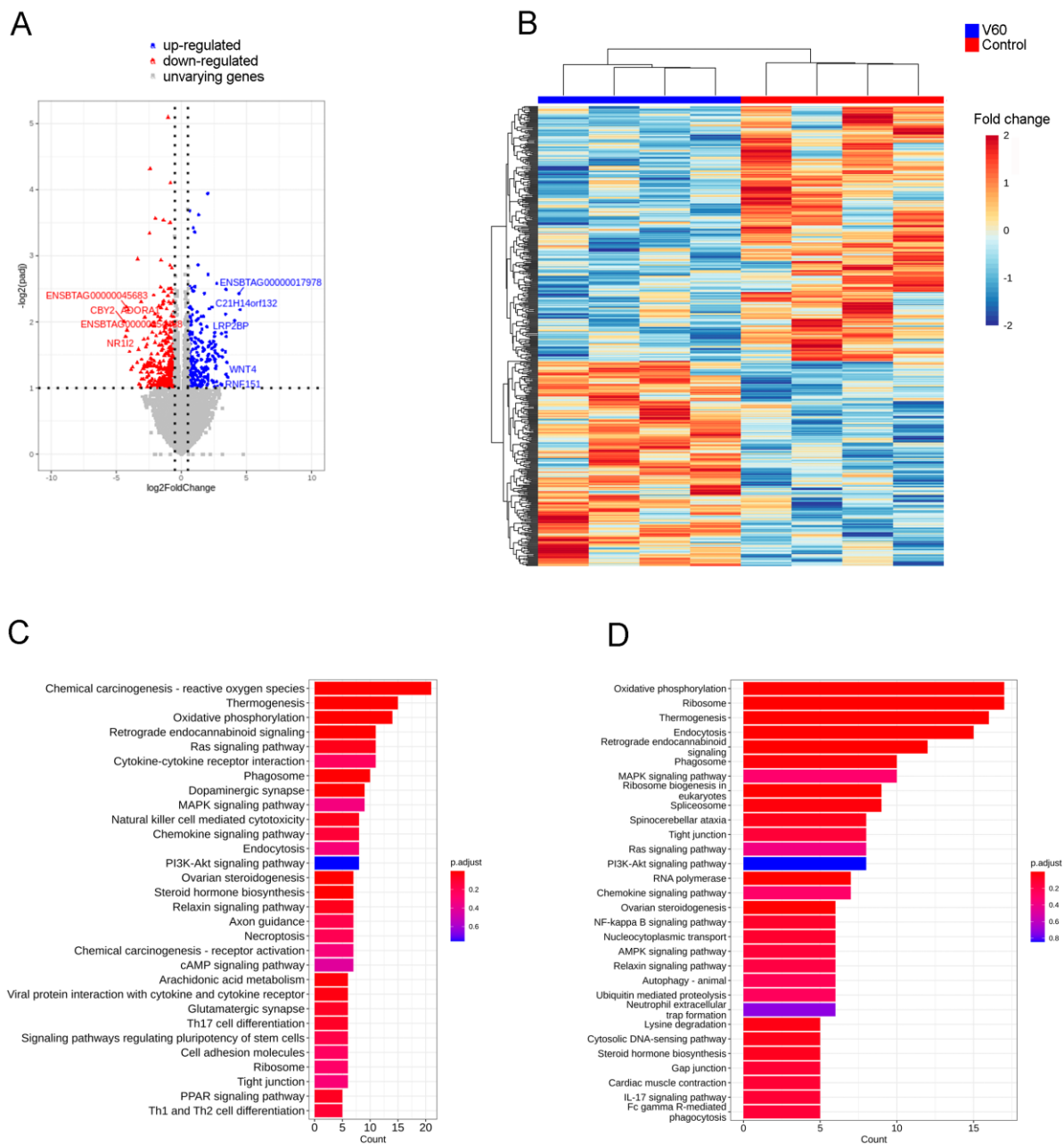


Figura 5. A microvibração leva a uma profunda alteração transcriptômica nos blastocistos.(A) Volcano plot e (B) agrupamento hierárquico para sequenciamento de RNA (RNAseq) comparando blastocistos produzidos sob microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez a cada 60 minutos; n = 4) em relação à condição estática (Controle; n = 4). Análise de enriquecimento da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) com base em genes expressos diferencialmente determinados usando DESEQ2 (C) e CeTF (D). Veja também as Figuras 7-10.

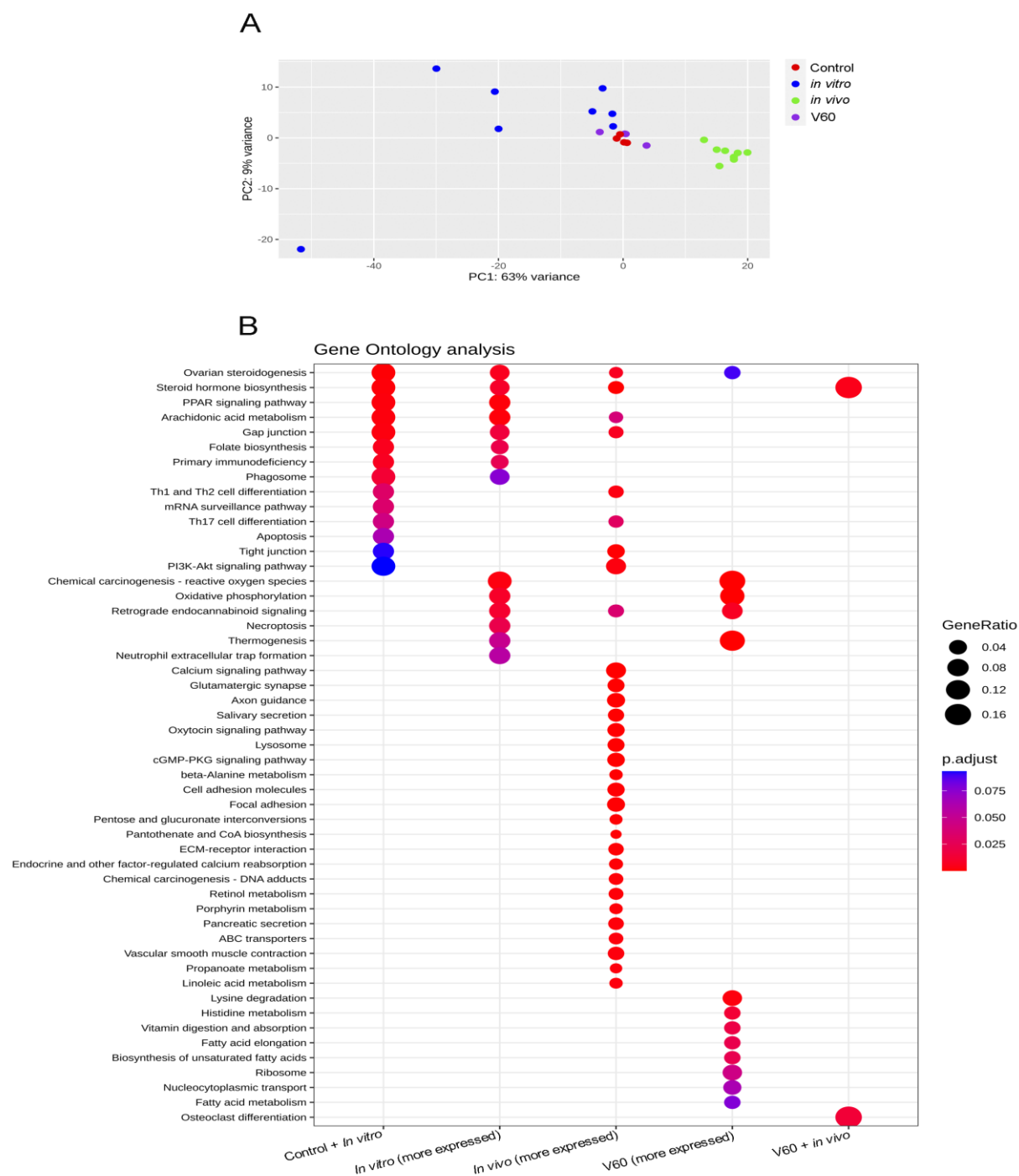


Figura 6. O transcriptoma de blastocistos produzidos sob microvibração não é alterado em relação ao de embriões derivados *in vivo*. Análise de componentes principais (PCA; A) comparando o perfil transcricional de microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; n = 4) e *in vivo* (n = 7; dados de Heras et al. [130]). Embriões produzidos *in vitro* não submetidos à microvibração, denominados Controle (n = 4) e *in vitro* (n = 7 [130]), foram utilizados como controles para embriões V60 e *in vivo*, respectivamente. A análise de enriquecimento da Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG; B) foi realizada usando os mesmos dados considerados para PCA, exceto que os grupos experimentais foram combinados com base em agrupamentos de interesse. Veja também as Figuras 8-11.

