

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

**Domínios ICRs 1 e 2 de bovinos no período pré-implantação:
expressão, perfil da metilação do DNA e suas associações com a
reprogramação epigenética**

CAROLINA GENNARI VERRUMA

**Ribeirão Preto
2022**

CAROLINA GENNARI VERRUMA

**Domínios ICRs 1 e 2 de bovinos no período pré-implantação:
expressão, perfil da metilação do DNA e suas associações com a
reprogramação epigenética**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Professora Dra. Ester Silveira
Ramos

**Ribeirão Preto
2022**

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

Domínios ICRs 1 e 2 de bovinos no período pré-implantação: expressão, perfil da metilação do DNA e suas associações com a reprogramação epigenética

142p. il.; 30cm

Tese (Doutorado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Genética

Orientadora: Professora Dra. Ester Silveira Ramos

1. Produção *in vitro* de embriões; 2. Reprogramação epigenética; 3. *Imprinting* genômico; 4. ICRs; 5. Desenvolvimento embrionário; 6. Modelos animais.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio 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

DOMÍNIOS ICRS 1 E 2 DE BOVINOS NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO:
EXPRESSÃO, PERFIL DA METILAÇÃO DO DNA E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM A REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA

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

BANCA EXAMINADORA

Data da defesa: __ / __ / __

Prof. Dra. Ester Silveira Ramos

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

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela vida e saúde em tempos tão difíceis.

À **minha família**, em especial meus pais **Sérgio** e **Sylvia** e minha irmã **Marina** por todo apoio e suporte durante a caminhada na vida acadêmica.

À professora **Ester Silveira Ramos**, minha orientadora, por acreditar no meu potencial, ajudar a lapidar minhas ideias e dar suporte para desenvolver este trabalho. Por toda ajuda antes mesmo de eu ser oficialmente sua aluna. Obrigada por tudo.

À querida pesquisadora **Dra. Cristiana L. Miranda Furtado**, por se envolver no meu projeto e me ajudar sempre que eu precisei. Obrigada por abrir caminhos, pelas ideias, incentivos e amizade.

Ao **Reginaldo Ap. Vila**, técnico do laboratório, que desde 2012 acompanha minha vida acadêmica. No decorrer desses anos se tornou um grande amigo, dando conselhos, auxiliando meus experimentos, ouvindo meus temores e discutindo sobre diversos assuntos, além da ciência.

Ao pesquisador **Prof. Dr. Fabrício Álvaro Lopes Rios** por todo suporte na análise de bioinformática.

Ao professor **Flavio V. Meirelles**, por abrir seu laboratório e permitir que eu acompanhasse, aprendesse e realizasse experimentos.

Ao **Dr. Rafael Vilar Sampaio** e **Dr. Tiago H. Camara de Bem** por toda a paciência e ensinamentos no período que estive no Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP).

Aos integrantes do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, em especial os alunos **Renan da S. Santos** e **Sarah L. A. Sales**, por todo cuidado, suporte e atenção durante a realização do sequenciamento.

Aos meus amigos da **47ª turma da Biologia** da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Aos meus **amigos de Ribeirão Preto e Dourado** por se fazerem sempre presente, mesmo em tempos de pandemia.

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

Ao **frigorífico Barra Mansa** (Sertãozinho-SP), pela atenção e fornecimento dos ovários para realização dos experimentos. Agradeço também ao coletor **Leonardo** por todo serviço prestado, assim como dedicação e cuidado com o material coletado.

Ao **departamento de Genética da FMRP/USP** pelo apoio durante e suporte durante esse anos de mestrado e doutorado. Em especial à **Susie**, secretaria do programa de pós-graduação em Genética.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida – Código de Financiamento 001.

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.

*“Foi o tempo que dedicaste
à tua rosa que a fez tão importante”*
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

RESUMO

VERRUMA, C. G. **Domínios ICRs 1 e 2 de bovinos no período pré-implantação: expressão, perfil da metilação do DNA e suas associações com a reprogramação epigenética.** 2022. 142p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Durante o início do desenvolvimento embrionário, alguns momentos são fundamentais para o sucesso da gestação, como a reprogramação epigenética que ocorre ainda em período pré-implantacional e a correta regulação das regiões controladoras de *imprinting* (ICRs). Humanos e bovinos possuem duas ICRs denominadas H19DMR e KvDMR1 localizadas no cromossomo autossomo 11 e 29, respectivamente, que possuem alta similaridade e, alterações epigenéticas nestas regiões podem levar ao desenvolvimento de fenótipos e síndromes semelhantes em ambas as espécies. Portanto, é de suma importância entender a regulação dos genes controlados por essas ICRs, assim como o perfil de metilação do DNA. Uma ferramenta útil para avaliar esses processos é a produção *in vitro* de embriões. O objetivo deste trabalho foi avaliar a metilação da H19DMR e KvDMR1, e a expressão dos genes controlados por *imprinting* controlados por elas, assim como a expressão de genes relacionados ao controle da metilação, desmetilação do DNA e diferenciação celular durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial. Para tanto, foram coletados oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) antes e metáfase II (MII) após maturação *in vitro*. Embriões bovinos foram produzidos *in vitro* e diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados, dentre eles zigoto, embrião 4-células, 8-células, mórula e blastocistos expandidos (Bx). A expressão dos genes localizados na ICR1 (*H19* e *IGF2*) e na ICR2 (*CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*), assim como dos genes envolvidos na metilação (*DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*), desmetilação do DNA (*TET1*, *TET2* e *TET3*) e pluripotência (*OCT4* e *NANOG*) foram avaliadas utilizando RT-qPCR, enquanto a metilação da H19DMR e da KvDMR1 foi avaliada por sequenciamento de nova geração após conversão com bissulfato de sódio. A análise estatística do padrão de expressão gênica foi realizada utilizando teste ANOVA e *post-hoc* Tukey. Como esperado, a expressão dos genes localizados na H19DMR e KvDMR1 variaram durante a maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário. Os genes da família *DNMTs* e *TETs* também apresentaram variações na expressão nos estádios avaliados, além de apresentarem um padrão de expressão que está de acordo com a reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento embrionário. Os genes relacionados à pluripotência, *OCT4* e *NANOG*, apresentaram maior expressão em mórula, ou seja, no início da diferenciação celular nas duas primeiras linhagens celulares do embrião, a massa celular interna e trofotoderma. Além disso, *NANOG* não foi detectado em oócitos e em zigoto. A análise da H19DMR mostrou manutenção de hipermetilação em todos os estádios avaliados, com exceção de 8-células e mórula que estavam parcialmente metilados. Por outro lado, a KvDMR1 se manteve hipermetilada durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, com exceção do estágio de Bx que estava parcialmente metilado. Os resultados obtidos mostram que existe uma ampla variação na regulação dos genes controlados pelas ICRs. Por fim, os achados deste trabalho contribuem para o enriquecimento do conhecimento acerca da maturação oocitária e desenvolvimento pré-implantacional em bovinos.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões; Reprogramação epigenética; *Imprinting* genômico; ICRs; Desenvolvimento embrionário; Modelos animais.

ABSTRACT

ABSTRACT

VERRUMA, C. G. **Bovine ICRs 1 and 2 domains on preimplantation period: expression, DNA methylation profile and its associations with epigenetic reprogramming.** 2022. 142p. Thesis (PhD) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

During early embryo development, several moments are fundamental to the pregnancy success, as the epigenetic reprogramming that occurs during preimplantation development and the correct regulation of imprinting control regions (ICRs). Human and cattle have two ICRs denominated H19DMR and KvDMR1 on chromosome 11 and 29 respectively, that present high level of similarities and, epigenetics alterations in these regions leads to similar phenotypes on both species. Therefore, understand the regulation of genes controlled by these ICRs and its DNA methylation profile is of major importance. To study these moments, *in vitro* production (IVP) of embryos is a useful tool. In this study, we aimed to evaluate the H19DMR and KvDRM1 methylation and the expression of the imprinted genes controlled by them, as the expression of genes related to the control of DNA methylation and demethylation and cell differentiation on bovine oocytes and during early embryo development. During IVP, oocytes were collected before (germinal vesicle, or GV) and after (metaphase II, or MII) *in vitro* maturation and embryos were collected in five different stages during *in vitro* culture: single-cell, 4-cells, 8-cells, morula, and expanded blastocysts. The expression pattern was analyzed by qPCR on three different groups: imprinted genes (*IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* and *PHLDA2*), DNA methylation and demethylation genes (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *TET1*, *TET2* and *TET3*) and pluripotency genes (*OCT4* and *NANOG*). The H19DMR and KvDMR1 methylation were evaluated by next generation sequence after bisulfite DNA conversion. Statistical analysis was realized using ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test, considering a level of significance of 5%. As expected, the expression of the genes located on H19DMR and KvDMR1 changed during oocyte maturation and early embryo development. The *DNMTs* and *TETs* genes also presented alterations in their expression, in accordance with epigenetic reprogramming that occurs in early embryo development. The pluripotency genes, *OCT4* and *NANOG*, presented the higher expression level on morula stage, in accordance with the beginning of cell differentiation into inner cell mass and trophectoderm. The H19DMR analysis shown a hypermethylation maintenance in all evaluated stages, with exception of 8-cell and morula that were partially methylated. On the other hand, the KvDMR1 was hypermethylated during oocyte maturation and embryo development, with exception of blastocyst that was partially methylated. The results found in our study shown several alterations on expression pattern of genes controlled by ICRs 1 and 2. Finally, the data found in our study contributes to the knowledge enrichment concerning bovine oocyte maturations and embryo preimplantation development.

Keywords: *In vitro* production of embryos; Epigenetic reprogramming; Genomic imprinting; ICRs; Embryo development; Animal Model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reprogramação epigenética durante a maturação dos gametas e início do desenvolvimento embrionário. (A) Modelo animal murino mostrando a desmetilação e reestabelecimento das marcações epigenéticas das células germinativas primordiais (CGPs) durante sua migração para a crista gonadal. (B) Desmetilação do DNA embrionário que ocorre logo após a fertilização em bovinos. O material paterno sofre desmetilação ativa enquanto o materno sofre uma desmetilação passiva. Entre os estádios de 8 e 16 células ocorre uma metilação *de novo* e reestabelecimento das marcações epigenéticas até o estádio de blastocisto, onde são observadas duas linhagens celulares, a massa celular interna (MCI) e a trofotoderma (TE). A linha pontilhada (em roxo) representa os genes controlados por *imprinting* que não são afetados pela reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento. Fonte: Modificado de Reik; Dean e Walter (2001) e Yang et al., (2007).....31

Figura 2 - Metilação do DNA. Representação da adição do grupo metil (CH₃) ao quinto carbono do nucleotídeo citosina, seguida por uma guanina (CpG). A metilação do DNA só é possível graças à ação das enzimas da família DNA metiltransferase (DNMTs). Fonte: Modificado de Beayno et al., (2019)...33

Figura 3 - Representação do cromossomo 29 bovino onde são encontradas a H19DMR e a KvDMR1. Representação dos alelos materno e paterno, a interação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) e consequente expressão dos genes ali localizados. No alelo materno, ocorre o *imprinting* paterno quando a H19DMR não está metilada e o gene *H19* é expresso, enquanto na KvDMR1 ocorre a metilação do DNA e os genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *SLC22A18* e *PHLDA2* estão expressos (representados em rosa). No alelo paterno ocorre o contrário, *imprinting* materno, com *IGF2* e *KCNQ1OT1* (representados em azul) expressos na H19DMR e KvDMR1, respectivamente. Na H19DMR, a proteína insuladora CTCF influencia diretamente na expressão dos genes *H19* e *IGF2*. Fonte: Modificado de Hori et al., (2010); Verruma et al., (2021).....37

Figura 4 - Delineamento experimental. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....46

Figura 5 - Oócitos GI selecionados para maturação *in vitro* e coleta. (A) Oócitos GI com ooplasma homogêneo e mais de três camadas de células do cumulus. (B) Oócitos GI sem as células do cumulus após tratamento com hialuronidase. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....49

Figura 6 - Oócitos após maturação *in vitro*. (A) Oócito transferido para a fertilização *in vitro* com as células do cumulus expandidas em volta dele pós MIV. (B) Oócito selecionado para coleta após MIV já sem as células do cumulus; seta mostrando a extrusão do corpúsculo polar, indicativo de que a maturação ocorreu de maneira correta. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....50

Figura 7 - Classificação dos blastocistos de acordo com morfologia e expansão da blastocele. (A) Blastocisto inicial (Bi). (B) Blastocisto (Bl). (C) Blastocisto expandido (Bx). (D) Blastocisto eclodido (Be). Seta apontando o início da cavitação da blastocele. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....52

Figura 8 - Embriões nos cinco estádios escolhidos para análise. (A) Embriões de uma célula ou zigotos. (B) Embriões de 4-células. (C) Embriões de 8-células. (D) Mórulas. (E) Blastocistos expandidos. Aumento de 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....53

Figura 9 - Curva de *melting* dos genes avaliados. Análise da curva de *melting* demonstrando a especificidade dos *primers* utilizados. Os controles negativos estão representados nas linhas que não amplificaram durante a corrida. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....57

Figura 10 - Exemplo de amplificação dos genes avaliados, onde (A) gene *IGF2* em vermelho e *CDKN1C* em rosa; (B) gene *OCT4* em azul e *DNMT1* em verde; (C) gene *TET3* em verde e *NANOG* em azul; (D) gene *KCNQ1OT1* em azul claro, *H19* em verde e *KCNQ1* em azul escuro; (E) gene

DNMT3a em verde, *TET1* em rosa e *TET2* em vermelho; (F) gene *ACTB* em vermelho e *DNMT3b* em verde; (G) gene *GAPDH* em amarelo e *PHLDA2* em azul escuro. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....58

Figura 11 - Predição das ilhas CpGs e fragmento escolhido para amplificação da (A) H19DMR e (B) KvDMR1 localizadas no cromossomo 29 bovino. Segundo o *software MethPrimer* as ilhas CpGs estão representadas em azul. Abaixo está descrita a sequência de nucleotídeos do fragmento selecionado em cada região. As CpGs estão destacada em vermelho Fonte: Modificado de Li; Dahiya (2022).....62

Figura 12 - Expressão relativa dos genes *IGF2* e *H19*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Em rosa, genes maternalmente expressos e em azul, genes paternalmente expressos. Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....67

Figura 13 - Expressão relativa dos genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Em rosa, genes maternalmente expressos e em azul, genes paternalmente expressos. Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....69

Figura 14 - Expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....71

Figura 15 - Expressão relativa dos genes *TET1*, *TET2* e *TET3*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....73

Figura 16 - Genes que atuam na metilação (*DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) e desmetilação do DNA (*TET1*, *TET2* e *TET3*). Em vermelho estão representados os genes relacionados à metilação do DNA e em verde são os genes relacionados à desmetilação do DNA. O gradiente de cor representa expressão de cada um no decorrer da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, onde os tons mais escuros representam maior expressão e os mais claros representam menor expressão gênica. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....74

Figura 17 - Expressão relativa dos genes *OCT4* e *NANOG*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....76

Figura 18 - Gráfico gerado pelo MiSeq (*Illumina, USA*) durante as etapas do sequenciamento. O parâmetro apontado pelo gráfico demonstra que as amostras passaram pelo teste de qualidade, filtro de pureza ou *passing filter*, antes de iniciar o sequenciamento. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022)..76

Figura 19 - Gráfico gerado pelo MiSeq (*Illumina, USA*) durante a realização do sequenciamento. O valor de *Q-Score* mostra a probabilidade de erro de leitura durante o sequenciamento, onde Q30 representa o erro de leitura de 1 nucleotídeo a cada 1000 lidos. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....77

Figura 20 - Média de porcentagem de metilação do DNA da H19DMR e KvDMR1 nos sete estádios avaliados. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....77

Figura 21 - Porcentagem média de metilação do DNA nas 10 CpGs avaliadas na H19DMR. O eixo x mostra a posição das CpGs no genoma, enquanto o eixo y representa os sete estádios avaliados. As amostras representadas em verde e amarelo estão hipermetiladas (>61%) enquanto as CpGs em azul e roxo estão parcialmente (31-60%) e hipometiladas (<30%), respectivamente. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....78

Figura 22 - Porcentagem média de metilação do DNA nas 18 CpGs avaliadas na KvDMR1. O eixo x mostra a posição das CpGs no genoma, enquanto o eixo y representa os sete estádios avaliados. As amostras representadas em verde e amarelo estão hipermetiladas (>61%) enquanto as CpGs em azul e roxo estão parcialmente (31-60%) e hipometiladas (<30%), respectivamente. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).....79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - *Primers* utilizados para análise de expressão gênica por RT-qPCR. pb, pares de base. Temp, temperatura. ¹RIOS et al., 2007. ²VERRUMA et al., 2021. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2020).....55
- Tabela 2** - Ciclagem determinada para conversão das citosinas não-metiladas em timinas utilizando bissulfito. Fonte: *EpiTect Bissulfite Kit (QIAGEN, Hilden Germany)*.....60
- Tabela 3** - Sequência de adaptadores (em negrito) e *primers* para reconhecimento e sequenciamento pelo MiSeq (*Illumina, USA*). pb, pares de base.....63
- Tabela 4** - Ciclo de quantificação (Média ± Desvio Padrão) dos genes controlados por *imprinting* localizados na H19DMR. Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.....66
- Tabela 5** - Ciclo de quantificação (Média ± DP) dos genes controlados por *imprinting* localizados na KvDMR1. Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.....68
- Tabela 6** - Ciclo de quantificação (média ± DP) dos genes da família *DNMT*. Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.....70
- Tabela 7** - Ciclo de quantificação (média ± DP) dos genes da família *TET*. Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.....72
- Tabela 8** - Ciclo de quantificação (Média ± DP) dos genes relacionados à pluripotência, *OCT4* e *NANOG*. Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1°CP	1° corpúsculo polar
5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hydroximetilcitosina
5-mC	Metilação no quinta carbono da citosina
ACTB	<i>β-actina</i>
BD	Do inglês <i>desulfonation buffer</i>
BE	Do inglês <i>elution buffer</i>
Be	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
BSA FAF	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos
BSA V	Albumina sérica bovina fração V
Bx	Blastocisto expandido
BW	Do inglês <i>wash buffer</i>
BSA V FAF	Albumina sérica bovina fração V livre de ácidos graxos
CDKs	Quinases ciclinas-dependentes
CDKN1C	<i>Cyclin Dependente Kinase Inhibitor 1C</i>
CDX2	<i>Caudal Type Homeobox 2</i>
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
cdNA	Ácido desoxirribonucleio complementar
cfDNA	Do inglês <i>Cell free DNA</i>
CG	Dinucleotídeo citosina-guanina
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CGPs	Células germinativas primordiais
CH₃	Grupo metil
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO₂	Dióxido de carbono
COCs	Complexo cumulus-oócito
Cq	Ciclo de quantificação
CR2	Meio Charles Rosenkranss 2
CTCF	Fator de ligação CCCTC
D0	Embriões em estadio de zigoto
D4	Quarto dia do desenvolvimento embrionário
D7	Sétimo dia do desenvolvimento embrionário
DMR	Do inglês <i>Differentially methylated region</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleio
DNMTs	Enzimas DNA metiltransferase
DNMT1	<i>DNA metiltransferase 1</i>
DNMT2	<i>DNA metiltransferase 2</i>
DNMT3a	<i>DNA metiltransferase 3 alfa</i>
DNMT3b	<i>DNA metiltransferase 3 beta</i>
DNMT3l	<i>DNA metiltransferase 3 like</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
E	<i>Enhancer</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante

GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GI	Oócitos grau I
H19	<i>Imprinted Maternally expressed transcript</i>
H19DMR	Região diferencialmente metilada do H19
IETS	<i>International embryo transfer society</i>
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
ICRs	Do inglês <i>Imprinting control regions</i>
ICR1	Do inglês <i>Imprinting control regions 1</i>
ICR2	Do inglês <i>Imprinting control regions 2</i>
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
KCNQ1	<i>Potassium Voltage-Gated Channel</i>
KCNQ1OT1	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Overlap Transcript 1</i>
KvDMR1	Região diferencialmente metilada da Kv
LH	Hormônio luteinizante
lncRNA	RNA longo não codificante
LOI	Do inglês <i>Loss of imprinting</i>
LOS	<i>Large offspring syndrome</i>
MII	Metafase da meiose II
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NANOG	<i>Homeobox transcription factor Nanog</i>
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	RNA não codificante
NGS	Do inglês <i>next generation sequence</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
p57Kip2	Proteína p57Kip2
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial Hidrogênico
PHE	Solução antibiótica de penicilina, heparina e taurina
PHLDA2	<i>Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 2</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
POU5F	<i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>
RNA	Ácido ribonucleio
RNAm	Ácido ribonucleio mensageiro
RQ	Do inglês <i>Relative Quantification</i>
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SFB	Soro fetal bovino
siRNAs	Do inglês <i>small interfering RNA</i>
SOP	Síndrome do ovário policístico
SPTZ	Espermatozoides
TE	Trofoblasto
TET	Enzima <i>Ten-eleven translocation</i>
TET1	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 1</i>
TET2	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 2</i>
TET3	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 3</i>
TNCS	Transferência Nuclear de célula somática

TRAs Tecnologias de Reprodução Assistida
VG Vesícula germinativa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Gramma
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
G	Gauges
kb	Kilo base
mg	Miligramma
min	Minutos
mL	Mililitro
pb	Pares de base
pmol	Picomol
μg	Microgramma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
%	Porcentagem
U	Unidades

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs).....	26
1.2 Reprogramação epigenética e desenvolvimento embrionário inicial.....	29
1.3 Utilização de bovinos como modelo animal.....	38
2. HIPÓTESES.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1 Aspectos Éticos.....	48
5.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) bovinos.....	48
5.2.1 Coleta e seleção dos oócitos.....	48
5.2.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	49
5.2.3 Seleção e capacitação espermática.....	50
5.2.4 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	50
5.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	51
5.2.6 Classificação dos embriões viáveis.....	51
5.2.7 Coleta dos embriões durante o desenvolvimento embrionário.....	52
5.3 Análise de expressão gênica	53
5.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	53
5.3.2 PCR em tempo real.....	54
5.4 Análise de metilação do DNA da KvDMR1 e H19DMR.....	59
5.4.1 Extração do DNA.....	59
5.4.2 Conversão do DNA por bissulfito.....	59
5.4.3 Amplificação da H19DMR e da KvDMR1 por PCR.....	61
5.4.4 Sequenciamento de nova geração pós conversão do DNA com bissulfito.....	63

5.5 Análise estatística.....	64
6. RESULTADOS.....	66
6.1 Produção embrionária.....	66
6.2 Expressão gênica.....	66
6.2.1 Genes controlados por <i>imprinting</i> localizados na H19DMR e KvDMR1.....	66
6.2.2 Genes relacionados à metilação do DNA.....	69
6.2.3 Genes envolvidos na pluripotência embrionária.....	74
6.3 Metilação do DNA.....	76
7. DISCUSSÃO.....	81
8. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
APÊNDICES.....	112
APÊNDICE A – Média de metilação do DNA nas 10 CpGs da H19DMR.....	112
APÊNDICE B – Média de metilação do DNA nas 18 CpGs da KvDMR1.....	113
APÊNDICE C – Artigo submetido referente à tese.....	114
APÊNDICE D – Artigos publicados.....	115
ANEXOS.....	139
ANEXO A - Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP/USP).....	139
ANEXO B - Estoque FIV.....	140
ANEXO C - TALP Sêmen.....	141
ANEXO D - Estoque CR2.....	142

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As tecnologias de reprodução assistida (TRAs) são utilizadas tanto nas áreas clínicas como na pesquisa. Elas auxiliam casais que enfrentam casos de infertilidade, são utilizadas na pesquisa de alterações genéticas e epigenéticas em humanos e animais domésticos, além de ser uma ferramenta importante para a preservação de espécies (COMIZZOLI; PAULSON; MCGINNIS, 2018). Amplamente utilizada em animais domésticos, as TRAs permitiram, em bovinos, não somente o tratamento de fêmeas com baixa fertilidade, como também o aceleramento do processo de obtenção de embriões e manutenção de animais geneticamente superiores (GRUPEN, 2014; SIRARD, 2017).

Dentre as ferramentas disponíveis nas TRAs, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma das mais utilizadas na pesquisa de gametas e embriões (SCANAVEZ; CAMPOS; SANTOS, 2013; GRUPEN, 2014). Por meio da manipulação dos gametas feminino e masculino, a PIVE matura o oócito e capacita o espermatozoide *in vitro*, permitindo a junção dos gametas e o acompanhamento do desenvolvimento no período pré-implantacional de um novo organismo (GONÇALVES et al., 2008).

Entretanto, enquanto o embrião se desenvolve *in vitro*, são ativados mecanismos e vias que podem determinar o sucesso, ou o fracasso, do desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a ativação do genoma e a reprogramação epigenética, responsável por estabelecer grande parte das marcações epigenéticas do novo organismo (REIK; DEAN; WALTER, 2001; MEIRELLES et al., 2004). Tais marcações são estabelecidas por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e, outros processos complexos como o *imprinting* genômico, considerados essenciais no desenvolvimento e crescimento fetal e placentário de mamíferos, assim como no metabolismo e comportamento pós-natal do indivíduo (WILKINS; HAIG, 2003; FOWDEN et al., 2006; SMITH; GARFIELD; WARD, 2006; YANG et al., 2007; O'DOHERTY et al., 2015).

A síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), por exemplo, muitas vezes é comparada à síndrome do bezerro grande (do inglês, *large offspring syndrome*, ou LOS) que ocorre com frequência em ruminantes provenientes de reprodução assistida (ROBBINS et al., 2012; CHEN et al., 2013). Além disso, a semelhança à nível genômico entre humanos e bovinos (73,8%) (MILLER et al., 2007), faz com que muitas vezes bovinos sejam escolhidos como modelo animal para estudos relacionados aos gametas, início do desenvolvimento, alterações epigenéticas e síndromes que envolvem alterações do *imprinting* genômico. Estas pesquisas são muito importantes, uma vez que ainda existem lacunas a serem preenchidas em relação ao

desenvolvimento pré-implantacional, as vias, os genes e os mecanismos.

1.1 Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs)

Os primeiros relatos na literatura sobre a possibilidade de manipular e maturar gametas, principalmente oócitos, em laboratório datam da década de 1930, quando Pincus e Enzmann (1937) avaliaram vários estágios de maturação e migração de oócitos em cortes histológicos de ovários de coelha. Nas décadas seguintes, a utilização de outros modelos animais (e.g., camundongo e hamster) permitiram publicação de dados mais robustos que foram a base para o avanço da pesquisa nesta área (YANAGIMACHI; CHANG, 1963; WHITTINGHAM, 1968; PASSOS, 2004).

As descobertas feitas com a manipulação de gametas e embriões *in vitro* em diferentes espécies permitiu a criação e desenvolvimento de diversas TRAs. Nos anos seguintes, essas tecnologias puderam, não só ser voltadas para áreas como a pesquisa sobre problemas de infertilidade de casais e desenvolvimento de doenças, mas também para o melhoramento genético de animais de produção, como bovinos, ovinos e suínos (SJUNNESSON, 2020), além da criação de bancos genéticos e preservação de gametas e embriões de espécies ameaçadas de extinção (CLULOW; CLULOW, 2016; COMIZZOLI; PAULSON; MCGINNIS, 2018). Em bovinos, o uso das TRAs teve início na década de 1960 com o estudo da maturação *in vitro* de gametas femininos e, a partir do final da década de 1980, nasceram os primeiros bezerros vivos e saudáveis cujos oócitos foram maturados e fertilizados *in vitro* e os embriões cultivado *in vitro* até o estágio de blastocistos (EDWARDS, 1965a; GOTO et al., 1988; FUKUDA et al., 1990; SJUNNESSON, 2020).

Em humanos, a maturação de oócitos *in vitro* possibilitou observar algumas das diversas alterações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem, como a condensação da cromatina e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (1^oCP) (EDWARDS, 1965b). Entretanto, o marco da pesquisa em reprodução assistida foi o nascimento de Louise Brown em 1978, conhecida por muitos anos como a “bebê de profeta” (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Seis anos depois, nascia no Brasil a primeira criança concebida por fertilização *in vitro*. O desenvolvimento da técnica que permitiu a gestação e nascimento de um bebê saudável após a transferência de um embrião de oito células produzindo *in vitro* (STEPTOE; EDWARDS, 1978) rendeu, em 2010, o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia para Robert Edwards, um dos responsáveis pela criação e aperfeiçoamento da técnica.

Atualmente, o uso das TRAs vai muito além de auxiliar casais com problemas de fertilidade, uma vez que é possível o armazenamento de gametas e embriões de pacientes que

precisam passar por tratamentos oncológicos por longos períodos sem comprometer sua viabilidade (BONETTI et al., 2009; NOYES et al., 2011; DRUCKENMILLER et al., 2016), armazenar gametas de mulheres que desejam adiar a maternidade, avaliar o embrião antes da transferência em casos de doenças genéticas ou abortos recorrentes (SCIORIO; AIELLO; IROLLO, 2021; NAIR et al., 2022; YATSENKO; RAJKOVIC, 2022), permitir o rastreamento de genes candidatos, marcadores biológicos e a influência da epigenética no desenvolvimento de doenças com alta prevalência na população, como é o caso da síndrome do ovário policístico (SOP) (LI; HUANG, 2008; EIRAS et al., 2022).

