UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**“Efeito da suplementação com ácido fólico durante a maturação oocitária
na produção *in vitro* e expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* em embriões
bovinos”**

CAROLINA GENNARI VERRUMA

Ribeirão Preto

2017

CAROLINA GENNARI VERRUMA

“Efeito da suplementação com ácido fólico durante a maturação oocitária na produção *in vitro* e expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* em embriões bovinos”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Verruma, Carolina Gennari

Efeito da suplementação com ácido fólico durante a maturação oocitária com na produção *in vitro* e expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* em embriões bovinos.

96p. il.; 30cm

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Lôbo, Raysildo Barbosa

1. Embriões bovinos; 2. Produção *in vitro*; 3. Epigenética; 4. Expressão gênica; 5. Ácido fólico.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP);
- Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP).

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA GENNARI VERRUMA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* E EXPRESSÃO DOS GENES *IGF2* E *LIT1* EM EMBRIÕES BOVINOS, 2017.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Genética

BANCA EXAMINADORA

Data da defesa: ____/____/____

Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.” (Clarice Lispector)

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela vida e oportunidades oferecidas.

À **minha família**, em especial meus pais **Sérgio e Sylvia**, por todo apoio e suporte durante toda minha vida. Sem vocês eu nada seria. Amo vocês.

Ao professor Dr. **Raysildo Barbosa Lôbo**, meu orientador, por acreditar no meu trabalho e potencial. Pelos ensinamentos e liberdade de trabalho dentro do laboratório. Obrigada por tudo.

À professora Dra. **Ester Silveira Ramos**, que me ajudou muito durante todo o mestrado, sempre solicita para ensinar e tirar dúvidas. Além de disponibilizar o laboratório e material para realização de parte deste trabalho. Obrigada pela oportunidade e acolhimento em sua equipe.

Ao **Reginaldo Ap. Vila**, técnico do laboratório, que desde 2012 acompanha meus trabalhos, me ensina e se preocupa com a segurança e bem estar de todos dentro do laboratório. Obrigada também pelos momentos de descontração que nos ajudam a continuar caminhando mesmo em momentos difíceis. À **Marli Galerani**, ex-funcionária, pelos bons momentos e ajuda dentro do laboratório.

Ao **Matheus Eiras e Artur Fernandes**, amigos queridos que ganhei no último ano. Obrigada por toda ajuda e companheirismo dentro e fora do laboratório. Definitivamente os dias se tornaram mais amenos com vocês ao meu lado.

À querida pesquisadora **Cristiana L. Miranda-Furtado**, por se envolver de coração no meu projeto e me ajudar em tudo. Obrigada pela amizade, ideias, correções, ajudas, enfim, por tudo.

À minha amiga **Paula Verzola** pela amizade e companheirismo desde 2010. Sem esquecer de toda a ajuda com todo problema estatístico que surgiu nos últimos anos.

Aos alunos do **Laboratório de Epigenética e Reprodução**, **Jorge, Juliana e Hugo**, além das meninas que passaram por aqui, **Helô e Grace**. Obrigada por toda ajuda e convivência.

À minha querida tia e madrinha **Marta R. Verruma Bernardi** por sempre estar presente. Obrigada pelas correções, conversas e conselhos. Amo você.

À todos os **alunos e funcionários do Bloco C** do Departamento de Genética da FMRP/USP. Cada um possui um papel fundamental durante estes anos, seja ajudando em experimentos ou disciplinas, trocando ideias ou até mesmo durante uma pausa na cozinha.

Aos meus **amigos da 47ª turma da Biologia da FFCLRP**. Aos poucos e bons que se esforçam para continuar próximos mesmo seguindo caminhos diferentes.

Aos meus **amigos douradenses** que estão ao meu lado há muitos anos. Em especial ao querido amigo **Lucas S. Gastaldi**, meu professor de espanhol, com quem eu compartilho todas angústias, decepções e felicidades acadêmicas.

Aos **funcionários da guarda universitária** que nos mantém em segurança dentro do campus. Às **funcionárias da limpeza** que mantém o ambiente de trabalho em perfeitas condições.

Ao **frigorífico Barra Mansa** (Sertãozinho-SP), pelo fornecimento dos ovários para realização dos experimentos.

Ao **departamento de Genética da FMRP/USP** pelo apoio durante o mestrado. Em especial à **Susie**, secretaria do programa de pós-graduação em Genética, que sempre nos ajuda.

À **CAPES** e **FAEPA** pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A **ANCP** pelo fornecimento das doses dos touros e suporte financeiro para realização deste trabalho.

Aos **membros da banca examinadora**, por aceitarem participar da defesa, além de disponibilidade para analisar e contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

*“O que prevemos raramente ocorre; o que
menos esperamos geralmente acontece”
(Benjamín Disraeli)*

RESUMO

VERRUMA, CG. Efeito da suplementação com ácido fólico durante a maturação oocitária na produção *in vitro* e expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* em embriões bovinos. 2017. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Dentre as tecnologias de reprodução assistida (TRAs), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é a mais amplamente estudada, além de possuir um grande interesse econômico. Entretanto, existem fatores que influenciam negativamente a taxa de produção embrionária e o sucesso da gestação. Sabe-se que embriões provenientes das TRAs apresentam frequentemente alterações epigenéticas, relacionadas principalmente ao microambiente no qual os gametas e embriões se desenvolvem. A suplementação com ácido fólico parece prevenir tais erros epigenéticos, visto que além de ser um importante composto vitamínico, ele pode atuar como doador de grupamentos metil e possui ação antioxidante. A adição de ácido fólico durante a maturação oocitária parece influenciar positivamente a PIVE, além de existir evidências de que ele possa alterar os níveis de metilação do DNA e a expressão de genes importantes ao desenvolvimento embrionário. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo, avaliar a influência de diferentes concentrações de ácido fólico durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de diferentes qualidades (graus I e III) na produção embrionária e na expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* em blastocistos bovinos. Para tanto, três diferentes concentrações de ácido fólico (10, 30 e 100µM) foram avaliadas durante a MIV, em que 2159 oócitos (1087 oócitos grau I e 1072 oócitos grau III) foram maturados, fertilizados e cultivados por sete dias. Os blastocistos foram avaliados quanto à (1) taxa de produção nos diferentes tratamentos e origem dos oócitos e (2) a expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* foi investigada utilizando a transcrição reversa associada a PCR quantitativa. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. A avaliação da produção embrionária mostrou que a adição de 10µM de ácido fólico influencia positivamente a produção de embriões provenientes de oócitos grau III ($p=0,017$), enquanto em embriões provenientes de oócitos grau I não foi observada influência. O segundo tratamento mostrou que a adição de 30µM de ácido fólico parece não influenciar tanto embriões provenientes de oócitos grau I quanto grau III. Por outro lado, a adição de 100µM de ácido fólico prejudica o desenvolvimento de embriões provenientes de oócitos grau I ($p=0,043$), mas parece não influenciar os embriões provenientes de oócitos grau III. Quando avaliada a expressão gênica, o gene *IGF2* foi expresso em 25% das amostras, sendo que, com exceção de uma amostra, todas eram provenientes de oócitos grau I. Apesar do gene *LIT1* ser expresso em todas as amostras analisadas, não foram observadas diferenças entre os embriões cujos oócitos foram maturados na ausência ou na presença de ácido fólico, independente da concentração adicionada ou origem oocitária (graus I ou III). A adição de ácido fólico durante a maturação de oócitos bovinos parece ser interessante para a PIVE. No entanto, a concentração e a qualidade oocitária parecem ser fatores importantes para a produção embrionária, visto que menores concentrações favorecem oócitos de baixa qualidade enquanto que maiores concentrações prejudicam oócitos de maior qualidade. Por fim, as alterações na produção embrionária devido à adição de ácido fólico parecem não estar relacionada com os níveis de expressão dos genes *IGF2* e *LIT1*.

Palavras-chave: Embriões bovinos; Produção *in vitro*; Epigenética; Expressão gênica; Ácido fólico.

ABSTRACT

VERRUMA, CG. **Effect of folic acid supplementation during oocyte maturation on *in vitro* production and *IGF2* and *LIT1* expression in bovine embryos**. 2017. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Among assisted reproductive Technologies (ARTs), *in vitro* production (IVP) of bovine embryos is the most studied, besides exist a great economic interest. However, there are many factors that negatively influences production rates and pregnancy success. It's know that embryos produced by ARTs frequently present epigenetics alterations, related, specially, to the microenvironment where occurs the development of gametes and embryos. Supplementation with folic acid seems to prevent these epigenetics damages, since it is an important component and may act like a methyl donor and has antioxidant action. Folic acid addition during oocitary maturation seems to positively influences embryos IVP, in addition there are evidences that it may alter DNA methylation levels and expression of important genes during embryo development. Thus, this paper had as objective; evaluate different concentrations of folic acid during *in vitro* maturation (IVM) of different bovine oocytes (Grade I and III) on the embryo production and expression of *IGF2* and *LIT1* gene in the bovine blastocyst. For this purpose, three different folic acid concentrations (10, 30, and 100µM) were evaluated during IVM, when 2159 oocytes (1087 grade I and 1072 grade III) were matured, fertilized and cultured during seven days. Blastocysts were evaluated for (1) production rates in different treatments and oocyte type and (2) expression of *IGF2* and *LIT1* was investigated using quantitative reverse transcription PCR. Statistical analysis was realized using student t test. Embryo production analysis revealed that addition of 10µM of folic acid positively influences production of embryos from oocytes grade III ($p=0,017$), whereas in embryos from oocytes grade I this influence wasn't observed. The second treatment showed that 30µM of folic acid didn't influence both embryos from oocytes grade I and embryos from oocytes grade III. On the other hand, addition of 100µM of folic acid damages the development of embryos provide from oocytes grade I ($p=0,043$), but this wasn't observed in embryos provide from oocytes grade III. When evaluated gene expression, *IGF2* gene were expressed in 25% of all samples, being that, with exception of one sample, all of them were embryos from oocytes grade I. Despite *LIT1* expression were detected in all samples, wasn't observed statistical difference between embryos whose oocytes were matured in the absence or presence of folic acid, independent of concentration added or oocytes types (grades I ou III). Folic acid addition during bovine oocytes maturation seems to be interesting to embryo IVP. However, folic acid concentration and oocyte quality seems to be important factors to embryo production, since lower concentration its beneficial for lower quality oocytes, while higher folic acid concentration damage better oocytes. Finally, embryos production rates alterations due folic acid addition appears to be unrelated with expression levels of *IGF2* and *LIT1*.

Key-words: Bovine embryos; *In vitro* production; Epigenetics; Gene expression; Folic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fólico
<i>β-actina</i>	Gene <i>β-actina</i>
Be	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
BSA	Albumina sérica bovina
BSA V	Albumina sérica bovina fração V
BSA V FAF	Albumina sérica bovina fração V livre de ácido graxos
Bx	Blastocisto expandido
BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
cDNA	DNA complementar
<i>CDKN1C</i>	Gene
CG	Citosina-guanina
CGPs	Células germinativas primordiais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO₂	Gás carbônico
COCs	Complexo <i>cumulus</i> oócitos
CpG	Citosina-fosfato-guanina
Cq	Ciclo de quantificação
CR2	<i>Charles Rosenkranns 2</i>
CTCF	Fator de ligação CCCTC
D0	Zigotos
D4	Embriões com 4 dias
D7	Embriões com 7 dias
DMR	Região diferencialmente metilada
<i>DNMTs</i>	DNA metiltransferases
DP	Desvio-padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E</i>	<i>Enhancer</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>

GAPDH	Gene <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
H19	Gene <i>Imprinted Maternally expressed transcript</i>
H19DMR	Região Diferencialmente metilada do H19
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICM	Massa celular interna
ICR	Região controladora de <i>imprinting</i>
ICR1	Região controladora de <i>imprinting</i> 1
ICR2	Região controladora de <i>imprinting</i> 2
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IGF2	Gene <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IGF2R	<i>Insulin-like Growth Factor 2 Receptor</i> (Receptor do gene <i>IGF2</i>)
KCNQ1	Gene <i>Potassium Voltage-Gated Channel</i> (ou <i>KvLQT1</i>)
KCNQ1OT1	<i>KCNQ1 overlap transcript 1</i>
KvDMR	Região Diferencialmente Metilada da Kv
LH	Hormônio Luteinizante
LIT1	Gene <i>Long Intronic Transcript 1</i>
lncRNA	RNA não codificador longo
LOS	<i>Large Offspring Syndrome</i>
Mest	Gene <i>Mesoderm specific transcript</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
n	Número de embriões
NaOH	Hidróxido de sódio
ncRNA	RNA não-codificador
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG10	Gene <i>Patternally expressed 10</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
pH	Potencial Hidrogênico
PHE	Penicilina-heparina-aurina
Rasgrf1	Gene <i>Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico

RQ	Quantificação relativa
SFB	Soro fetal bovino
SPTZ	Espermatozoides
TRAs	Tecnologias de reprodução assistida
TE	Trofectorma

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Grama
g	Aceleração da gravidade
G	Gauges
mg	Miligramma
mL	Mililitro
pmol	Picomol
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
%	Porcentagem
U	Unidades

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Reprogramação epigenética gamética e embrionária. (A) Demetilação das células germinativas primordiais (CGPs) de ratos durante a migração para a crista gonadal, seguido de reestabelecimento das marcações epigenéticas e consequente metilação *de novo*. (B) Demetilação do DNA materno e paterno, seguido de metilação *de novo* do material genético de embriões bovinos. Em bovinos, o estado de demetilação seguido de quiescência do material genético dos pais ocorre até o estágio entre 8-16 células. (Modificado de REIK et al., 2001; YANG et al., 2007).....27
- Figura 2** - Representação das regiões H19DMR e KvDMR1, onde são encontrados os genes *IGF2*, *H19* e *LIT1*. Os genes *IGF2* e *LIT1*, tem expressão determinada pelo alelo paterno (azul), enquanto o gene *H19* tem expressão materna (rosa) (Modificado de O'NEILL, 2005; LEWIS; REIK, 2006).....29
- Figura 3** - Representação da interação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *IGF2* e *H19* e consequente expressão dos genes no alelos materno, quando ocorre a expressão *H19* devido ao *imprinting* paterno e no alelo paterno, quando ocorre a expressão do *IGF2* devido ao *imprinting* materno. (Modificado de MURRELL et al., 2004).....30
- Figura 4** - Representação do mecanismo de expressão da região da KvDMR1, onde são encontrados os genes *CDKN1C*, *KCNQ1* e *KCNQ1OT1* (*LIT1*). No alelo materno, a DMR encontra-se metilada (círculos pretos), impedindo a expressão do gene *LIT1* e permitindo a expressão de *CDKN1C* e *KCNQ1*. No alelo paterno, a DMR não está metilada (círculos brancos) permitindo a expressão do gene *LIT1*. (Modificado de AGER et al., 2008).....31
- Figura 5** - Oócitos classificados durante a seleção para maturação *in vitro*. (A) Oócitos classificados como grau I com várias camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo. (B) Oócitos classificados como grau II ainda com ooplasma homogêneo, porém com apenas 2 ou 3 camadas de células do *cumulus*. (C) Oócitos classificados como grau III com zona pelúcida parcialmente ou totalmente exposta e ooplasma heterogêneo. Foto: Acervo pessoal.....32
- Figura 6** - Representação esquemática da seleção dos oócitos em cada experimento, seguido de divisão em dois grupos para a maturação *in vitro* em meio TCM199 na ausência ou na presença de 10, 30 ou 100µM ácido fólico.....41
- Figura 7** - Representação da maturação oocitária, onde os oócitos passam de prófase I para metáfase II da meiose. (A) Oócitos imaturos selecionados para maturação após aspiração dos ovários. (B) Oócitos aptos à fertilização após período de maturação *in vitro* em meio TCM199. Foto: Laboratório de Micromanipulação de Embriões, FMRP/USP.....42
- Figura 8** - Representação dos quatro estádios de blastocistos encontrados no sétimo dia de desenvolvimento. (A) Seta indicando blastocisto inicial (Bi). (B) Seta indicando blastocisto (Bl). (C) Seta indicando blastocisto expandido (Bx). (D) Seta indicando blastocisto eclodido (Be), nota-se que a zona pelúcida rompeu-se e que o embrião está saindo dela. Foto: Laboratório de Micromanipulação de embriões, FMRP/USP.....44
- Figura 9** - Produção média de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10µM de ácido fólico. * p=0,017. AF, ácido fólico.....51