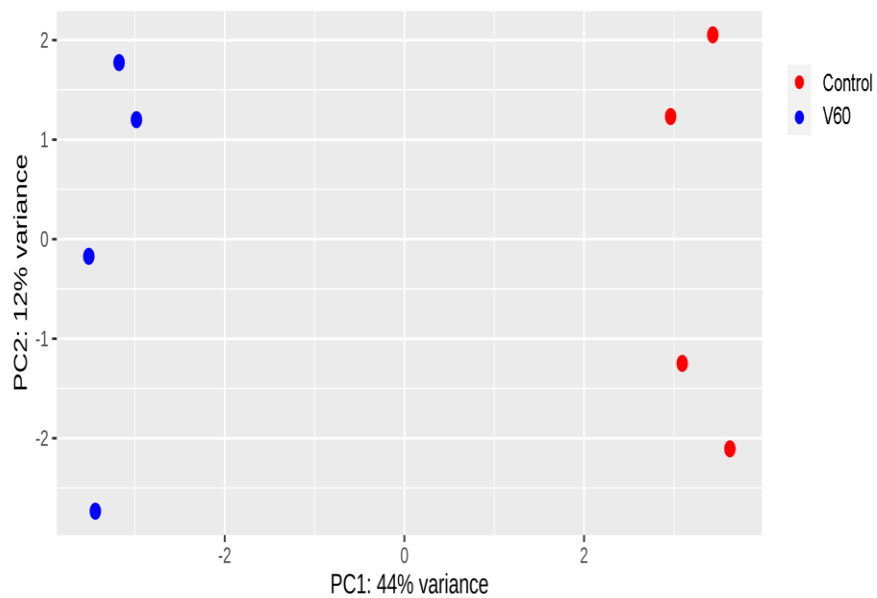
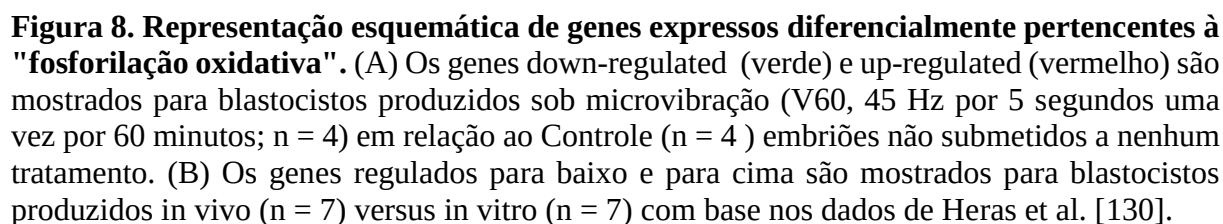


Figura 7. Análise de componentes principais para sequenciamento de RNA (RNAseq; A) dados comparando blastocistos produzidos sob condições estáticas (Controle; n = 4) ou microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; n = 4).



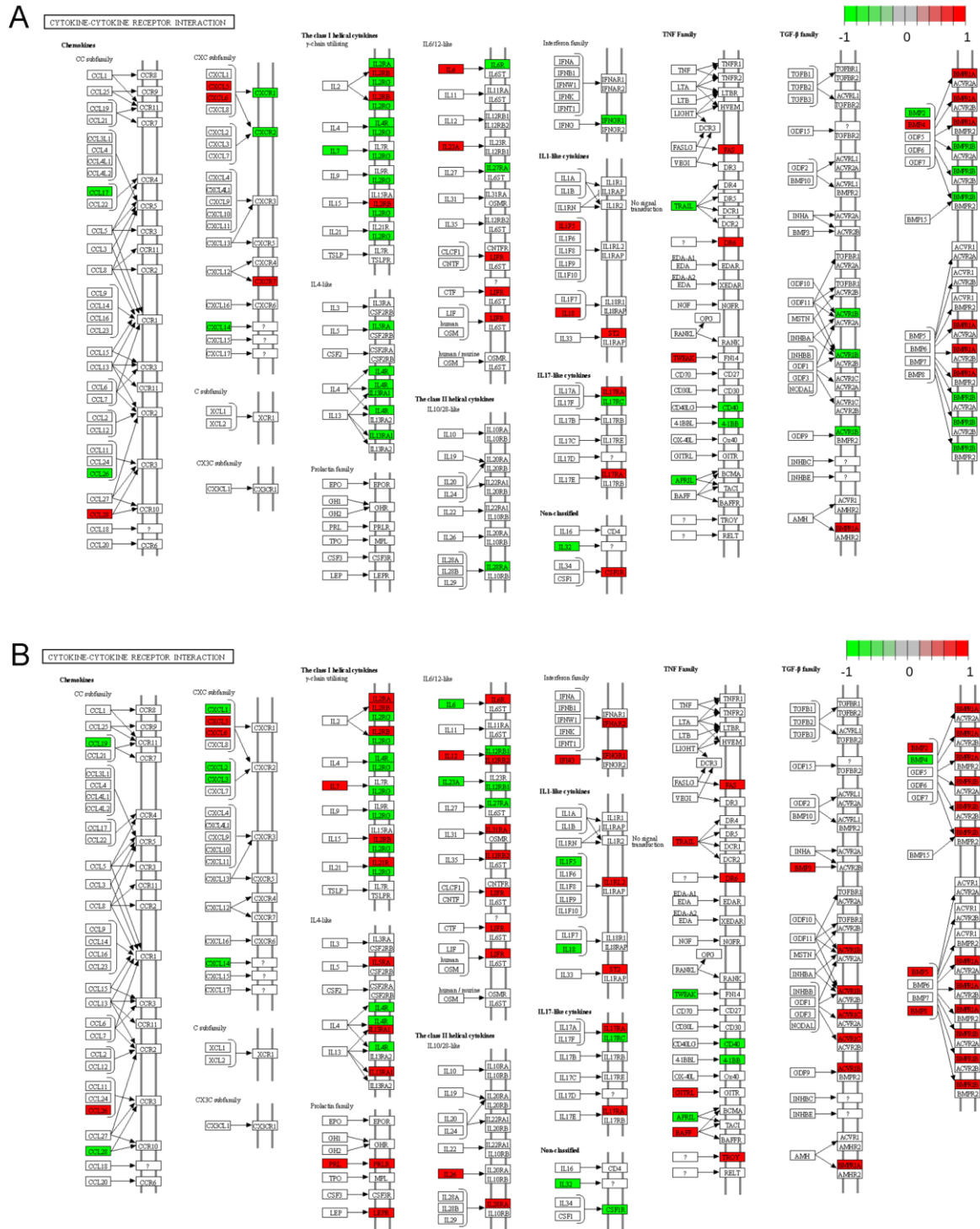
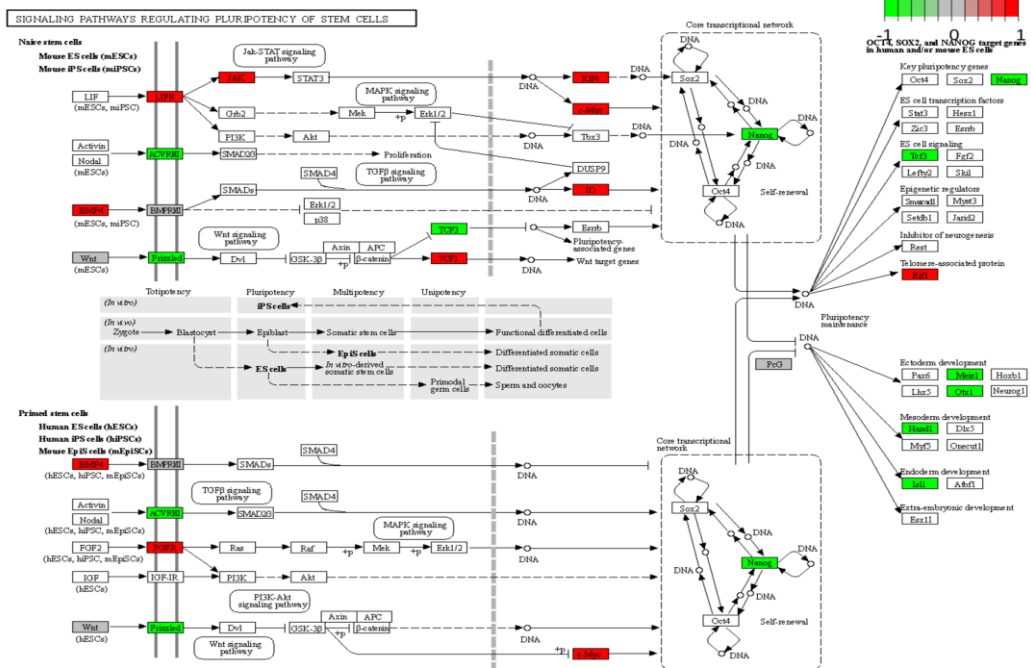


Figura 9. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes à "interação do receptor citocina-citocina". (A) Os genes down-regulated (verde) e up-regulated (vermelho) são mostrados para blastocistos produzidos sob microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; n = 4) em relação ao Controle (n = 4) embriões não submetidos a nenhum tratamento. (B) Os genes regulados para baixo e para cima são mostrados para blastocistos produzidos in vivo (n = 7) versus in vitro (n = 7) com base nos dados de Heras et al. [130].

A



B

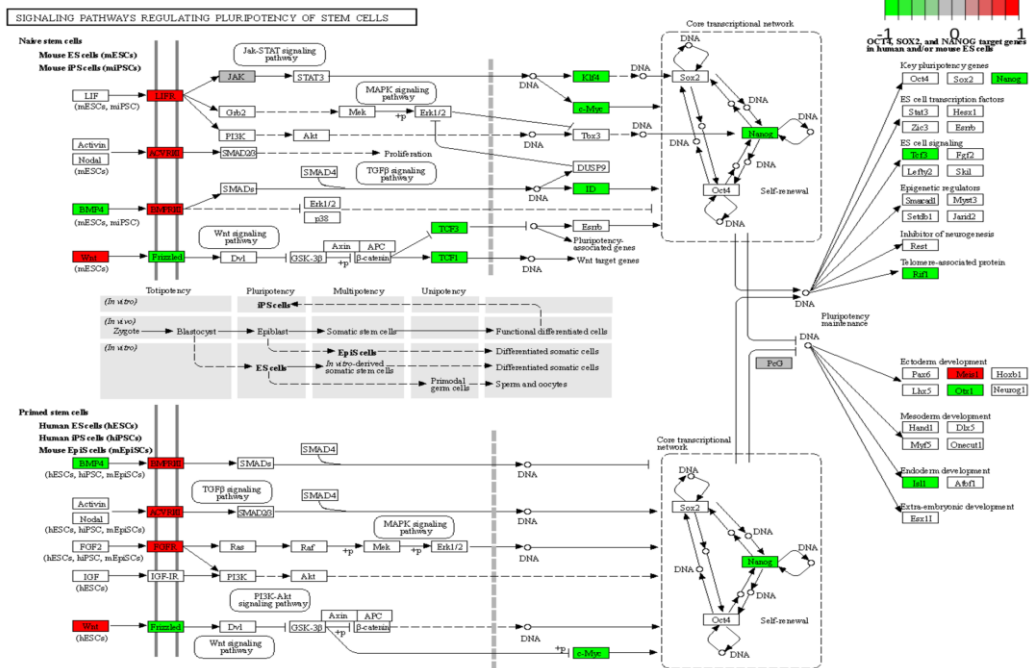


Figura 10. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes a “Caminhos de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco”. (A) Os genes regulados down-regulated (verde) e up-regulated (vermelho) são mostrados para blastocistos produzidos sob microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; n = 4) em relação ao Controle (n = 4) embriões não submetidos a nenhum tratamento. (B) Os genes regulados para baixo e para cima são mostrados para blastocistos produzidos in vivo (n = 7) versus in vitro (n = 7) com base nos dados de Heras et al. [130].