Só no Brasil, com o auxílio das TRAs, foram realizados em 2019, antes da pandemia, mais de 43 mil ciclos, sendo coletados mais de 410 mil oócitos e transferidos mais de 25 mil embriões (a fresco ou após serem criopreservados). Um ciclo completo compreende a coleta dos oócitos pós-hiperestimulação da mulher, fertilização do oócito por meio da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), e cultivo *in vitro* embrionário que pode se estender até o estágio de blastocisto (ANVISA, 2020). É importante ressaltar que tanto os gametas como o embrião podem ser criopreservados, permitindo a interrupção do ciclo. A diferença entre as técnicas de FIV e ICSI consiste no fato de que na FIV o oócito é colocado junto a milhares de espermatozoides e cabe a um deles atravessar as barreiras do gameta feminino para que ocorra a fertilização, enquanto na ICSI um único espermatozoide é selecionado e depositado, com auxílio de um micromanipulador, no interior do citoplasma do oócito. A princípio, a técnica de ICSI era escolhida para casais que apresentavam fatores masculinos severos, porém, hoje ela é utilizada na grande maioria das clínicas, para casais com ou sem alterações no gameta masculino (EVERS, 2016; SUNDERAM et al., 2020).

Diferente do que ocorre em humanos, o uso de TRAs em animais de produção é preferível em relação à concepção natural na grande maioria dos rebanhos, uma vez que permite o maior aproveitamento de animais considerados geneticamente superiores (GRUPEN, 2014; SIRARD, 2017). Segundo a *International Embryo Transfer Society* (IETS), em 2020 foram produzidos *in vitro* mais de um milhão de embriões bovinos, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial com mais de 350 mil embriões, dado este que não inclui os embriões produzidos em laboratórios de pesquisa (VIANA, 2021).

Tanto para fins de pesquisa como para produção e melhoramento genético, uma das TRAs mais utilizadas em bovinos é a PIVE. Esta técnica compreende três etapas: (a) a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos após aspiração de ovários *in vivo* (conhecido por *ovum pick-up* ou OPU) ou coletados em frigorífico; (b) a fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos pós-

maturação; e (c) o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões até, geralmente, o estágio de blastocisto, período conhecido como desenvolvimento pré-implantacional (WRENZYCKI, 2016; FERRÉ et al., 2020). Com o aperfeiçoamento da técnica, cerca de 90% dos oócitos são maturados corretamente, seguido por até 80% de sucesso nas taxas de FIV e a produção embrionária ao final do cultivo *in vitro* pode chegar até 50% em alguns casos, tendo em média 30 a 40% (RIZOS et al., 2008; LONERGAN; FAIR, 2016; FERRÉ et al., 2020; SJUNNESSON, 2020).

Durante o desenvolvimento embrionário, a cavitação da blastocela e a formação do blastocisto é um momento determinante, já que o embrião passa de um aglomerado de células indiferenciadas (mórula) para a diferenciação em duas linhagens celulares: a massa celular interna (MCI) e a trofotoderma (TE). A MCI é um aglomerado de células pluripotentes que formarão o embrião, enquanto a TE forma uma única camada de células e dará origem aos anexos embrionários e parte da placenta (PEDERSEN; WU; BALAKIER, 1986; KUNATH; STRUMPF; ROSSANT, 2004; SAWAI, 2021).

Já foi demonstrado que alguns genes são importantes para a indução e manutenção da pluripotência no período pré-implantação, sendo um deles o gene *OCT4* (também conhecido por *POU5F1* - do inglês, *POU domain, class 5, transcription factor 1*) e o *NANOG* (do inglês, *homeobox transcription factor Nanog*) (CHAMBERS et al., 2003; CAO, 2013). O *OCT4* é essencial para a manutenção e pluripotência de células germinativas, além de seu transcrito atuar na regulação do desenvolvimento embrionário (JERABEK et al., 2014). Daigneault e colaboradores (2018) mostraram que embriões *knockdown* para este gene se desenvolvem normalmente até o estágio de 8 a 16 células, porém a taxa de sobrevivência reduz significativamente nas etapas seguintes até blastocisto, comprovando a importância deste gene para a formação de blastocistos bovinos. Junto ao gene *OCT4*, o *NANOG* também parece estar intimamente ligado à manutenção da pluripotência de embriões bovinos. No entanto, foi demonstrado que zigotos cujo *NANOG* foi silenciado não apresentam problemas de compactação celular e formação inicial da blastocela (ORTEGA et al., 2019).

A competência do embrião ao final da CIV, que compreende a qualidade e habilidade embrionária, é determinante para o sucesso no decorrer do desenvolvimento, influenciando diretamente no estabelecimento e manutenção da gestação a termo (MARSICO et al., 2019). Tal avaliação pode ser realizada de diferentes maneiras, invasivas ou não (KUSSANO et al., 2016; MARSICO et al., 2019). Métodos não-invasivos, como a análise da morfologia, permitem a utilização do embrião pós-classificação e são as mais utilizadas tanto em bovinos como em humanos. Através da análise da morfologia, os embriões são avaliados em vários

aspectos que levam em consideração coloração, tamanho, simetria e formato dos blastômeros (MERTON, 2002; MARSICO et al., 2019; VERRUMA et al., 2020; CECHELE et al., 2022).

Em embriões humanos, a fragmentação do citoplasma pode ser levada em conta na hora de escolher o embrião que será transferido, já que essa característica pode ser um indicativo de baixa qualidade embrionária (CECCELE et al., 2022). Tanto os grupos de pesquisa como as clínicas de reprodução ainda carecem de um método não-invasivo que seja preciso, objetivo e que permita uma avaliação que corresponda ao desenvolvimento do embrião pós-transferência (ROCHA et al., 2016). A utilização de cfDNA (do inglês, *cell free DNA*) coletado do meio de cultivo *in vitro* para avaliação de aneuploidias, sinais de apoptose e outros parâmetros que podem determinar o sucesso da gravidez é uma abordagem promissora, porém ainda em desenvolvimento e só deve estar disponível na grande maioria das clínicas de reprodução assistida em alguns anos (RUBIO et al., 2019; QASEMI; MAHDIAN; AMIDI, 2021; ALIZADEGAN et al., 2022).

O avanço de técnicas de Biologia Molecular, como o uso de *microarrays*, a reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction* ou PCR) e seus derivados, permitem análises mais precisas como a interação entre células do cumulus e oócito e de como os meios utilizados podem influenciar a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, por exemplo. Entretanto, essas avaliações geralmente culminam na destruição do material, impossibilitando que o gameta e/ou embrião sejam utilizados posteriormente (BUKOWSKA et al., 2012). Do ponto de vista da Biologia Molecular, um oócito de boa qualidade é aquele que apresenta uma alta concentração de proteínas e RNAs mensageiros (RNAm), visto que esse estoque é importante para a manutenção do embrião antes dele ativar o genoma embrionário (MEIRELLES et al., 2004; BUKOWSKA et al., 2012).

Apesar das técnicas estarem estabelecidas há anos, clínicas de reprodução e laboratórios de pesquisa caminham lado a lado nos estudos relacionados às TRAs, visando sempre a inovação, o aperfeiçoamento e redução das perdas que ainda ocorrem em todas as etapas. Um maior entendimento do que ocorre durante a gametogênese, assim como no desenvolvimento embrionário pré-implantacional, principalmente na reprogramação epigenética e regulação de genes já descritos como importantes para estes momentos, pode preencher lacunas ainda existentes que influenciam direta ou indiretamente nas taxas de sucesso em diferentes momentos das técnicas de reprodução assistida (ZHU; MARJANI; JIANG, 2021).

1.2 Reprogramação epigenética e desenvolvimento embrionário inicial

O termo Epigenética foi utilizado pela primeira vez no início da década de 1940 em um estudo com a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) que visava relacionar a diferenciação celular com mutações que aconteciam durante o desenvolvimento. Neste trabalho, Conrad Waddington mencionou que a Epigenética era o estudo da epigênese, fazendo referência aos genes, assim como a interação entre eles e seus produtos e, como eles podem se manifestar de diferentes maneiras no fenótipo (WADDINGTON, 1942; BIRD, 2007; ROSS; CANOVAS, 2016; GREALLY, 2018).

A discussão acerca do tema continuou nos anos seguintes e na década de 1990 a Epigenética passou a ser relacionada com mudanças hereditárias que não poderiam ser explicadas por alterações na sequência do material genético (BIRD, 2007). Por se tratar de algo tão complexo, é difícil chegar a um consenso sobre o que é Epigenética, porém hoje sabe-se que a Epigenética envolve alterações químicas que ocorrem à nível de cromatina e na estrutura do DNA, mas sem alterar sua sequência. Estas alterações regulam a expressão gênica e podem levar a alterações fenotípicas. Além disso, a epigenética pode causar efeitos inter ou transgeracionais dependendo de quais células e de como elas são afetadas (PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014; BEDNARCZYK et al., 2021).

Durante a vida de um organismo ocorrem duas reprogramações epigenéticas que estão diretamente relacionadas aos níveis de metilação do DNA de determinadas regiões, expressão gênica e, conseqüentemente, sucesso durante seu desenvolvimento. A primeira reprogramação ocorre na gametogênese, durante a migração das células germinativas primordiais (CGPs) para a crista gonadal. Neste momento, as CGPs que estão com níveis elevados de metilação de DNA se comparado com outras células, perdem as marcações epigenéticas devido à desmetilação global do DNA. O reestabelecimento destas marcações ocorre apenas durante a maturação gamética (Figura 1A) (REIK; DEAN; WALTER, 2001; MORGAN et al., 2005; SMITH et al., 2015).

Em um segundo momento, pós-fertilização, ocorre no embrião indiferenciado uma nova reprogramação epigenética. Ela visa apagar as marcas trazidas pelos gametas feminino e masculino, e reestabelecer novas marcas epigenéticas, que vão influenciar diretamente nos níveis de metilação do DNA, assim como o padrão de expressão de diferentes genes e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário (Figura 1B) (LAMBROT et al., 2013; ZHANG et al., 2015; MILAZZOTTO et al., 2020).

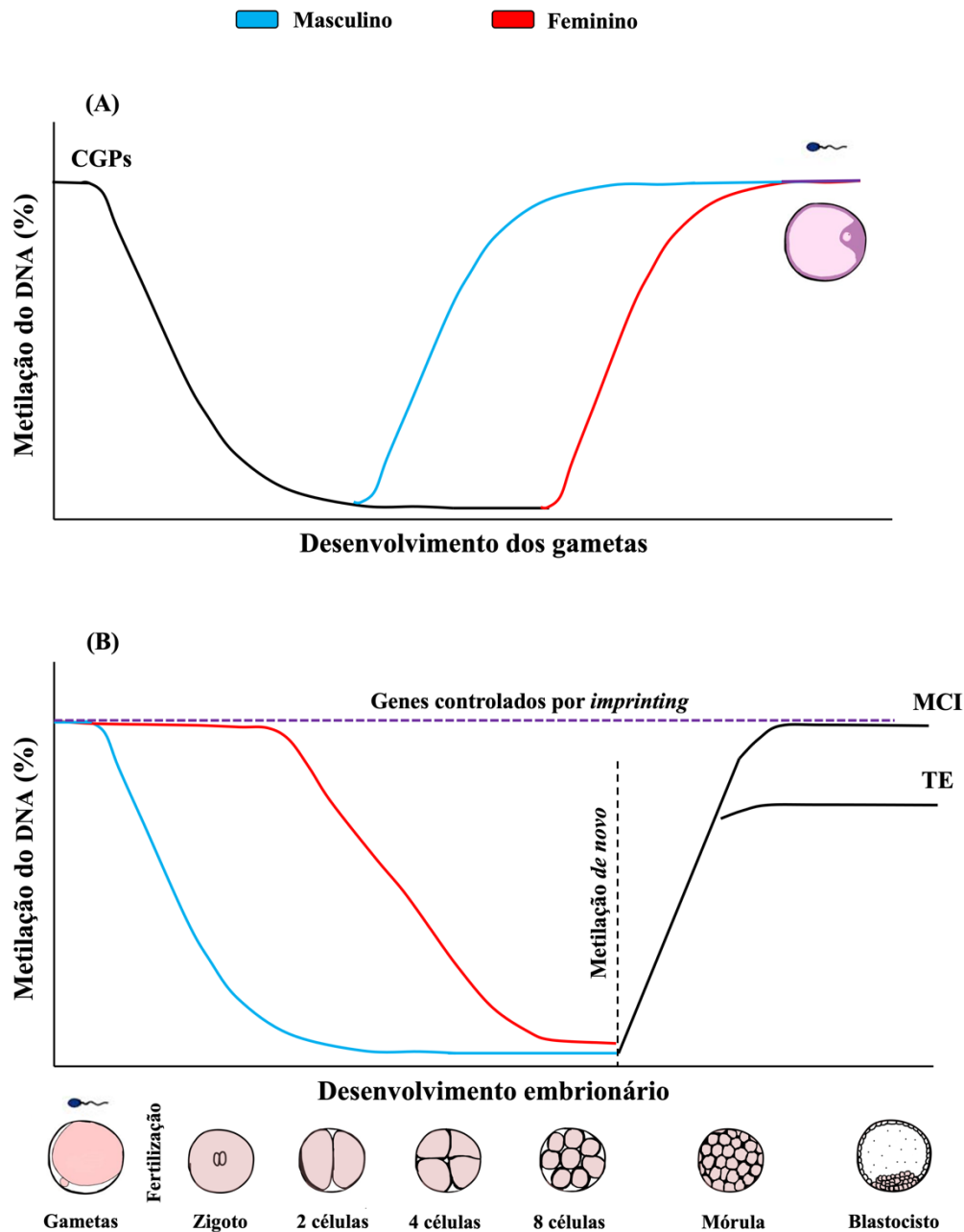


Figura 1 - Reprogramação epigenética durante a maturação dos gametas e início do desenvolvimento embrionário. (A) Modelo animal murino mostrando a desmetilação e reestabelecimento das marcações epigenéticas das células germinativas primordiais (CGPs) durante sua migração para a crista gonadal. (B) Desmetilação do DNA embrionário que ocorre logo após a fertilização em bovinos. O material paterno sofre desmetilação ativa enquanto o materno sofre uma desmetilação passiva. Entre os estádios de 8 e 16 células ocorre uma metilação *de novo* e reestabelecimento das marcações epigenéticas até o estádio de blastocisto, onde são observadas duas linhagens celulares, a massa celular interna (MCI) e a trofoblasto (TE). A linha pontilhada (em roxo) representa os genes controlados por *imprinting* que não são afetados pela reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento. Fonte: Modificado de Reik; Dean e Walter (2001) e Yang et al., (2007).

Dentre os mecanismos epigenéticos já descritos, podem ser mencionados: as alterações nas histonas através de metilação, fosforilação ou acetilação do DNA, a metilação do DNA, e a atuação direta e indireta dos RNA não codificantes (ncRNAs) na regulação da expressão gênica. Apesar de serem importantes em diferentes áreas além do desenvolvimento embrionário, estes mecanismos ainda não são completamente conhecidos e a metilação do DNA é, sem sombra de dúvidas, o mecanismo mais estudado (BIRD, 2007; PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014; LACAL; VENTURA, 2018).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético fundamental para a especificidade e identidade celular, sendo crucial para a gametogênese e desenvolvimento embrionário de mamíferos. Ela atua adicionando um grupamento metil (CH_3) ao quinto carbono do nucleotídeo citosina (5-mC) (WU; ZHANG, 2014; MILAZZOTTO et al., 2020). Em mamíferos no geral, o grupo metil é adicionado em citosinas que são seguidas por guaninas (citosina-fosfato-guanina, ou CpG) e, regiões com alta concentração destes dinucleotídeos são chamadas de ilhas CpGs (Figura 2). No genoma humano, por exemplo, são descritas cerca de 30 mil de ilhas CpGs, sendo estimado que até 80% delas estejam metiladas (LISTER et al., 2009; SMITH; MEISSNER, 2013; KIM; COSTELLO, 2017).

Por se tratar de um mecanismo dinâmico, os níveis de metilação do DNA variam em tecidos e células específicas, além disso, são conhecidos dois tipos de metilação do DNA, a metilação *de novo* e a metilação de manutenção (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011; UYSAL; AKKOYUNLU; OZTURK, 2015). Enquanto a metilação *de novo* é a responsável por estabelecer as primeiras marcas epigenéticas em um DNA não-metilado, a metilação de manutenção é responsável por manter o padrão de metilação do DNA no material hemimetilado das células-filha pós mitose (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

A transferência do grupamento metil à citosina só é possível graças à atividade das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (REIK; DEAN; WALTER, 2001). Nesta família são descritos cinco genes (*DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* e *DNMT3l*) que são importantes para a correta maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário, atuando tanto na metilação *de novo* (*DNMT3a* e *DNMT3b*) quanto na metilação de manutenção (*DNMT1*) (REIK; DEAN; WALTER, 2001).

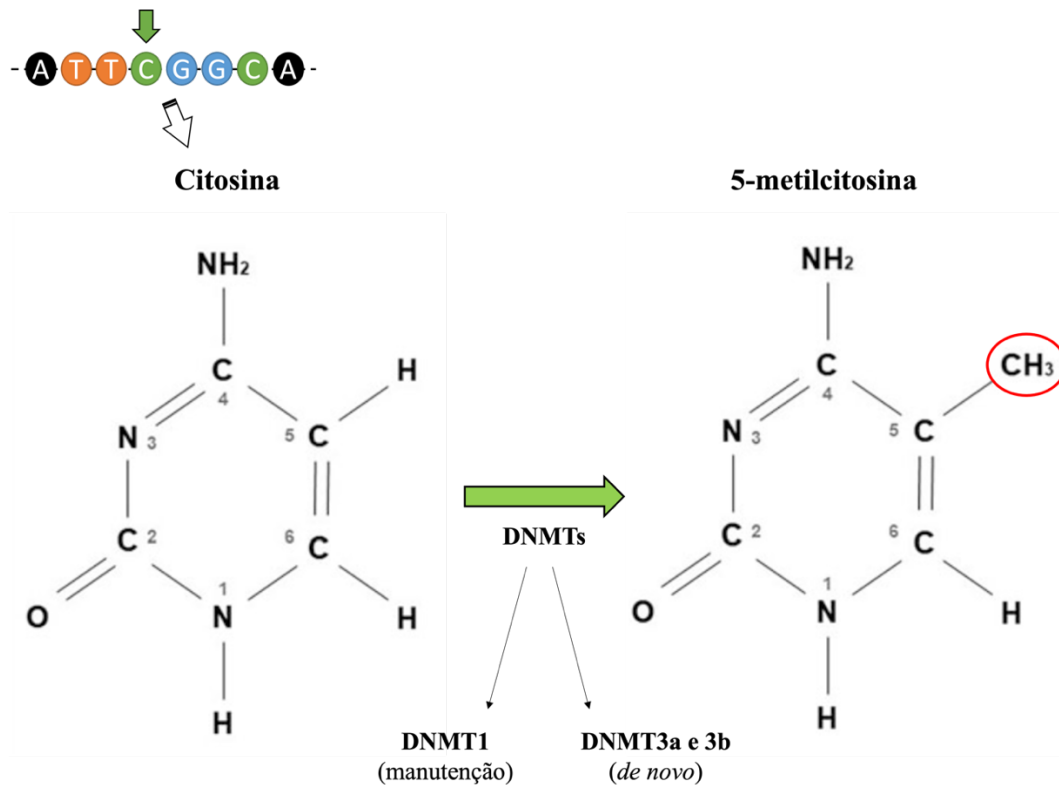


Figura 2 - Metilação do DNA. Representação da adição do grupo metil (CH_3) ao quinto carbono do nucleotídeo citosina, seguida por uma guanina (CpG). A metilação do DNA só é possível graças à ação das enzimas da família DNA metiltransferase (DNMTs). Fonte: Modificado de Beayno et al., (2019).

Os genes da família *DNMT* apresentam um padrão dinâmico de expressão gênica, aumentando e diminuindo sua expressão dependendo do estágio do desenvolvimento (UYSAL; AKKOYUNLU; OZTURK, 2015). O *DNMT1* é responsável por codificar a DNMT1, uma das enzimas mais abundantes na célula de mamíferos. Ela é expressa em alta concentração na fase S da mitose, sendo uma das responsáveis pela manutenção da metilação do DNA, mantendo as marcas epigenéticas das células-filha fiéis às da célula-mãe (DETICH; RAMCHANDANI; SZYF, 2001; BINISZKIEWICZ et al., 2002; DELAVAL; FEIL, 2004; DHE-PAGANON; SYEDA; PARK, 2011). Em bovinos, por exemplo, já foi demonstrado que a DNMT1 está presente no citoplasma celular tanto de oócitos durante a maturação como em embriões em diversos estágios de desenvolvimento (LODDE et al., 2009). Já Ma e colaboradores (2022) demonstraram em camundongos que alterações na regulação deste gene podem acarretar problemas ao embrião.

Diferente da DNMT1, as enzimas codificadas pelos genes *DNMT3a* e *DNMT3b* possuem afinidade por regiões do DNA não-metilado e são responsáveis por estabelecer novas marcas epigenéticas (metilação *de novo* do DNA) no embrião após a fertilização (OKANO; XIE; LI, 1998; REIK; DEAN; WALTER, 2001) Em camundongos, o silenciamento do gene

Dnmt3a em embriões levou a uma redução significativa no desenvolvimento embrionário após o estágio de 2 células, momento que coincide com a ativação do genoma embrionário, levando a crer que este gene está diretamente relacionado com a metilação *de novo* que ocorre após a ativação do genoma (UYSAL; CINAR; CAN, 2021). Por outro lado, o silenciamento do *Dnmt3b* leva à morte intrauterina por volta do estágio E9,5 de desenvolvimento (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

Enquanto as enzimas da família dos genes *DNMTs* são as responsáveis pela metilação do DNA, as enzimas transcritas pelos genes da família *TET* (do inglês, *ten-eleven translocation*) são responsáveis por parte da desmetilação ativa e passiva dos genomas paterno e materno, respectivamente, durante a reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento embrionário. Dentro desta família são descritos três genes, o *TET1*, *TET2* e *TET3*, cujas enzimas possuem um domínio catalítico c-terminal que é característica da superfamília das dioxigenases (TAHILIANI et al., 2009; LI et al., 2015; ZHANG et al., 2017; ROSS; SAMPAIO, 2018). Além disso, elas são capazes de transformar a 5-metilcitosina (5mC) em 5-hydroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxicitosina (5caC) e 5-formilcitosina (5fC) (HE et al., 2011; ZHANG et al., 2017).

Apesar de camundongos *knockdown* para o gene *Tet1* se desenvolverem normalmente (DAWLATY et al., 2011), a enzima TET1, além de participar das ondas de desmetilação do DNA durante as duas reprogramações epigenéticas, parece estar intimamente relacionada à diferenciação das células da MCI no período de pré-implantação (ITO et al., 2010). A enzima TET1 também é essencial durante o estabelecimento do *imprinting* genômico tanto em CGPs de fêmeas como em machos (YAMAGUCHI et al., 2013). Ainda em camundongos, foi demonstrado em embriões que o *Tet3* é importante para a oxidação da 5mC, uma vez que seu bloqueio afeta a desmetilação do material genético paterno ocasionando uma redução de sobrevivência fetal (GU et al., 2011). Por outro lado, o *knockdown* do *TET3* em bovinos, além de levar ao acúmulo de 5mC, reduz significativamente a maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (CHENG et al., 2019).

O *imprinting* genômico é um processo epigenético observado majoritariamente em mamíferos placentários. Ele ocorre quando um dos alelos está silenciado e o gene apresenta expressão monoalélica ao invés de bialélica. Ele é um importante processo epigenético influenciado pela origem parental, assim como a metilação do DNA, uma vez que, o *imprinting* materno ou paterno é determinado de acordo com qual alelo está silenciado e qual esta funcional (MCGRATH; SOLTER, 1984; REIK; WALTER, 2001; LAWSON; CHEVERUD; WOLF, 2013; BAJRAMI; SPIROSKI, 2016; EDWARDS et al., 2019). Em humanos são descritos mais

de 100 genes controlados por *imprinting*, enquanto em bovinos a literatura descreve cerca de 28 genes e em camundongos entre 150 e 200 (JIANG et al., 2015; KHATTABI et al., 2019; TUCCI et al., 2019; ZENG; CHEN, 2019).

Conservados entre algumas espécies de mamíferos eutérios (KILLIAN et al., 2000; REIK; WALTER, 2001; MORGAN et al., 2005), os genes controlados por *imprinting* genômico são geralmente encontrados agrupados (chamados *clusters*), sendo controlados por regiões ricas em dinucleotídeos CG denominadas regiões controladoras de *imprinting*, ou ICRs (do inglês *imprinting control regions*), as quais são diferencialmente metiladas (do inglês *Differentially Methylated Regions*, ou DMRs) (LEWIS; REIK, 2006; ABRAMOWITZ; BARTOLOMEI, 2012; ROBBINS et al., 2012; HOEIJMAKERS; KEMPE; VERSCHURE, 2016). Estes genes são fundamentais para o organismo, influenciando não só o desenvolvimento embrionário como também o fenótipo do indivíduo adulto (GOODALL; SCHMUTZ, 2007; SMITH et al., 2015).

Duas DMRs localizadas no cromossomo autossomo 29 de bovinos são importantes durante o desenvolvimento embrionário, a H19DMR e a KvDMR1, localizadas nas ICRs 1 e 2, respectivamente (Figura 3). Na H19DMR é encontrado o gene *Imprinted maternally expressed transcript (H19)* que possui expressão monoalélica materna (*imprinting* paterno) e transcreve um RNA longo não-codificante (*lncRNA*) conservado em diferentes espécies. Esse gene é importante para o correto desenvolvimento embrionário, uma vez que alterações epigenéticas nesta região podem levar ao desenvolvimento anormal do organismo (BRANNAN et al., 1990; ZHANG et al., 2004; MORGAN et al., 2005; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). Além do *H19*, na H19DMR também é encontrado o gene *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* que possui expressão monoalélica paterna (*imprinting* materno), atuando como promotor de crescimento e desenvolvimento, além de transcrever um fator de crescimento que atua na progressão do ciclo celular (SUZUKI et al., 2011a; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

A expressão dos genes localizados na H19DMR é regulada pela ação da proteína insuladora CTCF (fator de ligação CCCTC) que interfere também na ação de *enhancers* que estão próximos fisicamente (KIM et al., 2007). No alelo materno, a DMR encontra-se desmetilada permitindo que a CTCF se ligue a ela. Tal ligação cria uma barreira física e isso impede que o *enhancer downstream* ao gene *H19* atue sobre o *IGF2*. A aproximação física da H19DMR e CTCF distancia o *enhancer* do promotor do gene *IGF2*, culminando na expressão do *H19*. Enquanto isso, no alelo paterno a aproximação física da DMR ao *IGF2*, devido à metilação da região, aproxima o *enhancer* do promotor deste gene e coloca-o na região ativa

da cromatina, permitindo assim sua expressão (BELL; FELSENFELD, 2000; MURRELL; HEESON; REIK, 2004; LEWIS; REIK, 2006).

A outra DMR de interesse, a KvDMR1, é responsável por controlar o *imprinting* de vários genes e localiza-se dentro do gene *Potassium Voltage-Gated Channel (KCNQ1)* onde também é encontrado em antisense o promotor do gene *Potassium Voltage-Gated Channel Overlap Transcript 1 (KCNQ1OT1)*, que possui expressão monoalélica paterna e codifica um *lncRNA*. O *KCNQ1OT1*, quando desregulado, pode atuar como oncogene (MITSUYA et al., 1999; HORIKE et al., 2000; O'NEILL, 2005) Além destes, na KvDMR1 também são encontrados os genes *Cyclin Dependente Kinase Inhibitor 1C (CDKN1C)* e *Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 2 (PHLDA2)*, ambos de expressão monoalélica materna e com funções importantes em momentos específicos do desenvolvimento (DRIVER et al., 2013; STAMPONE et al., 2018).

O *CDKN1C* é parte da família do complexo de quinases ciclinas-dependentes (CDKs). Ele atua no ciclo celular e transcreve uma proteína chamada p57Kip2 cuja função é amplamente associada com o correto desenvolvimento embrionário. Similar a outros genes, ele é controlado por *lncRNAs* e sua expressão depende de diversos fatores como a localização e modificações pós-sintéticas (DRIVER et al., 2013; STAMPONE et al., 2018). Já a função do *PHLDA2* ainda é pouco conhecida na literatura. Porém, trabalhos realizados com microinjeção de siRNAs e posterior *knockdown* do gene no estadio de zigoto parecem melhorar a taxa de produção de blastocistos ao sétimo dia de desenvolvimento (KHATIB; GROSS, 2019). Além disso, Sikora e colaboradores (2011) demonstraram que o aumento da expressão desse gene parece estar relacionado com restrições no desenvolvimento da placenta, enquanto uma redução na expressão parece ocasionar o inverso (Figura 3).