Figura 10 - Produção média de embriões provenientes de oócitos grau I e III maturados na ausência ou presença de 30µM de ácido fólico. AF, ácido fólico.....	53
Figura 11 - Produção média de embriões provenientes de oócitos grau I e III e maturados na ausência ou presença de 100µM de ácido fólico. *p=0,043. AF, ácido fólico.....	54
Figura 12 - (A) Amplificação da amostra de cDNA de pulmão bovino utilizada como amostra referência para os cálculos da quantificação relativa. Em amarelo amplificação do gene <i>GAPDH</i> (Cq: 21,74), verde <i>β-actina</i> (Cq: 23,46), azul <i>IGF2</i> (Cq: 21,63) e rosa <i>LIT1</i> (Cq: 29,77). (B) Derivada da curva de <i>melt</i> dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> , <i>IGF2</i> e <i>LIT1</i> da amostra de pulmão utilizada como controle.....	56
Figura 13 - Curva de <i>melt</i> dos genes <i>GAPDH</i> (vermelho/amarelo), <i>β-actina</i> (verde), <i>IGF2</i> (azul) e <i>LIT1</i> (rosa) das amostras de embriões.....	57
Figura 14 - Representação gráfica da quantificação relativa (RQ) do gene <i>IGF2</i> . A expressão do gene foi detectada em nove das 36 amostras analisadas.....	61
Figura 15 - Quantificação relativa (RQ) das 36 amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III com diferentes tratamentos de ácido fólico.....	66
Figura 16 - Quantificação relativa (RQ) do gene <i>LIT1</i> nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 10µM de ácido fólico.....	67
Figura 17 - Quantificação relativa (RQ) do gene <i>LIT1</i> nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 30µM de ácido fólico.....	68
Figura 18 - Quantificação relativa (RQ) do gene <i>LIT1</i> nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 100µM de ácido fólico.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para análise de expressão gênica em RT-qPCR.....	46
Tabela 2 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (10uM).....	51
Tabela 3 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (30uM).....	52
Tabela 4 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (100uM).....	54
Tabela 5 - Eficiência dos <i>primers</i> após realização da curva de diluição (1:2).....	55
Tabela 6 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>IGF2</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10 μ M de ácido fólico.....	58
Tabela 7 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>IGF2</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 30 μ M de ácido fólico.	59
Tabela 8 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>IGF2</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 100 μ M de ácido fólico.....	60
Tabela 9 - Quantificação relativa (RQ) do gene <i>IGF2</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10, 30 ou 100 μ M de ácido fólico.....	62
Tabela 10 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>LIT1</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10 μ M de ácido fólico.....	63
Tabela 11 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>LIT1</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 30 μ M de ácido fólico.....	64
Tabela 12 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes <i>GAPDH</i> , <i>β-actina</i> e <i>LIT1</i> das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 100 μ M de ácido fólico.....	65
Tabela 13 - Quantificação relativa (RQ) do gene <i>LIT1</i> referente às amostras de embriões provenientes de oócitos grau I e III maturados na ausência e presença de 10, 30 e 100 μ M de ácido fólico.....	66
Tabela 14 - Média da quantificação do gene <i>LIT1</i> e análise estatística das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III nos três tratamentos de ácido fólico.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	23
1.2 Epigenética e PIVE.....	25
1.3 Ácido fólico e epigenética.....	32
 2. HIPÓTESES.....	 36
 3. OBJETIVOS.....	 38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.1.1 Objetivos específicos.....	38
 4. MATERIAL E MÉTODOS.....	 40
4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	40
4.1.1 Coleta e seleção de oócitos.....	40
4.1.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	40
4.1.3 Seleção e capacitação espermática.....	42
4.1.4 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	42
4.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) e desenvolvimento embrionário.....	43
4.1.6 Classificação dos embriões viáveis.....	43
4.1.7 Seleção e armazenamento de embriões Bx para análise em qPCR	44
4.2 Expressão gênica do <i>pool</i> de embriões pela RT-qPCR.....	44
4.2.1 Extração de RNA.....	44
4.2.2 Síntese de cDNA.....	45
4.2.3 Análise de expressão por PCR quantitativa (qPCR).....	46
4.3 Análise estatística da produção <i>in vitro</i> de embriões e expressão gênica.....	48
 5. RESULTADOS.....	 50
5.1 Produção embrionária.....	50
5.1.1 Adição de 10µM de ácido fólico.....	50
5.1.2 Adição de 30µM de ácido fólico.....	52
5.1.3 Adição de 100µM de ácido fólico.....	53

5.2	Expressão gênica.....	55
5.2.1	Eficiência dos <i>primers</i>.....	55
5.2.2	<i>IGF2</i>.....	57
5.2.3	<i>LIT1</i>.....	62
6.	DISCUSSÃO.....	71
7.	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXOS.....	93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A formação de um novo organismo tem início com a união dos gametas masculino e feminino. A fertilização é um evento complexo que compreende desde o contato e reconhecimento dos gametas, regulação da entrada do espermatozoide no oócito, fusão do material genético, ativação do genoma embrionário e desenvolvimento do embrião preimplantação (GILBERT, 2010).

Com o avanço das pesquisas foram desenvolvidas diversas tecnologias para auxiliar casais que enfrentam variados casos de infertilidade, tanto no tratamento das doenças relacionadas, quanto do ponto de vista reprodutivo no estabelecimento da gestação, as Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs) (FAIR, 2016). Além da sua aplicação em humanos, as TRAs são amplamente utilizadas em animais domésticos por permitirem a produção em larga escala, armazenamento e manutenção de linhagens de animais considerados geneticamente superiores (GRUPEN, 2014; ANCKAERT; FAIR, 2015). Em bovinos, por exemplo, a rápida evolução de técnicas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) permitiu não somente o tratamento de fêmeas com baixa fertilidade, como também o aceleração do processo de obtenção de embriões tanto em espécies leiteiras como de corte (SIRARD, 2017).

Apesar da evolução e aperfeiçoamento que pode ser observado nos processos relacionadas à TRAs, uma elevada taxa de desordens genéticas e epigenéticas é relacionada ao uso destas técnicas (CANOVAS et al., 2017), como a síndrome do bezerro grande, muito frequente em bovinos. Porém, os mecanismos que ocorrem no genoma quando este é submetido ao *stress* das TRAs é ainda pouco conhecido (SIRARD, 2017).

1.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Através da manipulação *in vitro* dos gametas feminino e masculino, a PIVE permite a fertilização do oócito pelo espermatozoide, reproduzindo o microambiente do trato feminino, assim como os processos fisiológicos que ocorrem até a formação do blastocisto (SCANAVEZ et al., 2013).

Segundo a *International Embryo Transfer Society* (IETS, 2016), em 2015, o Brasil foi responsável por cerca de 67% da produção mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro*, somando embriões provenientes de oócitos aspirados através de *ovum pick-up* (OPU) e de ovários de fêmeas abatidas em frigoríficos, deixando a América do Sul em posição de destaque na produção mundial de embriões bovinos (70,35%).

Das TRAs conhecidas até o momento, a PIVE é amplamente estudada em bovinos, no entanto ela ainda conta com dificuldades que interferem na produção final de embriões, apresentando entre 30 e 40% de blastocistos viáveis no sétimo dia de desenvolvimento embrionário (D7) (YANG et al., 2007; GONÇALVEZ et al., 2008, PONTES et al., 2011; KUSSANO et al., 2016). A morfologia dos embriões é um dos principais parâmetros utilizados para seleção e classificação do desenvolvimento embrionário (RIZOS, 2008). A classificação é feita de acordo com o manual da *International Embryo Transfer Society* (IETS) e, geralmente, utiliza métodos não-invasivos como a análise morfológica (VELASQUEZ et al., 2014), já que métodos invasivos inviabilizam os oócitos e embriões, impedindo que eles sejam utilizados na PIVE ou transferidos para receptoras (KUSSANO et al., 2016).

Dentro das três etapas que compreendem a PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões (VARAGO et al., 2008), muitos fatores podem influenciar na produção final de embriões, tais como os componentes armazenados pelos oócitos durante a maturação que serão posteriormente utilizados durante os primeiros estádios de desenvolvimento do embrião, assim como aqueles presentes no cultivo embrionário (LONERGAN et al., 2003b; GILBERT et al., 2015). A qualidade oocitária pode ser colocada como um dos principais fatores que influenciam na produção de embriões e, apesar das inúmeras tentativas, a melhora na maturação destes oócitos ainda não é satisfatória (LONERGAN et al., 2003b; KUSSANO et al., 2016). Além disto, pesquisas recentes reportaram que o espermatozoide contribui com outros fatores além do material genético, deixando também um “legado” epigenético que pode influenciar no desenvolvimento dos embriões (LAMBROT et al., 2013; GILBERT et al., 2015).

Existem diversos interesses por trás das inúmeras tentativas de aperfeiçoamento das técnicas de PIVE, como o interesse comercial existente nos embriões, uma vez que o Brasil possui o um dos maiores rebanhos mundiais, tendo alcançado 215,2 milhões de cabeças de gado em 2015 (IBGE, 2016). Paralelo à isto, existe também o interesse na pesquisa, já que o bovino é considerado um bom modelo para pesquisas relacionadas com reprodução humana, devido às semelhanças existentes entre as espécies, como um único período de ovulação por ciclo, duração do período pré-implantacional dos embriões e ativação do genoma embrionário (ANGULO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016).

Sabe-se que os protocolos de PIVE estão estabelecidos há anos. No entanto, acredita-se que ainda existam modificações que possam ser realizadas (LONERGAN et al., 2003a; WALTON; TAYLOR-ROBINSON, 2016), como alterações nos meios de maturação e cultivo

in vitro, a fim de reduzir a probabilidade de erros genéticos e epigenéticos durante o desenvolvimento embrionário, aumentando a produção e taxa de prenhez, assim como as taxas de sucesso de técnicas pós-cultivo, mantendo a qualidade do embrião.

1.2 Epigenética e PIVE

Embriões bovinos produzidos por PIVE são cultivados cerca de sete dias pós fertilização (dia 0) e neste período ocorrem quatro grandes eventos; as primeiras clivagens, a ativação do genoma embrionário, geralmente no estadio entre 8-16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto (LONERGAN et al., 2003a; HAVLICEK et al., 2005). A ativação do genoma é o evento mais delicado e determinante para o sucesso (ou não) do embrião (MEIRELLES, 2004; ANCKAERT; FAIR, 2016).

Em bovinos, entre o sexto e o oitavo dia de desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003a), o embrião desenvolve uma cavidade preenchida por fluido, a blastocèle, separando-o em duas linhagens celulares, a massa celular interna (ICM) e o trofotoderma (TE) (ROSSANT; TAM, 2009). O blastocisto é o último estadio antes do embrião iniciar a implantação na parede do útero (ZHANG et al., 2015) e, apesar de serem morfologicamente similares, os blastocistos podem apresentar nível de expressão gênica ou potencial de desenvolvimento diferentes (WRENZYCKI et al., 2005; VELASQUEZ et al., 2014).

Durante um estudo com a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) foi mencionado pela primeira vez o termo epigenética, surgindo como referência aos genes, seus produtos e a interação entre eles que podem se manifestar de diferentes maneiras através do fenótipo (WADDINGTON, 1942, 2012; ROSS; CANOVAS, 2016). Existem diversos mecanismos epigenéticos que podem alterar o fenótipo sem que haja alterações no material genético, como trocas de ácidos nucleicos, por exemplo. Este é um campo que vem sendo intensamente pesquisado e até o momento são conhecidos alguns mecanismos epigenéticos como as modificações na estrutura das histonas, a metilação do DNA e os RNAs não codificadores (ncRNA) (MOSS; WALLRATH, 2007; COSTA; PACHECO 2013). Dentre estes mecanismos, a metilação do DNA ocorre quando grupamentos metil são adicionados ao carbono de posição 5' da base nitrogenada citosina (5-metilcitosina) e, esta adição ocorre, na maioria das vezes, em dinucleotídeos num contexto citosina-fosfato-guanina (CpG) (ROSS; CANOVAS, 2016).

Existem dois momentos fundamentais para o estabelecimento das marcações epigenéticas durante a vida de um organismo, estando relacionados ao comportamento e expressão de determinados genes. São eles: a reprogramação epigenética que ocorre durante a

gametogênese e a que ocorre logo após a fertilização do gameta feminino, durante o desenvolvimento do embrião preimplantação. O primeiro evento de reprogramação ocorre quando as células germinativas primordiais (CGPs) migram para a crista gonadal. Neste período, estas células, que possuem elevados níveis de metilação quando comparadas às células somáticas, perdem a marcação epigenética devido à uma demetilação global do DNA, reestabelecendo estas marcações na maturação gamética (REIK et al., 2001; MORGAN et al., 2005; SMITH et al., 2015).

A segunda reprogramação epigenética ocorre durante o início do desenvolvimento embrionário. No momento da fertilização, os gametas feminino e masculino possuem diferentes marcações epigenéticas, além de estarem em diferentes etapas do ciclo celular. Com isto, logo após a fertilização, estas marcações “trazidas” pelos gametas são apagadas devido à reprogramação extensiva do DNA, dando lugar à uma nova marcação epigenética, fundamental ao início do desenvolvimento do embrião, influenciando na correta iniciação da expressão gênica e totipotência celular (MORGAN et al., 2005, LAMBROT et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

No entanto, as marcações epigenéticas dos gametas não são redefinidas por completo e, mesmo permanecendo desconhecido como estes mecanismos atuam, sabe-se que os gametas transmitem aos embriões algumas informações epigenéticas importantes como o *imprinting* genômico, além de outras informações, não menos importantes, como o tipo de exposição ambiental sofrida pelos pais. Sabe-se também que os níveis de metilação do DNA variam de acordo com a fase de desenvolvimento do oócito, enquanto que em espermatozoides os níveis são relativamente altos (LAMBROT et al., 2013; ROSS; CANOVAS, 2016).

São descritas algumas divergências em relação ao *status* de metilação em embriões de diferentes espécies, mas, de maneira geral, existe uma redução considerável nos níveis de metilação do DNA logo após a fertilização do oócito, conhecida como demetilação do DNA. O material genético paterno sofre uma rápida demetilação (demetilação ativa), enquanto o DNA materno reduz o nível de metilação no decorrer das divisões celulares, conhecida por demetilação passiva (DEAN et al., 2001; SMALLWOOD; KELSEY, 2012; HOEIJMAKERS et al., 2016). Em bovinos, por exemplo, este estado de quiescência estende-se até ao estadio entre 8-16 células, quando observa-se a metilação *de novo* do DNA e a ativação do genoma embrionário (Figura 1) (MORGAN et al., 2005; YANG et al., 2007; DOBBS et al., 2013).

Figura 1 - Reprogramação epigenética gamética e embrionária. (A) Demetilação das células germinativas primordiais (CGPs) de ratos durante a migração para a crista gonadal, seguido de reestabelecimento das marcações epigenéticas e consequente metilação *de novo*. (B) Demetilação do DNA materno e paterno, seguido de metilação *de novo* do material genético de embriões bovinos. Em bovinos, o estado de demetilação seguido de quiescência do material genético dos pais ocorre até o estágio entre 8-16 células. (Modificado de REIK et al., 2001; YANG et al., 2007).

Segundo DOBBS et al. (2013), embriões bovinos no período de pré-implantação sofrem alterações de metilação global no DNA e estas estão sob influência da linhagem celular de origem, massa celular interna (ICM) ou trofotoderma (TE), assim como sexo do embrião. Embriões bovinos produzidos *in vitro* mostraram ter um maior número de ilhas CpG metiladas no estágio de blastocisto quando comparado com estádios anteriores do desenvolvimento como zigoto e embriões de 4 ou 16 células (SALILEW-WONDIM et al., 2015).

Dentre os processos epigenéticos de controle da expressão gênica, o *imprinting* genômico tem papel fundamental no desenvolvimento e crescimento fetal e placentário, metabolismo e comportamento pós-natal (FOWDEN et al., 2006; SMITH et al., 2006; YANG et al., 2007; O'DOHERTY et al., 2015). O *imprinting* genômico é caracterizado pela expressão monoalélica dos genes dependente da origem parental (paterno ou materno) do qual

é herdado. Ele ocorre quando um *locus* gênico é transcricionalmente silenciado e a característica é referente à transcrição do outro alelo (WILKINS; HAIG, 2003; YANG et al., 2007; SMITH et al., 2015).