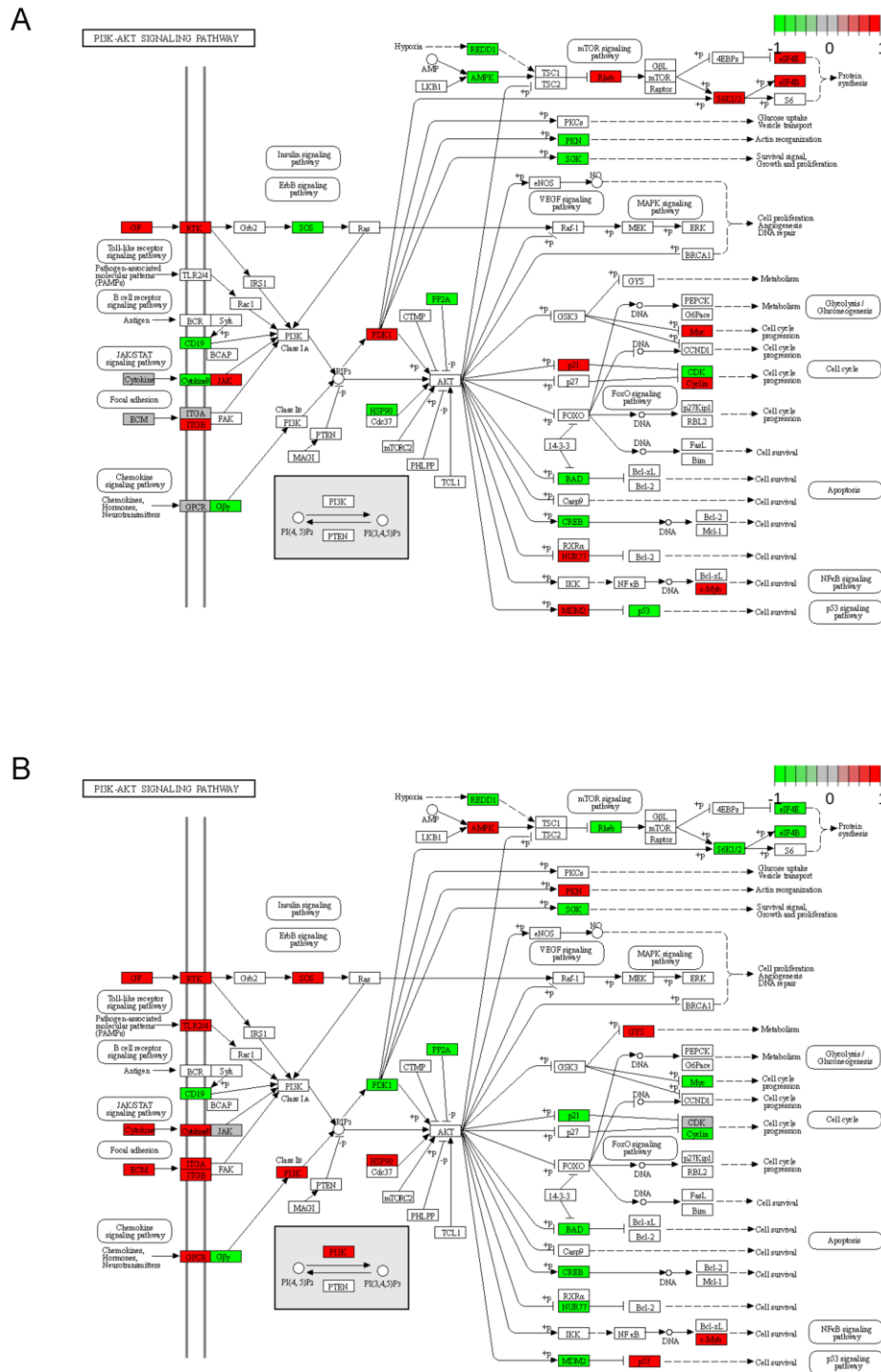


Figura 11. Representação esquemática de genes expressos diferencialmente pertencentes à "via de sinalização PI3K-Akt". (A) Os genes regulados down-regulated (verde) e up-regulated (vermelho) são mostrados para blastocistos produzidos sob microvibração (V60, 45 Hz por 5 segundos uma vez por 60 minutos; n = 4) em relação ao Controle (n = 4) embriões não submetidos a nenhum tratamento. (B) Os genes regulados para baixo e para cima são mostrados para blastocistos produzidos in vivo (n = 7) versus in vitro (n = 7) com base nos dados de Heras et al. [130].

7. Discussão

Apesar de um grande progresso durante as últimas décadas, as tecnologias de reprodução assistida como a PIVE são consideradas subótimas, pois podem levar a taxas de desenvolvimento mais baixas e anormalidades em comparação com embriões produzidos *in vivo* [3,4]. Uma estratégia que tem sido considerada para melhorar os sistemas de PIVE é cultivar oócitos/embriões sob vibração mecânica, buscando mimetizar as condições *in vivo* [10,11]. Aqui, a microvibração (45 Hz por 5 segundos uma vez a cada 60 minutos) aplicada durante a MIV e a CIV resultou em embriões bovinos mais tolerantes à vitrificação, apesar de não aumentar as taxas de desenvolvimento embrionário. Na verdade, tanto as taxas de clivagem quanto de blastocisto foram levemente prejudicadas pela microvibração em uma primeira série de experimentos, mas permaneceram inalteradas quando os experimentos foram repetidos em uma segunda etapa. Essa inconsistência pode ser devido ao uso de oócitos coletados durante o inverno (primeira etapa) versus verão (segunda etapa), revelando uma possível sensibilidade dos oócitos/embriões à microvibração dependendo da fonte e da estação [120].

Em suínos, a microvibração (20 Hz por 5 segundos em intervalos de 30-60 minutos) melhorou a formação de blastocistos quando aplicada durante a MIV, independentemente de seu uso durante a CIV [28]. Embora nenhuma mudança no número de células tenha sido observada nos blastocistos, o estudo baseou-se no uso de embriões partenogênicos e clonados, não fecundados [28]. Por sua vez, a microvibração (20-42 Hz por 5 segundos uma vez a cada 60 minutos) foi deletéria para embriões de camundongo quando aplicada durante a CIV [32], mas benéfica para o desenvolvimento pré e pós-implantação em humanos [12,27, 29,30]. Em bovinos, a microvibração (40 Hz por 5 segundos uma vez a cada 60 minutos) mostrou levar a melhores taxas de formação de blastocistos, sem alteração no número de células embrionárias [31]. No entanto, as taxas de desenvolvimento neste último estudo [31] foram muito menores do que o esperado para vacas, mesmo quando considerado o grupo controle, indicando que o resultado positivo da microvibração pode ter sido secundário ao protocolo PIVE ou raça (Japanese Black Cow) utilizados. Em resumo, nossos achados corroboram relatos anteriores de que a microvibração pode melhorar a qualidade de embriões derivados de PIVE, mas não indicam um efeito benéfico sobre as taxas de desenvolvimento embrionário.

Diante dos achados acima, fomos além para caracterizar possíveis efeitos moleculares da microvibração em blastocistos. Juntamente com a metilação do DNA, modificações pós-

tradicionais de histonas, como H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3, regulam a estrutura e acessibilidade da cromatina, desempenhando um papel crucial durante a embriogênese pois estão intrinsecamente ligadas a reprogramação e desenvolvimento do embrião [118]. Enquanto a presença de H3K9ac em promotores gênicos se associa estreitamente com cromatinas transcritionalmente ativas, H3K9me3 e H3K27me3 associam-se à formação de heterocromatina e silenciamento de genes [131,133,134]. Os níveis dessas marcas são altamente dinâmicos durante o desenvolvimento pré-implantação [135-137], com aumento de H3K9me3, paralelamente à diminuição de H3K9ac, associando-se a blastocistos bovinos de maior qualidade [136,138]. No entanto, tecnologias de reprodução assistida como a criopreservação, podem prejudicar o desenvolvimento embrionário, levando a anormalidades epigenéticas em blastocistos, incluindo níveis mais baixos de H3K9ac e níveis mais altos de H3K27me3 [139-143]. Aqui, H3K9ac e H3K9me3, mas não os níveis de H3K27me3, estavam diminuídos em blastocistos produzidos sob microvibração. Esses resultados concordam com trabalhos anteriores que mostram como a célula responde ao estresse mecânico, incluindo a regulação de H3K9ac e H3K9me3 necessária para prevenir danos ao DNA [144-146]. Por outro lado, dado que a metilação de H3K9 está implicada na inativação do cromossomo X, silenciamento de LTRs, perfil de impressão e especificação de linhagem celular em blastocistos [132,147,148], os níveis mais baixos de H3K9me3 apontam para um efeito negativo da microvibração no embrião, contrastando com um potencial efeito positivo dos níveis de H3K9ac [118,136].