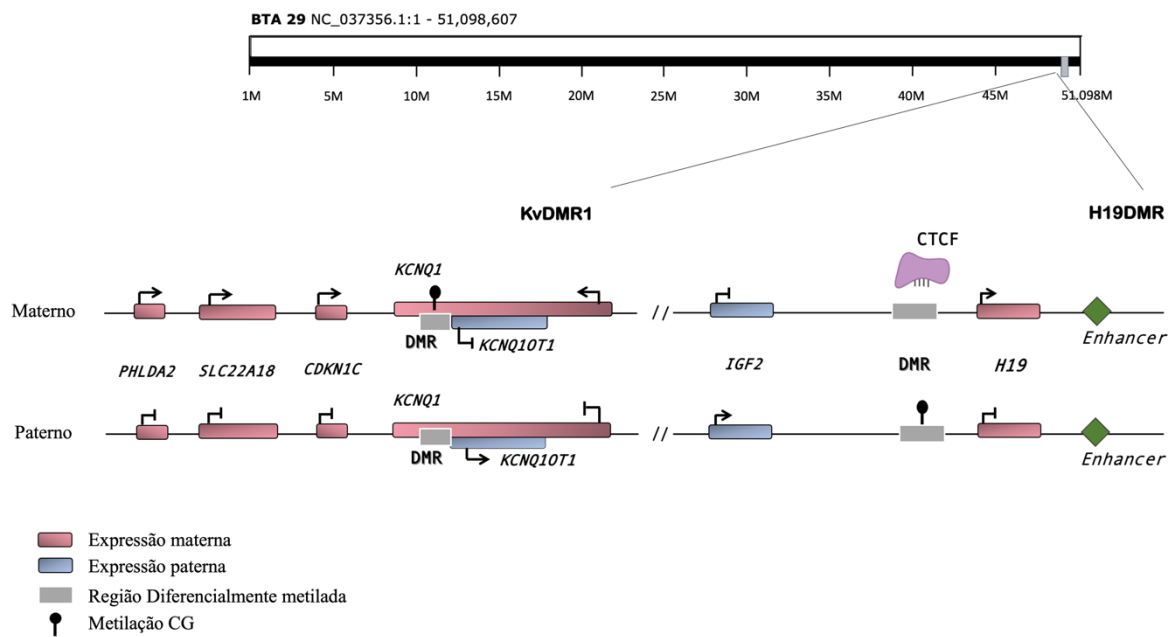


Figura 3 - Representação do cromossomo 29 bovino onde são encontradas a H19DMR e a KvDMR1. Representação dos alelos materno e paterno, a interação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) e consequente expressão dos genes ali localizados. No alelo materno, ocorre o *imprinting* paterno quando a H19DMR não está metilada e o gene *H19* é expresso, enquanto na KvDMR1 ocorre a metilação do DNA e os genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *SLC22A18* e *PHLDA2* estão expressos (representados em rosa). No alelo paterno ocorre o contrário, *imprinting* materno, com *IGF2* e *KCNQ1OT1* (representados em azul) expressos na H19DMR e KvDRM1, respectivamente. Na H19DMR, a proteína insuladora CTCF influencia diretamente na expressão dos genes *H19* e *IGF2*. Fonte: Modificado de Hori et al., (2010); Verruma et al., (2021).

Semelhante ao cromossomo 29 de bovinos, no cromossomo 11 humano (11p15.5) estão localizadas a H19DMR (ICR1) e na KvDMR1 (ICR2). Já foi demonstrado que as alterações no padrão de metilação do DNA nestas regiões e, consequentemente, alteração na regulação da expressão dos genes ali encontrados podem ocasionar o desenvolvimento de síndromes que envolvem *imprinting* genômico. Dentre elas, podem ser mencionadas a SBW e a síndrome de Silver Russel (SSR). A SBW é uma síndrome de hiper crescimento, onde os portadores podem apresentar macroglossia, defeitos da parede abdominal, neoplasias infantis como o tumor de Wilms, além de problemas respiratórios e cardíacos. Ela pode ocorrer por transmissão parental, mas em aproximadamente 85% dos casos o desenvolvimento é esporádico (WEKSBERG; SHUMAN; BECKWITH, 2010; MUSSA et al., 2017; BRIOUDE et al., 2018; LI et al., 2022). Dentro dos casos esporádicos, cerca de 50% deles são devidos à hipometilação do alelo materno da ICR2, também chamado de LOI (do inglês, *loss of imprinting*), que leva a uma alteração na regulação dos genes *KCNQ1OT1* e *CDKN1C*, enquanto 5 a 10% dos casos são devidos ao ganho de metilação (hipermetilação) do alelo materno da ICR1. Além das alterações epigenéticas mencionadas, 5% dos casos esporádicos são devidos a alterações genéticas (e.g.,

mutações) no *CDKN1C* (CHOUFANI; SHUMAN; WEKSBERG, 2010; AZZI; HABIB; NETCHINE, 2014; EGGERMANN et al., 2014; WANG et al., 2020).

O uso de TRAs pode expor o embrião à agentes externos durante uma das janelas de reprogramação epigenética, uma vez que o cultivo embrionário se estende, na maioria dos casos e espécies, até o estadio de blastocisto e o estabelecimento de novas marcas epigenéticas no embrião ocorre entre os estadios de 8-16 células em bovinos (REIK; DEAN; WALTER, 2001). Em humanos, é comprovado que o uso de TRAs pode aumentar em até dez vezes a chance de desenvolvimento de síndromes de *imprinting* como a SBW (GOMES et al., 2007, 2009; MUSSA et al., 2017; WANG et al., 2020) assim como já foi observado que o uso de TRAs também pode aumentar a incidência do desenvolvimento da síndrome do bezerro grande (do inglês, *large offspring syndrome*, LOS), uma síndrome que pode se desenvolver devido a alterações epigenéticas semelhante à SBW (ROBBINS et al., 2012; CHEN et al., 2013). Além das semelhanças na causa, em LOS também são observadas semelhanças fenotípicas à SBW como o desenvolvimento de macroglossia, macrossomia e defeitos na formação da parede abdominal (LI et al., 2022).

A grande similaridade encontrada na SBW e LOS, assim como entre os domínios do cromossomo 11 humano e do 29 bovino (CHEN et al., 2013), indicam que bovinos parecem ser adequados para serem utilizados como modelo animal para estudos de alterações epigenéticas, desenvolvimento de síndromes e malformações, principalmente quando é utilizada alguma técnica de reprodução assistida.

1.3 Utilização de bovinos como modelo animal

O uso de um modelo se faz necessário quando o objeto de estudo não pode ser total ou parcialmente manipulado e analisado. O modelo animal é um organismo vivo que permite o estudo de algum fenômeno onde, os resultados observados podem ser utilizados para prever características, comportamentos ou caracterizar algum sistema de interesse (WALL; SHANI, 2008). A ideia de utilizar modelos animais para diferentes fins existe desde o século XVIII quando Immanuel Kant (1724–1804) propôs que similaridades entre diferentes objetos poderiam ser usadas para prever causa e efeito sob uma perspectiva qualitativa. Dessa forma, a utilização de modelos animais apropriados permitiu o estudo de diversos mecanismos fisiológicos, regulação gênica e vias metabólicas que seriam impossíveis de serem estudadas em humanos.

Segundo o *National Research Council* (1985), a espécie utilizada como modelo animal deve ser cuidadosamente escolhida, uma vez que tem que ser levadas em consideração as

propriedades biológicas, a facilidade na obtenção e manipulação do material biológico, além de estar de acordo com as implicações éticas. Estudos relacionados à gametogênese, embriogênese, *stress* intrauterino e alterações genéticas e epigenéticas que podem ocasionar o desenvolvimento de síndromes em humanos são alguns dos vários tópicos que necessitam do uso de modelos animais para maior compreensão dos mecanismos envolvidos.

No Brasil, pela lei de biossegurança nº 11.105/2005 é permitida a doação embriões humanos produzidos *in vitro* para fins de pesquisa e terapia, desde que exista a permissão dos progenitores e que o embrião esteja criopreservado há, pelo menos, três anos. Entretanto, esse material além de ser extremamente raro (em 2019 apenas 22 embriões foram doados para pesquisa) deve ser manipulado dentro dos preceitos éticos (ANVISA, 2020). Com isso, a utilização de espécies de murinos e bovinos, por exemplo, se faz cada vez mais frequente nos laboratórios de pesquisa (WALL; SHANI, 2008).

Os roedores, principalmente camundongos, foram por muitos anos o modelo animal mais popular em laboratórios de pesquisa de fisiologia reprodutiva devido às suas características e fácil obtenção e manutenção dos animais em biotérios. No entanto, nas últimas décadas a utilização de animais maiores, como bovinos e suínos, permitiu maior compreensão de detalhes e vias envolvidas no sistema reprodutivo, gametas e embriões complementando os achados de pesquisas que utilizaram murinos (HABERMANN et al., 2007; ADAMS; SINGH; BAERWALD, 2012). Surgiu então o questionamento de qual seria a espécie mais apropriada para utilizar como modelo em estudos relacionados ao sistema reprodutivo, gametogênese, desenvolvimento embrionário e mecanismos epigenéticos envolvidos nessas etapas em humanos.

O uso de aves, principalmente galinhas, como modelo animal para estudos epigenéticos é interessante devido à facilidade de manipulação e observação *in vivo* ou *in vitro*, uma vez que o desenvolvimento embrionário ocorre em ambiente externo. Porém, ainda se faz necessário um maior conhecimento da reprogramação epigenética que ocorre, principalmente nas CGPs, para essa espécie ser levada em consideração no momento da escolha do modelo animal (BEDNARCZYK et al., 2021). Além disso, processos epigenéticos como o *imprinting* genômico não podem ser estudados neste modelo, uma vez que ainda não existem dados na literatura sobre *imprinting* genômico em outras espécies além de mamíferos (LI; SASAKI, 2011; EDWARDS et al., 2019).

Análises filogenéticas entre humanos, bovinos e camundongos mostraram que proteínas importantes durante o momento da fertilização, assim como o início do desenvolvimento embrionário possuem maior proximidade entre bovinos e humanos do que entre camundongos

e humanos (SYLVESTRE et al., 2013). Já foi demonstrado também que o uso de oócitos de bovinos e suínos fornecem respostas mais confiáveis quando são avaliadas as alterações químicas durante a maturação e fertilização *in vitro*, assim como o desenvolvimento embrionário inicial. Podem ser mencionadas também as semelhanças que existem entre os gametas e embriões nas duas espécies, como é o caso do diâmetro do gameta feminino (150-180µm tanto em humanos como em bovinos) e período das primeiras clivagens (OTOI et al., 1997; SANTOS; SCHOEVERS; ROELEN, 2014). Quando se fala em técnicas de criopreservação de gametas e embriões, os resultados apresentados quando camundongos são utilizados como modelo não refletem a realidade do que ocorre em humanos (MÉNÉZO; HÉRUBEL, 2002). Por fim, os autores descrevem que, levando em consideração diversos fatores, bovinos devem ser escolhidos preferencialmente à murinos quando forem realizados estudos de sistema reprodutivo, gametas e início de desenvolvimento embrionário.

Quanto aos estudos de diferenciação celular no período de pré-implantação, ainda existem dúvidas de qual seria o melhor modelo a ser utilizado. Apesar de pesquisas anteriores indicarem bovinos como o melhor modelo, Carreiro e colaboradores (2021) sugerem que as pesquisas de diferenciação celular e regulação dos genes envolvidos nestes processos deveriam utilizar murinos e bovinos em paralelo, o que permitiria comparar os resultados e determinar com maior precisão qual é mais fiel ao humano.

Apesar de animais de biotérios, como camundongos e coelhos, serem mais fáceis de serem obtidos para pesquisa, as semelhanças entre bovinos e humanos, não apenas em relação a fisiologia e morfologia, mas também levando em conta os aspectos genéticos e epigenéticos, levam a crer que o uso de bovinos como modelo animal é mais apropriado e permite resultados mais fiéis que outras espécies (MÉNÉZO; HÉRUBEL, 2002) quando se fala em sistema reprodutivo, gametogênese, início do desenvolvimento embrionário e reprogramação epigenética. Entretanto, para ser uma opção como modelo animal, ainda são necessárias informações que permitam compreender com clareza mecanismos como a reprogramação epigenética e a regulação gênica durante a maturação e início do desenvolvimento embrionário. Por isso, se faz tão importante as análises de metilação do DNA global e de regiões de interesse, assim como a expressão de genes controlados por *imprinting*, relacionados à diferenciação celular e ao controle da metilação e desmetilação do DNA.

HIPÓTESE

2. Hipótese

A expressão dos genes localizados nas ICRs1 e 2, reguladas respectivamente pelas H19DMR e KvDMR1, é alterada durante a maturação oocitária e o início do desenvolvimento embrionário em bovinos, assim como os genes envolvidos com o controle da metilação e desmetilação do DNA alteram a expressão de acordo com a reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento embrionário.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar as ICR1 e ICR2 durante a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário inicial, em termos da expressão dos seus genes e metilação do DNA, em associação com a expressão de genes envolvidos com a metilação, desmetilação do DNA e pluripotência.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a expressão dos genes das regiões ICR1 e 2, controlados pela H19DMR (*IGF2* e *H19*) e KvDMR1 (*CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*), respectivamente, em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estádios do desenvolvimento pré-implantacional;

Avaliar a metilação do DNA da H19DMR (ICR1) e da KvDMR1 (ICR2) em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estádios durante o desenvolvimento pré-implantacional;

Avaliar a expressão de genes envolvidos com pluripotência (*NANOG* e *OCT4*), metilação (*DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) e desmetilação do DNA (*TET1*, *TET2* e *TET3*) em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estádios do desenvolvimento pré-implantacional;

Comparar a expressão e a metilação do DNA dos genes analisados em relação às fases do desenvolvimento embrionário e a maturação de oócitos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

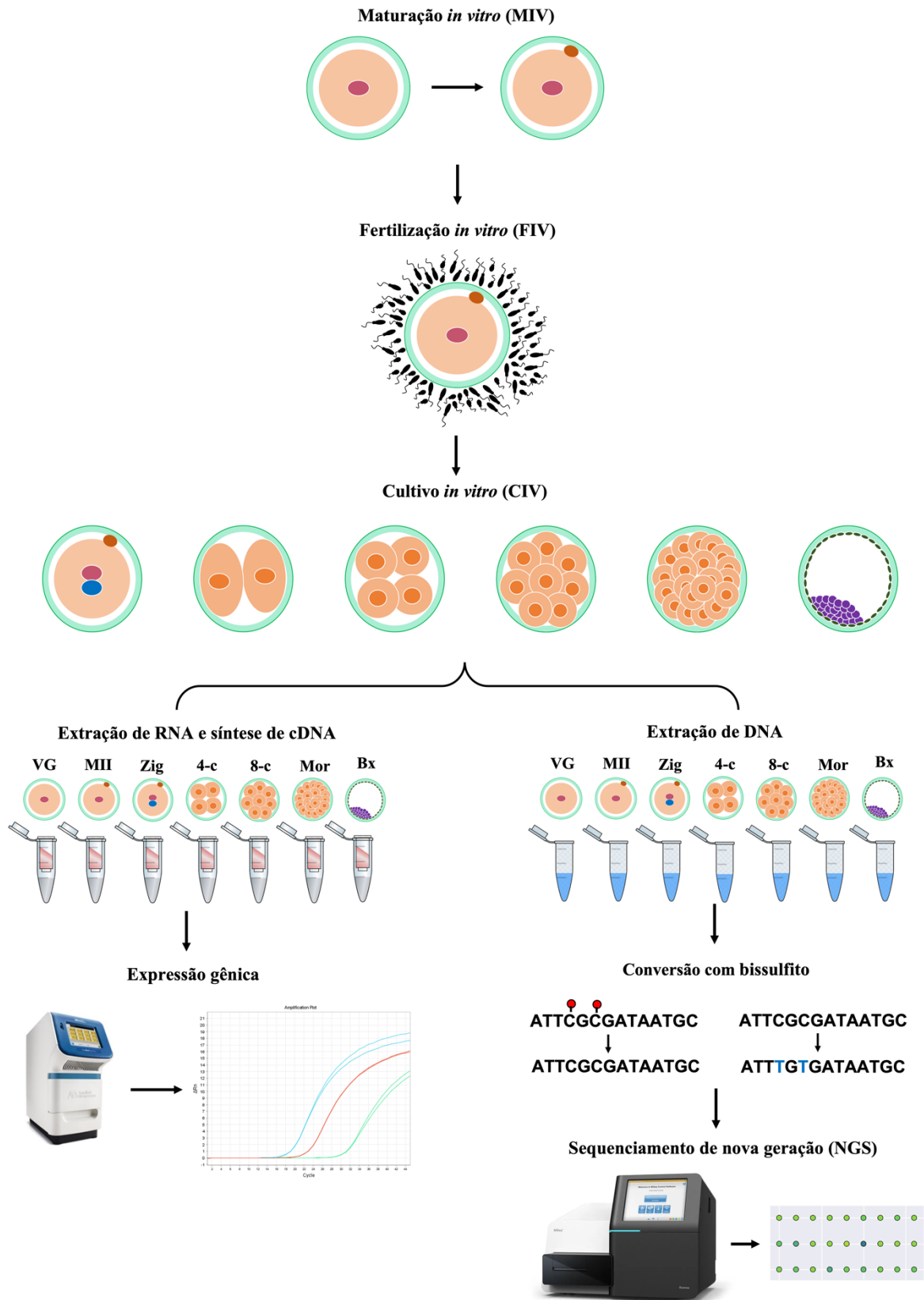


Figura 4 - Delineamento experimental. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

MATERIAL E MÉTODOS

5. Material e Métodos

5.1 Aspectos éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), processo nº004/2019-1 (ANEXO A).

5.2 Produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos

5.2.1 Coleta e seleção dos oócitos

Um total de 747 ovários (entre 40 e 50 ovários por experimento) foram obtidos em frigoríficos próximos à Ribeirão Preto-SP. Eles foram transportados até o laboratório à 36°C em solução salina estéril 0,9% e antibióticos (penicilina, estreptomicina e neomicina). No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina 0,9% e conservados em banho-maria à 36°C até o momento da aspiração folicular. Nos folículos foram encontrados oócitos em estágio de vesícula germinativa classificados como VG0, VG1, VG2 e VG3, de acordo com o nível de condensação da cromatina (LODDE et al., 2007). Com auxílio de uma seringa descartável acoplada a uma agulha 18G, apenas os folículos entre 2 e 8 milímetros foram aspirados (FERRÉ et al., 2020), o que aumenta a possibilidade de selecionar oócitos VG1, VG2 e VG3, ou seja, aqueles com maior porcentagem de cromatina condensada, o que indica potencial de desenvolvimento (LUCIANO; SIRARD, 2018).

O líquido folicular aspirado dos ovários foi colocado em um tubo tipo Falcon (50mL) mantido à 36°C por 10 minutos para decantação dos oócitos. Em seguida, o *pellet* formado foi observado sob estereomicroscópio para a identificação e seleção dos oócitos. Estes foram classificados de acordo com o número de camadas de células do cumulus e aparência do ooplasma, segundo Leibfried e First (1979), e apenas aqueles com mais de três camadas de células do cumulus e ooplasma homogêneo, classificados como grau I (GI), foram selecionados para maturação oocitária. Ao final, foram selecionados 3960 complexos cumulus oócitos (COCs), dos quais 3640 foram colocados para maturação *in vitro* (MIV). Os 320 COCs restantes, em estágio de vesícula germinativa (VG), foram lavados três vezes em solução de hialuronidase (0,04µg/mL) (*Sigma-Aldrich, Co.*) para retirada das células do cumulus e *pools* de 40 oócitos foram armazenados em 10µL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) à -80°C até análise de expressão gênica e metilação do DNA (Figura 5).

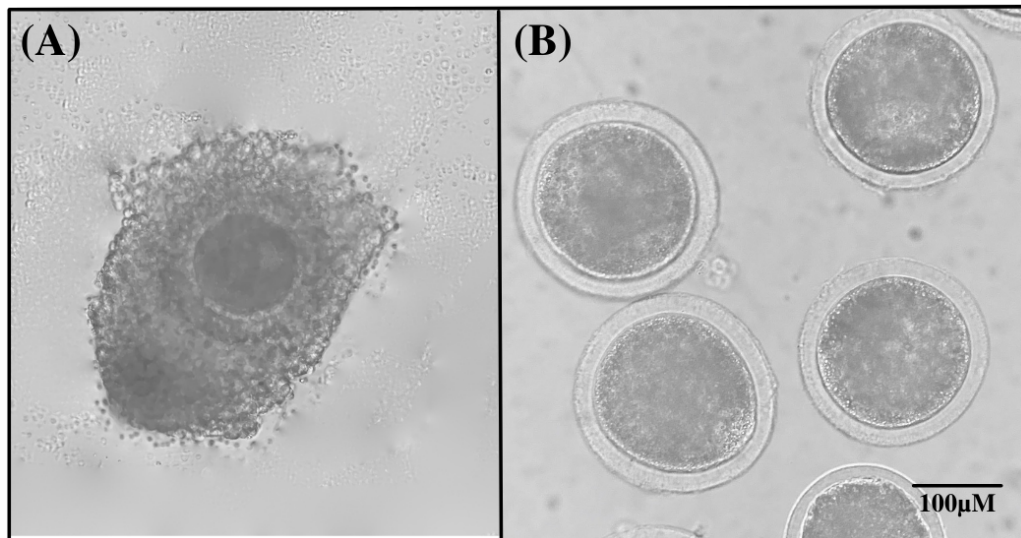


Figura 5 - Oócitos GI selecionados para maturação *in vitro* e coleta. (A) Oócitos GI com ooplasma homogêneo e mais de três camadas de células do cumulus. (B) Oócitos GI sem as células do cumulus após tratamento com hialuronidase. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

5.2.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Após a seleção, os COCs GI foram lavados em meio tamponado H199+ (TCM199 com sais Earles, glutamina, NaHCO_3 e HEPES - *ThermoFisher Scientific*, USA) suplementado com piruvato (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1mL de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico sulfato de amicacina (83 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes e depositados em microgotas (20 oócitos/microgota) de 100 μL de meio de maturação B199+ (TCM199 com sais Earles, glutamina, NaHCO_3 - *ThermoFisher Scientific*, USA) acrescido de piruvato (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10% de SFB, FSH (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LH (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estradiol (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e antibiótico sulfato de amicacina (83 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os oócitos permaneceram em incubadora à 38,8°C, máxima umidade e 5% de CO_2 em atmosfera por 22-24 horas para MIV.

Um dos fatores que evidenciam a maturação oocitária é a expansão das células do cumulus, a extrusão do 1°CP e a mudança do estágio de VG para metáfase da meiose II (MII) (Figura 6) (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). Após o período de MIV, parte dos oócitos foram lavados três vezes solução de hialuronidase (0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*Sigma-Aldrich*, Co.) para retirada das células do cumulus e, aqueles que apresentavam 1°CP foram armazenados (*pools* de 40 oócitos) em 10 μL de PBS à -80°C até análise de expressão gênica e metilação do DNA. O restante dos oócitos (com as células do cumulus) foram para a etapa de fertilização *in vitro*.

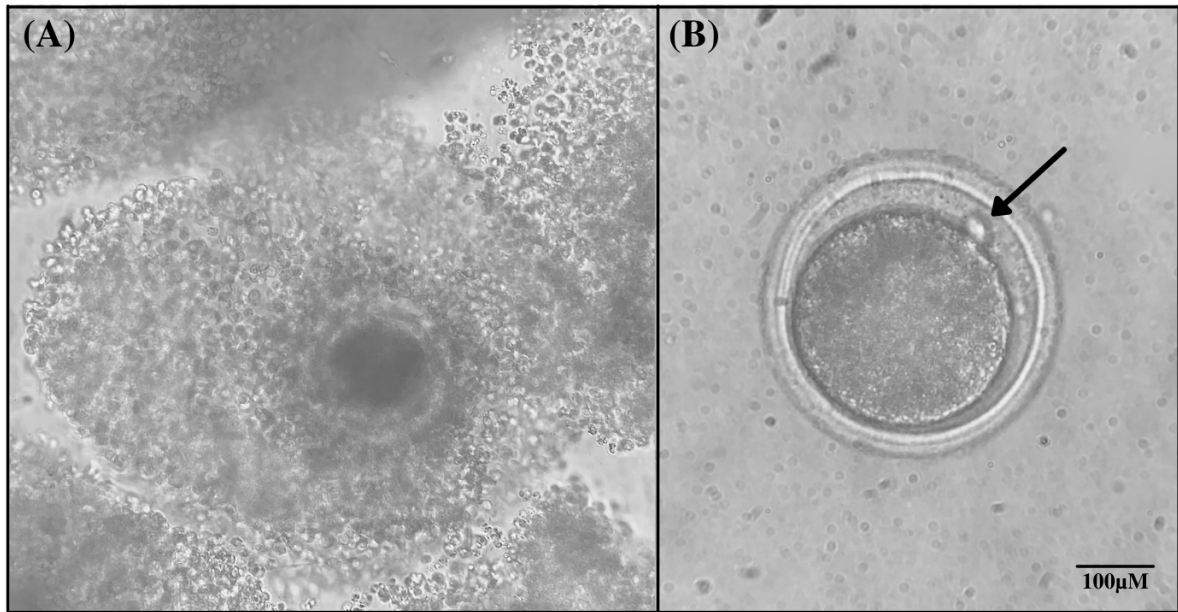


Figura 6 - Oócitos após maturação *in vitro*. (A) Oócito transferido para a fertilização *in vitro* com as células do cumulus expandidas em volta dele pós MIV. (B) Oócito selecionado para coleta após MIV já sem as células do cumulus; seta mostrando a extrusão do corpúsculo polar, indicativo de que a maturação ocorreu de maneira correta. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

5.2.3 Seleção e capacitação espermática

A seleção e capacitação dos espermatozoides foi realizada próximo ao término da maturação oocitária. Foram utilizadas palhetas da mesma partida de um único touro para todas as replicatas. Em cada experimento, uma palheta de sêmen era descongelada em banho-maria à 36°C por 60 segundos e o conteúdo era depositado em um tubo tipo Falcon (15mL) sob um gradiente descontínuo (45% e 90%) de Percoll® (*Sigma-Aldrich*, USA). Em seguida, o gradiente com o sêmen foi centrifugado por 30 minutos à 342xg para que houvesse a formação do *pellet* com os espermatozoides viáveis. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática e motilidade. Com estes dados, o *pellet* foi diluído de modo que houvesse cerca de dois milhões de espermatozoides por mililitro de meio de fertilização (2×10^6 spz/mL). Os espermatozoides foram colocados no meio de fertilização *in vitro* na incubadora à 38,8°C, 5% de CO₂ em ar e máxima umidade 15 minutos antes dos oócitos para que houvesse a capacitação espermática.

5.2.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

Ao final da MIV, os COCs foram lavados duas vezes em meio de fertilização *in vitro* (FIV) (ANEXO B) TALP (ANEXO C) acrescido de heparina, (10µg/mL), piruvato (22µg/mL), BSA sem ácidos graxos (6µg/mL), solução PHE (2µM de penicilamina, 1µM de hipotaurina e

0,25µM de epinefrina) e sulfato de amicacina (83µg/mL). Ao final da lavagem, eles foram transferidos para microgotas (100µL) de meio FIV onde já se encontravam os espermatozoides capacitados. As placas com os gametas foram levadas à incubadora à 38,8°C, 5% de CO₂ e umidade máxima por 18 horas.

5.2.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

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

Em seguida, os zigotos foram lavados três vezes em meio de cultivo CR2 (Charles Rosenkranns 2) (ANEXO D) suplementado com 5% de SFB, 0,03g de BSA V, 0,03g de BSA fração V FAF (livre de ácidos graxos), alanina (8,92µg/µL), glicina (75µg/µL) e antibiótico sulfato de amicacina (83µg/mL) em um volume final de 10mL (VERRUMA et al., 2020) e transferidos para microgotas (50µL) de meio de cultivo para desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Os embriões foram co-cultivados em monocamadas de células de cumulus.

A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a FIV e quatro dias após a FIV (D4) foi realizada a troca de parte do meio de cultivo. Os embriões foram avaliados em estereomicroscópio quanto à morfologia e ao número de células e, aqueles considerados inviáveis, foram separados do restante. Após a avaliação, 30µL do meio CR2 junto com os embriões inviáveis e o excesso do tapete celular foram substituídos por meio CR2 novo, processo este conhecido como *feeding*.

5.2.6 Classificação dos embriões viáveis

No sétimo dia (D7 – 168 horas após a FIV), os embriões foram novamente analisados em estereomicroscópio e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento que se encontravam (Figura 7). Os embriões foram classificados em quatro estádios:

- Blastocisto inicial (Bi), com o início da formação da blastocele (Figura 7A);
- Blastocisto (Bl), com a blastocele ocupando cerca de 50% do volume total do embrião (Figura 7B);
- Blastocisto expandido (Bx), onde o embrião já apresenta a blastocele bastante desenvolvida, formando claramente uma cavidade. É possível observar também o botão embrionário em uma região periférica do embrião e a zona pelúcida delgada (Figura 7C);
- Blastocisto eclodido (Be), o embrião se encontra parcial ou completamente fora da zona pelúcida (Figura 7D).