Os genes que sofrem *imprinting* genômico são, geralmente, conservados entre humanos e alguns mamíferos eutérios e marsupiais. Eles são essenciais para o correto desenvolvimento embrionário e placentário (KILIAN et al., 2000; REIK; WALTER, 2001; MORGAN et al., 2005). Estes genes são encontrados geralmente em *clusters* e são controlados por regiões ricas em dinucleotídeos CG (Ilhas CpG) denominadas regiões controladoras de *imprinting* (do inglês *Imprinting Control Regions*, ICRs), as quais são diferencialmente metiladas (do inglês *Differentially Methylated Regions*, DMRs) (LEWIS; REIK, 2006; ABRAMOWITZ; BARTOLOMEI, 2012; ROBBINS et al., 2012; HOEIJMAKERS et al., 2016).

As ICRs geralmente atuam em grandes regiões gênicas controlando a expressão de diversos genes. THORVALDSEN et al. (1998) evidenciaram em ratos a existência de uma relação direta entre a deleção ou silenciamento de DMRs com alterações nos níveis de metilação e consequente perda de *imprinting* da região gênica *IGF2/H19*, podendo levar ao desenvolvimento de fenótipos característicos de síndromes humanas.

Em animais domésticos, ainda não foi possível determinar o número exato de genes que sofrem *imprinting* genômico. Em bovinos foram descritos até então 28 genes, porém, dois destes genes que sofrem *imprinting* tiveram a expressão detectada apenas em tecidos provenientes da linhagem celular da trofotoderma (JIANG et al., 2015). De maneira geral, os genes que sofrem *imprinting* são fundamentais para o correto desenvolvimento do organismo, tendo influência já comprovada na qualidade e crescimento da carcaça, deposição de carne e gordura e também no correto desenvolvimento embrionário (GOODALL; SCHMUTZ, 2007; SMITH et al., 2015).

Semelhantes às ICR1 e ICR2 presentes no cromossomo 11 de humanos, dois domínios encontrados no cromossomo 29 do genoma bovino são estudados com frequência por conterem genes fundamentais ao desenvolvimento e crescimento fetal (HORI et al., 2010; ROBBINS et al., 2012). Na primeira região é encontrada a H19DMR onde estão localizados os genes *IGF2* (*Insulin-like growth fator 2*) e *H19* (*imprinted maternally expressed transcript*, gene não-codificador). Já na segunda região é encontrada a KvDMR1, responsável por controlar o *imprinting* de vários genes, localizando-se dentro do gene *KCNQ1* (ou *KvLQT1*, do inglês, *Potassium Voltage-Gated Channel*), gene este que possui um transcrito antisense *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 overlap transcript 1*), também conhecido por *LIT1* (*Long Intronic*

Transcript 1) (MITSUYA et al., 1999; HORIKE et al., 2000; O'NEILL, 2005).

O gene *H19* tem expressão monoalélica materna, sendo importante para o correto desenvolvimento do feto, uma vez que alterações de *imprinting* deste gene podem levar ao desenvolvimento anormal do organismo como mostrado em embriões bovinos produzidos por clonagem (ZHANG et al., 2004; MORGAN et al., 2005; URREGO et al., 2014). O gene *IGF2* possui expressão monoalélica paterna, atuando como promotor de crescimento e desenvolvimento, codificando um fator de crescimento que atua na progressão do ciclo celular (SUZUKI et al., 2011; URREGO et al., 2014). Assim como o *IGF2*, o *LIT1* (*KCNQ1OT1*) possui expressão monoalélica paterna. Ele codifica um longo RNA não-codificador (*lncRNA*) antisense ao gene *KCNQ1*, tendo normalmente o alelo materno metilado, porém, quando desregulado, pode apresentar expressão bialélica e atuar como oncogene (HORIKE et al., 2000; DeBAUN et al., 2003; ARIMA et al., 2005) (Figura 2).

IGF2 e H19

LIT1

Figura 2 - Representação das regiões H19DMR e KvDMR1, onde são encontrados os genes *IGF2*, *H19* e *LIT1*. Os genes *IGF2* e *LIT1* tem expressão determinada pelo alelo paterno (azul), enquanto o gene *H19* tem expressão materna (rosa) (Modificado de O'NEILL, 2005; LEWIS; REIK, 2006).

O *IGF2* e *H19* são genes conservados, estudados com frequência não apenas em bovinos, como também em muitos grupos de mamíferos. Eles estão localizados no braço longo do cromossomo autossômico 29 bovino, no mesmo *cluster*. Estes genes interagem e sua expressão depende do padrão de metilação da DMR. Além disto, eles compartilham o mesmo *enhancer*, situado *downstream* no gene *H19* (BELL; FELSENFELD, 2000; LEWIS; REIK, 2006)

A proteína insuladora CTCF (fator de ligação CCCTC) pode-se ligar em vários sítios presentes na H19DMR, atuando também na restrição da ação de *enhancers* (*E*) próximos (KIM et al., 2007). No alelo materno, a H19DMR encontra-se desmetilada, fazendo com que

as proteínas CTCF se liguem à ela e, esta ligação, cria uma barreira física que impede o *enhancer downstream* do *H19* de atuar no *IGF2*, aumentando sua afinidade com a região onde encontra-se o gene *H19*. Esta aproximação física da H19DMR distancia o *enhancer* do promotor do gene *IGF2*, promovendo assim, a expressão do gene *H19*. Por outro lado, no alelo paterno, a H19DMR encontra-se metilada, aproximando-o fisicamente ao gene *IGF2*. Esta movimentação aproxima o *enhancer* do promotor do gene *IGF2*, colocando-o na porção ativa da cromatina e consequentemente permitindo a expressão do gene *IGF2* e bloqueio da expressão do *H19* (Figura 3) (BELL; FELSENFELD, 2000; MURREL et al., 2004; LEWIS; REIK, 2006).

Figura 3 - Representação da interação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) dos genes *IGF2* e *H19* e consequente expressão dos genes no alelos materno, quando ocorre a expressão *H19* devido ao *imprinting* paterno e no alelo paterno, quando ocorre a expressão do *IGF2* devido ao *imprinting* materno. (Modificado de MURREL et al., 2004).

A metilação da ilha CpG, onde é encontrada a KvDMR1, é adquirida ainda nas linhagens germinativas durante a reprogramação epigenética que ocorre na gametogênese, sendo altamente conservada entre espécies distintas (MITSUYA et al., 1999; LEWIS; REIK, 2006). Em humanos, foi comprovado que cerca de 40-50% das alterações dos níveis de metilação e consequente expressão dos genes presentes nesta região, levam ao desenvolvimento da síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (Figura 4) (ARIMA et al., 2005; HORI et al., 2010). Além disto, DeBAUN et al. (2003) mostraram que embriões produzidos pelas TRAs possuem maiores probabilidades de apresentarem alterações epigenéticas na KvDMR1, associando-se também ao desenvolvimento da BWS.

Em bovinos, alterações epigenéticas nas ICRs H19DMR e KvDMR1 estão associadas ao desenvolvimento da síndrome do bezerro grande (do inglês *Large offspring syndrome*, LOS), cujo fenótipo assemelha-se ao encontrado na BWS, como hipercrecimento fetal e pós-natal, o desenvolvimento de hérnias, crescimento excessivo da língua (macroglossia) e órgãos internos, dentre outras alterações possibilitando utilizar a LOS como modelo de estudo para investigar a etiologia de BWS (HORI et al., 2010; CHEN et al., 2013).

Figura 4 - Representação do mecanismo de expressão da região da KvDMR1, onde são encontrados os genes *CDKN1C*, *KCNQ1* e *KCNQ1OT1* (*LIT1*). No alelo materno, a DMR encontra-se metilada (círculos pretos), impedindo a expressão do gene *LIT1* e permitindo a expressão de *CDKN1C* e *KCNQ1*. No alelo paterno, a DMR não está metilada (círculos brancos) permitindo a expressão do gene *LIT1*. (Modificado de AGER et al., 2008).

Pesquisas mais aprofundadas, como aquelas que envolvem a metilação e expressão de genes e regiões específicas podem demonstrar com maior precisão as alterações epigenéticas relacionadas as TRAs e suas consequências par ao desenvolvimento fetal e pós-natal. Estudos realizados por O'DOHERTY et al. (2015) com genes que sofrem *imprinting* *IGF2R*, *PEG10*, *H19* e as DNA metiltransferases (*DNMTs*) demonstraram que a metilação do DNA é considerada instável até o estadio de blastocisto, estabilizando-se quando ocorre um aumento na transcrição de genes envolvidos na regulação da metilação do material genético embrionário.

As alterações na metilação do DNA ou nos níveis de expressão gênica são algumas das alterações epigenéticas que ocorrem quando são utilizadas as TRAs, porém o momento e o porquê ocorrem ainda são pouco conhecidos. Com isto, a biologia molecular pode ser uma ferramenta importante para avaliar estas alterações frequentemente relacionadas com as

TRAs, já que uma maior compreensão destes eventos pode ser útil para o aperfeiçoamento destas técnicas (O'DOHERTY et al., 2015; SALILEW-WONDIM et al., 2015).

1.3 Ácido fólico e epigenética

Durante o processo de aspiração folicular não é possível diferenciar morfológica ou fisiologicamente os oócitos que são aspirados dos folículos. Ao fazer a seleção em estereomicroscópio são observados oócitos imaturos em diversos estádios de desenvolvimento (BILODEAU-GOESEEL; PANICH, 2002; BONI et al., 2002; FENG et al., 2007).

Classificados inicialmente por LEIBFRIED e FIRST (1979) e posteriormente confirmados por de LOSS et al. (1989), os oócitos podem ser divididos em quatro grupos de acordo com suas características morfológicas: Oócitos grau I possuem mais de três camadas de células do *cumulus*, compactas e ooplasma homogêneo; Oócitos grau II possuem entre duas e três camadas de células do *cumulus*, sendo o ooplasma também homogêneo; Oócitos grau III possuem ooplasma heterogêneo, podendo conter algumas granulações e as camadas de células do *cumulus* são irregulares, expondo parte ou toda zona pelúcida (Figura 5). Por último, oócitos grau IV iniciam processo de atresia, além de possuírem poucas ou nenhuma célula do *cumulus* ao redor da zona pelúcida e não serem utilizados na PIVE. Oócitos grau I são aqueles com maiores taxas de fertilização e consequente produção embrionária (TANGHE et al., 2003; BAKRI et al., 2016), o que se deve, principalmente, ao número e compactação das camadas de células do *cumulus* (BALL et al., 1983; KHURANA; NIEMANN, 2000).

Figura 5 - Oócitos classificados durante a seleção para maturação *in vitro*. (A) Oócitos classificados como grau I com várias camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo. (B) Oócitos classificados como grau II ainda com ooplasma homogêneo, porém com apenas 2 ou 3 camadas de células do *cumulus*. (C) Oócitos classificados como grau III com zona pelúcida parcialmente ou totalmente exposta e ooplasma heterogêneo. Fonte: Acervo pessoal.

Além dos diferentes graus encontrados, ao comparar oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, são observadas diferenças morfológicas como expansão incompleta das camadas de células do *cumulus* e retardo em alguns aspectos citoplasmáticos (BONI, 2012). Estes e outros fatores como as alterações na maturação nuclear (HUANG et al., 2013) podem ser diretamente relacionados às diferentes taxas de produção embrionária.

Estudos realizados em camundongos evidenciaram que a dieta materna afeta os padrões epigenéticos dos embriões, onde foi observada a interação entre a *Dnmt1* e os níveis de metilação em todas as DMRs (com exceção da *Rasgrf1*) dos embriões em período de préimplantação, podendo levar à erros durante o desenvolvimento e aparecimento de doenças na prole (HIRASAWA et al., 2008; KIM et al., 2009b).

O folato (forma natural) e ácido fólico (forma sintética) são compostos da família da vitamina B que agem como cofatores biosintéticos. Eles são fonte de grupamentos metil que atuam na síntese de nucleotídeos, possuem ação antioxidante, além de contribuir na transformação da homocisteína em metionina (KIM et al., 2009a; HUANG et al., 2013).

De acordo com KIM et al. (2009b) o folato, quando presente durante desenvolvimento embrionário, influencia na reprogramação da metilação do material genético embrionário durante seu desenvolvimento. O estoque de folato tem papel importante para o embrião durante o período de pré-implantação, entretanto, a maneira como este composto age em relação ao embrião ainda é pouco conhecida. Sabe-se que embriões bovinos neste estágio dependem, em grande parte, de estoques endógenos de folato formados durante a maturação oocitária, primariamente destinados à produção de nucleotídeos (O'NEILL, 1998; KOOISTRA et al., 2013; KWONG et al., 2010).

Em humanos, estudos realizados com mulheres que estavam tentando engravidar demonstraram que o ácido fólico influencia no microambiente dos oócitos. Acredita-se também que existe uma relação inversamente proporcional entre a concentração de homocisteína no fluido folicular e a maturação oocitária quando a paciente ingere doses diárias de ácido fólico antes de engravidar (SZYMANSKI; KAZDEPKA-ZIEMINSK, 2003; BOXMEER et al., 2008; HUANG et al., 2013).

Oócitos com características morfo-fisiológicas diferentes (ditos competentes ou não) maturados *in vitro* apresentaram padrões de metilação diferentes em genes que sofrem *imprinting* como o *IGF2* (FAGUNDES et al., 2011). Além disto, estudos que compararam os padrões de metilação em oócitos que se desenvolveram na presença ou ausência de doadores de metil, como o folato, evidenciaram que aqueles que se desenvolveram na ausência de doadores de metil foram considerados menos competentes, apresentando uma redução na

formação do primeiro corpúsculo polar e menores níveis de metilação em alguns genes como o *Mest* (ANCKAERT et al., 2010; SATO et al., 2013; TAWATAO et al., 2015).

A ação benéfica de ácido fólico durante a maturação *in vitro* foi apresentada também por SATO et al. (2013), que demonstraram que oócitos suínos maturados na presença de diferentes concentrações de ácido fólico tiveram suas taxas de fertilização e produção embrionária aumentadas.

As TRAs, apesar de amplamente estudadas, ainda contam com taxas de produção abaixo do desejado (GONÇALVES et al., 2008) devido à vários fatores que vão desde os meios de cultivo utilizados (VERRUMA, 2014) até alterações epigenéticas que ocorrem nos embriões, como alterações nos padrões de metilação e também dos níveis de expressão de genes importantes ao desenvolvimento embrionário como o *IGF2* (KHOSLA et al., 2001; RIOS et al., 2007).

Sabendo que o ácido fólico, quando presente durante a maturação oocitária, influencia positivamente as taxas de maturação e posterior produção embrionária, como demonstrado em trabalhos realizados em outros modelos animais como suínos (SATO et al., 2013), *Xenopus laevis* (HUANG et al., 2013) e galinhas (LIU et al., 2016) acredita-se que em bovinos a adição de ácido fólico na maturação *in vitro* de oócitos também seja benéfica durante a PIVE.

Além disto, dados sobre como e em quais vias o ácido fólico pode atuar durante o desenvolvimento embrionário são escassos, mas acredita-se que ele seja capaz de alterar os níveis de expressão de genes que sofrem *imprinting* importantes ao desenvolvimento embrionário, como *IGF2* e *LIT1* e, o avanço de técnicas moleculares como análise de DNA e RNA podem auxiliar no entendimento de como esses mecanismos interagem durante o início do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

HIPÓTESES

2. HIPÓTESES

- O uso de ácido fólico durante a maturação *in vitro* pode influenciar a maturação de oócitos bovinos de diferentes tipos (grau I e III) e consequente taxa de produção embrionária ao sétimo dia de desenvolvimento.

- A adição de diferentes concentrações de ácido fólico durante a maturação *in vitro* de embriões bovinos influencia nos níveis de expressão de genes que sofrem *imprinting* importantes durante o início do desenvolvimento embrionário.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a influência de diferentes concentrações de ácido fólico durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos morfológicamente diferentes, classificados como graus I e III, consequente produção embrionária e expressão gênica.

3.1.1 Objetivos específicos

- Analisar a produção embrionária após maturação *in vitro* de oócitos graus I e III maturados na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido fólico (10, 30 ou 100µM);

- Analisar os níveis da expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* dentro de cada grupo (grau I e III) e a influência da adição de diferentes concentrações de ácido fólico (10, 30 ou 100µM) na maturação dos oócitos e consequente no desenvolvimento embrionário.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

4.1.1 Coleta e seleção de oócitos.

Os ovários foram coletados em frigorífico na cidade de Sertãozinho-SP e transportados até o laboratório em recipiente térmico em solução salina 0,9% estéril e antibióticos (penicilina, estreptomicina e neomicina) à 36°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina e conservados em banho-maria à 36°C. Os folículos com diâmetro entre dois e oito milímetros foram aspirados com o auxílio de uma seringa descartável de 10mL acoplada a uma agulha de 18G. Sabe-se que folículos com diâmetro menor que dois milímetros contem oócitos que ainda não atingiram seu tamanho ideal, reduzindo em muito sua capacidade de maturação (FENG et al., 2007; GILBERT et al., 2015). O líquido folicular aspirado foi mantido em placa aquecedora à 36°C e o material biológico foi observado com o auxílio de um estereomicroscópio em aumento de 40 vezes para seleção de oócitos. Foram selecionados em média (de acordo com a classificação de LEIBFRIED e FIRST (1979)), em cada experimento, 240 complexo *cumulus* oócitos (COCs), 120 grau I (mais de três camadas de células de *cumulus* e ooplasma homogêneo) e 120 grau III (zona pelúcida parcialmente ou exposta por completo, poucas ou inexistentes células do *cumulus* e ooplasma heterogêneo) totalizando 2159 oócitos selecionados.