De acordo com os níveis mais baixos de H3K9ac e H3K9me3, a análise de blastocistos por RNAseq revelou um amplo efeito da microvibração na expressão gênica. Entre as vias enriquecidas, a "fosforilação oxidativa" foi uma das mais claramente alteradas pela microvibração, com 28 dos 34 DEGs significativamente aumentados. O citocromo c (CYCS) estava entre os poucos genes regulados negativamente, corroborando a menor taxa de apoptose induzida pela microvibração [149]. Durante o desenvolvimento pré-implantação há um aumento da demanda por ATP, com blastocistos dependendo fortemente de glicose como fonte de energia para a formação da blastocle e a proliferação celular [150-153]. Consequentemente, os blastocistos exibem um aumento significativo no consumo de oxigênio e na função de fosforilação oxidativa em comparação com estágios anteriores de desenvolvimento [154-156], e os genes que regulam a fosforilação oxidativa costumam aparecerem enriquecidos em blastocistos associados a gestações bem-sucedidas [157]. A regulação positiva de genes

relacionados à fosforilação oxidativa em blastocistos pode, portanto, ser indicativa de um efeito positivo da microvibração no embrião. No entanto, deve-se ter em mente que apenas metade da glicose consumida é completamente oxidada pelos blastocistos, sendo esse nível ainda muito menor na MCI. Toda a glicose captada restante é convertida pelos blastocistos em lactato, que por sua vez desempenha papel de sinalização após sua liberação no ambiente circundante [158-160]. Assim, de acordo com a hipótese do “embrião silencioso” [151,161,162], a superativação da fosforilação oxidativa por microvibração pode ter consequências adversas para o embrião.

Além disso, vários DEGs em blastocistos do tratamento de microvibração pertenciam à "interação do receptor citocina-citocina", indicativo de um efeito nas vias inflamatórias que influenciam a implantação do embrião, placentação e resultado da prenhez [163,164]. A sinalização CXCL5-CXCR2, por exemplo, tem sido associada ao envelhecimento em blastocistos de camundongos e humanos, com sua ativação levando ao crescimento deficiente do TE, enquanto a supressão aumenta a implantação e o desenvolvimento embrionário [165]. Aqui, *CXCR1* e *CXCR2*, ambos receptores cognatos para CXCL5, foram regulados negativamente em blastocistos expostos à microvibração, corroborando a menor incidência de apoptose em blastocistos e sugerindo um efeito da microvibração na sinalização ligada a CXCL5. Isso é ainda apoiado pela regulação positiva de *ACKR3* (também conhecido como CXCR7), o qual, assim como seu receptor cognato, CXCL12, promove a invasividade do TE [166]. Além disso, a regulação negativa de *TNFSF10* (conhecida como TRAIL), que está implicada na regulação da apoptose, corrobora a menor taxa de apoptose de blastocistos produzidos sob microvibração [167]. Dada a importância da família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) para o desenvolvimento embrionário e prenhez [168], também é importante notar que a microvibração desregulou a expressão de *BMP2* e *BMP4*, bem como seus receptores cognatos. A suplementação de sistemas de CIV bovino com BMP4 demonstrou afetar negativamente o desenvolvimento embrionário, um resultado que pode ser explicado pelo papel da BMP4 na apoptose e na expressão de *POU5F1* [169-171]. Além disso, a suplementação de BMP2 aumentou a expressão de *NANOG* e *CDX2* em blastocistos bovinos [172], enquanto a inibição de BMP4 aumentou o número de células de blastocistos e aumentou a expressão de marcadores de pluripotência [173], resultados estes que concordam com a sinalização de proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) através de SMAD1/5 sendo necessária para a formação de blastocistos [174,175].

Outra importante via desregulada pela microvibração foi a “vias de sinalização que

regulam a pluripotência de células-tronco”, incluindo a regulação positiva de vários fatores da via JAK/STAT conhecida por modular o desenvolvimento embrionário e pluripotência [176]. Os blastocistos são compostos por duas linhagens celulares principais, o TE e a MCI. Enquanto o primeiro dá origem a tecidos extraembrionários, o segundo se diferencia em epiblasto e hipoblasto antes de formar o embrião propriamente dito e o saco vitelino extraembrionário, respectivamente. Um processo intrincado envolvendo vários fatores de transcrição governa essas decisões de destino celular, afetando a competência do embrião [177-179]. Tem sido demonstrado que a PIVE afeta a especificação dessas linhagens celulares em bovinos, consequentemente determinando a qualidade do embrião e o potencial de desenvolvimento [180-182]. Assim, a estimulação simultânea das vias do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e do sítio de integração wingless-relacionado (WNT) durante a PIVE melhorou o desenvolvimento de blastocistos em bovinos, aumentando o número de células em TE e MCI. É importante ressaltar que esses resultados foram acompanhados por uma alteração transcricional na MCI de genes específicos de hipoblasto para epiblasto, incluindo regulação positiva de *NANOG*, *FGF4* e *SOX2* [183-185]. Por sua vez, Meng et al. [176] descobriram que a via JAK/STAT é necessária para a formação de MCI, promovendo transcritos específicos de epiblastos e hipoblastos, bem como transcritos relacionados à pluripotência, como *KLF4* e *TFCP2L1*. Os mesmos autores também descobriram que a fosfatidilinositol 3-quinase-proteína quinase B (PI3K-Akt) regula o crescimento da MCI, mas não a expressão gênica específica dessa linhagem celular, enquanto a inibição combinada do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e FGF regula positivamente marcadores de pluripotência de blastocistos bovinos tanto do epiblasto (FGF4 e *NANOG*) quanto do hipoblasto (*SOX17* e *PDGFRA*) [176]. Aqui, a regulação positiva de genes relacionados a JAK/STAT é sugestiva de um efeito positivo do tratamento de microvibração sobre a qualidade do blastocisto, embora a desregulação de *LIFR* [192], *BMP4* [169,187], *FGFR* [184,188,189] e *FRZB/TCF1/TCF3* [190,191] possa ter levado a efeitos adversos. *MEIS1*, *OTX1*, *HAND1* e *ISL1*, que estão todos envolvidos no desenvolvimento das camadas germinativas embrionárias [192] [193,194] [195], foram regulados negativamente em embriões produzidos sob microvibração, ilustrando mais uma vez o profundo impacto de microvibração na embriogênese.

Para auxiliar ainda mais na interpretação de nossos resultados, comparamos a alteração transcricional induzida pela microvibração com a de embriões derivados *in vivo* versus *in vitro*.

No geral, nossos achados sugerem que o tratamento de microvibração não foi muito eficaz em alterar a expressão gênica em direção a um transcriptoma mais fisiológico. Por exemplo, genes ligados à “fosforilação oxidativa” não foram enriquecidos em embriões produzidos *in vivo*, mas sim em embriões derivados *in vitro*, sugerindo que a regulação positiva de genes de fosforilação oxidativa induzida por microvibração pode ter sido deletéria, como antecipado acima. Outras vias enriquecidas em embriões *in vivo*, mas não em V60, foram “junção gap”, “junção tight”, “via de sinalização PI3K-Akt”, “via de sinalização de cálcio”, entre muitas outras. Os embriões *in vivo* e V60 compartilharam apenas uma via de relevância para a embriogênese, a via de “biossíntese de hormônios esteróides”. Consequentemente, a comparação de DEGs em embriões derivados de V60 e *in vivo* para “fosforilação oxidativa”, “interação do receptor de citocina-citocina” e “vias de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco” revelou um padrão divergente de expressão. Da mesma forma, a análise de DEGs pertencentes à “via de sinalização PI3K-Akt” mostrou que apenas 11 dos 35 transcritos eram comumente regulados em embriões derivados dos grupos V60 e *in vivo*. A “via de sinalização PI3K-Akt” está principalmente implicada na proliferação celular, apoptose, síntese de proteínas e regulação do metabolismo energético, desempenhando um papel fundamental na embriogênese [196-199]. Entre os DEGs na “via de sinalização PI3K-Akt”, vale destacar a regulação positiva de *RHEB*, *RPS6KB1*, *EIF4E* e *EIF4B* em embriões expostos à microvibração, indicativo de aumento da síntese proteica. Além disso, a regulação negativa de *PP2A* e a regulação positiva de *PDK1* sugerem que a atividade de AKT foi regulada positivamente pela microvibração, promovendo a proliferação celular enquanto a apoptose foi inibida.

8. Conclusão

Em conclusão, nossos achados atuais são consistentes com os efeitos profundos da microvibração em embriões bovinos. Aqui, a microvibração foi aplicada durante a MIV e a CIV, resultando em blastocistos com maior tolerância à vitrificação, apesar de não promover melhores taxas de desenvolvimento pré-implantação. Além disso, a microvibração levou a alterações epigenéticas e transcricionais, totalizando 502 genes desregulados em blastocistos. A meta-análise mostrou que a maior parte da alteração transcricional induzida pela microvibração não resultou em embriões mais semelhantes aos produzidos *in vivo*, embora alguns genes tenham sido regulados de modo similar. Embora sejam necessários mais experimentos para elucidar as consequências das anormalidades epigenéticas e transcricionais, esses achados indicam que se deve ter cautela ao considerar o uso de microvibração em sistemas PIVE, devido aos seus efeitos imprevisíveis para o embrião.