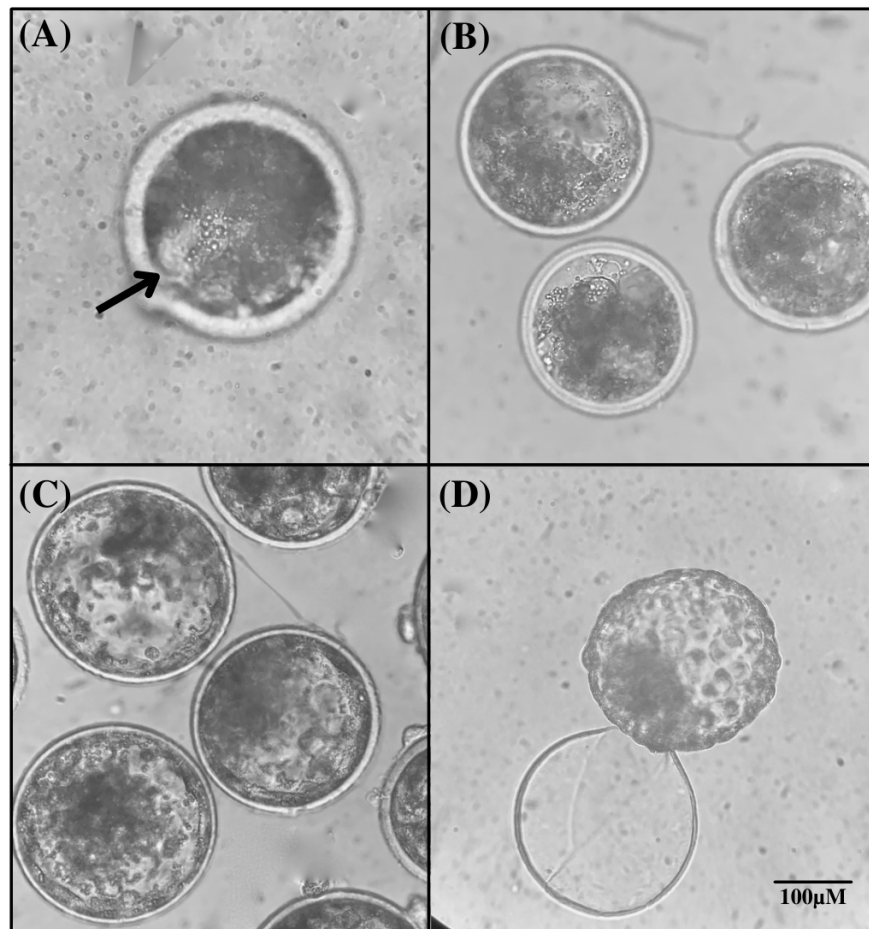


Figura 7 - Classificação dos blastocistos de acordo com morfologia e expansão da blastocele. (A) Blastocisto inicial (Bi). (B) Blastocisto (Bl). (C) Blastocisto expandido (Bx). (D) Blastocisto eclodido (Be). Seta apontando o início da cavitação da blastocele. Aumento: 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

5.2.7 Coleta dos embriões durante o desenvolvimento embrionário

Os embriões foram coletados em cinco diferentes estádios de acordo com Hafez e Hafez (2004) durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, (1) zigotos logo após a retirada das células do cumulus e espermatozoides aderidos (18 horas pós-fertilização), (2) estágio de 4 células (1,5 dia), (3) estágio de 8 células (2,5 dias), (4) mórula (após o *feeding*) e (5) blastocistos expandidos (após a classificação no D7) (Figura 8). Os embriões foram armazenados em *pools* em 10µL de PBS à -80°C até análise de expressão gênica e metilação do DNA.

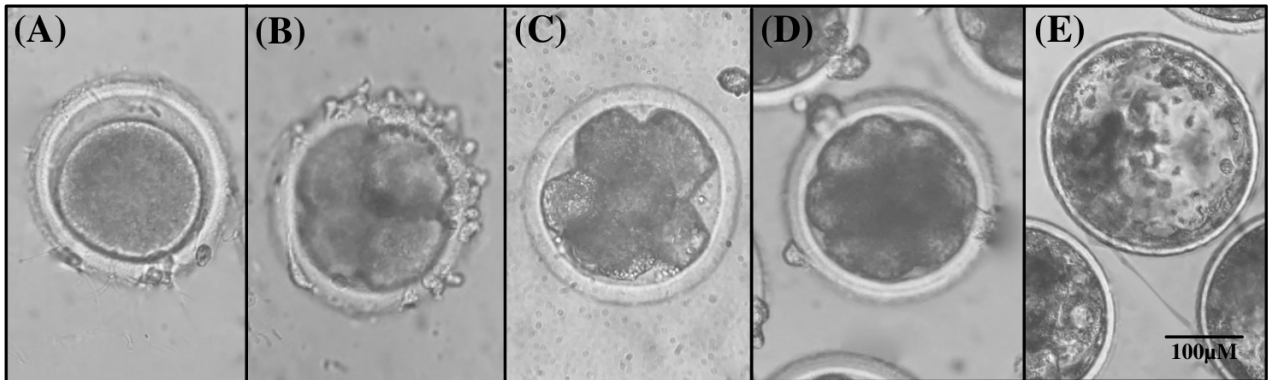


Figura 8 - Embriões nos cinco estádios escolhidos para análise. (A) Embriões de uma célula ou zigotos. (B) Embriões de 4-células. (C) Embriões de 8-células. (D) Mórulas. (E) Blastocistos expandidos. Aumento de 20x. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

5.3 Análise de expressão gênica

5.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada com auxílio do kit *PureLinkTM RNA Mini Kit* (*ThermoFisher Scientific*, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram descongeladas e centrifugadas. Em seguida, foram adicionados 300µL de solução de lise [solução de β-mercaptoetanol 1% (v/v)] e as amostras passaram no agitador tipo *vortex* para que ocorresse a lise celular. Em seguida, com uma pipeta de 200µL, as amostras foram homogeneizadas e um volume de 300µL de etanol 70% foi adicionado. As amostras passaram novamente pelo *vortex* para que não houvesse precipitado. O conteúdo foi então transferido para uma coluna, centrifugado por 15 segundos à 12000xg em temperatura ambiente e o filtrado foi descartado. Em seguida, foram adicionados à coluna 700µL de *wash buffer I*, a coluna foi centrifugada por 15 segundos à 12000xg em temperatura ambiente e o filtrado e tubo coletor foram descartados. Um novo tubo coletor foi acoplado à coluna e 500µL de *wash buffer II* foram adicionados, sendo centrifugada por 15 segundos à 12000xg em temperatura ambiente e o filtrado foi descartado. A lavagem com *wash buffer II* foi repetida e então as colunas foram centrifugadas por dois minutos à 12000xg em temperatura ambiente. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi acoplada à um microtubo de 1,5mL, sendo adicionados 30µL de água *RNase-free* à coluna e deixado em repouso por um minuto em temperatura ambiente. Ao final, a coluna foi centrifugada à 12000xg por 2 minutos para eluir o RNA da membrana e as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA) e as amostras com razão 260nm:280nm maior que 1,8 foram consideradas adequadas. A integridade das amostras foi confirmada em um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em uma eletroforese de 90 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *SuperScript IV First-Strand Synthesis System* (ThermoFisher Scientific, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Primeiro, todos os reagentes foram descongelados e centrifugados. Na primeira reação, 11µL de RNA total, 0,7µL de Oligo(dT)₂₀ (50µM), 0,3µL de *random hexamers* (50ng/µL) e 1µL de 10mM dNTP mix em um volume total de 13µL foram incubados por cinco minutos à 65°C e, em seguida, colocados no gelo por um minuto. Após resfriamento das amostras, foram adicionados 4µL de 5x RT *Buffer SS IV*, 1µL de 0,1M DTT, 1µL de RNA *inhibitor* (40U/µL) e 1µL da enzima *SuperScript IV RT* (200U/µL) em um volume final de 20µL que foram incubados por 10 minutos à 55°C, seguidos de 10 minutos à 80°C para inativação enzimática. Ao final, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a utilização.

5.3.2 PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica foi realizada utilizando o método de transcrição reversa associada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os genes avaliados podem ser divididos em três grupos: (a) genes controlados por *imprinting* (*H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*); (b) genes relacionados à metilação e desmetilação do DNA (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *TET1*, *TET2*, *TET3*) e (c) genes relacionados à pluriopotência (*NANOG* e *OCT4*). Como genes de referência, foram escolhidos da β -actina (*ACTB*) e o *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*). As sequências dos genes-alvo *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1*, *PHLDA2*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *TET1*, *TET2*, *TET3*, *NANOG* e *OCT4* foram obtidas no NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) e os *primers* foram desenhados com auxílio do *software Primer 3Plus* (USA) e *Primer blast* (ncbi.nlm.nih.gov, USA). Para os genes *IGF2*, *KCNQ1OT1* e *GAPDH* foram utilizados *primers* descritos por Verruma e colaboradores (2021). Por último, o *primer* do gene β -actina foi descrito por Rios e colaboradores (2007). As informações sobre a sequência dos *primers*, tamanho dos *amplicons*, eficiência e temperatura de hibridização de cada gene estão apresentadas na Tabela 1.

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

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho <i>amplicon</i> (pb)	Eficiência (%)	Temp. de hibridização (°C)
<i>ACTB</i> ¹	Fw: CCGTCTTCCCGTCCATCGTG Re: GGATGCCTCTCTTGCTCTGA	108	91,8	65
<i>GAPDH</i> ²	Fw: CGCCTGGAGAAACCTGCC Re: GGAGAGTGAGTGTGCTGTTG	135	100,8	65
<i>IGF2</i> ²	Fw: CCCGCCAAGTCCGAGAGG Re: CGCTGGGTGGACTGCTTC	116	99,9	65
<i>H19</i>	Fw: AGTGGGAGGGGCATTGGACT Re: GACCATATCATATCCCTCTGTGC	182	100,2	65
<i>KCNQ10T1</i> ²	Fw: GGAGACAGAGGCCAGAAAG Re: TAAGTGCCTGTGGAGCCTG	188	104,8	65
<i>KCNQ1</i>	Fw: TCGTCTACCACTTCGCTGTCT Re: ATGAGGTCGATGATGGAAATG	244	95,3	65
<i>CDKN1C</i>	Fw: GCCTTCATCTCCGACTTCTT Re: GCGCTCCTCTCCTGTCCAC	208	99,9	65
<i>PHLDA2</i>	Fw: GGGCGAGAGCTACTGGAAC Re: GATTCGCCGTGGGACTTAG	190	105,5	65
<i>DNMT1</i>	Fw: TCGGGTGGAAAGAGATACAGA Re: ACGCTGAAGCAGGTTAGTTT	117	97,1	65
<i>DNMT3a</i>	Fw: CGCATTGTGTCTTGGTGGAT Re: GCAGGACCTCGTAGATAGCC	196	95,3	65
<i>DNMT3b</i>	Fw: AGGACTCGGTCTGAAAGCCC Re: GGACCTGGTAGTTGAGAACG	153	95,5	65
<i>TET1</i>	Fw: TTTCTCTGGGGTCACTGCTT Re: CCCTTGATCCAAACTCATCTG	197	96,9	65
<i>TET2</i>	Fw: AGCTCACCGAGACGCTAAGG Re: AAAGAAAAGGAGGCACCACA	121	100,9	65
<i>TET3</i>	Fw: GAACTCATGGAGGAGCGGTA Re: GATCACCCACTTTGCGATG	117	96,1	65
<i>OCT4</i>	Fw: GGAGGAAGCTGACAACAACG Re: CACGTCTTTCTCCAGCCCGA	196	101,4	65
<i>NANOG</i>	Fw: CATGCCTGAAGAAAGTTACG Re: CTGGGGCTTGTGGAAGAATC	132	93,4	65

pb, pares de base. Temp, temperatura. ¹RIOS et al., 2007. ²VERRUMA et al., 2021. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2020).

Uma amostra de pulmão bovino foi utilizada para padronização dos *primers* (com exceção do gene *NANOG*), dos experimentos e como controle de experimento, sendo utilizado em todas as corridas. Por ser um gene com expressão majoritariamente no início do desenvolvimento e não em tecidos específicos, os *primers* referentes ao gene *NANOG* foram padronizados com uma amostra extra de blastocistos. Seguindo Livak e Schmittgen (2001), para cada gene foi realizada uma curva de diluição seriada, construindo um gráfico de quatro pontos de diluição (1:2), o que permitiu avaliar a eficiência e especificidade de cada par de *primer*. Foram considerados adequados para análise de expressão gênica apenas aqueles que apresentaram eficiência entre 90 e 110%, segundo as especificações do fabricante do equipamento *StepOne*.

As análises foram realizadas com a utilização do sistema de detecção de sequência *StepOne Plus Real-Time PCR* com *SYBR® Green PCR MasterMix* (Applied Biosystems, USA) e como método de quantificação foi utilizado o C_q (ciclo de quantificação) comparativo ou quantificação relativa. As reações foram realizadas com 5µL de *SYBR® Green PCR MasterMix*, 0,5µL de *primer forward* (2pmol), 0,5µL de *primer reverse* (2pmol), 2µL de água e 2µL de cDNA [diluição 1:3 (v/v)] em um volume final de 10µL. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por um minuto. Ao final da amplificação, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (*melting curve*) para verificar a especificidade e ausência de dímeros de *primer* (Figura 9). As reações foram avaliadas em triplicata para todos os genes (alvo e referência), sendo consideradas na análise apenas as que apresentaram desvio padrão menor ou igual a 0,3 (Figura 10). Além disso, também foi incluído um controle negativo para cada gene para verificação de contaminação.

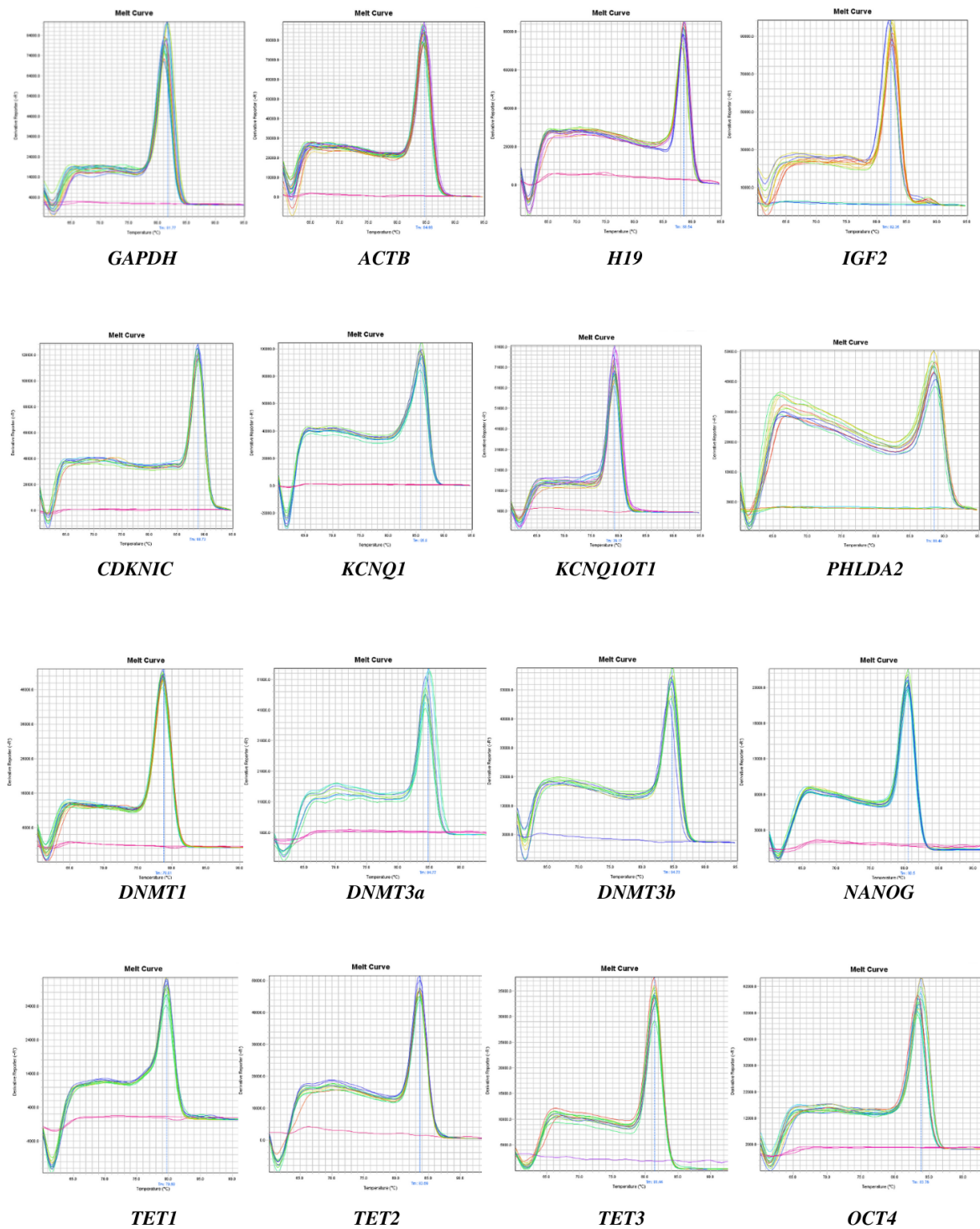


Figura 9 - Curva de *melting* dos genes avaliados. Análise da curva de *melting* demonstrando a especificidade dos *primers* utilizados. Os controles negativos estão representados nas linhas que não amplificaram durante a corrida. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

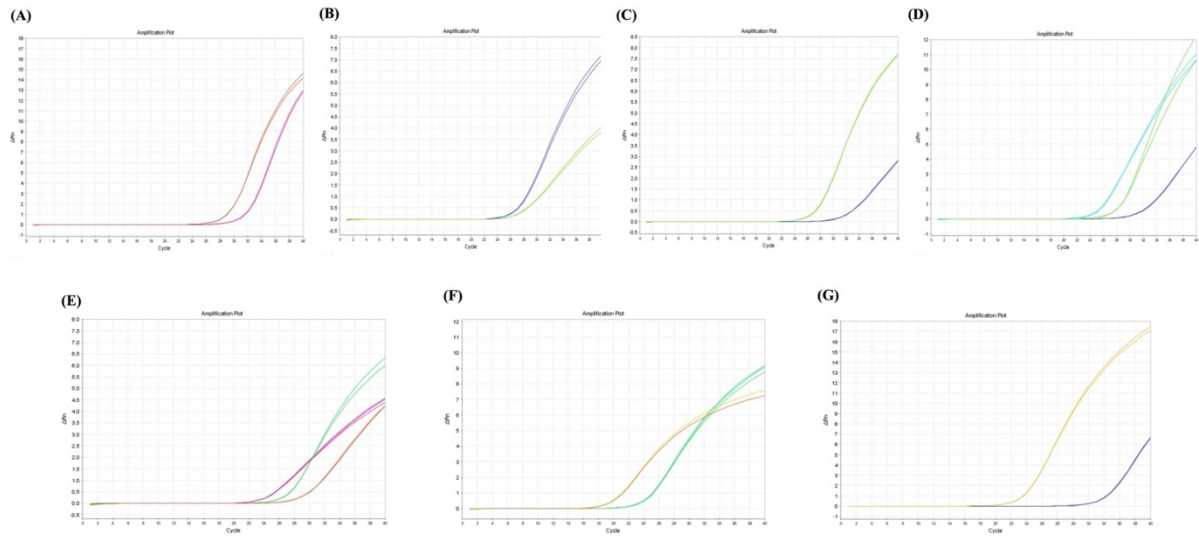


Figura 10 - Exemplo de amplificação dos genes avaliados, onde (A) gene *IGF2* em vermelho e *CDKN1C* em rosa; (B) gene *OCT4* em azul e *DNMT1* em verde; (C) gene *TET3* em verde e *NANOG* em azul; (D) gene *KCNQ1OT1* em azul claro, *H19* em verde e *KCNQ1* em azul escuro; (E) gene *DNMT3a* em verde, *TET1* em rosa e *TET2* em vermelho; (F) gene *ACTB* em vermelho e *DNMT3b* em verde; (G) gene *GAPDH* em amarelo e *PHLDA2* em azul escuro. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Os resultados obtidos através da análise das amostras foram comparados diretamente e a normalização da expressão gênica foi realizada seguindo os preceitos de Pfaffl (2001) que leva em consideração o *slope* para a realização da quantificação relativa (do inglês *relative quantification*, RQ). Os cálculos foram realizados de acordo com a 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 foram 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})

$[\Delta Cq]$; 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}).

5.4 Análise de metilação do DNA da KvDMR1 e H19DMR

Os níveis de metilação do DNA da KvDMR1 e da H19DMR foram avaliados utilizando sequenciamento de nova geração (do inglês, *next generation sequence*, ou NGS) após conversão com bissulfito de sódio. Foram avaliados oócitos em estadio VG e MII, embriões em estadio de zigoto, 4-células, 8-células, mórula e blastocisto expandido (Bx).

5.4.1 Extração do DNA

Para a extração de DNA dos oócitos e embriões, foram adicionados às amostras 2 μ L de Proteinase K (20ng/ μ L) (*Invitrogen*, USA) e 18 μ L de Tris HCl (10mM). As amostras foram incubadas por uma hora à 55°C seguido de 10 minutos a 95°C para inativação da enzima, sendo armazenadas ao final em freezer -20°C. No dia seguinte, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*ThermoFisher Scientific*, USA) e aquelas com razão 260nm:280nm próximas a 2 foram consideradas adequadas para uso.

5.4.2 Conversão do DNA por bissulfito

A conversão do DNA com bissulfito consiste na troca das citosinas não metiladas por timinas, o que permite analisar a metilação do DNA das regiões de interesse quando os fragmentos são sequenciados. A conversão do DNA foi feita utilizando o *EpiTect Bissulfite Kit* (*QIAGEN, Hilden Germany*) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram descongeladas, homogeneizadas e um total de 30 μ L foi transferido para um microtubo de 200 μ L. Em seguida foram adicionados 10 μ L de água *RNase-free*, 85 μ L de mix de bissulfito e 15 μ L de DNA *protect buffer*. A solução com um volume total de 140 μ L foi incubada em termociclador Bio-Rad T100 *Thermal Cycle* (*Bio-Rad Laboratories, USA*) por 5 horas (Tabela 2) para conversão do DNA.

Tabela 2 - Ciclagem determinada para conversão das citosinas não-metiladas em timinas utilizando bissulfito.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Denaturação	95	5
Incubação	60	25
Denaturação	95	5
Incubação	60	85
Denaturação	95	5
Incubação	60	175
Espera	20	Indefinido

Fonte: *EpiTect Bissulfite Kit (QIAGEN, Hilden Germany)*.

Após o processo de conversão, foi realizada a limpeza do DNA seguindo as recomendações do fabricante. Primeiro, a solução foi transferida para um microtubo de 1,5mL, e em seguida foram adicionados 560µL de *buffer* BL (*buffer* BL + 10µg/mL de RNA *carrier*) e homogeneizados. A solução foi transferida para uma coluna (fornecida pelo kit), sendo centrifugada por 1 minuto à 14000xg. O líquido do tubo coletor foi descartado e o tubo foi conectado à coluna novamente. Em seguida, 500µL de *buffer* BW (do inglês, *wash buffer*) foram adicionados à coluna, sendo centrifugada por um minuto à 14000xg e o líquido do tubo coletor descartado. O tubo coletor foi recolocado na coluna e 500µL de *buffer* BD (do inglês, *desulfonation buffer*) foram adicionados, sendo incubado por 15 minutos em temperatura ambiente (15-25°C).

Após este período, a coluna foi centrifugada por um minuto à 14000xg e o líquido do tubo coletor descartado. Em seguida, 500µL de *buffer* BW foram adicionados à coluna e ela foi centrifugada por um minuto à 14000xg e o líquido do tubo coletor foi descartado, repetindo este passo uma vez. Após o descarte do líquido e tubo coletor, um novo tubo coletor (2mL) foi acoplado à coluna e ela foi centrifugada por um minuto à 14000xg para remoção de líquidos residuais. Somado a isto, a coluna foi incubada por cinco minutos à 56°C com a tampa aberta para evaporação de líquidos remanescentes. Por fim, um novo microtubo (1,5mL) foi encaixado à coluna e 20µL de *buffer* BE (do inglês, *elution buffer*) foram adicionados ao centro da membrana. A coluna foi centrifugada por um minuto à 12000xg para eluição do DNA purificado. Para aumentar a quantidade de DNA, foram adicionados mais 20µL de *buffer* BE e a coluna foi novamente centrifugada, totalizando 40µL de DNA purificado. O material foi

armazenado em freezer -20°C até realização da amplificação dos fragmentos de interesse por PCR.

5.4.3 Amplificação da H19DMR e da KvDMR1 por PCR

Após a conversão, a H19DMR e KvDMR1 foram amplificadas por PCR *end point* em um termociclador Bio-Rad T100 *Thermal Cycle* (Bio-Rad Laboratories, USA) em uma reação com volume final de 25µl. Cada reação era composta por 2,5µl de 10x PCR *buffer* II, 1,5µl de MgCl₂ (25mM), 0,5µl de dNTP (10mM), 0,5µl de cada *primer* (10pmol), 0,2µl de *AmpliTaq Gold*[®] *DNA polymerase* (5U/µl) (ThermoFisher Scientific, USA), 3µl de amostra e 16,3µl de água ultrapura. Para a amplificação, primeiro as amostras foram submetidas à 95°C por cinco minutos, seguido por 50 ciclos de 45 segundos à 94°C, 45 segundos à 59°C e 45 segundos à 72°C. A extensão final foi de 10 minutos à 72°C. A amplificação das regiões de interesse foi confirmada através de um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em uma eletroforese. Os produtos da PCR foram armazenados em freezer -20°C até a realização do sequenciamento.

As ilhas CpGs da H19DMR e KvDMR1 foram previstas com o *software MethPrimer* (LI; DAHIYA, 2022). Baseado na localização das ilhas CpGs, os *primers* foram desenhados como descrito por Miranda-Furtado (2012). No fragmento escolhido são observadas 10 CpGs na H19DMR e 18CpGs na KvDMR1 (Figura 11), sendo adicionadas as sequências dos adaptadores identificadas pelo MiSeq (*Illumina*, USA). As sequências (adaptadores + *primers*) das duas regiões estão listadas na Tabela 3.

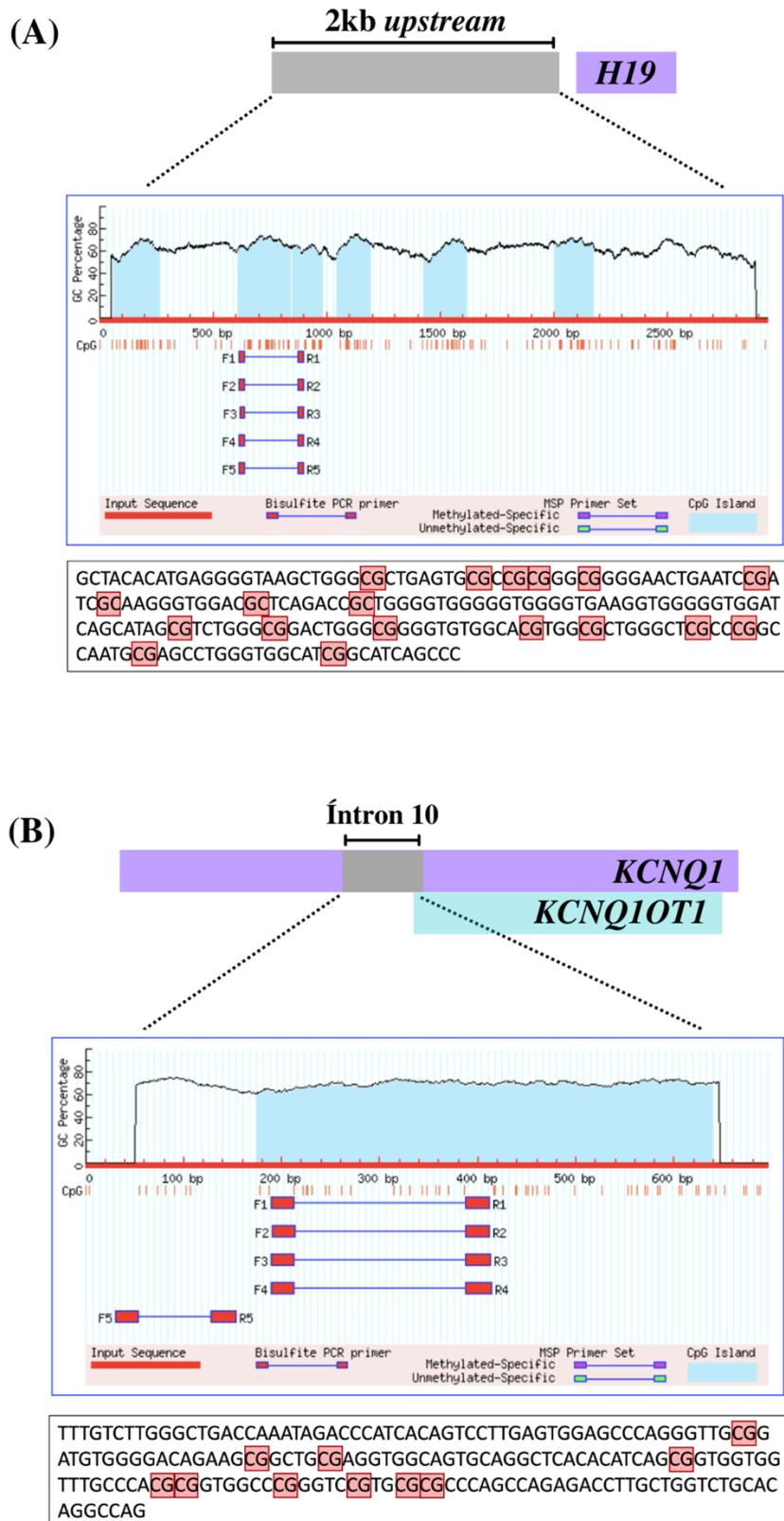


Figura 11 - Predição das ilhas CpGs e fragmento escolhido para amplificação da (A) H19DMR e (B) KvDMR1 localizadas no cromossomo 29 bovino. Segundo o *software MethPrimer* as ilhas CpGs estão representadas em azul. Abaixo está descrita a sequência de nucleotídeos do fragmento selecionado em cada região. As CpGs estão destacada em vermelho Fonte: Modificado de Li; Dahiya (2022).