4.1.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram lavados em meio tamponado H199+ (TCM199 com sais Earles, glutamina, NaHCO₃ e Hepes, suplementando com piruvato (22µg/mL) e 10% de SFB). Em seguida, os dois grupos (oócitos grau I e III) foram subdivididos em dois grupos, um maturado na ausência e o outro na presença de ácido fólico (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática da seleção dos oócitos em cada experimento, seguido de divisão em dois grupos para a maturação *in vitro* em meio TCM199 na ausência ou na presença de 10, 30 ou 100 μ M ácido fólico.

Os grupos maturados na ausência de ácido fólico (grau I e III) foram lavados três vezes em meio de maturação B199+ (TCM199 com sais Earles, glutamina, NaHCO_3 , suplementado com piruvato (22 $\mu\text{g/mL}$), 10% de SFB, FSH (0,5 $\mu\text{g/mL}$), LH (50 $\mu\text{g/mL}$), estradiol (1,0 $\mu\text{g/mL}$) e antibiótico sulfato de amicacina (83 $\mu\text{g/mL}$)). Posteriormente à lavagem, os COCs foram depositados em microgotas de 100 μL de meio B199+ e cobertos com 4mL de óleo mineral de baixa densidade. Em cada microgota foram depositados no máximo 20 COCs, totalizando, em média, 60 oócitos em cada grupo. As placas foram colocadas em incubadora à 38,8°C e 5% de CO_2 em ar e máxima umidade, permanecendo entre 22 e 24 horas para maturação oocitária.

Já os oócitos maturados com ácido fólico (grau I e III) foram maturados em meio B199+ (mesmo reportado acima) acrescidos de 10, 30 ou 100 μM de ácido fólico (solução de ácido fólico 1000 μM : 0,0022g de ácido fólico em 5mL de solução de NaOH (0,0021M)). Segundo MIORANZA (2014), a adição de solução com pH básico no meio de maturação *in vitro* TCM199 não altera seu pH final e não prejudica a maturação dos oócitos. Os COCs foram lavados e depositados em microgotas de 100 μL de meio (TCM199 + ácido fólico), cobertos com 4mL de óleo mineral de baixa densidade. Em cada microgota foram depositados no máximo 20 COCs, totalizando, em média, 60 oócitos em cada grupo. A placa foi colocada em incubadora à 38,8°C, 5% de CO_2 em ar e máxima umidade, permanecendo entre 22 e 24

horas para maturação oocitária (Figura 7).

Figura 7 - Representação da maturação oocitária onde os oócitos passam de prófase I para metáfase II da meiose. (A) Oócitos imaturos selecionados para maturação após aspiração dos ovários. (B) Oócitos aptos à fertilização após período de maturação *in vitro* em meio TCM199. Fonte: Laboratório de Micromanipulação de Embriões, FMRP/USP.

4.1.3 Seleção e capacitação espermática

Próximo ao término da maturação *in vitro* dos oócitos foi realizada a seleção e capacitação dos espermatozoides. Para isto, palhetas de sêmen de um único touro foram descongeladas em banho-maria à 36°C por 60 segundos e o conteúdo foi depositado sob um gradiente descontínuo de Percoll (45% e 90%). Em seguida, o gradiente com o sêmen foi centrifugado à 342g durante 30 minutos. Depois de ser centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides avaliado quanto ao seu volume, concentração espermática e motilidade. Realizado o cálculo, o sêmen foi diluído para que cada microgota recebesse cerca de dois milhões de espermatozoides por mililitro (2.10^6 spztz/mL). Os espermatozoides já nas gotas de fertilização *in vitro* foram deixados por 15 minutos em incubadora à 38,8°C, 5% de CO₂ em ar e máxima umidade para capacitação espermática.

4.1.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

Com os espermatozoides aptos a serem utilizados, os COCs foram lavados duas vezes em meio de fertilização FIV (Anexo 1) (TALP (Anexo 2) suplementado com heparina (10µg/mL), piruvato (22µg/mL), BSA sem ácidos graxos (6µg/mL) e solução PHE (2µM de penicilamina, 1µM de hipotaurina e 0,25µM de epinefrina)) acrescido de sulfato de amicacina (83µg/mL). Ao término da segunda lavagem, os COCs foram colocados nas microgotas de meio FIV onde já se encontravam os espermatozoides. As placas contendo oócitos e espermatozoides foram então colocadas na incubadora à 38,8°C, 5% de CO₂ em umidade máxima onde permaneceram por 18 horas.

4.1.5 Cultivo *in vitro* (CIV) e desenvolvimento embrionário

Dezoito horas após o primeiro contato entre espermatozoides e oócitos, os prováveis zigotos foram pipetados em 600µL meio FIV para remoção do excesso de células do *cumulus* e espermatozoides mortos aderidos.

Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados três vezes em meio de cultivo *in vitro* para remoção do meio FIV e então transferidos para microgotas de 50µL (no máximo 10 zigotos por microgota) de meio de cultivo, cobertas com 4mL de óleo mineral e co-cultivados com monocamadas de células do *cumulus*. Os embriões se desenvolveram em meio de cultivo estoque de CR2 (Anexo 3) acrescido de 5% de SFB (500µL), 0,03g de BSA V, 0,03g de BSA fração V FAF (livre de ácidos graxos), 100µL de alanina, 100µL de glicina e 50mg/mL de antibiótico sulfato de amicacina (83µg/mL) em um volume final de 10mL. Segundo VERRUMA (2014), a substituição parcial de 500µL de SFB por 0,03g de BSA V FAF mantém a produção de embriões reduzindo significativamente a concentração de fosfolípidios.

Quatro dias após a FIV (D4) foi feita a refrescagem do meio. Os embriões foram analisados sob estereomicroscópio e aqueles julgados inviáveis foram separados do restante. Após a avaliação foram retirados 30µL de meio CR2 de cada microgota, juntamente com as células do *cumulus* em excesso que estavam depositadas no fundo da placa e os embriões inviáveis, permanecendo na placa apenas os que possuíam entre 16 e 32 células. Logo após, foram adicionados 30µL de meio de cultivo CR2, processo conhecido como *feeding*.

4.1.6 Classificação dos embriões viáveis

No sétimo dia, 168 horas após a FIV, os embriões foram novamente analisados sob estereomicroscópio e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento que se encontravam (Figura 8), sendo este:

- Blastocisto inicial (Bi), com a blastocela ocupando apenas uma pequena porcentagem do volume total do embrião (Figura 8A).
- Blastocisto (Bl) com a blastocela ocupando, no mínimo, metade do volume total do embrião (Figura 8B).
- Blastocisto expandido (Bx), o embrião possui uma blastocela bastante desenvolvida, formando claramente uma cavidade, onde o botão embrionário apresenta-se reduzido em uma região periférica do embrião e a zona pelúcida encontra-se delgada (Figura 8C).

- Blastocisto eclodido (Be), onde embrião possui zona pelúcida rompida, estando parcialmente ou totalmente fora dela (Figura 8D).

Figura 8 - Representação dos quatro estágios de blastocistos encontrados no sétimo dia de desenvolvimento. (A) Seta indicando blastocisto inicial (Bi). (B) Seta indicando blastocisto (Bl). (C) Seta indicando blastocisto expandido (Bx). (D) Seta indicando blastocisto eclodido (Be), nota-se que a zona pelúcida rompeu-se e que o embrião está saindo dela. Fonte: Laboratório de Micromanipulação de embriões, FMRP/USP.

4.1.7 Seleção e armazenamento de embriões Bx para análise em qPCR

Após avaliação dos embriões, aqueles classificados como blastocistos expandidos (Bx) foram selecionados (em média 12 embriões) para análise da expressão dos genes que sofrem *imprinting* *IGF2* e *LIT1*. Estes embriões foram lavados três vezes em PBS (*Phosphate buffered saline*) e depositados em microtubos de 600µL, sendo armazenados em freezer - 80°C até o momento da extração de RNA e síntese de cDNA .

4.2 Expressão gênica do *pool* de embriões pela RT-qPCR

4.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada com auxílio do kit *RNeasy® MicroKit* (*Qiagen*). Os embriões foram descongelados e centrifugados (1844g), desprezando o sobrenadante. Em seguida, foram lavados em PBS (350µL) e novamente centrifugados. O *pellet* foi solto por completo, adicionando em seguida 75µL de tampão RLT. O lisado foi homogeneizado e em seguida foi adicionado 75µL de etanol 70%. As amostras foram transferidas para uma coluna

RNAeasy MinElute acoplada em tubo de 2mL (kit). A tampa foi fechada, a amostra foi centrifugada à 7378g (1min) e o fluido filtrado foi desprezado. Logo após foram adicionados 350µL de Buffer RW1 à coluna. A tampa foi fechada e as amostras centrifugadas por 15 segundos (7378g) para lavar a membrana da coluna, descartando, em seguida, o fluido filtrado.

Foram adicionados 10µL de solução estoque de DNase I à 70µL de *Buffer RDD* e misturado por inversão, depositando, em seguida, o mix de amostra e DNase I (80µL) diretamente na membrana da coluna, deixando descansar em temperatura ambiente (20-30°C) por 15 minutos. Após este período, foram adicionados 350µL de *Buffer RW1* à coluna, a tampa foi fechada e, as amostras, centrifugadas por 15 segundos (7378g) para lavar a membrana da coluna, descartando o fluido e o tubo coletor. A amostra foi depositada em um novo tubo coletor de 2mL, adicionando 500µL de Buffer RPE à coluna, centrifugada por 15 segundos (7378g) para lavar a membrana da coluna e, o fluido, descartado.

Foi então adicionado 500µL de etanol 80% à coluna *RNeasy MinElute* e centrifugado por três minutos (7378g) para lavar a membrana da coluna, descartando novamente o fluido. A coluna foi colocada em novo tubo coletor de 2mL e, com a tampa aberta, as amostras foram centrifugadas na velocidade máxima (14462g) por 5 minutos, garantindo que não existisse etanol ao final do processo.

Ao final da centrifugação, o tubo coletor foi descartado. Para finalizar a extração, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 1,5mL, foram adicionados 14µL de água *RNase-free* diretamente no centro da membrana da coluna, centrifugando em velocidade máxima (14462g) por 2 minutos para eluir o RNA, tendo volume final de 12µL.

4.2.2 Síntese de cDNA

A transformação do RNA em cDNA foi realizada utilizando kit *SuperScript® III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen by Life Technologies™)*. Para tanto, foram adicionados 2µL de RNA total, 1µL de oligo(dT)₂₀ (50µM), 1µL de dNTP mix (10mM) e 6µL de água DEPC (volume final de 10µL). As amostras foram colocadas em termociclador, permanecendo por cinco minutos à 65°C. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas em gelo (4°C) por um minuto.

Na segunda etapa, o anelamento e síntese de cDNA, foi feito um *cDNA synthesis mix* contendo 2µL de 10x *RT Buffer*, 4µL de MgCl₂ (25mM), 2µL de DTT (0,1M), 1µL de *RNaseOUT* (40U/µL) e 1µL de *SuperScript® III RT* (200U/µL). Em seguida, 10µL do cDNA

synthesis mix foi adicionado à amostra de RNA, homogeneizado com pipeta e depois incubada em termociclador por 50 minutos à 50°C seguidos de cinco minutos à 85°C. Com as amostras no gelo (4°C) foi adicionado 1µL de *RNaseH* e as amostras voltaram ao termociclador por 20 minutos à 37°C, sendo armazenadas em seguida em freezer -20°C até a utilização.

4.2.3 Análise de expressão por PCR quantitativa (qPCR)

Para avaliar a expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* foi utilizado o método de transcrição reversa associada a PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Foram escolhidos como genes de referência o β -actina e o *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Os *primers* dos dois genes alvo *IGF2* e *LIT1* e o gene de referência *GAPDH* foram desenhados com auxílio do *software Premier Biosoft* (premierbiosoft.com/netprimer/) de acordo com as sequências depositadas no Ensembl (ensembl.org). Para o *primer* do gene de referência β -actina foi utilizada sequência descrita por RIOS et al. (2007). As informações sobre os quatro *primers* utilizados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para análise de expressão gênica em RT-qPCR.

Genes	Sequência 5'→ 3'	Produto (pb)*
<i>β-actina</i>	CCGTCTTCCCGTCCATCGTG	108pb
	GGATGCCTCTCTTGCTCTGA	
<i>GAPDH</i>	CGCCTGGAGAAACCTGCC	135pb
	GGAGAGTGAGTGTCGCTGTTG	
<i>IGF2</i>	CCCGCCAAGTCCGAGAGG	116pb
	CGCTGGGTGGACTGCTTC	
<i>LIT1</i>	GGAGACAGAGGCCCAAGAAG	188pb
	TAAGTGCCTGTGGAGCCTG	

*pb, pares de bases.

Para os testes iniciais e padronização do experimento foram utilizados *pools* de embriões provenientes de experimentos anteriores, onde foram analisadas a temperatura, a concentração necessária dos *pools* de embriões e *primers*. Para comprovar os resultados obtidos pela RT-qPCR, tantos os genes de referência quanto os genes alvo deveriam apresentar eficiência alta e similar. Levando em consideração LIVAK e SCHMITTGEN

(2001), foi construída uma curva de diluição seriada para cada gene, construindo um gráfico com quatro pontos de diluição (1:2).

As análises foram realizadas com a utilização do sistema de detecção de sequência *StepOne Real-Time PCR* com *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) e como método de quantificação foi utilizado o Cq (do inglês, *cicle quantification*) comparativo ou quantificação relativa. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, tanto para os genes de referência como para os genes alvos.

As reações foram constituídas utilizando 5µL de *SYBR® Green Master Mix* (4309155), 0,5pmol de *primer forward* e 0,5pmol de *primer reverse*, 2µL de água e 2µL de amostra de cDNA, com volume final de 10µL. As condições para amplificação foram: 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 59°C por 1 minuto. Para validar a expressão apenas das regiões de interesse e ausência de produtos não-específicos e dímeros de *primer*, ao término dos 45 ciclos, as amostras eram submetidas à análise da curva de dissociação (*Melt curve*), passando de 60°C à 95°C, onde a temperatura aumentava 0,2°C a cada 1 minuto.

Os resultados obtidos através da análise das amostras foram comparados diretamente e a normalização da expressão gênica foi feita tomando como referência PFAFFL (2001). Estes cálculos levam em consideração o *slope* dado para realização dos cálculos de quantificação relativa (RQ) de cada amostra, utilizando a seguinte fórmula:

$$E = 10^{(-1/slope)}$$

$$RQ = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Cq (Cq_{ref} - Cq_{amostra})}}{(E_{Mref})^{\Delta Cq (MCq_{ref} - mCq_{amostra})}}$$

Onde,

E é a eficiência da reação; RQ é a quantificação relativa de cada amostra. Para os cálculos são utilizadas a eficiência do gene alvo (E_{alvo}) (ΔCq ; variação entre o ciclo de quantificação do gene alvo no controle (Cq_{ref}) e o ciclo de quantificação do gene alvo da amostra ($Cq_{amostra}$)) sobre a média de eficiência da reação dos genes de referência (E_{Mref}) (ΔCq ; variação entre a média do ciclo de quantificação dos genes de referência na amostra ($MCq_{amostra}$) e média do ciclo de quantificação dos genes de referência no controle (MCq_{ref})).

4.3 Análise estatística da produção de embriões e expressão gênica

A análise estatística foi realizada em dois momentos do trabalho, (1) para avaliar a produção dos embriões provenientes de oócitos graus I e III nos diferentes tratamentos com ácido fólico (10, 30 e 100 μ M) e (2) para avaliar a expressão gênica destas amostras utilizando os cálculos de quantificação relativa seguindo PFAFFL (2001).