9.Referências bibliográficas

- 1.Viana J. 2019 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter 2020; 38:14–26.
- 2.Bishop TF, Van Eenennaam AL. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. Journal of Experimental Biology 2020;223. <https://doi.org/10.1242/jeb.207159>.
- 3.Hansen PJ. Implications of Assisted Reproductive Technologies for Pregnancy Outcomes in Mammals. Annual Review of Animal Biosciences 2020; 8:395–413. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-084010>.
- 4.Siqueira LG, Silva MVG, Panetto JC, Viana JH. Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. Reproduction, Fertility, and Development 2019;32:82–97. <https://doi.org/10.1071/RD19278>.
- 5.Plourde D, Vigneault C, Laflamme I, Blondin P, Robert C. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine in vitro embryo production. Theriogenology 2012; 77:1767-1778.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.021>.
- 6.Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. Reproduction in Domestic Animals 2008;43 Suppl 4:44–50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>.
- 7.Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, et al. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. Biology of Reproduction 2012; 87:1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099697>.
- 8.Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches B V., Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, et al.

Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009;71:690–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.031>.

9.Leme LO, Machado GM, Fidelis AAG, Guimarães ALS, Sprícigo JFW, Carvalho JO, et al. Transcriptome of D14 in vivo x in vitro bovine embryos: is there any difference? *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 2021; 57:598–609. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00599-x>.

10.Swain JE, Smith GD. Advances in embryo culture platforms: Novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. *Human Reproduction Update* 2011; 17:541–57. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr006>.

11.1Yanez LZ, Camarillo DB. Microfluidic analysis of oocyte and embryo biomechanical properties to improve outcomes in assisted reproductive technologies. *Molecular Human Reproduction* 2017; 23:235–47. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw071>.

12.1Isachenko V, Maettner R, Sterzik K, Strehler E, Kreinberg R, Hancke K, et al. In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. *Reproductive Biomedicine Online* 2011; 22:536–44. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.006>.

13.Suzuki H, Tsutsumi Y. Intraluminal Pressure Changes in the Oviduct, Uterus, and Cervix of the Mated Rabbit. *Biology of Reproduction* 1981; 733:723–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.4.723>

14.Paltieli Y, Weichselbaum A, Hoffman N, Eibschitz I, Kam Z. Physiology: Laser scattering instrument for real time in-vivo measurement of ciliary activity in human fallopian tubes. *Human Reproduction* 1995; 10:1638–41. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136147>.

15.1Weström L, Mårdh PA, Mecklenburg C V, Håkansson CH. Studies on ciliated epithelia of

the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. *Fertility and Sterility* 1977; 28:955–61. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)42798-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)42798-6).

16.Xie Y, Liu J, Proteasa S, Proteasa G, Zhong W, Wang Y, et al. Transient stress and stress enzyme responses have practical impacts on parameters of embryo development, from IVF to directed differentiation of stem cells. *Molecular Reproduction and Development* 2008; 75:689–97. <https://doi.org/10.1002/mrd.20787>.

17.Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74:1287–94. <https://doi.org/10.1002/mrd.20563>.

18.Swain JE, Lai D, Takayama S, Smith GD. Thinking big by thinking small: Application of microfluidic technology to improve ART. *Lab on a Chip* 2013;13:1213–24. <https://doi.org/10.1039/c3lc41290c>.

19.Thouas GA, Jones GM, Trounson AO. The “GO” system - A novel method of microculture for in vitro development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction* 2003; 126:161–9. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260161>.

20.Kim MS, Bae CY, Wee G, Han YM, Park JK. A microfluidic in vitro cultivation system for mechanical stimulation of bovine embryos. *Electrophoresis* 2009; 30:3276–82. <https://doi.org/10.1002/elps.200900157>.

21.Bae CY, Kim MS, Park JK. Mechanical stimulation of bovine embryos in a microfluidic culture platform. *Biochip Journal* 2011; 5:106–13. <https://doi.org/10.1007/s13206-011-5202-4>.

22.Heo YS, Cabrera LM, Bormann CL, Shah CT, Takayama S, Smith GD. Dynamic microfunnel culture enhances mouse embryo development and pregnancy rates. *Human Reproduction* 2010; 25:613–22. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep449>.

23. Matsuura K, Hayashi N, Kuroda Y, Takiue C, Hirata R, Takenami M, et al. Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 20:358–64. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.002>.
24. Hara T, Matsuura K, Kodama T, Sato K, Kikkawa Y, Muneto T, et al. A tilting embryo culture system increases the number of high-grade human blastocysts with high implantation competence. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 26:260–8. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.014>.
25. Koike T, Matsuura K, Naruse K, Funahashi H. In-vitro culture with a tilting device in chemically defined media during meiotic maturation and early development improves the quality of blastocysts derived from in-vitro matured and fertilized porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 2010; 56:552–7. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-041H>.
26. Hoppe PC, Pitts S. Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biology of Reproduction* 1973; 8:420–6. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/8.4.420>.
27. Isachenko E, Maettner R, Isachenko V, Roth S, Kreienberg R, Sterzik K. Mechanical agitation during the in vitro culture of human pre-implantation embryos drastically increases the pregnancy rate. *Clinical Laboratories* 2010; 56:569–76. PMID: 21141442.
28. Mizobe Y, Yoshida M, Miyoshi K. Enhancement of cytoplasmic maturation of in vitro-matured pig oocytes by mechanical vibration. *Journal of Reproduction and Development* 2010; 56:285–90. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-142A>.
29. Hur YS, Ryu EK, Yoon SH, Lim KS, Lee WD, Lim JH. Comparison of static culture, micro-vibration culture, and micro-vibration culture with co-culture in poor ovarian responders. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2016; 43:146–51. <https://doi.org/10.5653/cerm.2016.43.3.146>.
30. Hur YS, Park JH, Ryu EK, Park SJ, Lee JH, Lee SH, et al. Effect of micro-vibration culture system on embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2013; 30:835–

41. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0007-0>.

31. Takahashi M, Honda T, Hatoya S, Inaba T, Kawate N, Tamada H. Efficacy of mechanical micro-vibration in the development of bovine embryos during in vitro maturation and culture. The Journal of Veterinary Medical Science 2018; 80:532–5. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0607>.

32. Asano Y, Matsuura K. Mouse embryo motion and embryonic development from the 2-cell to blastocyst stage using mechanical vibration systems. Reproduction, Fertility and Development 2014;26:733–41. <https://doi.org/10.1071/RD13039>.

33. Brackett, Benjamin G. et al. Normal Development Following in Vitro Fertilization in the Cow. Biology of Reproduction, [s.l.], v. 27, n. 1, p.147-158, 1 ago. 1982. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>.

34. Taneja, Maneesh et al. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes in Vitro and in Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation1. Biology of Reproduction, [s.l.], v. 62, n. 1, p.206-213, 1 jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod62.1.206>.

35. Bousquet, D et al. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology, [s.l.], v. 51, n. 1, p.59-70, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00231-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00231-3).

36. Gonçalves, P. B. D.; Figueredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo – SP: Varela, p.408, 2008.

37. Rumpf, Rodolfo. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, Mg, v. 36, n. 1, p.229-233, 2007.

38. Gordon, Ian R. Laboratory Production of Cattle. 2. ed. London, Uk: Cabi Publishing, 2003.

- 39.Rumpf, R.; Dode, M.a.n.; SILVA, A.e.d. Feliciano. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, Salvador, Ba, 2000.
- 40.Hoshi, Hiroyoshi. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, [s.l.], v. 59, n. 2, p.675-685, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01247-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01247-5).
- 41.Dode, M. A. N.; Rumpf, R. In: Produção in vitro de embriões: eficiência, limitações e perspectivas Futuras - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, [S. 1. s/n.: 2002]. 10 f.
- 42.Thompson, J.g et al. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, [s.l.], v. 60-61, p.263-275, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00096-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00096-8).
- 43.Galli, C et al. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, [s.l.], v. 59, n. 2, p.599-616, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01243-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01243-8).
- 44.Gonçalves, P. B. D.; Visintin, J. A.; Oliveira, M. A. L.; Montagner, M. M.; Costa, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.
- 45.Sangild, P.T. et al. Blood Chemistry, Nutrient Metabolism, and Organ Weights in Fetal and Newborn Calves Derived from In Vitro-Produced Bovine Embryos1. *Biology of Reproduction*, [s.l.], v. 62, n. 6, p.1495-1504, 1 jun. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1495>.
- 46.Rodrigues, C.F.M., Garcia, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. *Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.*, v.28, p.186-187, 2000.
- 47.Avelino, K.B., Vantini, E., Seneda, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. *Theriogenology*, v.57, p.656, 2002.

48. Machaty, Z.; Peippo, J.; Peter, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, [s.l.], v. 78, n. 5, p.937-950, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>.
49. Dode, M.a.n. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*, [s.l.], v. 69, n. 1-2, p.15-23, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00148-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00148-8).
50. Galli, C.; Lazzari, G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sei.*, v.42, p.371-379, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01530-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01530-8)
51. Young, L. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, [s.l.], v. 3, n. 3, p.155-163, 1 set. 1998. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/ror.0.0030155>.
52. Rodriguez-Alonso, Beatriz et al. Challenges in studying preimplantation embryo-maternal interaction in cattle. *Theriogenology*, [s.l.], p.0-0, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.019>.
53. Van Soom, Ann et al. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Molecular Reproduction and Development*, [s.l.], v. 45, n. 2, p.171-182, out. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199610\)45:23.0.co;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199610)45:23.0.co;2-4).
54. Viuff, Dorthe et al. A High Proportion of Bovine Blastocysts Produced In Vitro Are Mixoploid. *Biology of Reproduction*, [s.l.], v. 60, n. 6, p.1273-1278, 1 jun. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1273>.
55. Viuff, Dorthe et al. Chromosome Aberrations in Vitro-Produced Bovine Embryos at Days 2– 5 Post-Insemination. *Biology of Reproduction*, [s.l.], v. 63, n. 4, p.1143-1148, 1 out. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1143>.