Tabela 3 - Sequência de adaptadores (em negrito) e *primers* para reconhecimento e sequenciamento pelo MiSeq (*Illumina*, USA).

Região	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Comprimento do fragmento (pb)
H19DMR	Fw – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	253
	TTTGT TTTGGGTTGATTA AATAGATT	
	Re – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	
	CTAACCTATACAAACCAACAAAATC	
KvDMR1	Fw – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	276
	GTTATATATGAGGGGTAAGTTGG	
	Re – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	
	AAACTAATACCRATACCACCCAAA	

pb, pares de base.

5.4.4 Sequenciamento de nova geração pós conversão do DNA com bissulfito

O sequenciamento das regiões de interesse foi realizado em parceria com o Laboratório de Genômica e Bioinformática do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) sob coordenação da Profa. Dra. Cristiana L. M. Furtado. O sequenciamento pós-conversão com bissulfito (Bis-Seq) foi realizado usando o aparelho MiSeq (*Illumina*, USA). Os produtos de PCR contendo os adaptadores foram purificados utilizando *beads* magnéticas, e as bibliotecas foram preparadas com o Nextera XT index (96 indexes, 384 samples) seguindo o protocolo correspondente ao 16S *Metagenomic Sequencing Library Preparation* modificado para sequenciamento de alvos específicos, de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3*, 600pb *pair-end* conforme descrito por Miranda-Furtado e colaboradores (2019). A qualidade e especificidade do sequenciamento seguiram os padrões de qualidade determinados pelo fabricante com valor de qualidade da base determinada pelo *Q-Score* de 30 (Q30 = 1 erro a cada 1000 nucleotídeos sequenciados) > 70% para bibliotecas 300pb *pair-end* e *passing filter* até 1200-1400 k/mm² clusters.

Os arquivos fastq de cada uma das amostras foram gerados na plataforma *BaseSpace* (*Illumina*, USA) (bcl2fastq2-v2-20). Os adaptadores e *index* foram removidos do fragmento usando o *software* Trimmomatic v0.38.124. A leitura das sequências pareadas foi realizada com auxílio do FLASH v1.2.11.425 e o alinhamento ao genoma convertido com bissulfito utilizando Bismark v0.18.2 com os parâmetros: -ambig_bam26, que também foi utilizado para contar os fragmentos com diferentes padrões de metilação do DNA. As regiões foram classificadas em

três de acordo com a porcentagem de metilação, sendo: (1) metiladas se houvesse $\geq 61\%$ de ilhas CPGs metiladas, (2) parcialmente metiladas se apresentasse entre 31 e 60% de ilhas CPGs metiladas e (3) não-metiladas se apresentassem menos de 30% de ilhas CPGs metiladas. A visualização das CpGs metiladas nas duas regiões de interesse foi realizada baseando-se em Tabsat v1.0.227.

5.5 Análise estatística

A expressão gênica foi avaliada a partir da comparação entre os dois estádios da maturação e entre os cinco estádios durante o desenvolvimento embrionário. A distribuição dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk (nível de significância: 0,05). O padrão de expressão de cada gene foi comparado utilizando o teste ANOVA (nível de significância: 0,05), seguido de teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em R (v. 4.0.1) e RStudio (v. 1.4.1717).

RESULTADOS

6. Resultados

6.1 Produção embrionária

Um total de 13 replicatas foram realizadas para coletar as amostras necessárias nos sete estádios, sendo que 2478 zigotos iniciaram o cultivo *in vitro*. Durante o desenvolvimento, os embriões foram avaliados quanto à taxa de clivagem (48 horas após a fertilização), apresentando $86,50\% \pm 5,0$ de embriões clivados e produção de blastocistos (D7) ao final do sétimo dia, apresentando uma taxa de $36,26\% \pm 10,7$.

A coleta dos oócitos e embriões foi realizada de acordo com Hafez e Hafez (2004) com a intenção de avaliar a regulação epigenética, o perfil de expressão genética e a metilação do DNA antes (oócito VG) e depois (oócito MII) da maturação *in vitro*, assim como antes (zigoto e 4-células), durante (8-células) e após a ativação do genoma bovino (mórula e blastocistos expandidos).

6.2 Expressão gênica

6.2.1 Genes controlados por *imprinting* localizados na H19DMR e KvDMR1

Nos genes controlados pela H19DMR, a expressão relativa foi detectada em, pelo menos, seis diferentes estádios durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (Tabela 4).

Tabela 4 - Ciclo de quantificação (média \pm DP) dos genes controlados por *imprinting* localizados na H19DMR.

Estádio	Cq (Média + DP)	
	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>
VG	30,50 \pm 0,8	31,47 \pm 1,23
MI	28,10 \pm 1,62	30,58 \pm 1,49
Zig	22,13 \pm 0,54	23,81 \pm 0,22
4-cel	21,77 \pm 0,44	24,88 \pm 0,20
8-cel	24,92 \pm 1,50	26,99 \pm 1,33
Mor	27,86 \pm 1,88	30,08 \pm 1,48
Bx	0	27,67 \pm 0,52

Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MI, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

Entre os genes da ICR1 (H19DMR), o estadiu de zigoto (ou embrião de uma célula) foi o que apresentou maior expressão gênica. Também foi o único estadiu que apresentou diferença estatística quando sua expressão foi comparada com a de todos os demais, tanto para o gene *H19* ($F_{(6)}= 41,89$; $p<0,01$) quanto para o *IGF2* ($F_{(6)}= 44,2$; $p<0,01$). Em ambos os genes, ocorreu uma redução da expressão entre os estadios de zigoto e 4-células, seguido por um aumento da expressão no estadiu seguinte 8-células (apesar de não significativa) e por uma nova redução até o estadiu de Bx. O gene *IGF2* não teve sua expressão detectada no estadiu de Bx (Figura 12).

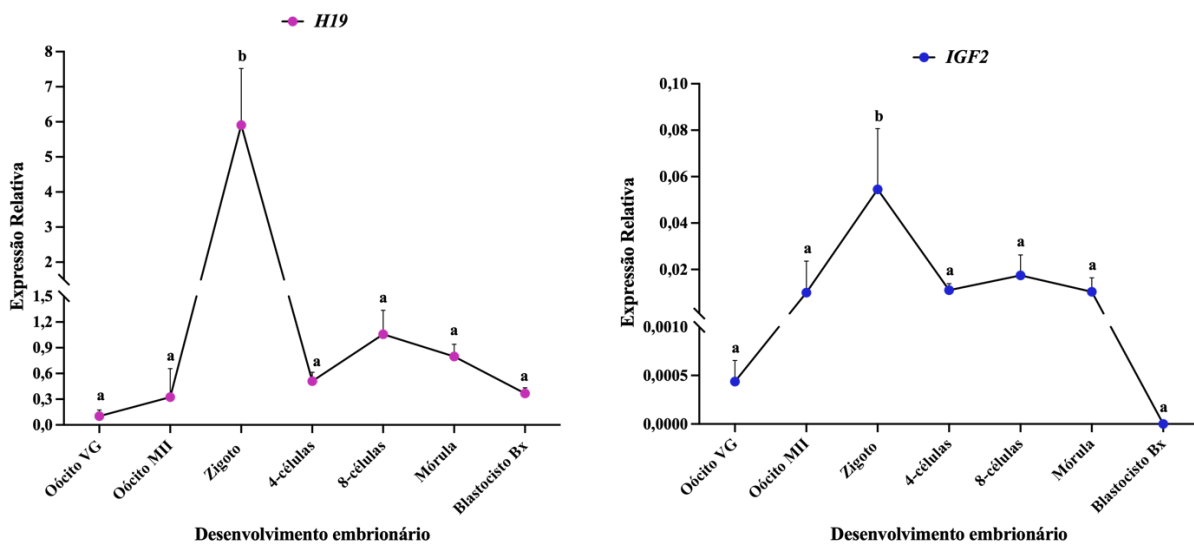


Figura 12 - Expressão relativa dos genes *IGF2* e *H19*. O gráfico mostra os sete estadios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Em rosa, genes maternalmente expressos e em azul, genes paternalmente expressos. Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Nos genes controlados pela KvDMR1, a expressão relativa foi detectada em, pelo menos, quatro diferentes estadios durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (Tabela 5).

Tabela 5 - Ciclo de quantificação (média \pm DP) dos genes controlados por *imprinting* localizados na KvDMR1.

Estadio	Cq (Média \pm DP)			
	<i>CDKN1C</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNQ1OT1</i>	<i>PHLDA2</i>
VG	26,96 \pm 0,55	0	28,77 \pm 1,07	31,89 \pm 0,13
MII	27,37 \pm 0,61	41,05 \pm 1,21	28,46 \pm 1,11	36,32 \pm 0,92
Zig	25,93 \pm 0,45	32,88 \pm 0,91	23,20 \pm 0,33	32,32 \pm 0,39
4-cel	25,24 \pm 1,03	32,88 \pm 1,07	23,63 \pm 0,18	33,08 \pm 0,82
8-cel	26,64 \pm 1,73	36,17 \pm 0,96	26,43 \pm 0,63	36,43 \pm 1,97
Mor	29,69 \pm 1,34	0	28,00 \pm 0,67	37,32 \pm 0,59
Bx	27,25 \pm 0,69	0	25,46 \pm 0,53	35,54 \pm 1,35

Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

Os genes *KCNQ1*, *KCNQ1OT1*, *CDKN1C* e *PHLDA2*, envolvidos com a KvDMR1, apresentaram diferença significativa na expressão observada nos diferentes estadios ($F_{(6)} = 5,96$; $p < 0,01$; $F_{(6)} = 20,04$; $p < 0,01$; $F_{(6)} = 14,95$; $p < 0,01$; $F_{(6)} = 44,2$; $p < 0,01$). Assim como nos genes envolvidos com a H19DMR, o estadio de zigoto apresentou a maior expressão nos genes *KCNQ1* e *KCNQ1OT1* (Figura 13). Já o gene *CDKN1C* apresentou sua maior expressão em oócitos MII, enquanto para *PHLDA2* a maior expressão foi observada em oócitos VG (Figura 13). Com exceção do *CDKN1C*, pôde ser observada nos três outros genes uma redução significativa da expressão entre os estadios de zigoto e 4-células.

O *CDKN1C* apresentou também um aumento significativo da expressão no estadio de 8-células. Esse aumento também foi observado no genes *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*, porém sem diferença estatística. Esse aumento coincide, no caso de bovinos, com a ativação do genoma embrionário. Além disso, o *KCNQ1* foi o gene da ICR2 (KvDMR1) que apresentou os menores níveis de expressão durante todos os estadios avaliados e não teve a sua expressão detectada em três dos estadios avaliados: oócitos VG, embriões em mórula e Bx (Figura 13)

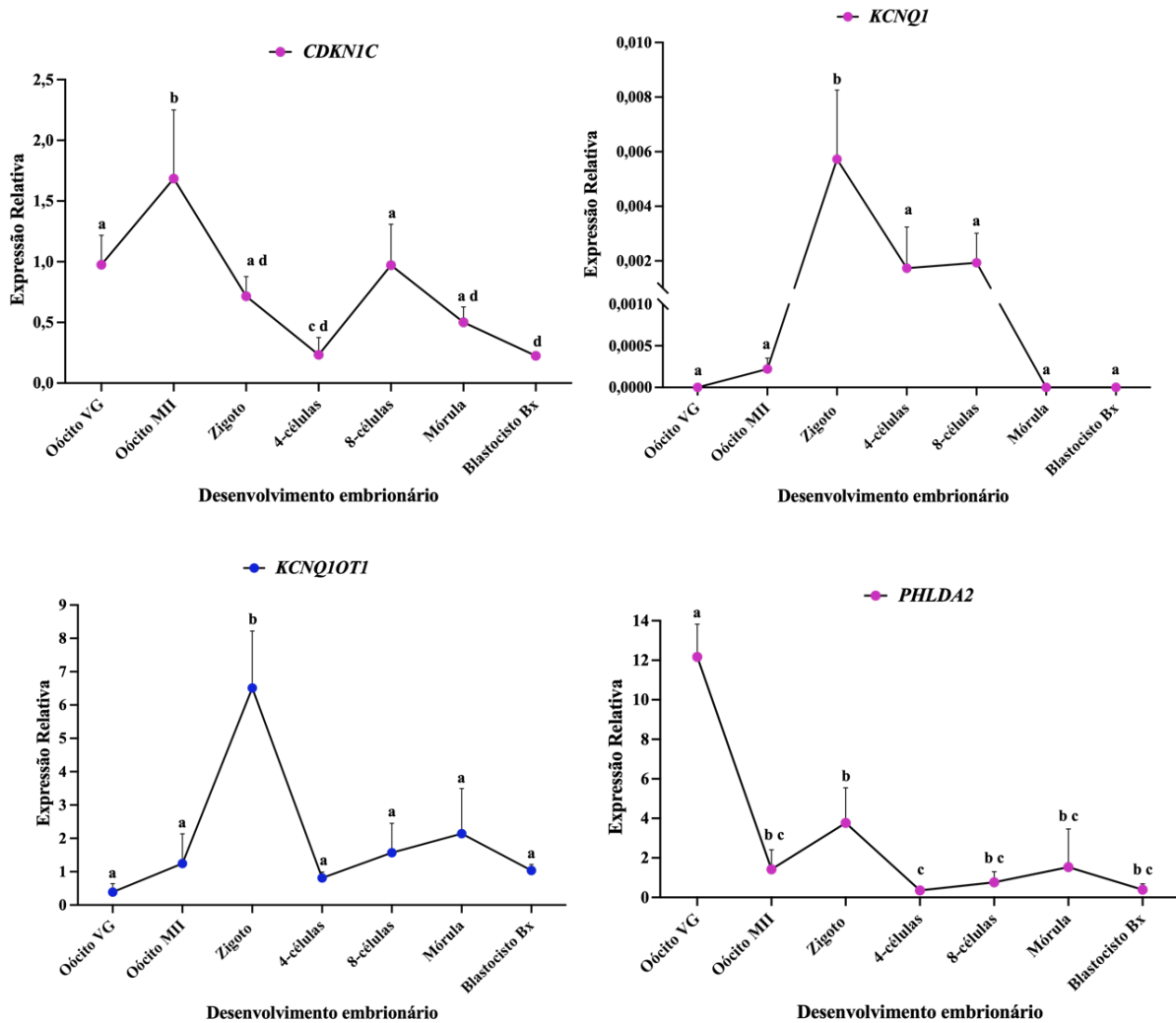


Figura 13 - Expressão relativa dos genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* e *PHLDA2*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Em rosa, genes maternalmente expressos e em azul, genes paternalmente expressos. Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022)

6.2.2 Genes relacionados à metilação do DNA

Foram escolhidos os genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* relacionados à metilação do DNA. A detecção destes genes foi identificada em todos os estádios avaliados como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Ciclo de quantificação (média \pm DP) dos genes da família *DNMT*.

Estadio	Cq (Média \pm DP)		
	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3a</i>	<i>DNMT3b</i>
VG	22,53 \pm 0,51	23,62 \pm 0,25	21,52 \pm 0,26
MII	22,52 \pm 0,33	23,74 \pm 0,26	21,49 \pm 0,32
Zig	23,44 \pm 1,24	23,30 \pm 0,79	22,63 \pm 0,66
4-cel	23,27 \pm 0,31	22,71 \pm 0,35	23,64 \pm 0,22
8-cel	27,61 \pm 1,68	26,66 \pm 1,15	27,02 \pm 0,59
Mor	28,64 \pm 0,25	28,67 \pm 0,67	29,12 \pm 0,17
Bx	27,93 \pm 0,70	23,53 \pm 0,33	22,51 \pm 0,80

Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

Os estadios com maior expressão foram oócito MII seguido por oócito VG nos três genes da família *DNMT*. Foi possível observar uma redução significativa na expressão do *DNMT1* ($F_{(6)}= 84,43$; $p<0,01$), *DNMT3a* ($F_{(6)}= 63,22$; $p<0,01$) e *DNMT3b* ($F_{(6)}= 153,2$; $p<0,01$) entre o final da maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário, até o estadio de 4-células (Figura 14). Após a redução na expressão, o *DNMT1* se manteve estável no decorrer do desenvolvimento embrionário.

Por outro lado, apesar de não ter apresentado diferença estatística, foi possível observar um aumento na expressão dos genes *DNMT3a* e *DNMT3b* entre os estadios de 8-células e Bx. Embora seja em proporções diferentes, a análise dos gráficos mostra um comportamento semelhante entre a expressão dos genes *DNMT3a* e *DNMT3b* durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (Figura 14).

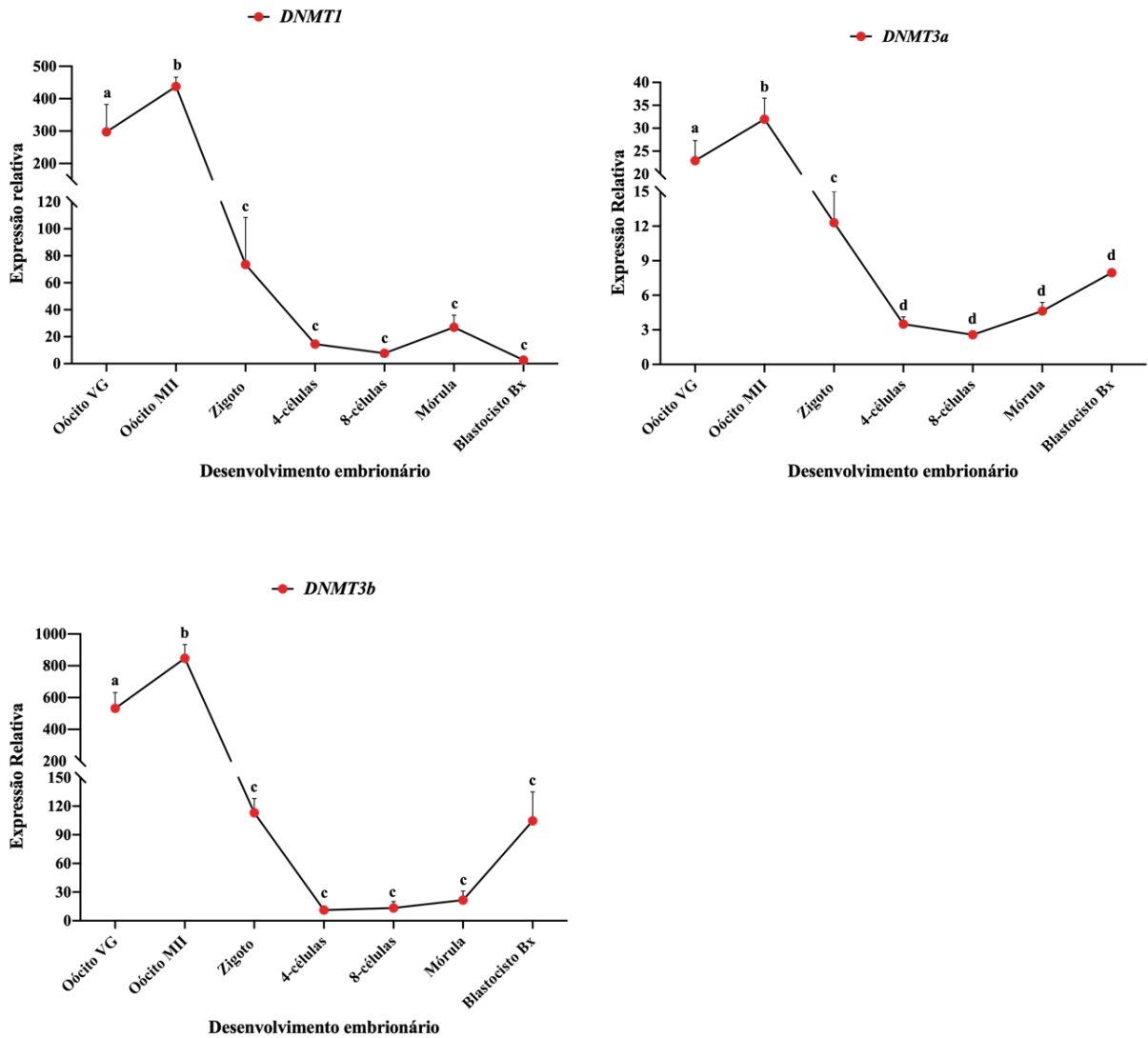


Figura 14 - Expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Por outro lado, para avaliar os genes relacionados à desmetilação do DNA foram utilizados os genes *TET1*, *TET2* e *TET3*. Assim como os genes da família *DNMT*, a expressão dos genes da família *TET* foi detectada em todos os estádios avaliados (Tabela 7).

Tabela 7 - Ciclo de quantificação (média \pm DP) dos genes da família *TET*.

Estadio	Cq (Média \pm DP)		
	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>
VG	33,24 \pm 1,34	28,20 \pm 0,22	22,79 \pm 0,44
MII	33,35 \pm 1,06	28,73 \pm 0,38	22,83 \pm 0,47
Zig	28,13 \pm 0,40	27,67 \pm 0,81	23,38 \pm 0,88
4-cel	28,72 \pm 0,47	27,46 \pm 0,13	23,16 \pm 0,17
8-cel	27,47 \pm 0,82	31,46 \pm 1,66	26,70 \pm 1,31
Mor	25,82 \pm 0,68	32,97 \pm 0,16	28,88 \pm 0,28
Bx	23,16 \pm 0,27	30,56 \pm 0,53	27,00 \pm 0,60

Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

A expressão do gene *TET1* também foi diferente entre os estadios analisados ($F_{(6)}=128,8$; $p<0,01$). Neste gene, foi possível observar que a expressão se manteve baixa até o estadio de 4-células quando começou a aumentar significativamente até o estadio de mórula (maior expressão dentre todos os avaliados), seguido por uma redução significativa em Bx (Figura 15).

Antagonistas ao *TET1*, tanto para *TET2* como *TET3* o pico de expressão foi observado durante a maturação oocitária, em oócito MII ($F_{(6)}=22,53$; $p<0,01$ e $F_{(6)}=73,99$; $p<0,01$, respectivamente), como pode ser observado na Figura 15. É notável que *TET2* e *TET3* apresentaram um padrão de expressão semelhante durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário com uma redução significativa entre os estadios de oócito MII e embriões 4-células, mantendo-se relativamente baixa até Bx (Figura 15).

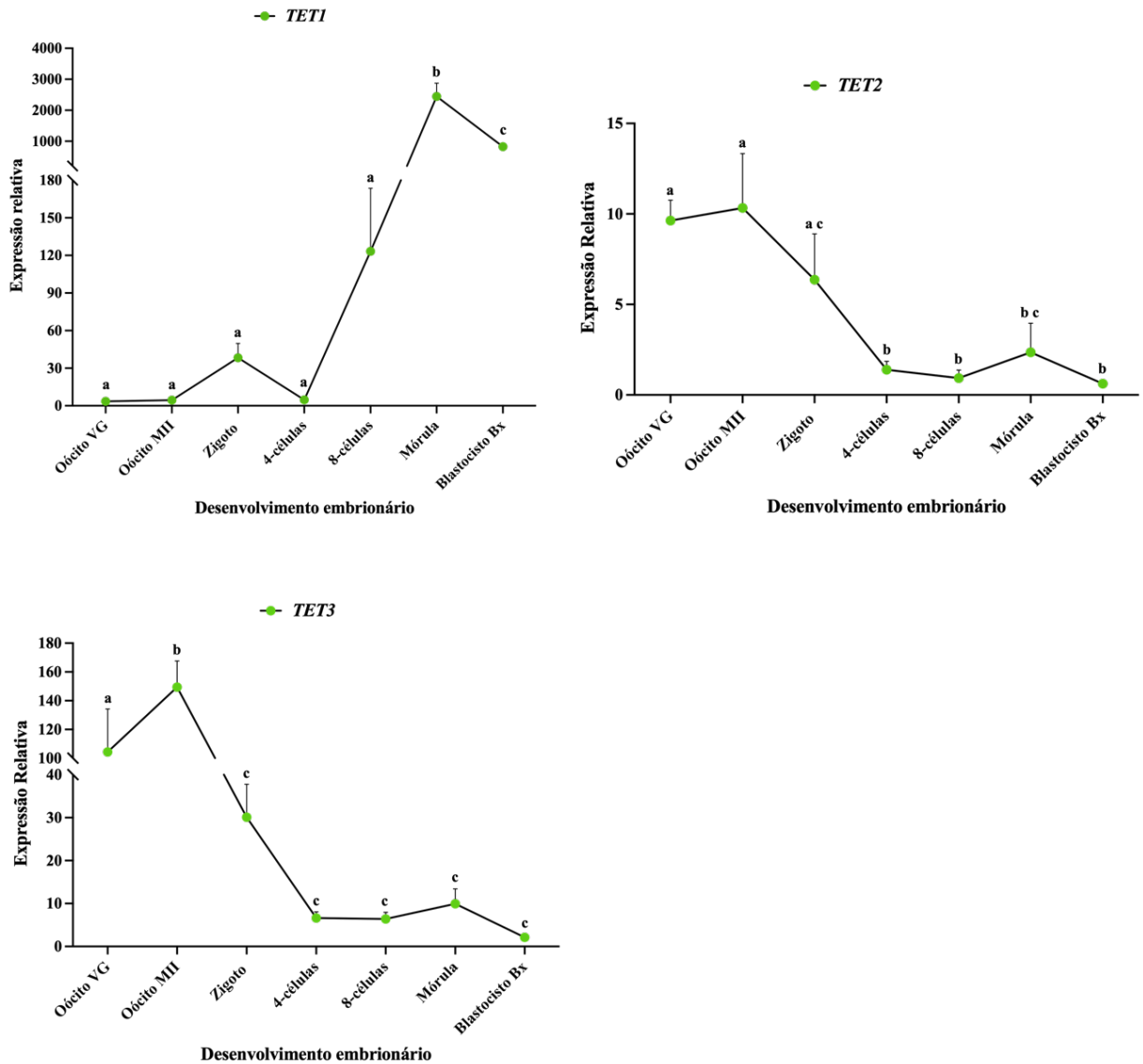


Figura 15 - Expressão relativa dos genes *TET1*, *TET2* e *TET3*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

O padrão de expressão dos genes relacionados ao controle da metilação e desmetilação do DNA durante a maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário está representado na Figura 16.