A distribuição das variáveis foi analisada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk* (indicado para testes com amostras pequenas) utilizando o *software* SPSS 22 (IBM®, EUA). As amostras com distribuição normal foram comparadas através do teste t de *student*, enquanto aquelas que não possuíam distribuição normal foram comparadas utilizando teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. Os testes de comparação de médias foram também realizados no *software* SSPSS 22, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (IBM®, EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Produção embrionária

Foram realizados três tratamentos diferentes para avaliar a influência de 10, 30 e 100 μ M de ácido fólico (AF) no meio de maturação oocitária. Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando nove experimentos. Em todos foram utilizadas palhetas de sêmen de um único touro, sendo estas da mesma partida, com taxa de fertilidade do touro conhecida.

5.1.1 Adição de 10 μ M de ácido fólico

Foram selecionados 716 COCs divididos em dois grupos: (1) oócitos grau I (n=366) e (2) oócitos grau III (n=350). Os oócitos de cada grupo foram maturados em duas condições diferentes, na ausência e presença de 10 μ M ácido fólico (Tabela 2). Não foi observada diferença na produção embrionária a partir de oócitos grau I maturados na ausência (52,58% $\pm$ 8,5) e na presença de 10 μ M ácido fólico (45,40% $\pm$ 5,7) (p=0,292). Por outro lado, ao analisar a produção embrionária proveniente de oócitos grau III, foi observado um aumento significativo (p=0,017) na produção de embriões maturados na presença de 10 μ M de ácido fólico (42,33% $\pm$ 3,7) em relação àqueles maturados na ausência do mesmo (32,60% $\pm$ 2,0) (Figura 9).

Tabela 2 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (10uM).

	COCs		Zigotos (D0)		Produção D7 n (%)	
	Maturados sem AF	Maturados com AF	Sem AF	Com AF	Sem AF	Com AF
Grau I	60	62	54	62	25 (46,29)	25 (40,32)
	61	61	61	61	30 (49,18)	27 (44,26)
	60	62	53	62	33 (62,26)	32 (51,61)
Grau III	60	50	55	42	19 (34,54)	16 (38,09)
	60	60	59	53	18 (30,50)	24 (45,28)
	60	60	58	55	19 (32,75)	24 (43,63)

COCs, Complexo *cumulus* oócito; D0, dia zero pós fertilização *in vitro* (zigoto); D7, embriões com sete dias de desenvolvimento; AF, ácido fólico; n, número total de embriões contabilizados no D7.

Figura 9 - Produção média de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10μM de ácido fólico. *Diferença estatística (p=0,017). AF, ácido fólico.

Os resultados demonstram que o acréscimo de 10 μ M de ácido fólico no meio de maturação MIV B199 influencia positivamente a produção de embriões provenientes de oócitos considerados menos competentes (grau III).

5.1.2 Adição de 30 μ M de ácido fólico

Foram selecionados 722 COCs divididos em dois grupos: (1) oócitos grau I (n=360) e (2) oócitos grau III (n=360). Os oócitos de cada grupo foram maturados em duas condições diferentes, na ausência e presença de 30 μ M ácido fólico (Tabela 3). A produção de embriões provenientes de oócitos grau I não difere entre os oócitos maturados na ausência (48,39% $\pm$ 4,3) e na presença de ácido fólico (49,79% $\pm$ 5,0) (p=0,827). De maneira semelhante ao encontrado na avaliação do embriões provenientes de oócitos grau I, os embriões provenientes de oócitos grau III também não apresentaram diferença estatística (p=0,709) entre o grupo de embriões, em que os oócitos maturados na ausência de ácido fólico apresentaram uma média de 42,14% $\pm$ 2,0) e na presença de 30 μ M de ácido fólico apresentaram média de 41,57% $\pm$ 1,3 (Figura 10).

Tabela 3 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (30 μ M).

	COCs selecionados		Zigotos (D0)		Produção D7; n (%)	
	Maturados sem AF	Maturados com AF	Sem AF	Com AF	Sem AF	Com AF
Grau I	60	61	57	61	29 (50,87)	27 (44,26)
	60	60	55	59	28 (50,9)	30 (50,84)
	60	60	53	59	23 (43,39)	32 (54,23)
Grau III	60	60	59	57	26 (44,06)	24 (42,10)
	60	60	55	55	22 (40,0)	22 (40,0)
	60	61	59	61	25 (42,37)	26 (42,62)

COCs, Complexo *cumulus* oócito; D0, dia zero pós fertilização *in vitro* (zigoto); D7, embriões com sete dias de desenvolvimento; AF, ácido fólico; n, número total de embriões contabilizados no D7.

Figura 10 - Produção média de embriões provenientes de oócitos grau I e III maturados na ausência ou presença de 30 μ M de ácido fólico. AF, ácido fólico.

Estes resultados evidenciam que a adição de 30 μ M de ácido fólico no meio de MIV TCM199 não influencia a maturação *in vitro* de oócitos classificados como grau I ou III e posterior desenvolvimento embrionário.

5.1.3 Adição de 100 μ M de ácido fólico

Foram selecionados 722 oócitos divididos em dois grupos: (1) oócitos grau I (n=361) e (2) oócitos grau III (n=360). Os oócitos de cada grupo foram maturados em duas condições diferentes, na ausência e presença de 100 μ M ácido fólico (Tabela 4). A adição de 100 μ M de ácido fólico durante a maturação de oócitos grau I reduziu a produção embrionária ($p=0,043$), quando comparada a produção embrionária proveniente de oócitos maturados na ausência de ácido fólico ($54,58\% \pm 7,8$) com aqueles maturados na presença de ácido fólico ($39,55 \pm 4,2$). Entretanto, ao avaliar a produção embrionária proveniente de oócitos grau III, não houve diferença entre o grupo maturado na ausência ($33,57 \pm 1,2$) e na presença de ácido fólico ($42,49 \pm 9,4$) ($p=0,242$) (Figura 11).

Tabela 4 - Produção embrionária proveniente de oócitos graus I e III, maturados na ausência e presença de ácido fólico (100uM).

	COCs selecionados		Zigotos (D0)		Produção D7; n (%)	
	Maturados sem AF	Maturados com AF	Sem AF	Com AF	Sem AF	Com AF
Grau I	60	60	60	58	32 (53,33)	21 (36,20)
	60	60	59	55	28 (47,45)	21 (38,18)
	60	61	55	61	34 (62,96)	27 (44,26)
Grau III	60	60	56	60	18 (32,14)	32 (53,33)
	60	60	53	58	18 (33,96)	22 (37,93)
	60	60	52	58	18 (34,61)	21 (36,20)

COCs, Complexo *cumulus* oócito; D0, dia zero pós fertilização *in vitro* (zigoto); D7, embriões com sete dias de desenvolvimento; AF, ácido fólico; n, número total de embriões contabilizados no D7.

Figura 11 - Produção média de embriões provenientes de oócitos grau I e III e maturados na ausência ou presença de 100µM de ácido fólico. *Diferença estatística (p=0,043). AF, ácido fólico.

Pode-se dizer que o acréscimo de 100µM de ácido fólico é prejudicial à maturação de oócitos grau I, refletindo assim na taxa de maturação oocitária e consequente produção embrionária.

5.2 Expressão gênica

5.2.1 Eficiência dos *primers*

A análise da expressão dos genes *IGF2* e *LIT1* foi realizada em todas as amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e na presença de 10, 30 e 100µM de ácido fólico, totalizando 36 amostras.

A padronização dos *primers* foi realizada através da construção de uma curva de diluição seriada (1:2), demonstrando uma eficiência entre 90 e 110% (Tabela 5).

Tabela 5 - Eficiência dos *primers* após realização da curva de diluição (1:2).

Genes	Eficiência (%)	<i>Slope</i>
<i>GAPDH</i>	100,8%	-3,30
<i>β-actina</i>	91,8%	-3,53
<i>IGF2</i>	99,9%	-3,32
<i>LIT1</i>	104,8%	-3,21

Para a confecção da curva de diluição da quantificação relativa (RQ) foi utilizada uma amostra de pulmão bovino. Ela também foi utilizada como amostra referência. A amplificação e curva de *melt* dos genes *GAPDH* e *β-actina* (referência) e *IGF2* e *LIT1* (alvo) da amostra de pulmão (Figura 12).

Figura 12 - (A) Amplificação da amostra de cDNA de pulmão bovino utilizada como amostra referência para os cálculos da quantificação relativa. Em amarelo amplificação do gene *GAPDH* (Cq: 21,74), verde *β-actina* (Cq: 23,46), azul *IGF2* (Cq: 21,63) e rosa *LIT1* (Cq: 29,77). (B) Derivada da curva de *melt* dos genes *GAPDH*, *β-actina*, *IGF2* e *LIT1* da amostra de pulmão utilizada como controle.

Além disto, foram avaliadas as curvas de *melt* dos genes de cada amostra, onde foi possível observar um único pico para cada gene, nas mesmas posições encontradas no controle (Figura 13).

Figura 13 - Curva de *melt* dos genes *GAPDH* (vermelho/amarelo), *β-actina* (verde), *IGF2* (azul) e *LIT1* (rosa) das amostras de embriões.

5.2.2 *IGF2*

A expressão do gene *IGF2* não foi detectada em todas as amostras de embriões analisadas, como pode ser observada nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *IGF2* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>IGF2</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	23,46 ($\pm$ 0,14)	22,39 ($\pm$ 0,03)	35,18 ($\pm$ 0,82)
		23,91 ($\pm$ 0,07)	22,85 ($\pm$ 0,04)	35,07 ($\pm$ 0,88)
		25,14 ($\pm$ 0,06)	24,41 ($\pm$ 0,01)	-
	Com AF	23,55 ($\pm$ 0,04)	22,56 ($\pm$ 0,02)	35,27 ($\pm$ 0,73)
		23,51 ($\pm$ 0,07)	22,32 ($\pm$ 0,05)	-
		22,87 ($\pm$ 0,10)	21,39 ($\pm$ 0,07)	35,88 ($\pm$ 0,30)
Grau III	Sem AF	23,61 ($\pm$ 0,08)	23,28 ($\pm$ 0,13)	-
		24,03 ($\pm$ 0,11)	23,02 ($\pm$ 0,06)	-
		25,16 ($\pm$ 0,03)	24,21 ($\pm$ 0,03)	-
	Com AF	23,30 ($\pm$ 0,12)	22,22 ($\pm$ 0,12)	-
		24,78 ($\pm$ 0,11)	23,69 ($\pm$ 0,03)	-
		23,97 ($\pm$ 0,16)	23,02 ($\pm$ 0,04)	-

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

Tabela 7 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *IGF2* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 30 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>IGF2</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	24,04 ($\pm$ 0,04)	23,09 ($\pm$ 0,03)	-
		24,53 ($\pm$ 0,09)	23,69 ($\pm$ 0,05)	-
		24,29 ($\pm$ 0,09)	23,12 ($\pm$ 0,11)	-
	Com AF	23,32 ($\pm$ 0,10)	22,52 ($\pm$ 0,09)	-
		25,60 ($\pm$ 0,65)	24,10 ($\pm$ 0,01)	34,93 ($\pm$ 0,56)
		23,08 ($\pm$ 0,15)	21,93 ($\pm$ 0,08)	34,76 ($\pm$ 0,20)
Grau III	Sem AF	25,52 ($\pm$ 0,12)	24,76 ($\pm$ 0,04)	-
		23,63 ($\pm$ 0,14)	22,67 ($\pm$ 0,15)	-
		23,34 ($\pm$ 0,10)	22,66 ($\pm$ 0,02)	36,11 ($\pm$ 0,62)
	Com AF	25,10 ($\pm$ 0,09)	24,39 ($\pm$ 0,02)	-
		23,92 ($\pm$ 0,11)	23,17 ($\pm$ 0,16)	-
		24,12 ($\pm$ 0,02)	23,47 ($\pm$ 0,03)	-

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

Tabela 8 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *IGF2* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 100 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>IGF2</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	24,11 ($\pm$ 0,36)	22,51 ($\pm$ 0,07)	-
		25,01 ($\pm$ 0,32)	23,81 ($\pm$ 0,18)	-
		23,99 ($\pm$ 0,06)	23,19 ($\pm$ 0,08)	34,85 ($\pm$ 0,07)
	Com AF	24,00 ($\pm$ 0,06)	22,90 ($\pm$ 0,12)	-
		23,47 ($\pm$ 0,12)	22,20 ($\pm$ 0,02)	34,08 ($\pm$ 0,40)
		23,82 ($\pm$ 0,16)	22,85 ($\pm$ 0,05)	-
Grau III	Sem AF	26,02 ($\pm$ 0,06)	25,18 ($\pm$ 0,10)	-
		23,29 ($\pm$ 0,05)	22,33 ($\pm$ 0,04)	-
		24,89 ($\pm$ 0,06)	24,50 ($\pm$ 0,04)	-
	Com AF	23,26 ($\pm$ 0,02)	22,37 ($\pm$ 0,17)	-
		23,71 ($\pm$ 0,12)	22,77 ($\pm$ 0,07)	-
		23,78 ($\pm$ 0,07)	23,31 ($\pm$ 0,08)	-

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

A partir da eficiência de amplificação de cada gene e dos ciclos de quantificação (Cq) obtidos, foi possível determinar a quantificação relativa (RQ) de cada amostra. Das nove amostras com expressão do gene *IGF2*, oito eram provenientes de oócitos grau I e uma de oócitos grau III (Figura 14).

Figura 14 - Representação gráfica da quantificação relativa (RQ) do gene *IGF2*. A expressão do gene foi detectada em nove das 36 amostras analisadas.

Com esses resultados, é possível observar que a expressão do gene *IGF2* pode ser detectada quase exclusivamente em embriões provenientes de oócitos grau I, independente da presença ou não de ácido fólico durante a maturação oocitária *in vitro* (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação relativa (RQ) do gene *IGF2* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10, 30 ou 100µM de ácido fólico.

	Grau I		Grau III	
	Sem AF	Com AF	Sem AF	Com AF
10µM	0,0001	0,0001	-	-
	0,00013	-	-	-
	-	0,00037	-	-
30µM	-	-	-	-
	-	0,00037	-	-
	-	0,0001	0,00005	-
100µM	-	-	-	-
	-	0,00012	-	-
	0,0002	-	-	-

AF, ácido fólico.

Devido ao baixo número de amostras no qual houve detecção da expressão do gene *IGF2*, não foi possível realizar uma análise estatística para avaliar se as diferentes concentrações de ácido fólico influenciam os níveis de expressão.

5.2.3 *LIT1*

A expressão do gene *LIT1* foi observada em todas as amostras, tanto nos embriões provenientes de oócitos maturados na ausência de ácido fólico, como nos tratados com 10, 30 e 100µM (Tabelas 10, 11 e 12).

Tabela 10 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *LIT1* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 10 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>LIT1</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	23,42 ($\pm$ 0,04)	22,49 ($\pm$ 0,02)	35,22 ($\pm$ 1,94)
		24,30 ($\pm$ 0,04)	23,34 ($\pm$ 0,02)	34,62 ($\pm$ 0,60)
		25,14 ($\pm$ 0,07)	24,41 ($\pm$ 0,01)	35,86 ($\pm$ 0,21)
	Com AF	23,55 ($\pm$ 0,04)	22,56 ($\pm$ 0,02)	33,96 ($\pm$ 0,51)
		23,93 ($\pm$ 0,03)	22,84 ($\pm$ 0,02)	33,10 ($\pm$ 0,15)
		22,87 ($\pm$ 0,10)	21,39 ($\pm$ 0,07)	32,56 ($\pm$ 0,55)
Grau III	Sem AF	23,51 ($\pm$ 0,05)	23,10 ($\pm$ 0,04)	34,15 ($\pm$ 0,79)
		24,03 ($\pm$ 0,11)	23,02 ($\pm$ 0,06)	32,75 ($\pm$ 1,04)
		25,16 ($\pm$ 0,03)	24,21 ($\pm$ 0,03)	34,79 ($\pm$ 0,27)
	Com AF	23,30 ($\pm$ 0,12)	22,22 ($\pm$ 0,12)	34,07 ($\pm$ 0,25)
		25,34 ($\pm$ 0,04)	24,24 ($\pm$ 0,01)	35,61 ($\pm$ 0,04)
		23,97 ($\pm$ 0,16)	23,02 ($\pm$ 0,04)	34,74 ($\pm$ 0,33)

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

Tabela 11 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *LIT1* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 30 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>LIT1</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	24,05 ($\pm$ 0,04)	23,09 ($\pm$ 0,03)	32,68 ($\pm$ 0,13)
		24,53 ($\pm$ 0,09)	23,69 ($\pm$ 0,05)	33,79 ($\pm$ 0,48)
		24,35 ($\pm$ 0,05)	23,25 ($\pm$ 0,12)	33,48 ($\pm$ 0,004)
	Com AF	23,32 ($\pm$ 0,04)	22,52 ($\pm$ 0,09)	32,76 ($\pm$ 0,24)
		24,56 ($\pm$ 0,03)	23,82 ($\pm$ 0,03)	34,88 ($\pm$ 0,62)
		23,08 ($\pm$ 0,15)	21,93 ($\pm$ 0,08)	32,70 ($\pm$ 0,24)
Grau III	Sem AF	25,52 ($\pm$ 0,12)	24,76 ($\pm$ 0,04)	35,08 ($\pm$ 0,00)
		24,14 ($\pm$ 0,11)	22,87 ($\pm$ 0,00)	33,44 ($\pm$ 0,12)
		23,57 ($\pm$ 0,007)	22,93 ($\pm$ 0,07)	33,30 ($\pm$ 0,18)
	Com AF	25,37 ($\pm$ 0,01)	24,55 ($\pm$ 0,16)	34,81 ($\pm$ 1,38)
		24,28 ($\pm$ 0,18)	23,50 ($\pm$ 0,15)	33,75 ($\pm$ 1,18)
		24,12 ($\pm$ 0,02)	23,47 ($\pm$ 0,03)	33,93 ($\pm$ 0,52)

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

Tabela 12 - Ciclo de quantificação (desvio-padrão) dos genes *GAPDH*, *β -actina* e *LIT1* das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência ou presença de 100 μ M de ácido fólico.