56. Farin, P.w.; Crosier, A.e.; Farin, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, [s.l.], v. 55, n. 1, p.151-170, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00452-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00452-0).
57. Mingoti, G. Z. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: *Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução*, 2005, Jaboticabal, SP. CD-ROM *Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução*. Jaboticabal, SP: Funep, 2005.
58. Jiang, Zongliang et al. Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of in Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.0-0, fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21215>
59. Isachenko, Vladimir et al. In Vitro Microvibration Increases Implantation Rate after Embryonic Cell Transplantation. *Cell Transplantation*, [s.l.], v. 26, n. 5, p.789-794, maio 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3727/096368916x693428>.
60. Muglia, U; Motta, PM. A new morpho-functional classification of the Fallopian tube based on its three-dimensional myoarchitecture. *Journal of Histology & Histopathology*, Vancouver, v. 16, n. 1, p.227-237, jan. 2001. <https://doi.org/10.14670/HH-16.227>
61. Lyons, R.a. et al. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Human Reproduction*, [s.l.], v. 17, n. 3, p.584-588, 1 mar. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/17.3.584>.
62. Chauveau, A.; Arlong, S.; Fleming, George. The comparative anatomy of the domesticated animals / by A. Chauveau; translated and edited by George Fleming; with 450 illustrations. Appleton and Company, [s.l.], v. 2, n. 1, p.0-0, 1873. D. Appleton and Company, 549 & 551 Broadway. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.39284>.
63. Fauci, Lisa J.; Dillon, Robert. BIOFLUIDMECHANICS OF REPRODUCTION. *Annual Review of Fluid Mechanics*, [s.l.], v. 38, n. 1, p.371-394, jan. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.fluid.37.061903.175725>.

- 64** Xieura, Koji et al. Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. Reproductive Biomedicine Online, [s.l.], v. 20, n. 3, p.358-364, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.002>.
- 65.** YANG, Seong-ho et al. Improvement of embryonic development and clinical outcomes of germinal vesicle stage oocytes using a microvibration culture system. Systems Biology In Reproductive Medicine, [s.l.], v. 65, n. 4, p.333-341, 19 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2019.1602681>.
- 66.**Hansen, P. J.; Block, J.; Loureiro, B.; Bonilla, L.; Hendricks, K. E. M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro produced embryos for post-transfer survival in cattle. Reproduction, Fertility and Development, v. 22, p. 59–66, 2010. doi: 10.1071/RD09212.
- 67.**Kawamoto, Stonoga Taynan et al., Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bovinos – Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 31 p.: il. color. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102- 0110; 363).
- 68.**Viana, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 59).
- 69.**Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS, p. 112-113, Illinois, 1998.
- 70.**Caixeta, F. M. C. et al., Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos by somatic cell nuclear transfer. Zygote, v. 25, n. 1, p. 32-40, 2017. doi:10.1017/S0967199416000289.
- 7.**Guimarães, A. L. S. et al., Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation

system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 83, n. 1, p. 52-57, 2015. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.042.

72.Corrêa, G. A. et al., Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, v. 104, n. 2-4, p. 132-142, 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.02.002.

73.Laskowski, Denise et al. Insulin during in vitro oocyte maturation has an impact on development, mitochondria, and cytoskeleton in bovine day 8 blastocysts. *Theriogenology*, [s.l.], v. 101, p.15-25, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.002>.

74.Inaba, Yasushi et al. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology*, [s.l.], v. 72, n. 2, p.86-92, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.006>.

75.Valleh, Mehdi Vafaye et al. Insulin-like growth factor 2: A modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, [s.l.], v. 82, n. 7, p.942-950, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.003>.

76.Ochota, M. et al., Total Cell Number and its Allocation to Trophectoderm and Inner Cell Mass in In Vitro Obtained Cats' Blastocysts. *Reproduction In Domestic Animals*, [s.l.], v. 51, n. 3, p.339-345, 14 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12684>.

77.Fouladi-Nashta, AA et al. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, [s.l.], v. 10, n. 4, p.497-502, jan. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60827-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60827-9).

78.Russel, D. F. et al., The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 10, p. 1255–70, 2006. doi: 10.1002/mrd.20553.

- 79.**Iwasaki, S.et al., Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, n. 1, p. 279–84, 1990. doi: 10.1530/jrf.0.0900279.
- 80.**Velazquez, M. A. et al., In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. *Theriogenology*, v. 78, n. 3, p. 517-527, 2012. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.034.
- 81.**Koo, D. B.et al., Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 2, p. 487–92, 2002. doi: 10.1095/biolreprod67.2.487.
- 82.**Kerr, J F R. et al., Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.239-257, ago. 1972. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- 83.**Tilly, J. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*, [s.l.], v. 1, n. 3, p.162-172, 1 set. 1996. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/ror.0.0010162>.
- 84.**Makarevich, A.V.; Markkula, M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During In Vitro Maturation and Culture1. *Biology of Reproduction*, [s.l.], v. 66, n. 2, p.386-392, 1 fev. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.2.386>.
- 85.**Matwee, Christie; Betts, Dean H.; King, W. Allan. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.57-68, fev. 2000. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199400000836>.
- 86.**Reik, W.; Dufort, I.; Sirard, M. Analysis of the Gene Expression Pattern of Bovine Blastocysts at Three Stages of Development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, p. 226–240, 2011. doi: 10.1002/mrd.21286.

- 87.** Machado, G.M. et al. Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, [s.l.], v. 25, n. 4, p.600- 608, 2013. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd11282>.
- 88.** Machado, G.M. et al. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, [s.l.], v. 80, n. 11, p.936-947, 10 set. 2013b. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22230>.
- 89.** Mundim, T.C.D. et al. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genetics and Molecular Research*, [s.l.], v. 8, n. 4, p.1398-1407, 2009. *Genetics and Molecular Research*. <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-4gmr646>.
- 90.** Wrenzycki, C. et al., Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *Journal of Reproduction and*, v. 112, p. 387–398, 1998. doi: 10.1530/jrf.0.1120387.
- 91.** Niemann, H.; Wrenzycki, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 21-34. 2000. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00237-x.
- 92.** Harvey, A. J. et al., REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, v. 123, p. 479–486, 2002. doi: 10.1530/rep.0.1230479.
- 93.** Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 2014, (28):812–28. doi: 10.1101/gad.234294.113.
- 94.** Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics.* 2017, 18:643–658.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2017.57>

- 95.**Reik, W. et al., Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 358, n. 1436, p.1403-9, 2003. doi: 10.1098/rstb.2003.1326.
- 96.** Morgan, H. D. et al., Epigenetic reprogramming in mammals. Human Molecular Genetics, v. 14, n. 1, p. R47–R58, 2005. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>
- 97.**Palini, S. et al., Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation embryo development. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v. 1221, p. 54–60, 2011. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05937.x.
- 98.**Duranthon V. et al., Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. Reproduction, v. 135, n. 2, p. 141-50, 2008. doi: 10.1530/REP-07-0324.
- 99.**Kohda, T.; Ishino, F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 368, p. 353, 2012. doi: 10.1098/rstb.2012.0353.
- 100.**Rizos, D. et al., Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. Biology of Reproduction, v. 66, n. 3, p. 589-595, 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.589>
- 101.**Rizos, D. et al., Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and Messenger RNA expression. Biology of Reproduction, Champaign, v. 68, p. 236-243, 2003. doi: 10.1095/biolreprod.102.007799.
- 102.**Fire, A. et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, n. 6669, p.806-811, 1998. <https://doi.org/10.1038/35888>.

- 103.**Costa, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, v. 410, n. 1, p. 9- 17, 2008. doi: 10.1016/j.gene.2007.12.008.
- 104.**Luger, K. et al., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, v. 389, n. 6648, p. 251-260, 1997. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- 105.**Morales, V.; Richard-Foy, H. Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 19, p. 7230-7237, 2000. doi: 10.1128/MCB.20.19.7230-7237.2000.
- 106.**Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, et al. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio*. 2013, 3:363-9. doi: 10.1016/j.fob.2013.08.007.
- 107.**Park JS, Jeong YS, Shin ST, et al. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Dev Dyn*. 2007, 236(9): 2523-33. doi: 10.1002/dvdy.21278.
- 108.**Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, et al. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*. 2008, 56(8):711-21. doi: 10.1369/jhc.2008.951251.
- 109.**Rice, J.C.; Allis, C.D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, London, v.13, p.263-273, 2001. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00208-8.
- 110.**Fuks, F. et al., The DNA methyltransferases associate with HP-1 and SUV39H1 histone methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, London, v.31, p.2305-2312, 2003. doi: 10.1093/nar/gkg332.
- 111.**Wu X, Li Y, Xue L, et al. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. *Zygote*. 2010, 19: 31–45. doi:

10.1017/S0967199410000328.

112. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun.* 2014;5(1):5464. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6464>. PMID:25394724.

113. Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, Chen C, Kou X, Zhao Y, Chen J, Wang Y, Le R, Wang H, Duan T, Zhang Y, Gao S. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5):620-31. <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0093-4>. PMID:29686265.

114. Santos, F. et al., Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology*, v. 13, p. 1116-1121, 2003. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00419-6.

115. Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction.* 2008, 136:777-785. doi: 10.1530/REP-08-0045.

116. Daujat S, Weiss T, Mohn F, Lange UC, Ziegler-Birling C, Zeissler U, Lappe M, Schübeler D, Torres-Padilla ME, Schneider R. H3K64 trimethylation marks heterochromatin and is dynamically remodeled during developmental reprogramming. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(7):777-81. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1629>. PMID:19561610.

117. Wongtawan T, Taylor JE, Lawson KA, Wilmut I, Pennings S. Histone H4K20me3 and HP1 α are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 11):1878-90. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.080721>. PMID:21576353.