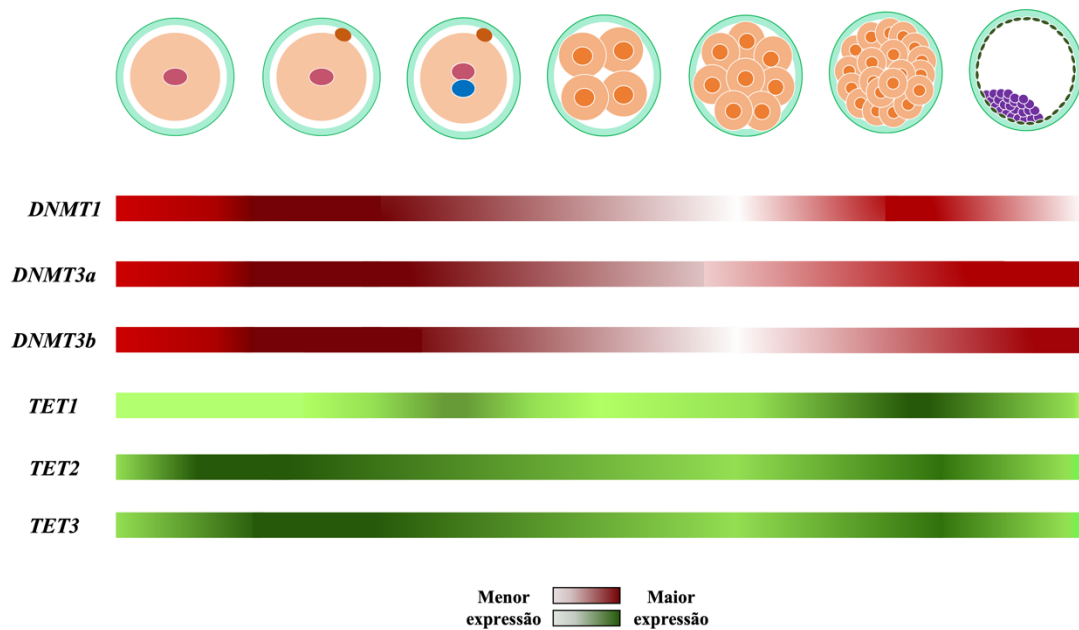


Figura 16 - Genes que atuam na metilação (*DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) e desmetilação do DNA (*TET1*, *TET2* e *TET3*). Em vermelho estão representados os genes relacionados à metilação do DNA e em verde são os genes relacionados à desmetilação do DNA. O gradiente de cor representa expressão de cada um no decorrer da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, onde os tons mais escuros representam maior expressão e os mais claros representam menor expressão gênica. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

6.2.3 Genes envolvidos na pluripotência embrionária

Para analisar o desenvolvimento e a pluripotência dos embriões durante o cultivo *in vitro*, foram avaliados também os genes *OCT4* e *NANOG*, por serem considerados genes importantes em relação à pluripotência durante o início do desenvolvimento embrionário. A expressão destes genes foi detectada em, pelo menos, quatro estádios, dentre os sete avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 - Ciclo de quantificação (média \pm DP) dos genes relacionados à pluripotência, *OCT4* e *NANOG*.

Estadio	Cq (Média \pm DP)	
	<i>OCT4</i>	<i>NANOG</i>
VG	22,49 \pm 0,20	0
MII	22,91 \pm 0,29	0
Zig	22,71 \pm 0,51	0
4-cel	23,01 \pm 0,44	37,06 \pm 2,01
8-cel	26,08 \pm 1,18	31,12 \pm 1,27
Mor	23,77 \pm 0,68	31,23 \pm 0,64
Bx	20,12 \pm 0,37	31,53 \pm 0,12

Cq, ciclo de quantificação. DP, desvio padrão. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

A expressão do gene *OCT4* foi detectada em todos os estadios avaliados, sendo observadas variações entre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário ($F_{(6)} = 115,9$; $p < 0,01$), como pode ser observado na Figura 17. Para este gene, o estadio que apresentou maior expressão foi a mórula, seguida pelo Bx. Foram observados dois períodos com elevada expressão desse gene, primeiro durante a maturação oocitária, seguido por uma redução significativa nos primeiros estadios de desenvolvimento embrionário. Após a ativação do genoma, ocorre o segundo pico no estadio de mórula.

Para o gene *NANOG* a expressão não foi detectada durante a maturação do oócito, assim como no primeiro estadio embrionário, o zigoto. Sua expressão foi detectada apenas a partir de 4-células, sendo observada uma variação na expressão até o estadio de Bx [$F_{(6)} = 11,8$; $p < 0,01$]. Houve um aumento significativo até o estadio de mórula, momento de maior expressão, sendo seguido por uma redução significativa no estadio seguinte, o Bx (Figura 17).

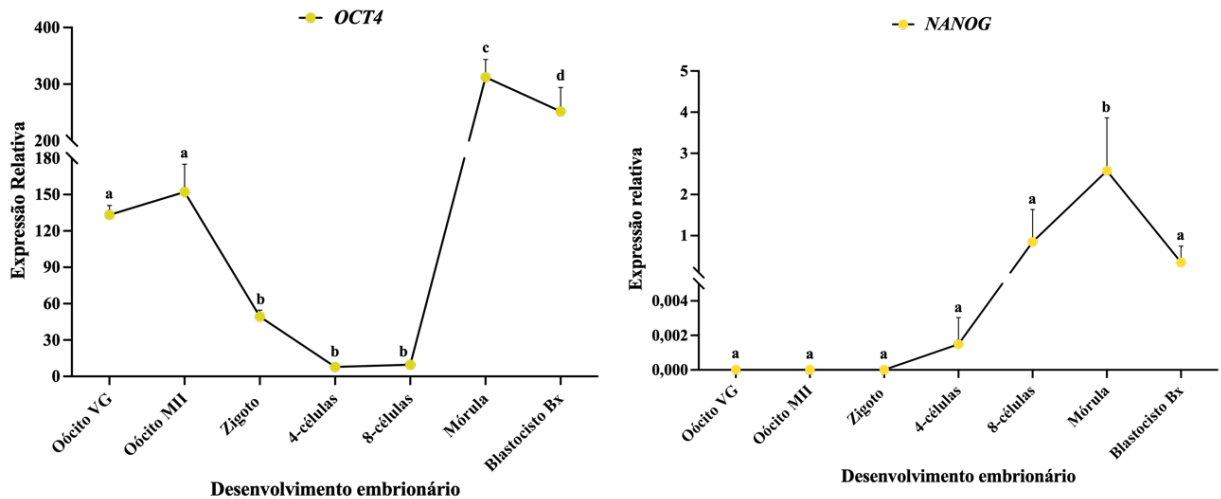


Figura 17 - Expressão relativa dos genes *OCT4* e *NANOG*. O gráfico mostra os sete estádios avaliados, sendo antes e após a maturação oocitária (oócitos VG e MII) e durante o desenvolvimento pré-implantacional (zigoto, 4-células, 8-células, mórula e Bx). Nota: letras diferentes significam diferença estatística (nível de significância: 0,05). Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022)

6.3 Metilação da H19DMR e H19DMR

Os parâmetros de clusterização por *lane* foram de acordo com os previstos, não havendo *over* ou *down cluster*, com uma média de 895k/mm² e *passing filter* de 87,7% (Figura 18).

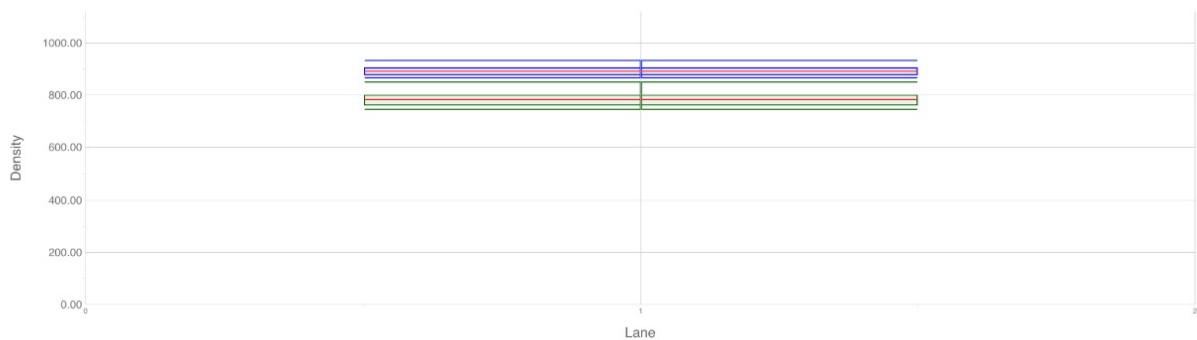


Figura 18 - Gráfico gerado pelo MiSeq (*Illumina, USA*) durante as etapas do sequenciamento. O parâmetro apontado pelo gráfico demonstra que as amostras passaram pelo teste de qualidade, filtro de pureza ou *passing filter*, antes de iniciar o sequenciamento. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Um segundo parâmetro avaliado pelo MiSeq (*Illumina, USA*) é o *Q-Score*, onde Q30 representa a probabilidade de erro de leitura de um nucleotídeo a cada 1000 lidos. Neste caso, Q30 foi maior que 72,8% (Figura 19).

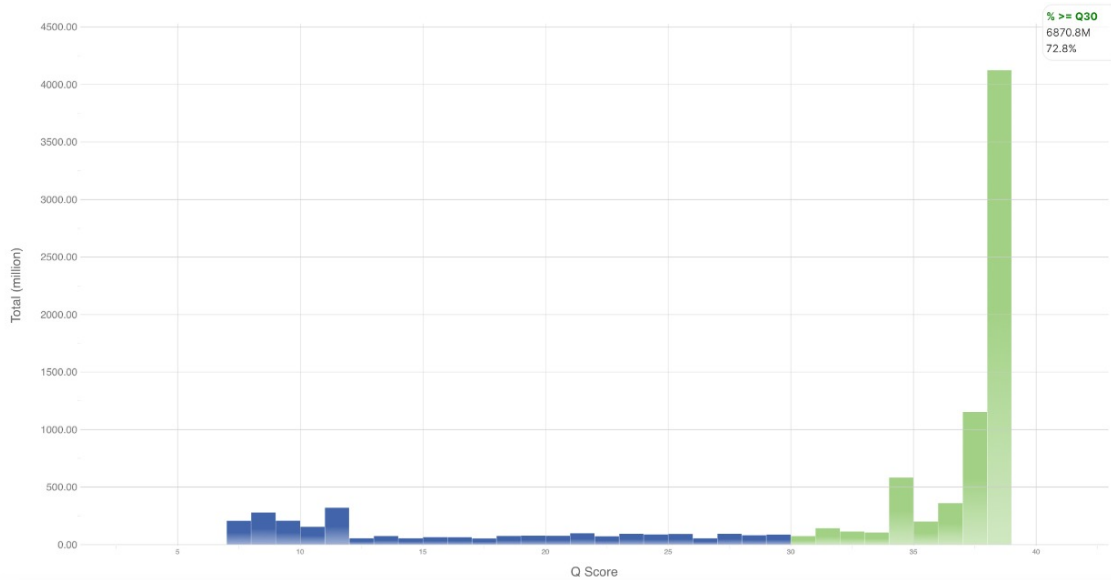


Figura 19 - Gráfico gerado pelo MiSeq (*Illumina, USA*) durante a realização do sequenciamento. O valor de *Q-Score* mostra a probabilidade de erro de leitura durante o sequenciamento, onde Q30 representa o erro de leitura de 1 nucleotídeo a cada 1000 lidos. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Para avaliação da metilação do DNA nos sete estádios durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, foram escolhidos dois fragmentos que representam a H19DMR e a KvDMR1. A porcentagem média de metilação do DNA da H19DMR e KvDMR1 durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário pode ser observada na Figura 20.

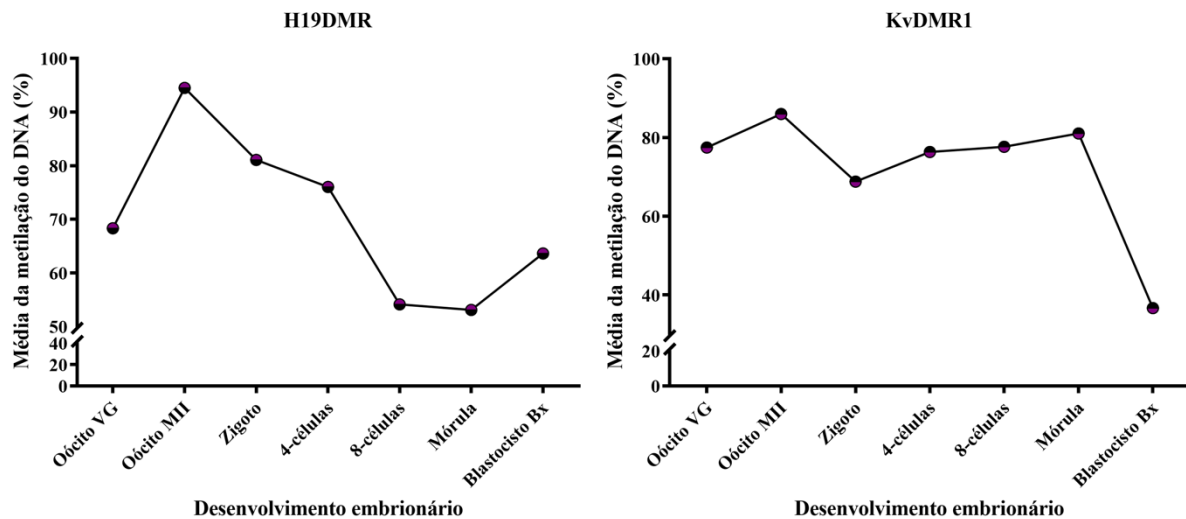


Figura 20 - Média de porcentagem de metilação do DNA da H19DMR e KvDMR1 nos sete estádios avaliados. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

Dentro da H19DMR e KvDMR1 individualmente foram identificados 10 e 18 CpGs, respectivamente, onde ocorreu ou não a troca de nucleotídeos durante a conversão do material

com bissulfito. A análise das duas regiões está representada pelas Figuras 21 e 22. A coloração varia de roxo a amarelo de acordo com a porcentagem de metilação do DNA, onde quanto mais escuro (roxo) menor a metilação do DNA e quanto mais claro (amarelo) maior a porcentagem de metilação do DNA.

As 10 CpGs da H19DMR, assim como sua posição no genoma, estão representadas pelos círculos coloridos na Figura 21. Dos sete estádios avaliados, em cinco a H19DMR está hipermetilada (>61%). Apesar de hipermetilada nos dois estádios durante a maturação, é possível observar que ocorre um aumento da metilação do DNA durante a transição do oócito VG (68,32%) para MII (96,48%). No desenvolvimento embrionário ocorre uma redução gradativa da porcentagem de metilação do DNA até o estágio de mórula, onde embrião 8-células e mórula são os únicos estádios parcialmente metilados. Entretanto, a porcentagem de metilação do DNA volta a subir no estágio de Bx (APÊNDICE A).

Ao avaliar as 10 CpGs identificadas na H19DMR em cada estágio separadamente, pode-se dizer que elas apresentam a menor variação na metilação do DNA em oócito MII e embrião em mórula (Figura 21).

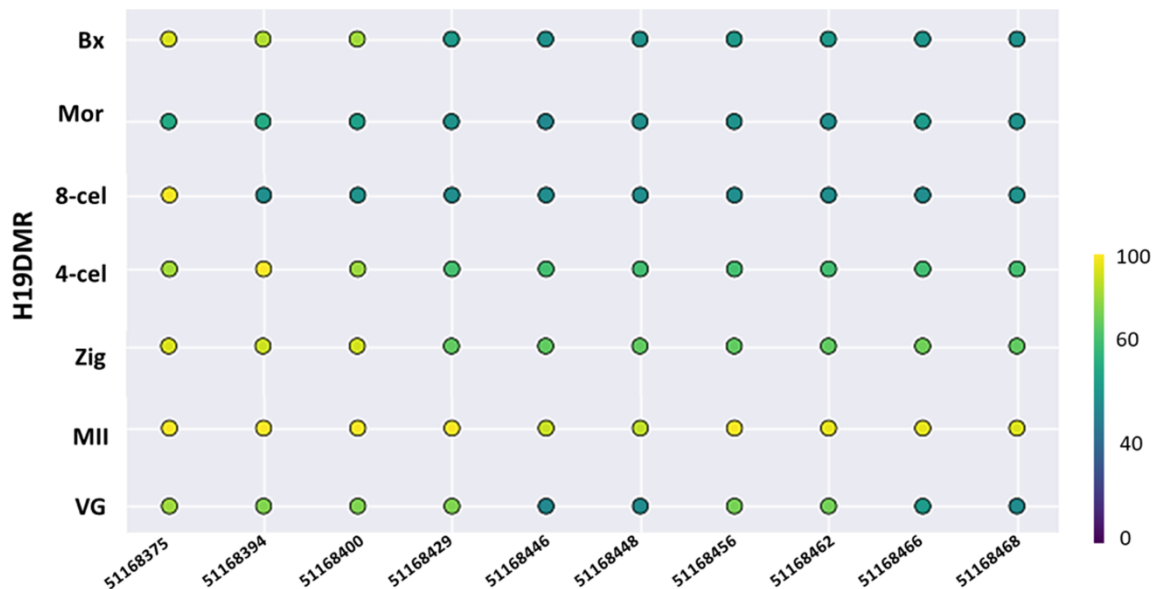


Figura 21 - Porcentagem média de metilação do DNA nas 10 CpGs avaliadas na H19DMR. O eixo x mostra a posição das CpGs no genoma, enquanto o eixo y representa os sete estádios avaliados. As amostras representadas em verde e amarelo estão hipermetiladas (>61%) enquanto as CpGs em azul e roxo estão parcialmente (31-60%) e hipometiladas (<30%), respectivamente. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

A segunda região avaliada foi a KvDMR1, também localizada no cromossomo 29. No fragmento escolhido foram identificadas 18 CpGs (Figura 22). Dos sete estádios avaliados, em seis a KvDMR1 apresentou hipermetilação (>61%). Assim como observado na H19DMR, na KvDMR1 também foi possível observar um aumento da metilação do DNA durante a maturação dos oócitos, passando de 77,45 para 88,98% (Figura 20). Apesar de hipermetilada durante quase todo o desenvolvimento embrionário, pode ser observada uma variação na porcentagem de metilação do DNA (APÊNDICE B).

Entre os estádios de zigoto e mórula ocorreu um aumento gradativo (de 68,77 para 81,04%) na metilação do DNA. O último estádio avaliado durante o desenvolvimento pré-implantacional, o Bx, foi o único que estava parcialmente metilado (36,64%).

A avaliação das 18CpGs em cada estádio separadamente mostrou que em zigoto, 4-células e Bx foram encontradas as menores variações nos níveis de metilação DNA. Por outro lado, na sexta CpG (posição 50580085) dos oócitos VG e MII é possível observar uma hipometilação (19,95% e 5,68%, respectivamente) enquanto as outras 17 CpGs estão hipermetiladas

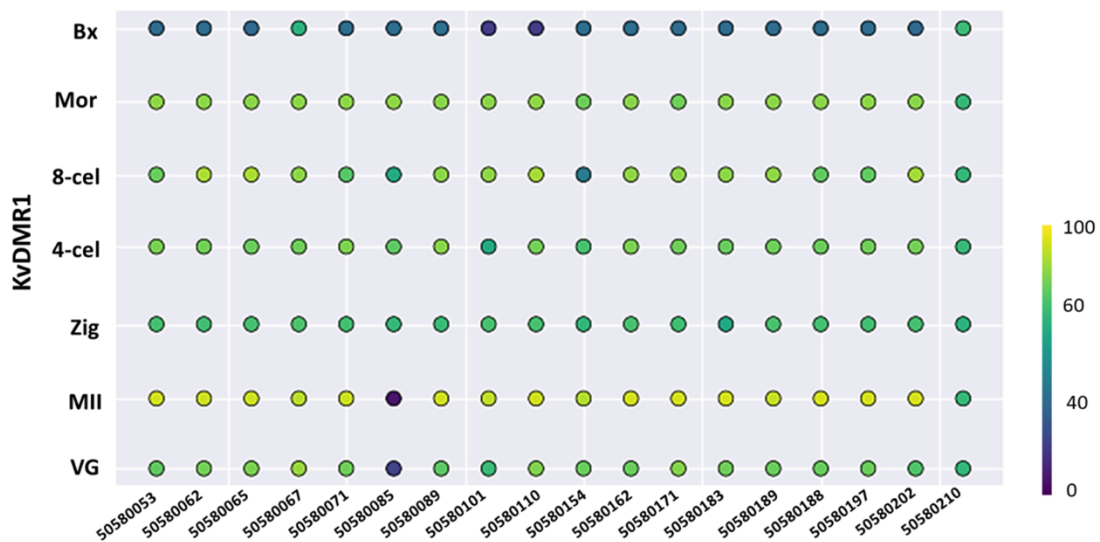


Figura 22 - Porcentagem média de metilação do DNA nas 18 CpGs avaliadas na KvDMR1. O eixo x mostra a posição das CpGs no genoma, enquanto o eixo y representa os sete estádios avaliados. As amostras representadas em verde e amarelo estão hipermetiladas (>61%) enquanto as CpGs em azul e roxo estão parcialmente (31-60%) e hipometiladas (<30%), respectivamente. Fonte: Carolina Gennari Verruma (2022).

DISCUSSÃO

7. Discussão

A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma ferramenta útil para obtenção de material biológico para estudos relacionados à gametogênese e desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Se as etapas forem desempenhadas da maneira correta, é possível realizar análises morfofisiológicas e em nível genômico durante a maturação de oócitos, assim como acompanhar os primeiros sete dias do desenvolvimento do embrião. Em nossos resultados foi observada uma taxa de clivagem de mais de 85% e a produção de blastocistos ao final do cultivo foi de cerca de 36%, o que vai de acordo com os dados de produção embrionária apresentados na literatura (CAMARGO et al., 2006; LONERGAN; FAIR, 2016). Isso demonstra que os embriões se desenvolveram no ambiente apropriado e de maneira correta, diminuindo a probabilidade de interferência externa na regulação da expressão gênica embrionária e conferindo maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Os primeiros dias de um embrião, também conhecido por desenvolvimento pré-implantacional, são cruciais para o sucesso da gestação. Determinados genes, como aqueles controlados por *imprinting*, são essenciais durante este período e, como pode ser observado em nossos resultados, o perfil de expressão varia tanto na maturação *in vitro* do oócito como no início do desenvolvimento embrionário. Além disso, os genes envolvidos na metilação e desmetilação do DNA também apresentaram variações nestes períodos. Processos epigenéticos, como o *imprinting* genômico, são fundamentais para o desenvolvimento fetal e placentário. Diversos genes que são controlados por *imprinting* podem ser tecido e/ou espécie específicos e estas características os tornam difíceis de serem estudados em modelos animais (MÉNÉZO; HÉRUBEL, 2002). Exemplo disto é que enquanto em humanos já foram descritos mais de 100 genes controlados por *imprinting*, apenas um terço desse número é descrito em bovinos (CHEN et al., 2015; JIANG et al., 2015; TUCCI et al., 2019).

É importante compreender o papel de cada gene, como eles atuam e, principalmente, os processos epigenéticos envolvidos durante o início do desenvolvimento embrionário, tanto em humanos como nas espécies candidatas à modelo animal para escolher o modelo mais adequado. Neste estudo, os genes avaliados que são controlados por *imprinting* genômico apresentam expressão monoalélica tanto em humanos como bovinos (CHEN et al., 2013, 2015; JIANG et al., 2015) e já foi demonstrado que modificações no perfil de expressão durante o desenvolvimento embrionário podem levar ao desenvolvimento de síndromes e alterações fenotípicas semelhantes em ambas as espécies (NAGAI; MEGURO-HORIKI; HORIKI, 2012; CHEN et al., 2013, 2015).

O desenvolvimento pré-implantacional do embrião é marcado por alterações significativas (de ganhos e perdas) na metilação global do DNA (TUCCI et al., 2019). Responsáveis pela adição do grupo metil no quinto carbono da citosina, as enzimas da família DNA metiltransferases (DNMTs) são fundamentais para a metilação do DNA (REIK et al., 2001), influenciando diretamente na reprogramação epigenética embrionária. Segundo Von Meyenn e Reik (2015), a reprogramação epigenética é um processo fundamental para os mamíferos e parece ser altamente conservada entre determinadas espécies. Em nossos resultados, foi possível observar a expressão de *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* antes (VG) e depois da maturação *in vitro* dos oócitos (MII), assim como nos cinco momentos avaliados durante o desenvolvimento pré-implantacional, corroborando com os dados já apresentados na literatura (LODDE et al., 2009; UYSAL et al., 2015).

Apesar de apresentarem proporções diferentes de expressão, o *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* mostraram um comportamento semelhante de expressão entre os estádios de oócitos VG e embriões 4-células. Houve um aumento na expressão durante a maturação oocitária, reduzindo significativamente no estágio de zigoto (momento de maior expressão em embriões) e 4-células. Nos estádios seguintes, ocorreu um aumento na expressão tanto em *DNMT3a* quanto em *DNMT3b*. Assim como observado em nossos resultados, durante a maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário, os genes da família *DNMT* apresentam um padrão dinâmico de expressão gênica, aumentando e diminuindo sua expressão dependendo do estágio (UYSAL et al., 2015).

O *DNMT1* é um dos responsáveis pela manutenção da metilação do DNA, sendo importante durante a maturação oocitária e desenvolvimento pré-implantacional, principalmente em genes controlados por *imprinting* que não sofrem o apagamento e posterior reestabelecimento das marcas durante a reprogramação epigenética (BINISZKIEWICZ et al., 2002; DELAVAL; FEIL, 2004). É possível observar em nossos resultados que o *DNMT1* apresentou as maiores taxas de expressão durante a maturação oocitária e, sabe-se que em camundongos, a *Dnmt1* materna e a produzida pelo zigoto são capazes de manter as marcas epigenéticas trazidas pelos gametas durante a reprogramação epigenética embrionária (HIRASAWA et al., 2008). Em bovinos, a reprogramação no início do desenvolvimento acontece devido à uma desmetilação ativa do genoma e atuação das enzimas da família TET, somado a uma desmetilação passiva devido à baixa ação do *DNMT1*, corroborando com os resultados encontrados, onde o gene *DNMT1* apresenta baixa expressão no início do desenvolvimento (MESSERSCHMIDT; KNOWLES; SOLTER, 2014; MILAZZOTTO et al., 2020).

Semelhante ao observado nas duas regiões avaliadas neste trabalho, estudos apontam que oócitos imaturos apresentam menores níveis de metilação global do DNA, aumentando gradativamente durante seu crescimento e maturação (SENDŽIKAITĖ; KELSEY, 2019). O aumento significativo da expressão dos genes *DNMT3a* e *DNMT3b* durante a maturação oocitária vai de acordo com o aumento da metilação do DNA de regiões controladas por *imprinting* (O'DOHERTY; O'SHEA; FAIR, 2012; MESSERSCHMIDT; KNOWLES; SOLTER, 2014; RAY, 2022), mostrando a importância desta família para a correta marcação epigenética e posterior desenvolvimento embrionário. Somado a isso, pode ser observado que a expressão dos dois genes volta a subir após a ativação do genoma embrionário, que ocorre majoritariamente no período de 8-16 células em bovinos (MEIRELLES et al., 2004; GRAF et al., 2014).

A função primária destes genes é a metilação *de novo* de células não-metiladas e a sua expressão pode ser diretamente relacionada com o aumento da metilação do DNA após a reprogramação epigenética (ZENG; CHEN, 2019), o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. Além da metilação *de novo*, relatos mostram que na ausência do *Dnmt1*, o *Dnmt3a* e o *Dnmt3b* atuam na metilação de manutenção do DNA, preservando parte da metilação do DNA de algumas regiões que apresentam *imprinting* genômico, em camundongos (OKANO et al., 1999; MILAZZOTTO et al., 2020).

Enquanto a metilação do DNA é guiada pelas enzimas da família DNA metiltransferase, a desmetilação ocorre devido à atuação dos genes da família *TET*, os genes *TET1*, *TE2* e *TET3* (LI et al., 2015). Juntas, as enzimas DNMTs e TETs trabalham em concordância para que seja possível a correta reprogramação epigenética e ativação do genoma do embrião no início do desenvolvimento (ARAND et al., 2022). No entanto, a desmetilação do DNA que ocorre durante a reprogramação epigenética parece ter como propósito principal apenas o apagamento das marcas epigenéticas, visto que ainda não existem evidências de que ela esteja associada à alterações na expressão gênica (VON MEYENN; REIK, 2015).

Os genes da família *TET* são responsáveis, de maneira geral, pela desmetilação do DNA através do processo de oxidação da 5mC (KOHLI; ZHANG, 2013). Apesar de apresentarem funções específicas distintas, os três genes desta família também atuam em conjunto, uma vez que parece ocorrer uma realocação das funções de um ou dois genes da família quando na ausência do terceiro, como em um mecanismo de compensação, mantendo assim a regulação epigenética. Entretanto, como isso ocorre ainda é desconhecido, o que torna de grande importância entender o comportamento desses genes no início do desenvolvimento, assim como a caracterização de todas as suas funções em diferentes espécies (CHENG et al., 2019;

GARCIA-OUTEIRAL et al., 2021).