Oócitos	Tratamento	<i>GAPDH</i> Cq (DP)	<i>β-actina</i> Cq (DP)	<i>LIT1</i> Cq (DP)
Grau I	Sem AF	24,11 ($\pm$ 0,36)	22,51 ($\pm$ 0,07)	34,02 ($\pm$ 0,96)
		25,01 ($\pm$ 0,32)	23,81 ($\pm$ 0,18)	35,25 ($\pm$ 0,96)
		23,99 ($\pm$ 0,06)	23,19 ($\pm$ 0,08)	34,72 ($\pm$ 0,17)
	Com AF	24,00 ($\pm$ 0,06)	22,88 ($\pm$ 0,12)	34,48 ($\pm$ 0,88)
		23,47 ($\pm$ 0,12)	22,20 ($\pm$ 0,02)	33,98 ($\pm$ 0,77)
		23,82 ($\pm$ 0,16)	22,87 ($\pm$ 0,05)	34,75 ($\pm$ 0,31)
Grau III	Sem AF	25,91 ($\pm$ 0,06)	25,27 ($\pm$ 0,11)	34,52 ($\pm$ 0,20)
		23,48 ($\pm$ 0,17)	22,48 ($\pm$ 0,10)	32,77 ($\pm$ 0,03)
		24,89 ($\pm$ 0,06)	24,49 ($\pm$ 0,03)	34,53 ($\pm$ 0,16)
	Com AF	23,26 ($\pm$ 0,02)	22,37 ($\pm$ 0,17)	33,03 ($\pm$ 0,54)
		23,71 ($\pm$ 0,12)	22,77 ($\pm$ 0,07)	33,19 ($\pm$ 0,06)
		23,77 ($\pm$ 0,07)	23,31 ($\pm$ 0,08)	34,02 ($\pm$ 0,27)

Cq, Ciclo de quantificação; DP, desvio-padrão.

A análise dos ciclos de quantificação (Cq) e *slopes* das retas de cada gene permitiu a quantificação relativa (RQ) de cada amostra. A expressão gênica do gene *LIT1* apresentou valores menores quando comparados com os genes de referência *GAPDH* e *β -actina*, no entanto, diferente do gene *IGF2* todas as amostras apresentaram níveis detectáveis de expressão (Figura 15 e Tabela 13).

Figura 15 - Quantificação relativa (RQ) das 36 amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III com diferentes tratamentos de ácido fólico.

Tabela 13 - Quantificação relativa (RQ) do gene *LIT1* referente às amostras de embriões provenientes de oócitos grau I e III maturados na ausência e presença de 10, 30 e 100µM de ácido fólico.

	Grau I		Grau III	
	Sem AF	Com AF	Sem AF	Com AF
10µM	0,023	0,068	0,067	0,051
	0,064	0,138	0,221	0,059
	0,056	0,099	0,113	0,052
30µM	0,241	0,147	0,125	0,119
	0,157	0,06	0,116	0,124
	0,138	0,116	0,117	0,115
100µM	0,077	0,068	0,239	0,113
	0,067	0,05	0,132	0,134
	0,057	0,047	0,137	0,09

AF, ácido fólico.

Com a detecção da expressão gênica do gene *LIT1* em todas as 36 amostras foi possível realizar uma análise estatística para avaliar se houve diferença entre os embriões cujos oócitos foram maturados na ausência ou presença de ácido fólico.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras nos três tratamentos, tanto em embriões provenientes de oócitos grau I quanto oócitos grau III (Tabela 14 e Figuras 16, 17 e 18).

Tabela 14 - Média da quantificação do gene *LIT1* e análise estatística das amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III nos três tratamentos de ácido fólico.

		Grau I		Grau III	
		Média (DP)	p-value	Média (DP)	p-value
10µM	Sem AF	0,047 ± 0,021	0,086	0,133 ± 0,079	0,156
	Com AF	0,047 ± 0,021		0,054 ± 0,004	
30µM	Sem AF	0,178 ± 0,054	0,155	0,119 ± 0,004	1,000
	Com AF	0,107 ± 0,044		0,119 ± 0,004	
100µM	Sem AF	0,067 ± 0,010	0,241	0,169 ± 0,060	0,199
	Com AF	0,055 ± 0,011		0,112 ± 0,022	

DP, desvio-padrão; AF, ácido fólico.

Figura 16 - Quantificação relativa (RQ) do gene *LIT1* nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 10µM de ácido fólico.

Figura 17 - Quantificação relativa (RQ) do gene *LIT1* nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 30 μ M de ácido fólico.

Figura 18 - Quantificação relativa (RQ) do gene *LIT1* nas amostras de embriões provenientes de oócitos graus I e III maturados na ausência e presença de 100 μ M de ácido fólico.

Apesar da observação de que diferentes concentrações de ácido fólico podem influenciar positivamente ou negativamente a produção *in vitro* de embriões bovinos, estas alterações parecem não estar relacionadas aos níveis de expressão do gene *LIT1*.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A PIVE bovinos é uma das TRAs mais utilizadas no mundo, fazendo com que muitos busquem sua otimização (STROEBECH et al., 2015). Existem inúmeros fatores que podem influenciar a qualidade e produção embrionária, como os diferentes tipos de oócitos selecionados (graus I, II e III), a composição dos meios de maturação oocitária, o meio de cultivo embrionário e a presença de compostos orgânicos (LONERGAN et al., 2003a; TANGHE et al., 2003; GILBERT et al., 2015). Tais tecnologias são frequentemente relacionadas às alterações epigenéticas durante o desenvolvimento embrionário, como modificações nas histonas e alterações na metilação do DNA, durante as primeiras divisões celulares, podendo causar variações na expressão gênica (WRENZYCKI et al., 2005; URREGO et al., 2014).

A obtenção de embriões saudáveis demanda cuidados e, um oócito maturado de maneira correta é um dos pré-requisitos para o sucesso nas taxas de produção e desenvolvimento embrionário. O amadurecimento dos oócitos é um dos grandes desafios encontrados na PIVE, já que, durante este período, ocorrem várias modificações nucleares e citoplasmáticas no gameta feminino, tornando-o apto a receber o espermatozoide e acumulando compostos fundamentais para o início do desenvolvimento embrionário (GOTTARDI; MINGOTTI, 2009; MOUSSA et al., 2015).

O ácido fólico é um importante suplemento vitamínico cujo uso é recomendado antes e durante as fases iniciais da gestação para evitar mal formação do tubo neural do feto (SMITHELLS et al., 1976; CZEIZEL; DUDÁS, 1992; TAMURA; PICCIANO, 2006). Este composto atua como doador de grupamentos metil, auxiliando a produção de nucleotídeos e influenciando a metilação do DNA durante a reprogramação epigenética dos gametas e no início do desenvolvimento embrionário (KIM et al., 2009a; HUANG et al., 2013).

Existe uma relação positiva entre a ingestão diária de ácido fólico no período pré-concepcional e o nível de metilação de genes importantes para o desenvolvimento embrionário em crianças nascidas após o tratamento, como a metilação da DMR do gene *IGF2* e consequentes alterações nos níveis de expressão do *IGF2* e genes relacionados (STEEGERS-THEUNISSEN et al., 2009).

Além de ser doador de grupamentos metil, auxiliando na síntese de variados compostos, o ácido fólico pode atuar como antioxidante, desempenhando um papel importante em microambientes no qual ocorre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que durante o início do desenvolvimento podem acumular-se nos embriões em resposta ao

stress oxidativo causado pelo meio de cultivo *in vitro*. Portanto, a presença de ácido fólico durante o início do desenvolvimento tem o potencial de melhorar a qualidade embrionária (KIM et al., 2009a; MA et al., 2015).

O ácido fólico está relacionado ao aumento das taxas de maturação oocitária de ratos e rãs quando adicionado ao meio de MIV, devido a manutenção de uma distribuição uniforme das células da granulosa, ao aumento nas taxas de formação do primeiro corpúsculo polar, restauração da configuração das fibras do fuso, além de eliminar as células corticais que se distribuem de maneira anormal. No entanto, como o ácido fólico atua durante a maturação destes oócitos permanece desconhecido (HUANG et al., 2013).

A adição de ácido fólico durante a MIV pode melhorar as taxas de produção embrionária provenientes de oócitos de diferentes qualidades. Foram avaliadas diferentes concentrações (10, 30, 100 μ M) de ácido fólico durante a MIV de oócitos GI e GII. Os oócitos GI, com várias camadas de células do *cumulus*, não foram influenciados por 10 μ M de ácido fólico durante a maturação, fertilização e consequente desenvolvimento dos embriões, apresentando média de produção de 52,57% naqueles embriões cujos oócitos maturaram na ausência e 45,39% no grupo cujos oócitos maturaram na presença de ácido fólico (Figura 9). O estudo realizado por SATO et al. (2013) maturou oócitos suínos com células do *cumulus* compactas (grau I), na ausência e presença de 10 μ M de ácido fólico, fertilizou e cultivou os embriões por sete dias e, de maneira semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, a adição de ácido fólico não influenciou a produção de blastocistos.

Os oócitos grau III foram influenciados positivamente pela adição de 10 μ M de ácido fólico, apresentando como consequência o aumento na taxa de produção embrionária. Os embriões cujos oócitos foram maturados na ausência de ácido fólico apresentaram 32,59% de média de produção, enquanto os provenientes de oócitos maturados com ácido fólico apresentaram 42,33%. Estes resultados permitem inferir que a adição de 10 μ M de ácido fólico no meio de maturação *in vitro* TCM199 aumenta a produção ($p=0,017$) de embriões provenientes de oócitos grau III, considerados inferiores em relação à qualidade, taxa de maturação e consequente produção embrionária (HAWK; WALL, 1994; BONI et al., 2002; FENG et al., 2007; BONI, 2012).

A adição de 30 μ M de ácido fólico (Figura 10) não influenciou a produção de embriões, uma vez que a média dos grupos foi próxima tanto em oócitos grau I (48,39% na ausência e 49,79% na presença de ácido fólico) quanto grau III (42,14% na ausência e 41,57% na presença de ácido fólico). Apesar de não ter sido observada a influência desta concentração

de ácido fólico na produção embrionária, os resultados mostram uma produção maior de embriões provenientes de oócitos grau I em relação aos oócitos grau III, corroborando com estudos que evidenciam que a quantidade de células do *cumulus* está diretamente relacionada com o sucesso de maturação dos oócitos e consequente desenvolvimento embrionário (FENG et al., 2007; BAKRI et al., 2016).

No último tratamento (Figura 11), com a adição de 100µM de ácido fólico, observou-se uma influência negativa, com a redução significativa ($p=0,043$) da produção de embriões provenientes de oócitos grau I maturados na presença de ácido fólico (39,54%) quando comparados àqueles maturados na ausência (54,58%). Em relação aos embriões provenientes de oócitos grau III não houve diferença significativa entre a produção de embriões maturados na ausência (33,57%) e na presença de ácido fólico (42,48%). Diferente dos dados encontrados nesse trabalho, em suínos, a mesma concentração de ácido fólico (100µM) influenciou positivamente a maturação *in vitro* de oócitos, aumentando significativamente a produção de embriões (SATO et al., 2013).

A adição de 100µM de ácido fólico durante o cultivo *in vitro* não altera a produção embrionária tanto de embriões bovinos provenientes de oócitos grau I quanto grau III como demonstrado por MIORANZA (2014). Este fato fortalece a hipótese de que o ácido fólico utilizado pelos embriões durante o período pré-implantacional é proveniente dos gametas, principalmente dos oócitos, que podem acumular determinados compostos durante a maturação (O'NEILL, 1998).

KWONG et al. (2013) demonstraram que embriões bovinos em período de pré-implantação utilizam os estoques de folato armazenados pelos oócitos durante a maturação para síntese de bases nitrogenadas, demonstrando a importância da presença de ácido fólico durante a maturação *in vitro* dos oócitos ou na dieta materna.

Apesar de não haver relatos na literatura sobre possíveis efeitos negativos relacionados à exposição de embriões sob determinadas concentrações de ácido fólico, MIKAEL et al. (2013) demonstraram que, em camundongos, o aumento na ingestão de ácido fólico pode estar relacionada à problemas durante o início do desenvolvimento embrionário.

Com os dados obtidos na produção embrionária dos três tratamentos realizados (10, 30 e 100µM de ácido fólico), foi possível observar que o ácido fólico atua na maturação oocitária influenciando nas taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos, uma vez que 10µM de ácido fólico parece ser benéfico à maturação de oócitos menos competentes (grau III), enquanto 100µM reduziu a produção de embriões provenientes de oócitos de maior qualidade

(grau I). Estes resultados abrem novas perspectivas em relação ao uso do ácido fólico como um importante elemento no processo de maturação de oócitos bovinos, servindo de base para os próximos passos no aprimoramento da técnica.

Com o intuito de obter resultados mais robustos, somaram-se aos dados de produção embrionária as análises de biologia molecular, na tentativa de entender onde e como o ácido fólico atua durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, avaliando os níveis de expressão de genes importantes para o desenvolvimento, como o *IGF2* e *LIT1*, ambos genes que sofrem *imprinting* e apresentam expressão monoalélica paterna.

Em mamíferos, os genes que sofrem *imprinting* são bem conservados, sendo fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do embrião. Depois que o mecanismo de *imprinting* é estabelecido no gameta (reprogramação epigenética dos gametas), deve ser mantido até o momento da fertilização, passando, durante o início do desenvolvimento embrionário, por um novo período de reprogramação epigenética (REIK et al., 2001; YANG et al., 2007; ABRAMOWITZ; BARTOLOMEI, 2012).

O entendimento das relações existentes entre a maturação oocitária e os níveis de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário podem auxiliar no aperfeiçoamento das técnicas de reprodução assistida, resultando no aumento das taxas de sucesso (MOORE, 2001; GOOSENS et al., 2007; MURAKAMI et al., 2007). Componentes armazenados pelos oócitos, assim como aqueles disponíveis no meio de cultivo *in vitro*, possuem uma grande influência sobre os processos que ocorrem durante o início do desenvolvimento embrionário, sendo capazes de interferir na regulação de mecanismos epigenéticos, dentre eles o *imprinting* genômico, podendo acarretar em alterações na expressão gênica (KOHDA; ISHINO, 2012; O'NEILL, 2015).

O gene *IGF2*, que sofre *imprinting* materno, é importante no controle do crescimento fetal e seu nível de expressão aumenta no decorrer do desenvolvimento embrionário (MOORE, 2001; HAN et al., 2003). FAGUNDES et al. (2011) demonstraram que oócitos em diferentes graus, apresentam variações nos padrões de metilação deste gene, possibilitando o uso desta medida como um marcador molecular para avaliar a qualidade de oócitos bovinos.