118. Ross PJ, Sampaio R V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: Cows are not big mice. *Animal Reproduction* 2018; 15:204–14. <https://doi.org/10.21451/1984-3143->

[AR2018-0068](#).

119.Stojkovic M, Machado S a, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction* 2001; 64:904–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

120.Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues C a, et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science* 2011; 94:2383–92. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3904>.

121.Wright L. Photomicrographic illustration of embryo codes. In: Stringfellow D, Seidel S, editors. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3re ed., Savoy: International Embryo Transfer Society; 1998, p. 167–70.

122.Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>.

123.Sampaio RV, Sangalli JR, De Bem THC, Ambrizi DR, del Collado M, Bridi A, et al. Catalytic inhibition of H3K9me2 writers disturbs epigenetic marks during bovine nuclear reprogramming. *Scientific Reports* 2020; 10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67733-9>.

124.Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 2012; 16:284–7. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.

125.Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2009;26:139–40.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

126.Oliveira de Biagi CA, Nociti RP, Brotto DB, Funicheli BO, Cássia Ruy P de, Bianchi Ximenez JP, et al. CeTF: an R/Bioconductor package for transcription factor co-expression networks using regulatory impact factors (RIF) and partial correlation and information (PCIT) analysis. BMC Genomics 2021; 22:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07918-2>.

127.Reverter A, Hudson NJ, Nagaraj SH, Pérez-Enciso M, Dalrymple BP. Regulatory impact factors: Unraveling the transcriptional regulation of complex traits from expression data. Bioinformatics 2010; 26:896–904. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq051>.

128.Reverter A, Chan EKF. Combining partial correlation and an information theory approach to the reversed engineering of gene co-expression networks. Bioinformatics 2008; 24:2491–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn482>.

129.Luo W, Brouwer C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. Bioinformatics 2013; 29:1830–1. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>.

130.Heras S, De Coninck DIM, Van Poucke M, Goossens K, Bogado Pascottini O, Van Nieuwerburgh F, et al. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. BMC Genomics 2016; 17:1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2393-z>.

131.Cabot B, Cabot RA. Chromatin remodeling in mammalian embryos Reproduction 2018;155: R147–58. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0488>.

132.Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. Trends in Genetics 2016; 32:29–41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>.

133.Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. Nature Reviews Genetics 2017; 18:643–58.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2017.57>.

134. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes and Development* 2014; 28:812–28. <https://doi.org/10.1101/gad.234294.113>.

135. Wu X, Hu S, Wang L, Li Y, Yu H. Dynamic changes of histone acetylation and methylation in bovine oocytes, zygotes, and preimplantation embryos. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 2020; 334:245–56. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22943>.

136. Ispada J, Da Fonseca AM, Santos OLR, De Lima CB, Santos EC Dos, Da Silva VL, et al. Metabolism-driven post-translational modifications of H3K9 in early bovine embryos. *Reproduction* 2021; 162:181–91. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0134>.

137. Liu X, Wang Y, Gao Y, Su J, Zhang J, Xing X, et al. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Development (Cambridge)* 2018;145. <https://doi.org/10.1242/dev.158261>.

138. Silva T, Santos EC, Annes K, Soares CA, Leite RF, Lima CB, et al. Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology* 2016; 86:1308–17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.072>.

139. Chen H, Zhang L, Deng T, Zou P, Wang Y, Quan F, et al. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology* 2016; 86:868–78. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.008>.

140. Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clinical Epigenetics* 2020; 12:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00911-8>.

141. Estudillo E, Jiménez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, López-

Ornelas A. Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms221910864>.

142. Maldonado MBC, Penteado JCT, Faccio BMC, Lopes FL, Arnold DR. Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. *Cryobiology* 2015;71:481–5. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.001>.

143. Marsico T V, Caetano DP, Rodrigues R, Valente RS, Fontes PK, Mesquita FS, et al. Transcriptional profiling of embryo cryotolerance. *Molecular Reproduction and Development* 2020; 87:1245–59. <https://doi.org/10.1002/mrd.23436>.

144. Nava MM, Miroshnikova YA, Biggs LC, Whitefield DB, Metge F, Boucas J, et al. Heterochromatin-Driven Nuclear Softening Protects the Genome against Mechanical Stress-Induced Damage. *Cell* 2020; 181:800-817.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.052>.

145. Stephens AD, Banigan EJ, Adam SA, Goldman RD, Marko JF. Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus. *Molecular Biology of the Cell* 2017; 28:1984–96. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-09-0653>.

146. Sun J, Chen J, Mohagheghian E, Wang N. Force-induced gene up-regulation does not follow the weak power law but depends on H3K9 demethylation. *Science Advances* 2020; 6:1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9095>.

147. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggen K, et al. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nature Communications* 2014; 5:2–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms6464>.

148. Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, et al. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nature Cell Biology* 2018; 20:620–31. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0093-4>.

149. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020; 21:85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
150. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction* 2011; 26:1981–6. <https://doi.org/10.1093/humrep/der143>.
151. Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. *Reproduction, Fertility and Development* 2015; 27:638–54. <https://doi.org/10.1071/RD14421>.
152. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The Pattern of Energy Metabolism in the Oocyte and Zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1967; 58:560–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.560>.
153. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development* 1996; 44:476–85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199608\)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I).
154. May-Panloup P, Vignon X, Chrétien M-F, Heyman Y, Tamassia M, Malthiery Y, et al. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 2005; 3:65. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-65>.
155. Hashimoto S, Morimoto N, Yamanaka M, Matsumoto H, Yamochi T, Goto H, et al. Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2017; 34:573–80. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0886-6>.
156. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and- independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* 2000; 62:1866–74.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1866>.

157.Salilew-Wondim D, Tesfaye D, Rings F, Held-Hoelker E, Miskel D, Sirard MA, et al. The global gene expression outline of the bovine blastocyst: reflector of environmental conditions and predictor of developmental capacity. *BMC Genomics* 2021; 22:1–26. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07693-0>.

158.Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990; 88:361–8. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880361>.

159.Hewitson LC, Leese HJ. Energy metabolism of the trophoctoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *The Journal of Experimental Zoology* 1993; 267:337–43. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670310>.

160.Houghton FD. Energy metabolism of the inner cell mass and trophoctoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 2006; 74:11–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00052.x>.

161.Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: Obeying the quiet rules. *Human Reproduction* 2007; 22:3047–50. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem253>.

162.Leese HJ, Guerif F, Allgar V, Brison DR, Lundin K, Sturmey RG. Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. *Molecular Reproduction and Development* 2016; 83:748–54. <https://doi.org/10.1002/mrd.22684>.

163.Ojosnegros S, Seriola A, Godeau AL, Veiga A. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Human Reproduction Update* 2021;27:501–30. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa054>.

164.Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llurba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review.

Clinical Reviews in Allergy and Immunology 2017; 53:40–53. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8596-x>.

165.Kawagoe Y, Kawashima I, Sato Y, Okamoto N, Matsubara K, Kawamura K. CXCL5-CXCR2 signaling is a senescence-associated secretory phenotype in preimplantation embryos. Aging Cell 2020; 19:1–14. <https://doi.org/10.1111/accel.13240>.

166.Li MQ, Tang CL, Du MR, Fan DX, Zhao HB, Xu B, et al. CXCL12 controls over-invasion of trophoblasts via upregulating CD82 expression in dscs at maternal-fetal interface of human early pregnancy in a paracrine manner. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 2011; 4:276–86. PMID: 21487523; PMCID: [PMC3071660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3071660/).

167.Riley JK, Heeley JM, Wyman AH, Schlichting EL, Moley KH. TRAIL and KILLER are expressed and induce apoptosis in the murine preimplantation embryo. Biology of Reproduction 2004; 71:871–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026963>.

168.Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. Biomolecules 2020;10(3):487. <https://doi.org/10.3390/biom10030487>.

169.Sang L, Ortiz W, Xiao Y, Estrada-Cortes E, Jannaman EA, Hansen PJ. Actions of putative embryokines on development of the preimplantation bovine embryo to the blastocyst stage. Journal of Dairy Science 2020;103:11930–44. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19068>.

170.La Rosa I, Camargo LSA, Pereira MM, Fernandez-Martin R, Paz DA, Salamone DF. Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E 2011;9:18. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-18>.

171.Musto A, Navarra A, Vocca A, Gargiulo A, Minopoli G, Romano S, et al. miR-23a, miR-24 and miR-27a protect differentiating ESCs from BMP4-induced apoptosis. Cell Death and Differentiation 2015; 22:1047–57. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.198>.

- 172.** Lee K-B, Folger JK, Rajput SK, Smith GW. Temporal regulation of mRNAs for select bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors and their associated SMAD proteins during bovine early embryonic development: effects of exogenous BMP2 on embryo developmental progression. *Reproductive Biology and Endocrinology* : RB&E 2014;12:67. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-67>.
- 173.** Hajian M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Nasr-Esfahani MH. Targeting the transforming growth factor- β signaling during pre-implantation development in embryos of cattle, sheep and goats. *Growth Factors* (Chur, Switzerland) 2016;34:141–8. <https://doi.org/10.1080/08977194.2016.1206089>.
- 174.** Rajput SK, Yang C, Ashry M, Folger JK, Knott JG, Smith GW. Role of bone morphogenetic protein signaling in bovine early embryonic development and stage specific embryotropic actions of follistatin†. *Biology of Reproduction* 2020; 102:795–805. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz235>.
- 175.** Li G, Khateeb K, Schaeffer E, Zhang B, Khatib H. Genes of the transforming growth factor-beta signalling pathway are associated with pre-implantation embryonic development in cattle. *The Journal of Dairy Research* 2012; 79:310–7. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000210>.
- 176.** Meng F, Forrester-Gauntlett B, Turner P, Henderson H, Oback B. Signal Inhibition Reveals JAK/STAT3 Pathway as Critical for Bovine Inner Cell Mass Development. *Biology of Reproduction* 2015; 93:132. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134254>.
- 177.** Akizawa H, Saito S, Kohri N, Furukawa E, Hayashi Y, Bai H, et al. Deciphering two rounds of cell lineage segregations during bovine preimplantation development. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2021;35: e21904. <https://doi.org/10.1096/fj.202002762RR>.
- 178.** Simmet K, Kurome M, Zakhartchenko V, Reichenbach HD, Springer C, Bähr A, et al. OCT4/POU5F1 is indispensable for the lineage differentiation of the inner cell mass in bovine

embryos. FASEB Journal 2022; 36:1–13. <https://doi.org/10.1096/fj.202101713RRR>.

179. Madeja ZE, Pawlak P, Piliszek A. Beyond the mouse: Non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research. International Journal of Developmental Biology 2019; 63:187–201. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180414ap>.

180. Knijn HM, Gjørret JO, Peter L.A.M. Vos, Peter J.M Hendriksen, van der Weijden BC, Maddox-Hyttel P, et al. Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. Biology of Reproduction 2003; 69:1371–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017251>.

181. Pomar FJR, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, et al. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. Theriogenology 2005; 63:2254–68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.015>.

182. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, et al. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. Theriogenology 2000; 54:659–73. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00381-2).

183. Harris D, Huang B, Oback B. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors. Biology of Reproduction 2013;88:74. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.103390>.

184. McLean Z, Meng F, Henderson H, Turner P, Oback B. Increased MAP kinase inhibition enhances epiblast-specific gene expression in bovine blastocysts. Biology of Reproduction 2014;91:49. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120832>.

185. Ozawa M, Sakatani M, Hankowski KE, Terada N, Dobbs KB, Hansen PJ. Importance of culture conditions during the morula-to-blastocyst period on capacity of inner cell-mass cells of bovine blastocysts for establishment of self-renewing pluripotent cells. Theriogenology 2012; 78:1243-1251.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.020>.

- 186.**Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009; 460:118–22. <https://doi.org/10.1038/nature08113>.
- 187.**De Paepe C, Aberkane A, Dewandre D, Essahib W, Sermon K, Geens M, et al. BMP4 plays a role in apoptosis during human preimplantation development. *Molecular Reproduction and Development* 2019; 86:53–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.23081>.
- 188.**Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 2009;136:3215–22. <https://doi.org/10.1242/dev.038893>.
- 189.**Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development (Cambridge, England)* 2010;137:715–24. <https://doi.org/10.1242/dev.043471>.
- 190.**Tribulo P, da Silva Leão BC, Lehloenya KC, Mingoti GZ, Hansen PJ. Consequences of endogenous and exogenous WNT signaling for development of the preimplantation bovine embryo. *Biology of Reproduction* 2017; 96:1129–41. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox048>.
- 191.**Hansen PJ, Tríbulo P. Regulation of present and future development by maternal regulatory signals acting on the embryo during the morula to blastocyst transition-insights from the cow. *Biology of Reproduction* 2019; 101:526–37. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz030>.
- 192.**Azcoitia V, Aracil M, Martínez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Developmental Biology* 2005; 280:307–20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.004>.
- 193.**Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 1993; 364:501–6. <https://doi.org/10.1038/364501a0>.

- 194.**Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasakat M, Esumi E, Li S, Nonaka I, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 1993; 364:532–5. <https://doi.org/10.1038/364532a0>.
- 195.**Morikawa Y, Cserjesi P. Extra-embryonic vasculature development is regulated by the transcription factor HAND1. *Development* 2004; 131:2195–204. <https://doi.org/10.1242/dev.01091>.
- 196.**Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Ratajczak CK, Moley KH. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology* 2005; 284:377–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.033>.
- 197.**Ashry M, Rajput SK, Folger JK, Knott JG, Hemeida NA, Kandil OM, et al. Functional role of AKT signaling in bovine early embryonic development: potential link to embryotrophic actions of follistatin. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2018;16:1. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0318-6>.
- 198.**Baran V, Fabian D, Rehak P. Akt/PKB plays role of apoptosis relay on entry into first mitosis of mouse embryo. *Zygote (Cambridge, England)* 2013;21:406–16. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000178>.
- 199.**Cajas YN, Cañón-Beltrán K, Núñez-Puente C, Gutierrez-Adán A, González EM, Agirregoitia E, et al. Nobiletin-induced partial abrogation of deleterious effects of AKT inhibition on preimplantation bovine embryo development in vitro†. *Biology of Reproduction* 2021;105:1427–42. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab184>.

Tabela S1. Sequências de primers usado no experimento de PCR quantitativo.

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>CPXM2</i>	CATGACATCCGAACAGCCAG	CAGGTTGGTTTTGCTGAGCG	168
<i>GNAT2</i>	GTTTTCCAGAGTATGATGGGAACA	CCGCAGTCCTTGAGGTTTTTC	199
<i>KRT1</i>	CTCCTTCATCGACAAGGTGAGA	TAAGACGGCTGATGTACGCC	140
<i>NPPA</i>	AACAGGAGCAAATCCCGTGT	CAAACGGTCCAGCAAATTCTTG	76
<i>ACTB</i>	GTCGACACCGCAACCAGTTC	CACGAGCGCAGCAATATCAT	50
<i>RPS18</i>	ATTAAGGGTGTGGGGCGAAG	GTTCCACCTCATCCTCGGTG	100

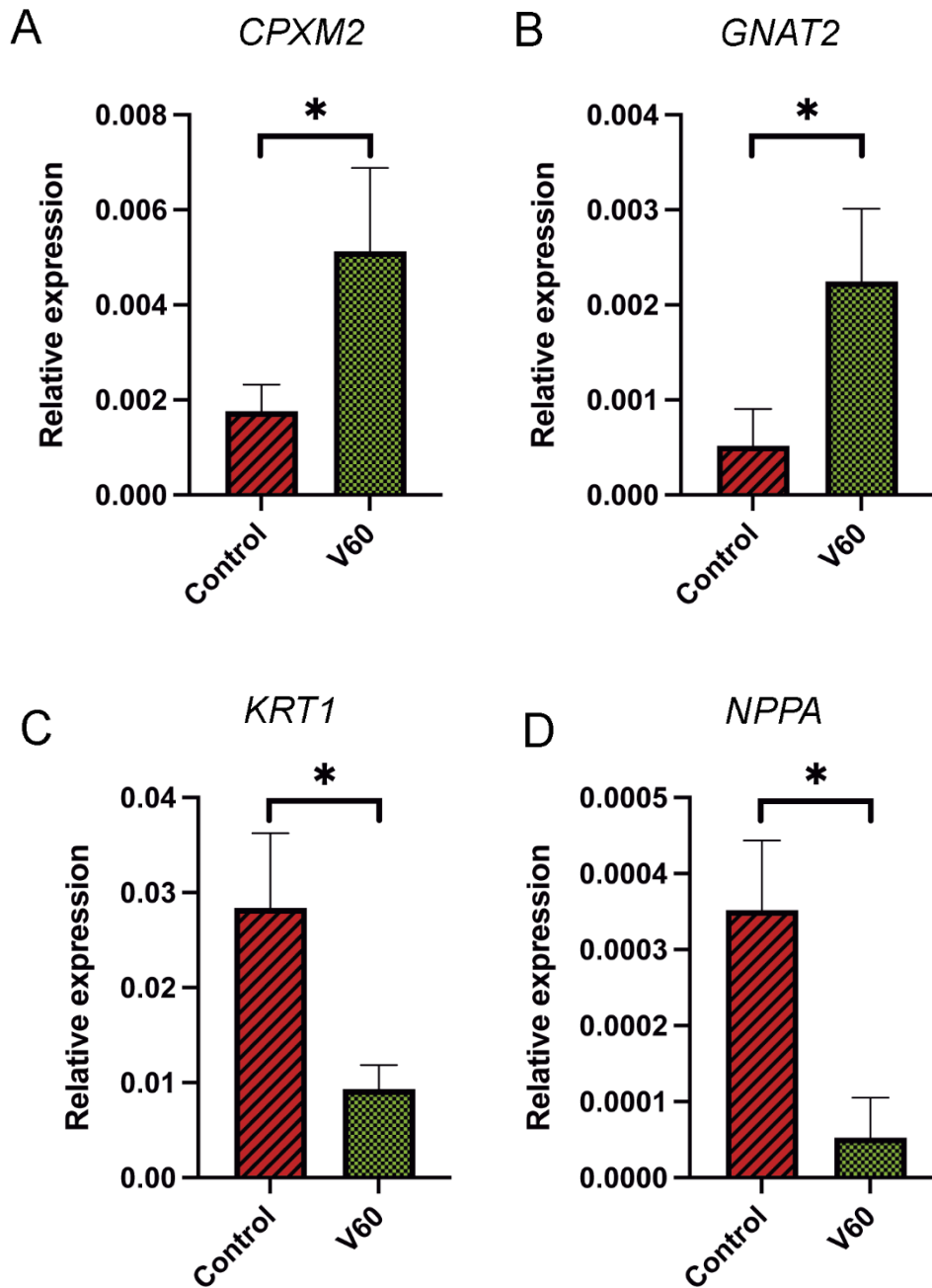


Fig. S2. Validação de dados transcriptômicos por PCR quantitativo. (A-D) Expressão gênica relativa de CPXM2 (A), GNAT2 (B), KRT1 (C) e NPPA (D) em blastocistos produzidos sob microvibração (V60, 45 Hz por 5 s uma vez a cada 60 min; n = 4) em relação à condição estática (Controle; n = 4). A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo (qPCR). Os valores de expressão dos genes-alvo foram normalizados pela expressão média de ACTB e RPS18. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *P < 0,05.