Por possuir expressão monoalélica, o nível de transcrito do gene *IGF2* em embriões de sete dias (blastocistos) é baixo, e pode ser detectado por técnicas como RT-qPCR apenas quando as amostras são formadas por *pools* com mais de 5 embriões (KAWASE et al., 2000). No entanto, quando *pools* contendo 10 blastocistos expandidos foram avaliados por meio de RT-qPCR não foi possível detectar a expressão do gene *IGF2* (MIRANDA-FURTADO, 2012), devido à baixa expressão deste gene em embriões neste estágio ou à reduzida

quantidade de material genético. Conforme o feto desenvolve-se a expressão gênica do *IGF2* aumenta, podendo ser detectada com maior facilidade, inclusive em pequenas amostras de tecidos como fígado, rins e pulmão (KAWASE et al., 2000; HORI et al., 2010).

Todas as amostras analisadas neste trabalho continham material genético de *pools* de cerca de 12 blastocistos expandidos e, apenas em nove das 36 amostras (25% do total) foram detectadas a expressão do gene *IGF2*. Destas nove amostras, oito eram de embriões provenientes de oócitos grau I, que são aqueles oócitos considerados mais competentes, devido, entre outras características, ao fato de possuírem ooplasma homogêneo e várias camadas de células do *cumulus* compactas (BALL et al., 1983; TANGHE et al., 2003 ; BONI, 2012; BAKRI et al., 2016). Embora possa ser observada uma relação entre a expressão do gene *IGF2* e o grau do oócito, com a detecção majoritariamente em embriões de oócito grau I, não foi encontrada uma relação entre a expressão do gene *IGF2* e a presença de ácido fólico no meio de maturação.

A presença de oócitos grau I auxilia a maturação *in vitro* de oócitos de menor qualidade (graus II e III) e, um maior número de oócitos por microgota também é considerado benéfico à maturação dos oócitos menos competentes. Provavelmente, este resultado é devido à presença de um maior número de células de *cumulus* provenientes dos oócitos grau I que atuam protegendo e retirando substâncias tóxicas que acumulam no meio durante a maturação oocitária (KHUMARA; NIEMANN, 2000; BOLS, 2012).

No entanto, o co-cultivo de oócitos diferentes pode ser relacionado à maior dificuldade em detectar a expressão do *IGF2*, visto que, como apresentado neste trabalho, a detecção de expressão deste gene em *pools* de embriões provenientes de oócitos grau I ocorreu em maior frequência (oito amostras) do que quando analisado *pools* de embriões provenientes de oócitos grau III (uma amostra). Talvez, isto seja devido à menor expressão do *IGF2* em embriões provenientes de oócitos grau III.

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos que relacionam o *IGF2* com o ácido fólico, sendo que a maioria deles estuda as alterações nos níveis de metilação deste gene, como por exemplo a hipometilação da H19DMR quando ocorre ingestão de ácido fólico antes e durante a gestação (HOYO et al., 2011) ou um possível aumento da expressão gênica devido à diminuição dos níveis de metilação quando ácido fólico é injetado em ovos de galinha (LIU et al., 2016).

O segundo gene com expressão avaliada foi o *LIT1*. Assim como o *IGF2*, ele sofre *imprinting* e possui expressão monoalélica paterna (DeBAUN et al., 2003; MURAKAMI et al., 2007). Alterações epigenéticas neste gene são frequentemente relacionadas com o

desenvolvimento da síndrome Beckwith-Wiedemann (BWS) e as TRAs em humanos. Crianças concebidas por meio de tecnologias de reprodução assistida possuem uma maior probabilidade de apresentarem alterações nos níveis de metilação e expressão desta região, acarretando em maiores chances de desenvolvimento de BWS (DeBAUN et al., 2002, 2003).

A síndrome do bezerro grande (do inglês *Large offspring syndrome*, LOS) é uma desordem epigenética que acomete ruminantes como bovinos e ovinos. Esta síndrome é fenotipicamente e geneticamente similar à BWS (YOUNG et al., 1998; CHEN et al., 2013). Assim como a BWS, a taxa de desenvolvimento da LOS aumenta significativamente quando os gametas ou embriões são submetidos à alguma técnica de reprodução assistida, seja ovulação da fêmea para coleta de oócitos ou PIVE (CHEN et al., 2013; HAJJ; HAAF, 2013; FAIR, 2016). O estudo desta região gênica utilizando bovinos como modelo animal, principalmente em relação aos genes que sofrem *imprinting* e demais alterações epigenéticas, podem ajudar a compreender a etiologia das síndromes de *imprinting* em humanos como a BWS (CHEN et al., 2013).

Diferente do observado na quantificação do gene *IGF2*, em todas as 36 amostras de embriões, independentemente do tratamento e origem do oócito, foi detectada a expressão do gene *LIT1*, tanto nos embriões provenientes de oócitos grau I quanto nos provenientes de oócitos grau III. No entanto, não foi observada diferença em nenhum dos três tratamentos com ácido fólico (10, 30 e 100µM) (Tabela 14).

Estes resultados mostram que, mesmo baixa, a expressão do gene *LIT1* é detectável em blastocistos expandidos, independentemente da origem oocitária dos embriões e da presença ou não de ácido fólico. Resultados que vão de acordo com a literatura disponível, onde são encontrados níveis detectáveis de expressão dos genes *KCNQ1* e seu anti-sense *LIT1* logo no início do desenvolvimento embrionário, a partir do estágio de duas células (LEWIS et al., 2006; GREEN et al., 2007).

Grande parte das crianças concebidas pelas TRAs que desenvolvem BWS apresentam padrão anormal de metilação em regiões com *imprinting* materno, principalmente hipometilação da KvDMR1, sugerindo que o padrão de metilação do genoma materno pode ser afetado pelos procedimentos de reprodução assistida (ROSSIGNOL et al., 2006; HAJJ; HAAF, 2013). Alterações semelhantes nos níveis de metilação do alelo materno da região da KvDMR1 foram encontradas em fetos bovinos concebidos por reprodução assistida, como a perda de metilação desta região (CHEN et al., 2013). Isto demonstra que o uso de técnicas de reprodução assistida em animais de grande porte, como bovinos, podem causar alterações

epigenéticas semelhantes às observadas em embriões humanos concebidos por reprodução assistida.

Com os resultados da expressão do gene *LIT1* a segunda hipótese do trabalho foi refutada, uma vez que diferentes concentrações de ácido fólico durante a maturação *in vitro* dos oócitos não teve influência na expressão gênica. Embora o uso do ácido fólico tenha influenciado as taxas de produção de blastocistos, não pôde ser feita uma relação entre a expressão deste gene e a produção *in vitro* de embriões. Em relação ao gene *IGF2*, a hipótese não pôde ser corroborada ou refutada, já que a análise estatística deste gene não foi realizada devido às poucas amostras nas quais houve detecção da expressão.

Curiosamente, com exceção de uma amostra, todas as outras que apresentaram expressão do gene *IGF2* eram de embriões provenientes de oócitos grau I. Esta diferença entre os oócitos graus I e III ainda não foi descrita na literatura, tornando-se um dos principais achados do trabalho, podendo ser relacionada com as diferenças morfológicas já descritas entre os oócitos graus I e III (LEIBFRIED; FIRST, 1979; de LOSS et al., 1989; BONI, 2012; BAKRI et al., 2016).

De maneira geral, nota-se que a adição de ácido fólico pode influenciar tanto positivamente quanto negativamente na PIVE bovinos, dependendo da concentração adicionada e do tipo de oócito utilizado (graus I ou III). No entanto, a influência positiva ou negativa do tratamento observada na produção não é devido à alterações na expressão dos genes *IGF2* e *LIT1*.

A adição de ácido fólico durante a maturação oocitária parece ser uma estratégia promissora para o aumento da produção embrionária, no entanto, novas análises moleculares são necessárias para compreender melhor o que ocorre durante as etapas de PIVE, com o intuito de descobrir como e onde atua o ácido fólico.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O ácido fólico influencia a produção *in vitro* de embriões bovinos quando adicionado durante a maturação oocitária.

Oócitos morfollogicamente diferentes possuem taxas de produção embrionária diferentes, além de responderem de maneira oposta à adição de determinadas concentrações de ácido fólico.

A adição de 10 μ M de ácido fólico melhorou as taxas de produção embrionária em oócitos de pior qualidade e menor competência, como os oócitos GIII.

A adição de 100 μ M influenciou negativamente as taxas de produção embrionária em oócitos considerados morfollogicamente mais competentes, os oócitos GI.

A presença de diferentes concentrações (10, 30 ou 100 μ M) de ácido fólico não influenciou a expressão do gene *LIT1*, independentemente da origem oocitária.

O gene *IGF2* foi expresso em 25% dos embriões analisados. Com exceção de uma, todas as amostras que apresentaram a expressão do *IGF2* eram provenientes de oócitos grau I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWITZ, L.K.; BARTOLOMEI, M.S. Genomic *imprinting*: recognition and marking of imprinted loci. **Genetics and Development**. v. 22, p.72-78. 2012.

AGER, E.I.; PASK, A.J.; GEHRING, H.M.; SHAW, G.; RENFREE, M.B. Evolution of the CDKN1C-KCNQ1 imprinted domain. **BMC Evolutionary Biology**. v. 8, n. 163, p. 1-14. 2008.

ANCKAERT, E.; ROMERO, S.; ADRIAENSSENS, T.; SMITZ, J. Effects of low methyl donor levels in culture medium during mouse follicle culture on oocyte *imprinting* establishment. **Biology of Reproduction**. v. 83, p. 377-386. 2010.

ANCKAERT, E.; FAIR, T. DNA methylation reprogramming during oogenesis and interference by reproductive technologies: Studies in mouse and bovine models. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 27, p. 739-754. 2015

ANGULO, L.; PERREAU, C.; LAKDARI, N.; UZBEKOV, R.; PAPILLIER, P.; FRERET, S.; CADORET, V.; GUYADER-JOLY, C.; ROYERE, D.; PONSART, C.; OZBEKOVA, S.; DALBIES-TRAN, R. Breast cancer anti-estrogen resistance 4 (BCAR4) encodes a novel maternal-effect protein in bovine and is expressed in the oocyte of humans and others non-rodent mammals. **Human Reproduction**. v. 28, n. 2, p. 430-441. 2013.

ARIMA, T.; KAMIKIHARA, T.; HAYASHIDA, T.; KATO, K.; INOUE, T.; SHIRAYOSHI, Y.; OSHIMURA, M.; SOEJIMA, H.; MUKAI, T.; WAKE, N. *ZAC*, *LIT1* (*KCNQ1OT1*) and *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nucleic Acids Research**. v. 33, n. 8, p. 2650-2660. 2005.

BALL, GD; LEIBFRIED, ML; LENZ, RW; AX, RL; BAVISTER, BD; FIRST, NL. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 28, p. 717-725. 1983.

BAKRI, N.M.; IBRAHIM, S.T.; OSMAN, N.A.; HASAN, N.; JAFFAR, F.H.F.; RAHMAN, Z.A.; OSMAN, K. Embryo apoptosis identification: Oocyte grade or cleavage stage?. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 23, p. 50-55. 2016.

BELL, A.C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**. v. 405, p. 482-485. 2000.

BILODEAU-GOESELL, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 7, p. 143-155. 2002.

BOLS, P.E.J.; GOOVAERTS, I.G.F.; JORSSSEN, E.P.A.; PETRO, E.M.L.; LANGBEEN, A.; LEROY, J.L.M.R. New applications for bovine IVP technology: from 'single oocyte culture' to toxicity screening. **Animal Reproduction**. v. 9, n. 3, p. 388-394. 2012.

BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 836-842. 2002.

BONI, R. Origins and effects of oocyte quality in cattle. **Animal Reproduction**. v. 9, n. 3, p. 333-340. 2012

BOXMEER, J.C.; MONTSERRATE BROUNS, R.; LINDEMANS, J.; STEEGERS, E.A.P.; MARTINI, E.; MACKLON, N.S.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. **Fertility and Sterility**. v. 89, n. 6, p. 1766-1770. 2008.

CANOVAS, S.; IVANOVA, E.; ROMAR, R.; GARCÍA-MARTÍNEZ, S.; SORIANO-ÚBEDA, C.; GARCÍA-VÁSQUEZ, F.A.; SAADEH, H.; ANDREWS, S.; KELSEY, G.; COY, P. DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. **Developmental Biology and Stem Cells**. 2017. DOI: 10.7554/eLife.23670.

CHEN, Z.; ROBBINS, K.M.; WELLS, K.D.; RIVERA, R.M. Large offspring syndrome. A bovine model for the human loss-of-*imprinting* overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics**. v. 8, n. 6, p. 591-601. 2013

COSTA, E.B.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Seminários: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**. v. 34, n. 2, p. 125-136. 2013.

CZEIZEL, A.E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **The New England Journal of Medicine**. v. 327, n. 26, p. 1832- 1835. 1992.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **PNAS**. v. 98, n. 24, p. 13734-13738. 2001.

DeBAUN, M.R.; NIEMITZ, E.L.; McNEIL, D.E.; BRANDENBURG, S.A.; LEE, M.P.; FEINBERG, A.P. Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. **American Journal of Human Genetic**. v. 70, p. 604-611. 2002.

DeBAUN, M.R.; NIEMITZ, E.L.; FEINBERG, A.P. Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. **American Journal of Human Genetics**. v. 72, p. 156-160. 2003.

DOBBS, K.B.; RODRIGUEZ, M.; SUDANO, M.J.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. **Plos One**. v. 8, n. 6, p. 1-10. 2013.

FAGUNDES, N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; CAIXETA, E.S.; MACHADO, G.M.; RODRIGUES, F.C.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the *IGF2* locus in *Bos Taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**. v. 17, n. 2, p. 85-91. 2011.

FAIR, T. DNA methylation dynamics during oocyte and embryo development and its association with environmental induced alterations. **Animal Reproduction**. v. 13, n. 3, p. 250-256. 2016.

FENG, W.G.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; CHANG, Z.L.; ZHOU, P.; LIU, D.J.; BAO, S.; TAN, J.H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. **Theriogenology**. v. 67, p. 1339-1350. 2007.

FOWDEN, A.L.; SIBLEY, C.; REIK, W.; CONSTANCIA, M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. **Hormone Research**. v. 65, p. 50-58. 2006. Supplemented 3.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 9ª edição. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 711p. 2010.

GILBERT, I.; MACAULAY, A.; ROBERT, C. Oocyte competence and embryo quality: distinction and new perspectives. **Animal Reproduction**. v. 12, n. 3, p. 397-407. 2015.

GONÇALVES, PBD; BARRETA, MH; SIQUEIRA, LC; ANTONIAZZI, AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v. 11, p. 135-138. 2008.

GONÇALVES, R, F.; FERREIRA, M.S.; OLIVEIRA, D.N.; CANEVAROLO, R.; ACHILLES, M.A.; DÉRCOLE, D.; BOLS, P.E.; VISITIN, J.A.; KILIAN, G.J.; CATHARINO, R.R. Analysis and characterization of bovine oocyte and embryo biomarkers by matrix-assisted desorption ionization mass spectrometry imaging. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 28, p. 293-301. 2016.

GOODALL, J.J.; SCHMUTZ, S.M. *IGF2* gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. **Animal Genetics**. v. 38, p. 154-161. 2007.

GOOSENS, K.; SOOM, A.V.; POUCKE, M.V.; VANDALE, L.; VANDESOMPELE, J.; ZEVEREN, A.V.; PEELMAN, L.J. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Developmental Biology**. v. 7, n. 64, p. 1-12. 2007.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94. 2009.

GREEN, K.; LEWIS, A.; DAWSON, C.; DEAN, W.; REINHART, B.; CHAILLET, J.R.; REIK, W. A developmental window of opportunity for imprinted gene silencing mediated by DNA methylation and *Kcnq1ot1* noncoding RNA. **Mammalian Genome**. v. 18, p. 32-42. 2007.

GRUPEN, C.G. The evolution of porcine embryo *in vitro* production. **Theriogenology**. v. 81, p. 24-37. 2014.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª edição. São Paulo: Manole. 2004. 513p.

HAN, D.W.; SONG, S-J.; UHUM, S.J.; DO, J-T.; KIM, N-H.; CHUNG, K-S.; LEE, H.T. Expression of *IGF2* and *IGF* receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. **Zygote**. v. 11, p. 245-252. 2003.

HAJJ, N.; HAAF, T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. **Fertility and Sterility**. v. 99, n. 3, p. 632-641. 2013.

HAVLICEK, V.; WETSCHER, F.; HUBER, T.; BREM, G.; MUELLER, M.; BESENFELDER, U. *In vivo* culture of IVM/IVF embryos in bovine oviducts by transvaginal endoscopy. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 52, p. 94-98. 2005.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**. v. 41, p. 1571-1583. 1994.

HIRASAWA, R.; CHIBA, H.; KANEDA, M.; TAJIMA, S.; LI, E.; JAENISCH, R.; SASAKI, H. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. **Genes and Development**. v. 22, p. 1607-1616. 2008.

HOEIJMAKERS, L.; KEMPE, H.; VERSCHURE, P.J. Epigenetic *imprinting* during assisted reproductive technologies: The effect of temporal and cumulative fluctuations in methionine cycling on the DNA methylation state. **Molecular Reproduction and Development**. v. 83, p. 94-107. 2016.

HORI, N.; NAGAI, M.; HIRAYAMA, M.; HIRAI, T.; MATSUDA, K.; HAYASHI, M.; TANAKA, T.; OZAWA, T.; HORIKE, S. Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome. **Animal Reproduction Science**. v. 122, p. 303-312. 201.

HORIKE, S.; MITSUYA, K.; MEGURO, M.; KOTOBUKI, N.; KASHIWAGI, A.; NOTSU, T.; SCHULZ, T.C.; SHIRAYOSHI, Y.; OSHIMURA, M. Targeted disruption of the human *LIT1* locus defines a putative *imprinting* control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Human Molecular Genetics**. v. 9, n. 14, p. 2075-2083. 2000.

HOYO, C.; MURTHA, A.P.; SCHILDKRAUT, J.M.; JIRTLE, R.; DEMARK-WAHNEFRIED, W.; FORMAN, M.R.; IVERSEN, E.S.; KURTZBERG, J.; OVERCASH, F.; HUANG, Z.; MURPHY, S.K. Methylation variation at *IGF2* differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy. **Epigenetics**. v. 6, n. 7, p. 928-936. 2011.

HUANG, X.; GAO, S.; XIA, W.; HOU, S.; WU, K. Folic acid facilitates *in vitro* maturation of mouse and *Xenopus laevis* oocytes. **British Journal of Nutrition**. v. 109, p. 1389-1395. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2016). **Rebanho bovino alcança 215,2 milhões de cabeças em 2015**. Acessado em brasil.gov.br em 17/04/2017.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. (2016). **2015 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals**. Annual report. 2016.

JIANG, Z.; DONG, H.; ZHENG, X.; MARJANI, S.L.; DONOVAN, D.M.; CHEN, J.; TIAN, X.C. mRNA levels of imprinted genes in bovine *in vivo* oocytes, embryos and cross species comparisons with humans, mice and pigs. **Scientific Reports**. v. 5, p. 1-10. 2015. DOI: 10.1038/srep17898

KAWASE, Y.; MORIKI, A.; MINATO, Y.; HAMANO, S.; MATSUKAWA, K.; KONO, T. Analysis of *IGF2* and *IGF2R* genes expression by RT-PCR in bovine fetuses. **Journal of Mammalian Ova Research**. v.17, p. 124-127. 2000.

KILIAN, J.K.; BYRD, J.C.; JIRTLE, J.V.; MUNDAY, B.L.; STOSKOPF, M.K.; MACDONALD, R.G.; JIRTLE, R.L. *M6P/IGF2R* Imprinting evolution in mammals. **Molecular Cell**. v. 5, p. 707-716. 2000.

KIM, T.H., ABDULLAEV, Z.K., SMITH, A.D., CHING, K.A., LOUKINOV, D.I., GREEN, R.D., ZHANG, M.Q., LOBANENKIV, V.V., REN, B. (2007). **Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF binding sites in the human genome**. *Cell*. 128: 1231-1245.

KIM, E.S.; SEO, J.S.; EUM, J.H.; LIM, J.E.; KIM, D.H.; YOON, T.K.; LEE, D.R. The effect of folic acid on *in vitro* maturation and subsequent embryonic development of porcine immature oocytes. **Molecular Reproduction Development**. v. 76, p. 120-121. 2009.

KIM, K.; FRISO, S.; CHOI, S. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **Journal of Nutrition and Biochemistry**. v. 20, n. 12, p. 917-926. 2009b.

KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 918-926. 2001.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 54, p. 741-756. 2000.

KOHDA, T.; ISHINO, F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 2012. DOI: 10.1098/rstb.2012.0353

KOOISTRA, M.; TRASLER, J.M.; BALTZ, J.M. Folate transport in mouse cumulus-oocyte complexes and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**. v. 89, n. 63, p. 1-9. 2013.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**. v. 85, p. 1167-1176. 2016.

KWONG, W.Y.; ADAMIAK, S.J.; GWYNN, A.; SINGH, R.; SINCLAIR, K.D. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarioan follicle, oocyte and pre-implantation embryo. **Reproduction**. v. 139, p. 705-715. 2010.

LAMBROT, R.; XU, C.; SAINT-PHAIR, S.; CHOUNTALOS, G.; COHEN, T.; PAQUET, M.; SUDERMAN, M.; HALLET, M.; KIMMINS, S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. **Nature Communications**. 2013. DOI: 10.1038/ncomms3889.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. (1979). **Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro***. Journal of Animal Science. 49: 76-86.

LEWIS, A.; REIK, W. How imprinting centres work. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 113, p. 81-89. 2006.

LEWIS, A.; GREEN, K.; DAWSON, C.; REDRUP, L.; HUYNH, K.D.; LEE, J.T.; HEMBERGER, M.; REIK, W. Epigenetic dynamics of the *Kcnq1* imprinted domain in the early embryo. **Development**. v. 133, p. 4203-4210. 2006.

LIU, Y.; ZHI, L.; SHEN, J.; LI, S.; YAO, J.; YANG, X. Effect of *in ovo* folic acid injection on hepatic *IGF2* expression and embryo growth of broilers. **Journal of Animal Science Biotechnology**. v. 7, n. 40, p. 1-9. 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n. 4, p. 402-408. 2001.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYNE, A.M., KINGSTON, M., WADE, M., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**. v.126, p. 337-346. 2003a.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZÁDAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 259-267. 2003b.

de LOSS, F.; van VILET, C.; van MAURIK, P.; KRUIP, Th.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**. v. 24, p. 197-204. 1989.

MA, Y.; ZHANG, C.; GAO, Z-G.; LUO, H-Y.; CHEN, Y.; LI, H.; MA, X.; LU, C-L. Folic acid protects against arsenic-mediated embryo toxicity by up-regulating the expression of *Dvr1*. **Scientific Reports**. v. 5, p. 1-14. 2015. DOI: 10.1038/srep16093.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 82, n. 83, p. 13-20. 2004.

- MIKAEL, L.G.; DENG, L.; PAUL, L.; SELHUB, J.; ROZEN, R. Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development. **Birth Defects Research**. v. 97, p. 47-52. 2013.
- MIORANZA, A. **Estudo *in silico* de elementos regulatórios do genoma e análise do padrão de metilação no DNA de embriões bovinos produzidos por fertilização *in vitro* e clonagem**. 2014. 160f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- MIRANDA-FURTADO, C.L. **Estudos das regiões controladoras de imprinting 1 e 2 em oócitos, embriões e placentas de primeiro trimestre**. 2012. 103f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- MITSUYA, K.; MEGURO, M.; LEE, M.P.; KATOH, M.; SCHULZ, T.C.; KUGOH, H.; YOSHIDA, M.A.; NIIKAWA, N.; FEINBERG, A.P.; OSHIMURA, M. *LIT1*, an imprinted antisense RNA in the human *KvLQT1* locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. **Human Molecular Genetics**. v. 8, n. 7, p. 1209-1217. 1999.
- MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**. v. 14, p. 47-58. 2005.
- MOORE, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. **Reproduction**. v. 122, p. 185-193. 2001.
- MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X.H.; ZENG, F. Maternal control of oocytes quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**. v. 155, p. 11-27. 2015.
- MOSS, T.J.; WALLRATH, L.L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**. v. 618, p. 163-174. 2007.
- MURAKAMI, K.; OSHIMURA, M.; KUGOH, H. Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted *LIT1*. **Journal of Human Genetic**. v. 52, p. 926-933. 2007.
- MURREL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. **Nature Genetics**. v. 36, p. 889-893. 2004.
- O'DOHERTY, A.M.; MAGEE, D.A.; O'SHEA, L.C.; FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; MAMO, S.; FAIR, T. DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-implantation embryo development. **BMC Developmental Biology**. v. 15, n. 13, p. 1-12. 2015.
- O'NEILL, C. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. **Human Reproduction**. v. 13, n. 5, p. 1312-1316. 1998.
- O'NEILL, M.J. The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. **Human Molecular Genetics**. v. 14, p. 113-120. 2005.

O'NEILL, C. The epigenetics of embryo development. **Animal Frontiers**. v. 5, n. 1, p. 42-49. 2015. DOI: 10.2527/af.2015-0007.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, n. 9, p. 2002-2007. 2001.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBINS, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. v. 75, p. 1640-1646. 2011.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**. v. 2, p. 21-32. 2001.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Science**. v. 239, p. 1089-1092. 2001.

RIOS, A.F.L.; LEMOS, D.C.; FERNANDES, M.B.; ANDREA, M.V.; GOMES, M.V.M.; LÔBO, R.B.; MAZUCATO, M.; RAMOS, E.S. Expression of the *CTCF* gene in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Genetics and Molecular Biology**. v. 30, n. 4, p. 1202-1205. 2007.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 43, p. 44-50. 2008. Supplemented 4.

ROBBINS, K.M.; CHEN, Z.; WELLS, K.D.; RIVERA, R.M. Expression of *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *H19*, and *PLAGL1* and the methylation patterns at the KvDMR1 and *H19/IGF2* imprinting control regions is conserved between human and bovine. **Journal of Biomedical Science**. v. 19, n. 65, p. 1-10. 2012.

ROSS, J.P.; CANOVAS, S. Mechanisms of epigenetic remodeling during preimplantation development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 25-40. 2016.

ROSSANT, J.; TAM, P.P.L. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**. v. 136, p. 701-713. 2009.

ROSSIGNOL, S.; STEUNOU, V.; CHALAS, C.; KERJEAN, A.; RIGOLET, M.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; JOUANNET, P.; LE BOUC, Y.; GICQUEL, C. The epigenetic *imprinting* defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restrict to the 11p15 region. **Journal of Medical Genetic**. v. 43, p. 902-907. 2006.

SALILEW-WONDIM, D.; FOURNIER, E.; HOELKER, M.; SAEED-ZIDANE, M.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; NEUHOFF, C.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; et al. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed *in vivo* from embryos completed different stages of development *in vitro*. **Plos One**. v. 10, n. 11, p. 1-31. 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0140467.

- SATO, D.; SAKURAI, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Supplementation of maturation medium with folic acid affects DNA methylation of porcine oocytes and histone acetylation of early developmental stage embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**. v. 30, n. 3, p. 109-116. 2013.
- SCANAVEZ, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 65, n. 3, p. 722-728. 2013.
- SIRARD, M.A. The influence of *in vitro* fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**. 2017. DOI: 10.1017/s2040174417000125.
- SMALLWOOD, S.A.; KELSEY, G. *De novo* DNA methylation: a germ cell perspective. **Cell Press**. v. 28, n. 2, p. 33-42. 2012.
- SMITH, F.M.; GARFIELD, A.S.; WARD, A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 113, p. 279-291. 2006.
- SMITH, L.C.; THERRIEN, J.; FILION, F.; BRESSAN, F.; MEIRELLES, F.V. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes *SNRPN*, *H19/IGF2* and *IGF2R*. Mini Review. **Frontiers in Genetics**. v. 6, n. 58, p. 1-6. 2015.
- SMITHELLS, R.W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C.J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Archives of Disease in Childhood**. v. 51, p. 944-950. 1976.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; OBERMANN-BORST, S.A.; KREMER, D.; LINDEMANS, J.; SIEBEL, C.; STEEGERS, E.A.; SLAGBOOM, P.E.; HEIJMANS, B.T. Periconceptional maternal folic acid use of 400µg per day is related to increased methylation of the *IGF2* gene in the very young child. **PlosOne**. v. 4, n. 11, p. 1-5. 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007845.
- STROEBECH, L.; MAZZONI, G.; PEDERSEN, H.S.; FREUDE, K.K.; KADARMIDEEN, H.N.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Animal Reproduction**. v.12, n. 3, p. 465-472. 2015.
- SUZUKI, J.; THERRIEN, J.; FILION, F.; LEFEBVRE, R.; GOFF, A.K.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V. Loss of methylation at *H19* DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**. v. 84, p. 947-956. 2011.
- SZYMANSKI, W.; KAZDEPKA-ZIEMINSKA, A. ABSTRACT. Effect of homocysteine concentration in follicular fluido n a degree of oocyte maturity. **Ginekologia Polska**. v. 74, n. 10, p. 1392-1396. 2003.
- TAMURA, T.; PICCIANO, M.F. Folate and human reproduction. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 83, p. 993-1016. 2006.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; MEHRZAD, J.; MAES, D.; DUCHATEAU L.; KRUIF, A. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. **Theriogenology**. v. 60, p. 135-149. 2003

TAWATAO, K.M.; MANAOIS II, F.V.; OCAMPO, L.C.; OCAMPO, M.B. Folic acid supplementation for bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Journal of Agricultural Technology**. v. 11, n. 8, p. 2401-2409. 2015.

THORVALDSEN, J.L.; DURAN, K.L.; BARTOLOMEI, M.S. Deletion of the *H19* differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of *H19* and *Igf2*. **Genes and Development**. v. 12, p. 3693-3702. 1998.

TIAN, X.C. Genomic *imprinting* in farm animals. **Annual Review of Animal Biosciences**. v. 2, n. 10, p. 1-18. 2014.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics**. v. 9, n. 6, p. 803-815. 2014.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 32, n. 2, p. 100-109. 2008.

VELASQUEZ, A.E.; CASTRO, F.O.; VERAGUAS, D.; COX, J.F.; LARA, E.; BRIONES, M.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L. Splitting of IVP bovine blastocyst affects morphology and gene expression of resulting demi-embryos during *in vitro* culture and *in vivo* elongation. **Zygote**. v. 24, p. 18-30. 2014.

VERRUMA, C.G. **Efeito da substituição parcial do soro fetal bovino na produção de blastocisto e concentração lipídica em embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2014. 71f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

WADDIGTON, C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**. v. 150, n. 3811, p.563-565. 1942.

WADDIGTON, C.H. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**. v. 41, p. 10-13. 2012.

WALTON, S.; TAYLOR-ROBINSON, A.W. Improvements to *in vitro* culture media for use in bovine IVF. **Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry**. v. 4, n. 2, p. 1-6. 2016. DOI: 10.15744/2348-9790.4.205

WILKINS, J.F.; HAIG, D. What good is genomic *imprinting*: the function of parent-specific gene expression. **Nature Reviews**. v. 4, p. 1-10. 2003.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro*

procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 23-35. 2005.

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J-P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**. v. 39, n. 3, p. 295-302. 2007.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. **Large offspring syndrome in cattle and sheep. Reviews of Reproduction**. v. 3, p. 155-163. 1998.

ZHANG, S.; KUBOTA, C.; YANG, L.; ZHANG, Y.; PAGE, R.; O'NEILL, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Genomic *imprinting H19* in naturally reproduced and cloned cattle. **Biology of Reproduction**. v. 71, p. 1540-1544. 2004.

ZHANG, S.; WANG, F.; FAN, C.; TANG, B.; ZHANG, X.; LI, Z. Dynamic changes of histone H3 lysine 9 following trimethylation in bovine oocytes and pre-implantation embryos. **Biotechnologies letters**. 2015. DOI: 10.1007/s10529-015-2001-3.

ANEXOS**Anexo 1 – Estoque FIV**

Componentes	(/100mL de H₂O)
NaCl	0,6660g
KCl	0,0240g
MgCl₂.6H₂O	0,0100g
NaH₂PO₄	0,0041g
NaHCO₃	0,2100g
CaCl₂.2H₂O	0,0300g
Lactato Na 60%	143µL
Vermelho Fenol	0,0010g

Anexo 2 – TALP Sêmen

Componentes	(/100mL de H₂O)
NaCl	0,5820g
KCl	0,0230g
MgCl₂.6H₂O	0,0080g
NaH₂PO₄	0,0035g
NaHCO₃	0,2100g
CaCl₂.2H₂O	0,0300g
Lactato Na 60%	310µL
Vermelho Fenol	0,0010g
Hepes	0,2380g

Anexo 3 – Estoque CR2

Componentes	(/100mL de H₂O)
NaCl	0,6300g
KCl	0,0220g
NaHCO₃	0,2080g
Hemicálcio lactato	0,0550g
Piruvato	0,0425g
BME	2,0mL
MEM	1,0mL
L-glutamina	0,0005g
Penicilina	0,0064g
Estreptomicina	0,0100g
Vermelho Fenol	0,0005g