Em nosso estudo foi possível observar que enquanto *TET1* apresentou as maiores taxas de expressão nos pontos mais tardios do desenvolvimento (mórula e Bx), em *TET2* e *TET3* esses picos são observados durante a maturação oocitária (tanto em VG quanto em MII). Esse fato corrobora com estudo realizado em camundongos (AKAHORI et al., 2015), onde os resultados apontam para alta expressão do *Tet3* em oócitos e zigotos. Em bovinos, é possível observar que ocorre um aumento, não significativo, no decorrer do desenvolvimento embrionário de *TET3*. Além disso, se compararmos a expressão dos três genes em oócitos, *TET3* é o que apresenta a maior expressão (CHENG et al., 2019). Acredita-se que, o *TET3* bovino está envolvido com a desmetilação do genoma materno e, além do processo de oxidação, ele seria capaz de controlar os níveis de metilação do DNA impedindo a adição de novos grupamentos metil durante o processo de metilação *de novo* (PEAT et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

O perfil de metilação do DNA de um organismo permanece estável e é passado para as células-filha sem alterações, graças à ação da DNMT1, na maior parte da sua vida. Porém, durante a reprogramação epigenética que ocorre no início do desenvolvimento embrionário e é influenciada diretamente pelas enzimas DNMTs e TETs, ocorre o apagamento das marcas epigenéticas de todo o genoma, com exceção de algumas regiões como as ICRs, onde são encontrados os genes controlados por *imprinting* (TUCCI et al., 2019; MILAZZOTTO et al., 2020). Neste trabalho, é importante ressaltar que todos os genes controlados por *imprinting* avaliados apresentam o mesmo padrão (*imprinting* paterno ou materno) em humanos e bovinos.

As regiões ICR1 e ICR2 são altamente conservadas em diferentes espécies de mamíferos como humanos, cachorros e bovinos (DONATO et al., 2017). Os genes encontrados nessas regiões, localizados no cromossomo humano autossomo 11 (11p15.5) e bovino 29, são alguns dos muitos genes essenciais para o desenvolvimento do organismo. Na região telomérica da ICR1 (H19DMR), o gene *IGF2* apresenta *imprinting* materno e sua expressão só é detectada quando são avaliados *pools* com dez ou mais embriões devido ao baixo perfil de expressão durante o início do desenvolvimento em bovinos (KAWASE et al., 2000). Seguindo a literatura, todos os grupos analisados no presente trabalho foram formados por *pools* com número superior a dez, tanto de oócitos como de embriões, e a expressão do *IGF2* foi detectada em todos os estádios, com exceção de Bx, sendo o estádio de zigoto o que apresentou maior expressão. Este gene transcreve um importante fator de crescimento e já foi demonstrado que, quando ocorre um aumento da sua expressão, ele pode apresentar expressão bialélica e atuar como um oncogene, sendo altamente relacionado com o aparecimento de tumores e síndromes de hiper

crescimento, como a SBW (MURRELL et al., 2004; SMITH et al., 2006; RENFREE et al., 2013).

Além da importância no início do desenvolvimento embrionário, estudo recente ressaltou a relevância deste gene no final da gestação em humanos. Sandovici e colaboradores (2022) mostraram que o gene *IGF2* fetal parece estar envolvido na vascularização da placenta e que problemas na gestação devido à placentação podem estar relacionados à baixa emissão de sinais pelo feto e, conseqüentemente, redução na formação dos vasos sanguíneos.

Fisicamente próximo ao *IGF2*, o *H19* (*imprinting* paterno) transcreve um *lncRNA* conservado em mamíferos marsupiais e placentários, além de ser um dos primeiros *lncRNA* descritos na literatura como funcional (BRANNAN et al., 1990; SUZUKI et al., 2011a). Ele atua em oposição ao *IGF2*, reprimindo o peso e tamanho do feto, e modificações no perfil de sua expressão durante o desenvolvimento pré-implantacional influenciam a expressão de genes vizinhos (SMITS et al., 2008; KAWAHARA et al., 2009; RENFREE et al., 2013; BOUCKENHEIMER et al., 2016). Nossos resultados mostraram que em todos os estádios a expressão do *H19* foi superior à do *IGF2*. No entanto, os dois genes apresentaram padrão semelhante, com a maior expressão no estádio de zigoto, seguido pela redução e estabilidade na expressão no decorrer do desenvolvimento. Já foi demonstrado que alterações na metilação do DNA na H19DMR alteram o padrão de expressão destes genes e podem levar ao desenvolvimento da síndrome de Silver-Russel quando a DMR encontra-se hipometilada e o *H19* aumenta sua expressão (GICQUEL et al., 2005), ou ao desenvolvimento de SBW quando o oposto ocorre. É importante ressaltar que o presente trabalho foi realizado em condições de reprodução assistida, que podem provocar alterações epigenéticas, que incluem o desenvolvimento de SBW, em humanos, ou LOS em bovinos.

A análise da metilação do DNA da H19DMR durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário mostrou que a mesma se manteve hipermetilada na maioria dos estádios avaliados, sendo parcialmente metilada (~53,5%) apenas em embriões 8-células e mórula. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Miranda-Furtado (2012) em oócitos VG, MII e Bx. Entretanto, diferente da hipermetilação observada nos blastocistos produzidos *in vitro*, blastocistos produzidos *in vivo* apresentaram hipometilação (20-32%) da H19DMR no sétimo dia de desenvolvimento (O'DOHERTY et al., 2015). Diferenças nos níveis de metilação do DNA e na expressão gênica em oócitos e embriões manipulados *in vivo* e *in vitro* são descritos com frequência em diferentes espécies (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014; ADONA et al., 2016; OSMAN; FRANASIAK; SCOTT, 2018).

Nossos resultados mostram uma hipermetilação de oócitos VG (cerca de 70%).

Fagundes e colaboradores (2011) avaliaram o nível de metilação do DNA da H19DMR de oócitos bovinos provenientes de folículos de diferentes tamanhos. Os autores observaram que oócitos de folículos maiores eram mais competentes e apresentavam maior nível de metilação na H19DMR no estadio de VG se comparado aos oócitos de folículos menores. É importante ressaltar também que todos os oócitos selecionados em nosso estudo eram provenientes de folículos maiores, além de todos serem classificados como grau I.

No entanto, diferente do encontrado no nosso trabalho, Fagundes e colaboradores (2011) observaram também que a metilação da H19DMR reduz após a maturação *in vitro* dos oócitos considerados mais competentes e não aumenta como foi observado em nossos resultados. Já Borghol e colaboradores (2006) relataram diferentes resultados ao avaliarem oócitos humanos maturados *in vitro*. Os autores relataram que os oócitos apresentaram diferentes porcentagens de metilação da H19DMR variando entre 0 e 100% de metilação nesta mesma região.

Na ICR2, a KvDMR1 influencia um maior número de genes que são controlados por *imprinting* e estão localizados próximos à ela, como o *KCNQ1*, *KCNQ1OT1*, *CDKN1C* e *PHLDA2* (STAMPONE et al., 2018). O gene *KCNQ1* pertence a uma vasta família de genes envolvidos na produção de canais de potássio importantes em processos biológicos como troca de íons para a manutenção do volume celular (ABBOTT, 2014). Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que ele apresentou o maior nível de expressão em zigotos, reduzindo sua expressão durante o desenvolvimento e, entre os genes avaliados, é o que apresentou o mais baixo nível de expressão, com uma redução significativa entre os estadios de 4 e 8-células, além de não ter sido detectada nos estadios de oócito VG, embrião em mórula e Bx. Em humanos, em momentos mais avançados da gestação, este gene apresenta expressão bialélica em tecidos específicos (como o coração) e a proteína transcrita por ele interage com outras na formação de canais de potássio, sendo crucial para a repolarização do tecido cardíaco (KOROSTOWSKI et al., 2012; STAMPONE et al., 2018).

A KvDMR1 está localizada no íntron 10 do gene *KCNQ1* e o nível de metilação de DNA desta região pode influenciar a expressão deste gene e de outros localizados próximos à ela (MANCINI-DINARDO et al., 2003; BEATTY; WEKSBERG; SADOWSKI, 2006; HORI et al., 2010; DONATO et al., 2017). Na análise da KvDMR1, todos os estadios avaliados, com exceção do Bx, apresentaram hipermetilação variando entre 68,77 e 85,98%. Ao contrário do que ocorreu na H19DMR, a KvDMR1 apresentou hipometilação no estadio de Bx, porcentagem semelhante ao encontrado por Miranda-Furtado (2012) quando blastocistos iniciais e expandidos (Bx) foram avaliados quanto a metilação do DNA. Pode ser observado que ocorreu

um aumento na metilação da KvDMR1 durante a maturação *in vitro* dos oócitos. Esse aumento já foi relatado em oócitos humanos entre os estádios de VG e MII quando estes também foram maturados *in vitro* (KHOUREIRY et al., 2008).

É interessante ressaltar que das 18 CpGs avaliadas nesta região, a última (posição 50580202) foi a que apresentou porcentagem de metilação do DNA com menor variação (63,93-69,01%) entre todos os estádios avaliados. Percebe-se que a maioria delas apresentou uma elevada variação no decorrer do desenvolvimento. Além disso, a sexta CpG (posição 50580085) foi a única que apresentou metilação do DNA próxima a zero durante a maturação oocitária, enquanto as outras estavam hipermetiladas.

Em teoria, com exceção dos gametas, as regiões diferencialmente metiladas apresentam metilação do DNA próximo à 50%, porém variações são observadas com frequência, em diferentes espécies, quando são utilizadas diferentes técnicas de reprodução assistida (HIURA et al., 2014; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014; HATTORI et al., 2019; MANGIAVACCHI et al., 2022) Entretanto, essas alterações não necessariamente levam a alterações fenotípicas (GOMES et al., 2009).

Antisense ao *KCNQ1*, o gene *KCNQ1OT1* é paternalmente expresso e influencia a atividade dos diversos genes vizinhos. Neste trabalho, foi possível observar que a expressão desse gene se manteve estável durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, apresentando apenas um aumento significativo em zigoto, seguido por uma redução no estágio seguinte. Já oócito VG foi o momento com a menor expressão. O *KCNQ1OT1* transcreve um *lncRNA* antisense ao *KCNQ1* que atua na regulação da cromatina, além de atuar no núcleo celular, influenciando diretamente na regulação da expressão de vários genes fisicamente próximos a ele, como é o caso do *CDKN1C* (MITSUYA et al., 1999; STAMPONE et al., 2018). Sabe-se que os RNAs não codificadores, principalmente os *lncRNAs*, são muito relevantes nos processos epigenéticos e parecem estar envolvidos nas alterações epigenéticas descritas no início do desenvolvimento (RIVERA et al., 2021). De maneira semelhante ao observado em bovinos e humanos, em camundongos já foi demonstrada também a importância deste gene na regulação da metilação do DNA e expressão gênica (MA et al., 2022).

Alterações epigenéticas na região do *KCNQ1OT1* são descritas tanto em humanos como em bovinos, estando relacionadas a alterações fenotípicas e ao desenvolvimento da SBW em humanos e LOS em bovino (HORI et al., 2010; CHEN et al., 2013). Além disso, quando a região encontra-se hipometilada e o *KCNQ1OT1* aumenta sua expressão, os genes maternalmente expressos localizados no mesmo *locus*, como o *KCNQ1* e o *CDKN1C*, podem ser silenciados (LEE et al., 1999; DEBAUN; NIEMITZ; FEINBERG, 2003; HORI et al., 2010).

Dentre os genes avaliados, o *CDKN1C* é o que apresentou maior variação de expressão. É possível observar dois picos, primeiro em oócito VG e em seguida em embrião 8-células, seguido por uma redução significativa. Por outro lado, os estádios de 4-células e Bx são os que apresentaram os menores níveis de expressão. Em bovinos, foi demonstrado por Driver e colaboradores (2013) que o silenciamento do *CDKN1C* acarreta uma redução na taxa de produção de blastocistos ao final do desenvolvimento *in vitro*. Avaliado em diferentes espécies, o *CDKN1C* parece ter uma estreita relação com a nutrição fetal durante a gestação. Em humanos, análises em coortes mostraram que esse gene apresenta baixa expressão em diferentes tecidos, com exceção da placenta, onde é observada elevada expressão. Este fato leva a crer que o *CDKN1C* tem grande importância na manutenção e correta evolução da gestação (SUNTHARALINGHAM et al., 2019). Já em estudos em camundongos e bovinos mostram que a p57Kip2 pode ser relacionada aos nutrientes fornecidos ao feto pela placenta materna e, junto com outros genes como o *PHLDA2*, o *CDKN1C* é essencial durante o início do desenvolvimento embrionário (TUNSTER; VAN DE PETTE; JOHN, 2011, 2012; DRIVER et al., 2013).

O gene *PHLDA2* apresenta *imprinting* paterno e é um dos genes regulados pela KvDMR1. É interessante ressaltar que, dentre os seis genes avaliados na KvDMR1, apenas ele apresentou redução da expressão durante a maturação oocitária. O *PHLDA2* é um gene que varia entre expressão monoalélica e bialélica dependendo do período do desenvolvimento, assim como do tecido avaliado. Em embriões bovinos sua expressão é monoalélica, enquanto em tecidos com alto grau de diferenciação, como o tecido cerebral, é observada expressão bialélica (SIKORA et al., 2011). Essa alteração na expressão no decorrer do desenvolvimento e especificidade tecidual também já foi observada em humanos, como descrito por Qian e colaboradores (1997).

Em camundongos, o *Phlda2* está relacionado ao controle de diversos genes, regulando o crescimento placentário, assim como a exposição fetal a diferentes hormônios (TUNSTER; CREETH; JOHN, 2016). Angiolini e colaboradores (2021) mostraram que o *Phlda2* parece também influenciar na permeabilidade da placenta, influenciando diretamente no fornecimento de nutrientes e crescimento fetal. Entretanto, ainda são desconhecidos quais mecanismos estão envolvidos. Assim como apresentado por Jiang e colaboradores (2015), após a ativação do genoma o *PHLDA2* teve um aumento da expressão até o estádio de mórula, reduzindo em seguida até Bx, que apresentou uma expressão próxima a zero. Sabendo que embriões em degeneração apresentam elevada expressão do *PHLDA2* (DRIVER et al., 2013), os resultados apresentados neste trabalho levam a crer que os embriões se desenvolviam de maneira correta,

visto que a expressão se manteve baixa durante todo o cultivo *in vitro*.

Análises evolutivas de diferentes espécies de mamíferos demonstraram que o *imprinting* genômico da H19DMR surgiu mais cedo evolutivamente do que na KvDMR1, uma vez que ele foi identificado também em algumas espécies de mamíferos marsupiais (SUZUKI et al., 2005, 2011b). Por outro lado, o *imprinting* genômico da KvDMR1, onde são encontrados o *CDKN1C*, *KCNQ1* e *PHLDA2*, surgiu mais tardio na evolução da classe Mammalia, após a divisão dos grupos em metatérios (marsupiais) e eutérios (placentários), sendo evidenciado apenas em mamíferos placentários. Sabe-se também que os genes da KvDMR1 são evolutivamente mais próximos em bovinos e humanos do que quando comparados humanos e camundongos (RIOS, 2007; SIKORA et al., 2011; SUZUKI et al., 2011b; BAMIDELE; OMITOGUN; IMUMORIN, 2015).

Assim como a expressão gênica, a metilação global do DNA é dinâmica durante o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o sexo do embrião pode influenciar os níveis de metilação do DNA até o estágio de blastocisto em bovinos. Entre os estágios de 6-8 células e blastocisto, embriões XY apresentam uma maior variação na metilação global do DNA do que embriões XX no mesmo período (DOBBS et al., 2013). Análises realizadas com *pools* de embriões ao invés de um único embrião são importantes por minimizarem influências externas como a relatada. Em nosso trabalho, os *pools* eram heterogêneos, sendo formados por embriões XX e XY, uma vez que as palhetas de sêmen utilizadas não eram sexadas.

Além dos genes relacionados à metilação e desmetilação do DNA e genes controlados por *imprinting*, também foi avaliada a expressão de dois genes importantes à pluripotência celular, o *OCT4* e o *NANOG*. Diferente dos genes controlados por *imprinting*, os genes relacionados à pluripotência apresentam expressão bialélica e não são influenciados pela reprogramação epigenética (EDWARDS et al., 2019). Entretanto, esses genes podem ser influenciados pelos genes da família *DNMT* e *TET*, principalmente o *TET3*. Sabe-se que o *TET3* atua ativamente na desmetilação do DNA através de processos como a oxidação e que o *knockdown* deste gene no início do desenvolvimento acarreta um aumento expressivo da metilação do DNA além de alterar a regulação de genes importantes ao desenvolvimento, como *OCT4* e o *NANOG* (GU et al., 2011; PEAT et al., 2014; CHENG et al., 2019).

O gene *OCT4* apresentou dois picos de maior expressão durante o período analisado: primeiro durante a maturação oocitária e depois em mórula (maior expressão) e Bx durante o desenvolvimento embrionário, comportamento semelhante ao observado na literatura (KHAN et al., 2012). Simmet e colaboradores (2018) demonstraram que embriões produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS), cujas células a serem clonadas tinham o

OCT4 silenciado, apresentavam no estadió de mórula o RNAm de *OCT4* de origem materna, o que demonstra a importância da elevada expressão deste gene em oócitos. Já o segundo aumento da expressão deste gene durante o desenvolvimento embrionário vai de acordo com a sua função, uma vez que ele é um dos responsáveis pela primeira diferenciação celular que ocorre no embrião. Sabe-se que entre os estadios de mórula e blastocisto é iniciada a cavitação da blastocela e a diferenciação nas duas primeiras linhagens celulares, a MCI e TE (BERG et al., 2011; BÓ; MAPLETOFT, 2013; CARREIRO et al., 2021). Apesar do *OCT4* ser fundamental para a diferenciação celular, sua ausência não é o suficiente para impedir o desenvolvimento embrionário. Porém, ele parece ser essencial para a manutenção da expressão do gene *NANOG* nos últimos momentos do desenvolvimento pré-implantacional (SIMMET et al., 2018).

A expressão do gene *NANOG* não foi detectada durante a maturação oocitária e em zigoto, aparecendo apenas a partir de 4-células nos embriões bovinos analisados. Diferente dos resultados encontrados, a literatura descreve que, em bovinos, a expressão deste gene é observada apenas a partir de embriões de 8-células (KHAN et al., 2012; GRAF et al., 2014) e não 4-células. As amostras avaliadas neste trabalho eram formadas por *pools* de embriões e, apesar de todos apresentarem morfologicamente 4-células, existe a possibilidade de alguns deles estarem em período de transição, iniciando assim a clivagem para o estadió de 8-células. Esse fator pode ter contribuído para a detecção da expressão do gene *NANOG*, apesar de extremamente baixa, em embriões em estadió de 4-células.

Apesar disso, o comportamento dos genes durante a maturação oocitária e desenvolvimento pré-implantacional corroboram os resultados encontrados na literatura acerca de ambos os genes (KHAN et al., 2012; AGUILA et al., 2022). De maneira semelhante ao *OCT4*, o silenciamento do gene *NANOG* em zigotos bovinos não interfere no desenvolvimento embrionário e formação da blastocela, fato este que leva a crer que ele não tem influência na formação da MCI (ORTEGA et al., 2019).

Apesar de atuarem em momentos diferentes, acredita-se que a ativação do *NANOG* pode estar relacionada com o *OCT4*. A estreita relação entre os genes de pluripotência, caso do *OCT4*, *NANOG* e *CDX2*, afeta diretamente os mecanismos de diferenciação, apoptose e, consequentemente, qualidade embrionária (AGUILLA et al., 2022). Além disso, já foi comprovada a importância da manutenção da regulação da expressão gênica para o desenvolvimento embrionário em bovinos, uma vez que embriões em estado de degeneração ou com menor probabilidade de se desenvolverem apresentam um aumento significativo na expressão dessa classe de genes (KHAN et al., 2012; SIMMET et al., 2018; VELÁSQUEZ et

al., 2019).

Os genes de pluripotência são extensivamente avaliados em murinos, entretanto, os resultados apresentados apontam diferenças entre eles e humanos, o que os tornam um modelo animal pouco apropriado para análises durante o início do desenvolvimento. Em bovinos, a caracterização do gene *OCT4*, assim como a relação entre ele e outros genes relacionados à pluripotência, como o *NANOG*, mostram semelhanças importantes no comportamento e regulação gênica, apontando que os bovinos podem ser considerados como um modelo adequado para estudos relacionados à pluripotência durante o início do desenvolvimento embrionário (KIRCHHOF et al., 2000; BERG et al., 2011; DAIGNEAULT et al., 2018; SIMMET et al., 2018).

Uma limitação deste trabalho foi o número de replicatas que foram utilizadas para a análise de metilação da H19DMR e KvDMR1. Apesar de ter sido utilizada uma técnica precisa, o material estudado é delicado e algumas amostras foram descartadas, reduzindo o número final de amostras avaliadas. Além disso, não foi possível realizar a análise de metilação do DNA de outras regiões, como é o caso das regiões promotoras dos genes da família *DNMT* e *TET*. A análise da metilação do DNA dessas regiões enriqueceria os resultados encontrados. Entretanto, um dos diferenciais deste trabalho foi a realização da análise de metilação do DNA da H19DMR e KvDMR1 e expressão dos genes controlados por elas em oócitos antes e depois da maturação oocitária. São escassos também os dados em diferentes pontos durante o desenvolvimento pré-implantacional em bovinos, sendo a maioria deles relatados em fetos e animais recém-nascidos ou então, apenas análise de metilação global do DNA e não em regiões específicas.

Apesar de apenas uma pequena porcentagem do genoma de mamíferos ser formado por genes controlados por *imprinting*, eles são essenciais para o desenvolvimento do organismo. Tanto na H19DMR quanto na KvDMR1 são encontrados genes controlados por *imprinting* codificantes e não codificantes de proteínas. São inúmeras as funções relacionadas ao desenvolvimento embrionário, fetal e placentário dos genes encontrados na H19DMR e KvDMR1. Entretanto, ainda existe muito a ser compreendido e os resultados obtidos neste trabalho enriquecem o conhecimento acerca do comportamento deles. Enquanto os genes *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1* e *PHLDA2* transcrevem proteínas que atuam em funções biológicas, ciclo e regulação celular, os não codificantes *H19* e *KCNQ1OT1* atuam, principalmente, na regulação da expressão de genes próximos dependendo do estágio de desenvolvimento.

A formação de um novo organismo até termo é complexa e depende de um controle rígido na regulação da expressão gênica, assim como dos mecanismos epigenéticos. Os primeiros momentos do embrião parecem ser ainda mais críticos. A regulação da expressão

gênica, principalmente dos genes controlados por *imprinting*, junto com a reprogramação epigenética e ativação do genoma vão determinar o destino da gestação. A utilização de ARTs em modelos animais permite o estudo destes processos, mas também expõe o embrião a diversos fatores que podem alterar o perfil de metilação do DNA e, conseqüentemente, o padrão de expressão gênica. Apesar dos genes envolvidos no desenvolvimento da SBW serem conservados entre humanos, bovinos e camundongos, é difícil reproduzir fielmente as alterações epigenéticas que levam às alterações fenotípicas já descritas e ao desenvolvimento de síndromes (ROBBINS et al., 2012).

Diversos estudos levam a crer que os bovinos são um modelo animal mais adequado que os camundongos quando são estudados gametogênese, início do desenvolvimento embrionário e reprogramação epigenética (MÉNÉZO; HÉRUBEL, 2002; HABERMANN et al., 2007; ADAMS; SINGH; BAERWALD, 2012; SYLVESTRE et al., 2013). É possível relatar semelhanças no perfil de metilação do DNA, assim como padrão de *imprinting* genômico dos genes, como é o caso do *IGF2* e *KCNQ1OT1* que apresentam *imprinting* materno e *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1* e *PHLDA2* que apresentam *imprinting* paterno (HANSMANN et al., 2011). Durante o desenvolvimento pré-implantacional, as semelhanças entre humanos e bovinos em nível genômico vão além dos genes controlados por *imprinting*, como demonstrado na expressão dos genes relacionados à pluripotência (*OCT4* e *NANOG*), ativação do genoma embrionário e alterações na cromatina (KIRCHHOF et al., 2000; BERG et al., 2011; SYLVESTRE et al., 2013; SIMMET et al., 2018; HALSTEAD et al., 2020).

Visto que grande parte da literatura faz referência a momentos mais tardios do desenvolvimento, utilizando diversas vezes tecidos específicos em suas análises, nossos resultados reforçam que os genes avaliados em bovinos apresentam padrão de expressão gênica semelhante à humanos também durante o desenvolvimento pré-implantacional quando estes são produzidos *in vitro*, como já levantado em alguns trabalhos da literatura (BERG et al., 2011; JIANG et al., 2015; SIMMET et al., 2018). Isso reforça a hipótese de que bovinos devem ser considerados no momento da escolha, sempre que possível, como modelo animal para avaliar a gametogênese, o desenvolvimento embrionário, os processos epigenéticos como o perfil de metilação do DNA, e suas conseqüências na expressão gênica durante desenvolvimento embrionário.

CONCLUSÕES

8. Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a expressão dos genes controlados por *imprinting* genômico localizados nos domínios ICR1 e ICR2 estavam alterados significativamente durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional em bovinos. É possível verificar também que o comportamento dos genes relacionados à metilação e desmetilação do DNA estavam de acordo com os momentos de reprogramação epigenética e a metilação *de novo* que ocorre no início do desenvolvimento. De maneira semelhante, a expressão dos genes relacionados à pluripotência estão de acordo com o esperado para o início da diferenciação celular em embriões bovinos.

A análise da metilação de DNA demonstrou que tanto a H19DMR quanto a KvDMR1 não são influenciadas pela onda de desmetilação do DNA que ocorre no início do desenvolvimento, visto que elas se mantêm hipermetiladas, apesar de serem observadas variações no nível de metilação do DNA durante a maturação oocitária e na maior parte do desenvolvimento embrionário.

Os achados deste trabalho referentes à metilação do DNA e à regulação da expressão de diferentes grupos de genes durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário contribuem para o enriquecimento do conhecimento acerca do desenvolvimento pré-implantacional em bovinos.

A técnica de PIVE se mostrou uma ferramenta apropriada para obtenção de material biológico e, sempre que possível, embriões bovinos produzidos *in vitro* devem ser considerados no momento da escolha em estudos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABBOTT, G. W. Biology of the *KCNQ1* Potassium Channel. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–26, 2014.

ABRAMOWITZ, L. K.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting: Recognition and marking of imprinted loci. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 22, n. 2, p. 72–78, 2012.

ADAMS, G. P.; SINGH, J.; BAERWALD, A. R. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1733–1748, 2012.

ADONA, P. R. et al. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v. 24, n. 4, p. 624–633, 2016.

AGUILA, L. . et al. Pluripotent core in bovine embryos: A Review. **Animals**, v. 12, n. 1010, p. 1–20, 2022.

AKAHORI, H. et al. Molecular evolution of the *TET* gene family in mammals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28472–28485, 2015.

ALIZADEGAN, A. et al. Application of cell free DNA in ART. **Placenta**, v. 120, n. September 2021, p. 18–24, 2022.

ANGIOLINI, E. et al. Deletion of the imprinted *phlda2* gene increases placental passive permeability in the mouse. **Genes**, v. 12, n. 5, p. 1–13, 2021.

ANVISA. **13º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões, SisEmbrio**. Disponível em: <www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/relatorios-de-producao-de-embrioes-sisembrio>.

ARAND, J. et al. Tet enzymes are essential for early embryogenesis and completion of embryonic genome activation. **EMBO reports**, v. 23, n. 2, p. 1–16, 2022.

AZZI, S.; HABIB, W. A.; NETCHINE, I. Beckwith-Wiedemann and Russell-Silver Syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 21, n. 1, p. 30–38, 2014.

BAJRAMI, E.; SPIROSKI, M. Genomic imprinting. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 181–184, 2016.

BAMIDELE, O.; OMITOGUN, O. G.; IMUMORIN, I. G. DNA sequence characteristics and phylogenetics of putative imprinted genes on bovine chromosome 29. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 8, 2015.

BEATTY, L.; WEKSBERG, R.; SADOWSKI, P. D. Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. **Genomics**, v. 87, n. 1, p. 46–56, 2006.

BEAYNO, A. et al. The role of epigenetics in addiction: Clinical overview and recent updates. **In: Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]2011p. 609–631.

BEDNARCZYK, M. et al. Chicken embryo as a model in epigenetic research. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101164, 2021.

BELL, A. C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**, v. 405, n. May, p. 2–5, 2000.

BERG, D. K. et al. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 244–255, 2011.

BINISZKIEWICZ, D. et al. *Dnmt1* Overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2124–2135, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, 2007.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 344–348, 2013.

BONETTI, T. C. S. et al. Sperm banking for male cancer patients: Social and semen profiles. **Clinical Urology**, v. 35, n. 2, p. 190–198, 2009.

BORGHOL, N. et al. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following *in vitro* maturation. **Genomics**, v. 87, n. 3, p. 417–426, 2006.

BOUCKENHEIMER, J. et al. Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 1, p. 19–40, 2016.

BRANNAN, C. I. et al. The product of *H19* gene may function as an RNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 1, p. 28–36, 1990.

BRIOUDE, F. et al. Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. **Nat Rev Endocrinol**, v. 14, n. 4, p. 229–249, 2018.

BUKOWSKA, D. et al. The invasive and new non-invasive methods of mammalian oocyte and embryo quality assessment: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n. 4, p. 169–176, 2012.

CAMARGO, L. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2006.

CAO, Y. Regulation of germ layer formation by pluripotency factors during embryogenesis. **Cell and Bioscience**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.

CARREIRO, L. E. et al. Cell differentiation events in pre-implantation mouse and bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 1–15, 2021.

CECCELE, A. et al. Cellular and molecular nature of fragmentation of human embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1–16, 2022.

CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor

in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643–655, 2003.

CHEN, Z. et al. 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.

CHEN, Z. et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **PNAS**, v. 112, n. 15, p. 4618–4623, 2015.

CHENG, H. et al. *Tet3* is required for normal *in vitro* fertilization preimplantation embryos development of bovine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 3, p. 298–307, 2019.

CHOUFANI, S.; SHUMAN, C.; WEKSBERG, R. Beckwith-Wiedemann syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 154, n. 3, p. 343–354, 2010.

CLULOW, J.; CLULOW, S. Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: Bringing the ARTs up to speed. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 8, p. 1116–1132, 2016.

COMIZZOLI, P.; PAULSON, E. E.; MCGINNIS, L. K. The mutual benefits of research in wild animal species and human-assisted reproduction. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 4, p. 551–560, 2018.

COUNCIL, N. R. **Models for Biomedical Research: A new perspective**. [s.l.: s.n.]

DAIGNEAULT, B. W. et al. Embryonic *POU5F1* is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

DAWLATY, M. M. et al. *Tet1* is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. **Cell stem cell**, v. 9, n. 2, p. 166–175, 2011.

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*. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 1, p. 156–160, 2003.

DELAVAL, K.; FEIL, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 14, n. 2, p. 188–195, 2004.

DETICH, N.; RAMCHANDANI, S.; SZYF, M. A Conserved 3'-Untranslated element mediates growth regulation of DNA methyltransferase 1 and inhibits its transforming activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 24881–24890, 2001.

DHE-PAGANON, S.; SYEDA, F.; PARK, L. DNA methyl transferase 1: Regulatory mechanisms and implications in health and disease. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 58–66, 2011.

DOBBS, K. B. et al. Dynamics of DNA Methylation during Early Development of the Preimplantation Bovine Embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

- DONATO, M. et al. Conservation of Repeats at the Mammalian *KCNQ1OT1-CDKN1C* Region Suggests a Role in Genomic Imprinting. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 13, p. 1–14, 2017.
- DRIVER, A. M. et al. Knockdown of *CDKN1C* (p57kip2) and *PHLDA2* results in developmental changes in bovine pre-implantation embryos. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- DRUCKENMILLER, S. et al. Successful Oocyte Cryopreservation in Reproductive-Aged Cancer Survivors. **Obstetrics and Gynecology**, v. 127, n. 3, p. 474–480, 2016.
- EDWARDS, B. R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, n. 5008, p. 349–351, 1965a.
- EDWARDS, C. A. et al. The origins of genomic imprinting in mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 7, p. 1203–1218, 2019.
- EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. **The Lancet**, p. 926–929, 1965b.
- EGGERMANN, T. et al. Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 3, p. 435, 2014.
- EIRAS, M. C. et al. Polycystic Ovary Syndrome: the Epigenetics Behind the Disease. **Reproductive Sciences**, v. 29, n. 3, p. 680–694, 2022.
- EVERS, J. L. H. H. Santa Claus in the fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 31, n. 7, p. 1381–1382, 2016.
- FAGUNDES, N. S. et al. 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.
- FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020.
- FOWDEN, A. L. et al. Imprinted genes, placental development and fetal growth. **Hormone Research**, v. 65, n. SUPPL. 3, p. 50–58, 2006.
- FUKUDA, Y. et al. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v. 42, n. 1, p. 114–119, 1990.
- GARCIA-OUTEIRAL, V. et al. The Complexity of *TET2* functions in pluripotency and development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. January, p. 1–9, 2021.
- GICQUEL, C. et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. **Nature Genetics**, v. 37, n. 9, p. 1003–1007, 2005.
- GOMES, M. V. et al. Methylation pattern at the KvDMR in child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. **American Journal of Medical Genetics**, v. 143A, p. 625–629,

2007.

GOMES, M. V. et al. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 471–477, 2009.

GONÇALVES, P. B. . et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 11, p. 135–138, 2008.

GOODALL, J. J.; SCHMUTZ, S. M. IGF2 gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 38, n. 2, p. 154–161, 2007.

GOTO, K. et al. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 753–758, 1988.

GRAF, A. et al. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014.

GREALLY, J. M. A user's guide to the ambiguous word “epigenetics”. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 207–208, 2018.

GRUPEN, C. G. The evolution of porcine embryo invitro production. **Theriogenology**, 2014.

GU, T. P. et al. The role of *Tet3* DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 606–612, 2011.

HABERMANN, F. A. et al. Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. **Theriogenology**, v. 68, p. 116–124, 2007.

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

HALSTEAD, M. M. et al. Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2020.

HANSMANN, T. et al. Characterization of differentially methylated regions in 3 bovine imprinted genes: A model for studying human germ-cell and embryo development. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 4, p. 239–247, 2011.

HATTORI, H. et al. Association of four imprinting disorders and ART. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2019.

HE, Y.-F. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v. 333, n. September, p. 1303–1307, 2011.

HIRASAWA, R. et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. **Genes and Development**, v. 22, n. 12, p. 1607–1616, 2008.

HIURA, H. et al. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 13, n. 4, p. 193–202, 2014.

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, n. 2, p. 94–107, 2016.

HORI, N. et al. 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, n. 3–4, p. 303–312, 2010.

HORIKE, S. -i. et al. 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.

ITO, S. et al. Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1129–1133, 2010.

JERABEK, S. et al. OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1839, n. 3, p. 138–154, 2014.

JIANG, Z. et al. mRNA levels of imprinted genes in bovine in vivo oocytes, embryos and cross species comparisons with humans, mice and pigs. **Scientific Reports**, v. 5, n. June, p. 1–10, 2015.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. **ChemBioChem**, v. 12, n. 2, p. 206–222, 2011.

KAWAHARA, M. et al. Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the *Igf2-H19* and *Dlk1-Gtl2* domains to mouse placentation by transcriptomic analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17751–17765, 2009.

KAWASE, Y. et al. Expression by RT-PCR in Bovine Fetuses. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 17, p. 124–127, 2000.

KHAN, D. R. et al. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–12, 2012.

KHATIB, H.; GROSS, N. Embryo survival—A genomic perspective of the other side of fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 4, p. 3744–3753, 2019.

KHATTABI, L. A. El et al. A genome-wide search for new imprinted genes in the human placenta identifies DSCAM as the first imprinted gene on chromosome 21. **European Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 1, p. 49–60, 2019.

KHOUREIRY, R. et al. Dynamic CpG methylation of the *KCNQ1OT1* gene during maturation of human oocytes. **Journal of Medical Genetics**, v. 45, n. 9, p. 583–588, 2008.

- KILLIAN, J. K. et al. M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 707–716, 2000.
- KIM, M.; COSTELLO, J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 4, p. 1–8, 2017.
- KIM, T. H. et al. Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1231–1245, 2007.
- KIRCHHOF, N. et al. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1698–1705, 2000.
- KOHLI, R. ; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, p. 472–279, 2013.
- KOROSTOWSKI, L.; SEDLAK, N.; ENGEL, N. The *Kcnq1ot1* long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of *Kcnq1*, but does not regulate its imprinting in the developing heart. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 9, 2012.
- KUNATH, T.; STRUMPF, D.; ROSSANT, J. Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse - A review. **Placenta**, v. 18, n. 25, p. 32–38, 2004.
- KUSSANO, N. R. et al. Theriogenology Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167–1176, 2016.
- LACAL, I.; VENTURA, R. Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. September, p. 1–22, 2018.
- LAMBROT, R. et al. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–13, 2013.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 150–158, 2014.
- LAWSON, H. A.; CHEVERUD, J. M.; WOLF, J. B. Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 9, p. 609–617, 2013.
- LEE, M. P. et al. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to *KVLQTI*, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 9, p. 5203–5208, 1999.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of animal science**, v. 48, n. 1, p. 76–86, 1979.
- LEWIS, A.; REIK, W. How imprinting centres work. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 113, n. 1–4, p. 81–89, 2006.
- LI, D. et al. TET Family of Dioxygenases: Crucial Roles and Underlying Mechanisms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 171–180, 2015.

- LI, L. .; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427–1431, 2002.
- LI, Y. et al. Spontaneous and ART-induced large offspring syndrome: similarities and differences in DNA methylome. **bioRxiv**, v. Pre-print, p. 1–48, 2022.
- LI, Y.; SASAKI, H. Genomic imprinting in mammals: Its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 466–473, 2011.
- LI, Z.; HUANG, H. Epigenetic abnormality: A possible mechanism underlying the fetal origin of polycystic ovary syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 3, p. 638–642, 2008.
- LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315–322, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LODDE, V. et al. Large-Scale Chromatin Remodeling in Germinal Vesicle Bovine Oocytes: Interplay With Gap Junction Functionality and Developmental Competence. **Molecular Reproduction**, v. 74, p. 740–749, 2007.
- LODDE, V. et al. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. **European Journal of Histochemistry**, v. 53, n. 4, p. 199–208, 2009.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255–268, 2016.
- LUCIANO, A. M.; SIRARD, M. A. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 162–169, 2018.
- MA, Y. et al. WGBS combined with RNA-seq analysis revealed that Dnmt1 affects the methylation modification and gene expression changes during mouse oocyte vitrification. **Theriogenology**, v. 177, p. 11–21, 2022.
- MANCINI-DINARDO, D. et al. A differentially methylated region within the gene *Kcnq1* functions as an imprinted promoter and silencer. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 3, p. 283–294, 2003.
- MANGIAVACCHI, P. M. et al. Multi-locus DNA methylation analysis of imprinted genes in cattle from somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 186, 2022.
- MARSICO, T. V. et al. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 423–439, 2019.
- MCGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 179–183, 1984.

- MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 13–20, 2004.
- MÉNÉZO, Y. J. R.; HÉRUBEL, F. Mouse and bovine models for human IVF. **Reproductive biomedicine online**, v. 4, n. 2, p. 170–175, 2002.
- MERTON, S. Morphological evaluation of embryos in domestical species. **In: Assessment of mammalian embryo quality**. [s.l: s.n.]p. 429.
- MESSERSCHMIDT, D. M.; KNOWLES, B. B.; SOLTER, D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. **Genes and Development**, v. 28, n. 8, p. 812–828, 2014.
- MILAZZOTTO, M. P. et al. Erasing gametes to write blastocysts: Metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 1–23, 2020.
- MILLER, W. et al. 28-Way vertebrate alignment and conservation track in the UCSC Genome Browser. **Genome Research**, v. 17, n. 12, p. 1797–1808, 2007.
- MIRANDA-FURTADO, C. L. **Estudo das regiões controladoras de imprinting 1 e 2 em oócitos, embriões e placentas do primeiro trimestre**. 2012. 2012.
- MIRANDA-FURTADO, C. L. et al. Variation in DNA methylation in the KvDMR1 (ICR2) region in first-trimester human pregnancies. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 1–7, 2019.
- MITSUYA, K. et al. *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. et al. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. SPEC. ISS. 1, p. 47–58, 2005.
- MURRELL, 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, n. 8, p. 889–893, 2004.
- MUSSA, A. et al. Assisted reproductive techniques and risk of Beckwith-Wiedemann syndrome. **Pediatrics**, v. 140, n. 1, p. 1–10, 2017.
- NAGAI, M.; MEGURO-HORIKE, M.; HORIKE, S. Epigenetic Defects Related Reproductive Technologies: Large Offspring Syndrome (LOS). **In: DNA Methylation - From Genomics to Technology**. [s.l: s.n.]
- NAIR, J. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A)—a single-center experience. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** p. 1–4, 2022.
- NOYES, N. et al. Oocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 3, p. 323–333, 2011.
- O'DOHERTY, A. M. et al. DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-

- implantation embryo development. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
- O'DOHERTY, A. M.; O'SHEA, L. C.; FAIR, T. Bovine DNA Methylation Imprints Are Established in an Oocyte Size-Specific Manner, Which Are Coordinated with the Expression of the DNMT3 Family Proteins. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 1–10, 2012.
- O'NEILL, M. J. The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. SPEC. ISS. 1, p. 113–120, 2005.
- OKANO, M. et al. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.
- OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature**, v. 391, n. 6675, p. 219–220, 1998.
- ORTEGA, M. S. et al. NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 1, p. 152–160, 2019.
- OSMAN, E.; FRANASIAK, J.; SCOTT, R. Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. **Seminars in reproductive medicine**, v. 36, n. 3–4, 2018.
- OTOI, T. et al. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769–774, 1997.
- PASSOS, E. P. History of assisted reproduction: Lessons learnt and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, v. 4, n. 4, p. 199–202, 2004.
- PEAT, J. R. et al. Genome-wide Bisulfite Sequencing in Zygotes Identifies Demethylation Targets and Maps the Contribution of *TET3* Oxidation. **Cell Reports**, v. 9, n. 6, p. 1990–2000, 2014.
- PEDERSEN, R. A.; WU, K.; BAŁAKIER, H. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: Cell lineage analysis by microinjection. **Developmental Biology**, v. 117, n. 2, p. 581–595, 1986.
- PESCHANSKY, V. J.; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as Direct and Indirect Modulators of Epigenetic Regulation. **Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 3–12, 2014.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E. . The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. **Journal of Morphology**, v. 61, n. 2, p. 351–377, 1937.
- QASEMI, M.; MAHDIAN, R.; AMIDI, F. Cell-free DNA discoveries in human reproductive medicine: providing a new tool for biomarker and genetic assays in ART. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 2, p. 277–288, 2021.
- QIAN, N. et al. The *IPL* gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to *TDAG51*, implicated in Fas expression and apoptosis. **Human Molecular Genetics**,

v. 6, n. 12, p. 2021–2029, 1997.

RAY, K. Epigenetics in reproduction and development. **In: Reproductive and Developmental Toxicology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2022. p. 1091–1102.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089–1093, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, 2001.

RENFREE, M. B.; SUZUKI, S.; KANEKO-ISHINO, T. The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1609, p. 1–11, 2013.

RIOS, Á. F. L. et al. Expression of the CTCF gene in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1202–1205, 2007.

RIOS, Á. F. L. **Caracterização in silico e análise epigenética em bovinos produzidos in vivo por transferência nuclear da região homóloga à 11p15.5 envolvida com a síndrome de Beckwith-Wiedemann em humanos**. 2007. 2007.

RIVERA, R. M. et al. Abnormal Offspring Syndrome – An Overgrowth Syndrome in Ruminants that Recapitulates the Human Syndrome Beckwith – Wiedemann (BWS). **In: Bovine Reproduction**. [s.l.: s.n.]p. 876–895.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008.

ROBBINS, K. M. et al. 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. 1, p. 1–10, 2012.

ROCHA, J. C. et al. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? **Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida**, v. 20, n. 3, p. 150–158, 2016.

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

ROSS, P. J.; SAMPAIO, R. V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: Cows are not big mice. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 204–214, 2018.

RUBIO, C. et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. **Fertility and Sterility**, v. 112, n. 3, p. 510–519, 2019.

SANDOVICI, I. et al. The imprinted Igf2-Igf2r axis is critical for matching placental microvasculature expansion to fetal growth. **Developmental Cell**, v. 57, n. 1, p. 63–79.e8, 2022.

- SANTOS, R. R.; SCHOEVERS, E. J.; ROELEN, B. A. J. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2014.
- SAWAI, K. Roles of cell differentiation factors in preimplantation development of domestic animals. **Journal of Reproduction and Development**, p. 1–27, 2021.
- 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 de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722–728, 2013.
- SCIORIO, R.; AIELLO, R.; IROLLO, A. M. Review: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) as a reproductive option in patients with neurodegenerative disorders. **Reproductive Biology**, v. 21, n. 1, p. 100468, 2021.
- SENDŽIKAITĖ, G.; KELSEY, G. The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte. **Essays in Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 691–705, 2019.
- SIKORA, K. M. et al. PHLDA2 is an imprinted gene in cattle. **Animal Genetics**, v. 43, n. 5, p. 587–590, 2011.
- SIMMET, K. et al. *OCT4/POU5F1* is required for *NANOG* expression in bovine blastocysts. **PNAS**, v. 115, n. 11, p. 2770–2775, 2018.
- 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**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2017.
- SJUNNESSON, Y. In vitro fertilisation in domestic mammals—a brief overview. **Journal of Medical Sciences**, v. 125, n. 2, p. 68–76, 2020.
- SMITH, F. M.; GARFIELD, A. S.; WARD, A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 113, n. 1–4, p. 279–291, 2006.
- SMITH, L. C. et al. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes *SNRPN*, *H19/IGF2* and *IGF2R*. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. February, p. 1–6, 2015.
- SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: Roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204–220, 2013.
- SMITS, G. et al. Conservation of the *H19* noncoding RNA and *H19-IGF2* imprinting mechanism in therians. **Nature Genetics**, v. 40, n. 8, p. 971–976, 2008.
- STAMPONE, E. et al. Genetic and epigenetic control of *CDKN1C* expression: Importance in cell commitment and differentiation, tissue homeostasis and human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–24, 2018.
- STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **The**

Lancet, p. 366, 1978.

SUNDERAM, S. et al. Comparing fertilization rates from intracytoplasmic sperm injection to conventional in vitro fertilization among women of advanced age with non-male factor infertility: a meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 2, p. 354-363.e1, 2020.

SUNTHARALINGHAM, J. P. et al. Analysis of *CDKN1C* in fetal growth restriction and pregnancy loss. **F1000Research**, v. 8, p. 90, 2019.

SUZUKI, J. et al. Loss of Methylation at H19 DMD Is Associated with Biallelic Expression and Reduced Development in Cattle Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer1. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 947-956, 2011a.

SUZUKI, S. et al. Genomic imprinting of *IGF2*, *p57KIP2* and *PEG1/MEST* in a marsupial, the tamar wallaby. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 2, p. 213-222, 2005.

SUZUKI, S. et al. Characterisation of marsupial *PHLDA2* reveals eutherian specific acquisition of imprinting. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 244, p. 1-9, 2011b.

SYLVESTRE, E. L. et al. Evolutionary conservation of the oocyte transcriptome among vertebrates and its implications for understanding human reproductive function. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 6, p. 369-379, 2013.

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner *TET1*. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930-935, 2009.

TUCCI, V. et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 952-965, 2019.

TUNSTER, S. J.; CREETH, H. D. J.; JOHN, R. M. The imprinted *Phlda2* gene modulates a major endocrine compartment of the placenta to regulate placental demands for maternal resources. **Developmental Biology**, v. 409, n. 1, p. 251-260, 2016.

TUNSTER, S. J.; VAN DE PETTE, M.; JOHN, R. M. Fetal overgrowth in the *Cdkn1c* mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 4, n. 6, p. 814-821, 2011.

TUNSTER, S. J.; VAN DE PETTE, M.; JOHN, R. M. Impact of genetic background on placental glycogen storage in mice. **Placenta**, v. 33, n. 2, p. 124-127, 2012.

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.

UYSAL, F.; AKKOYUNLU, G.; OZTURK, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. **Biochimie**, v. 116, p. 103-113, 2015.

UYSAL, F.; CINAR, O.; CAN, A. Knockdown of *Dnmt1* and *Dnmt3a* gene expression disrupts preimplantation embryo development through global DNA methylation. **Journal of Assisted**

Reproduction and Genetics, v. 38, n. 12, p. 3135–3144, 2021.

VELÁSQUEZ, A. E. et al. The expression level of *SOX2* at the blastocyst stage regulates the developmental capacity of bovine embryos up to day-13 of *in vitro* culture. **Zygote**, v. 27, n. 6, p. 398–404, 2019.

VERRUMA, C. G. et al. Partial replacement of fetal bovine serum during *in vitro* culture decreases phospholipid content in *in vitro* produced bovine embryos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 44, n. 3, p. 108–115, 2020.

VERRUMA, C. G. et al. Folic acid supplementation during oocytes maturation influences *in vitro* production and gene expression of bovine embryos. **Zygote**, p. 1–8, 2021.

VIANA, J. H. **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**. Disponível em: <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf>.

VON MEYENN, F.; REIK, W. Forget the parents: Epigenetic reprogramming in human germ cells. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1248–1251, 2015.

WADDINGTON, C. H. Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563–565, 1942.

WALL, R. J.; SHANI, M. Are animal models as good as we think? **Theriogenology**, v. 69, p. 2–9, 2008.

WANG, K. H. et al. Diagnosis and Management of Beckwith-Wiedemann Syndrome. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. January, p. 1–12, 2020.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; BECKWITH, J. B. Beckwith-Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 1, p. 8–14, 2010.

WHITTINGHAM, D. Fertilization of mouse eggs *in vitro*. **Nature**, v. 220, p. 592–593, 1968.

WILKINS, J. F.; HAIG, D. What good is genomic imprinting: The function of parent-specific gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 5, p. 359–368, 2003.

WRENZYCKI, C. *In vitro* culture systems: How far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 279–282, 2016.

WU, H.; ZHANG, Y. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. **Cell**, v. 23, n. 156, p. 46–68, 2014.

YAMAGUCHI, S. et al. Role of *Tet1* in erasure of genomic imprinting. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 460–464, 2013.

YANAGIMACHI, R.; CHANG, M. . Fertilization of hamster eggs *in vitro*. **Nature Chemistry**, v. 200, n. 4903, p. 281–282, 1963.

YANG, X. et al. Nuclear Reprogramming of Cloned Embryos and Its Implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295–303, 2007.

YATSENKO, S. A.; RAJKOVIC, A. Preimplantation genetic testing. **In: Perinatal Genetics**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2022. p. 161–173.

ZENG, Y.; CHEN, T. DNA methylation reprogramming during mammalian development. **Genes**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2019.

ZHANG, J. et al. Effect of *TET* inhibitor on bovine parthenogenetic embryo development. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–13, 2017.

ZHANG, S. et al. Genomic imprinting of *H19* in naturally reproduced and cloned cattle. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1540–1544, 2004.

ZHANG, S. et al. Dynamic changes of histone H3 lysine 9 following trimethylation in bovine oocytes and pre-implantation embryos. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 3, p. 395–402, 2015.

ZHU, L.; MARJANI, S. L.; JIANG, Z. The Epigenetics of Gametes and Early Embryos and Potential Long-Range Consequences in Livestock Species—Filling in the Picture With Epigenomic Analyses. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Média de metilação do DNA nas 10 CpGs da H19DMR.

Posição da CpG	Porcentagem Média (%)						
	VG	MII	Zig	4-cel	8-cel	Mor	Bx
1	85,33	99,165	94,035	85,955	98,08	60,57	94,045
2	81,11	99,24	92,155	99,845	48,905	60,7	88,095
3	80,615	99,12	93,355	85,05	51,315	56,36	85,71
4	80,525	99,06	75,475	70,445	48,555	50,815	54,52
5	46,935	91,765	75,415	69,74	48,515	46,545	50,95
6	47,97	90,44	75,435	69,735	48,475	50,145	50,95
7	78,965	99,13	75,62	69,935	48,78	50,94	54,145
8	78,905	96,12	75,57	69,55	48,605	49,48	54,52
9	54,625	96,25	77,915	69,895	48,745	54,48	52,425
10	48,28	94,52	75,655	69,955	51,49	50,94	50,95

CpG, citosina-fosfato-guanina. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.


APÊNDICE B – Média de metilação do DNA nas 18CpGs da KvDMR1

Posição da CpG	Porcentagem Média (%)						
	VG	MII	Zig	4-c	8-c	Mor	Bx
1	75,235	92,99	70,065	79,665	76,69	82,985	34,56
2	78,535	92,21	69,355	78,455	87,455	82,77	35,075
3	79,71	92,26	70,215	77	87,485	82,145	34,165
4	84,715	89,58	71,855	77,78	82,455	82,67	63,77
5	77,81	92,18	69,58	80,085	73,75	82,51	35,175
6	19,955	5,685	66,535	75	60,83	82,82	35,88
7	74,955	92,6	67,955	82,345	82,8	82,195	36,815
8	67,94	90,365	70,695	60,61	82,9	82,22	17,94
9	80,82	92,9	70,405	78,65	86,485	82,84	17,75
10	77,175	88,57	65,94	70,465	41,555	77,555	35,56
11	77,12	93,345	70,975	80,305	83,055	82,225	35,165
12	81,515	93,53	69,415	77,91	82,885	77,95	35,035
13	77,91	93,495	59,4	76,87	82,58	82,345	35,305
14	77,03	91,095	71,095	77,985	82,91	82,475	35,11
15	76,88	93,495	70,225	77,005	75,415	82,39	35,115
16	77,26	93,415	69,815	78,22	75,7	82,565	34,91
17	71,885	93,5	70,24	78,775	86,185	82,27	34,02
18	65,785	66,575	64,2	66,865	66,04	66,59	68,235

CpG, citosina-fosfato-guanina. VG, oócito vesícula germinativa. MII, oócito metáfase II. Zig, zigoto. 4-cel, embrião quatro células. 8-cel, embrião oito células. Mor, mórula. Bx, blastocisto expandido.

APÊNDICE C – Artigo submetido referente à tese.

ScholarOne Manuscripts™ Carolina Gennari Verruma | Instructions & Forms | Help

 **Molecular Human Reproduction**

[# Home](#) [/ Author](#) [Review](#)

[Corresponding Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to Molecular Human Reproduction

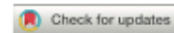
Manuscript ID MHR-22-0122

Title ICR1 and ICR2 Domains During Bovine Oocyte Maturation and Early Embryo Development

Authors Gennari Verruma, Carolina
Petroli Marchesi, Jorge
Vila, Reginaldo
Furtado, Cristiana
Ramos, Ester

Date Submitted 30-May-2022

ORIGINAL ARTICLE: EARLY PREGNANCY



Variation in DNA methylation in the KvDMR1 (ICR2) region in first-trimester human pregnancies

Cristiana Libardi Miranda Furtado, Ph.D.,^{a,b,c} Karina Bezerra Salomão, Ph.D.,^a Carolina Gennari Verruma, M.Sc.,^a Sarah Blima Paulino Leite, Ph.D.,^a Álvaro Fabrício Lopes Rios, Ph.D.,^d Monika Bialecka, Ph.D.,^b Ioannis Moustakas, M.Sc.,^{b,e} Hailiang Mei, Ph.D.,^a Claudia Cristina Paro de Paz, Ph.D.,^{a,f} Geraldo Duarte, M.D., Ph.D.,^c Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Ph.D.,^b and Ester Silveira Ramos, M.D., Ph.D.^a

^a Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^b Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands; ^c Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ^d Biotechnology Laboratory, Center of Bioscience and Biotechnology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goitacazes, Rio de Janeiro, Brazil; ^e Sequencing Analysis Support Core, Department of Biomedical Data Sciences, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands; and ^f Instituto de Zootecnia, Centro APTA de Bovinos de Corte, São Paulo, Brazil

Objective: To investigate the levels of DNA methylation in the KvDMR1 (KvLQT1 differentially methylated region 1) in embryonic and extra-embryonic tissues.

Design: Cross-sectional study.

Setting: University medical center and clinical hospital.

Patient(s): Embryonic and/or extraembryonic tissues (umbilical cord, chorionic villus, chorion, decidua, and/or amnion) collected from 27 first-trimester pregnancies (up to 12 weeks of gestation, single embryos) from elective abortions, extravillous trophoblasts (EVTs) from the top of individual chorionic villi, and chorionic villi from 10 normal full-term placentas collected after birth.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): DNA methylation of the KvDMR1 region evaluated using quantitative analysis of DNA methylation followed by real-time polymerase chain reaction (qAMP) and bisulfite sequencing (bis-seq) analysis.

Result(s): The results showed variability in KvDMR1 DNA methylation in different tissues from the same pregnancy. The average of DNA methylation was not different between the embryo, umbilical cord, amnion, and chorionic villi, despite the relatively low level of methylation observed in the amnion (33.50% ± 14.48%). Chorionic villi from term placentas showed a normal methylation pattern at KvDMR1 (42.60% ± 6.08%). The normal methylation pattern at KvDMR1 in chorionic villi (as well as in EVT) from first-trimester placentas was confirmed by bis-seq.

Conclusion(s): Our results highlight an existing heterogeneity in DNA methylation of the KvDMR1 region during first trimester and a consistent hypomethylation in the amnion in this period of gestation. (Fertil Steril® 2019;111:1186–93. Copyright ©2019 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.)

El resumen está disponible en Español al final del artículo.

Key Words: Bisulfite sequencing, DNA methylation, KvDMR1, pregnancy, real-time qPCR

Discuss: You can discuss this article with its authors and other readers at <https://www.fertsterdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/43422-26680>

Received July 18, 2018; revised January 28, 2019; accepted January 29, 2019; published online March 25, 2019.

C.L.M.F. has nothing to disclose. K.B.S. has nothing to disclose. C.G.V. has nothing to disclose. S.B.P.L. has nothing to disclose. A.F.L.R. has nothing to disclose. M.B. has nothing to disclose. I.M. has nothing to disclose. H.M. has nothing to disclose. C.C.P.P. has nothing to disclose. G.D. has nothing to disclose. S.M.C.S.L. has nothing to disclose. E.S.R. has nothing to disclose.

S.M.C.S.L. and E.S.R. should be considered similar in author order. Supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Netherlands Organization for International Cooperation in Higher Education (CAPES/NUFFIC 013/10), CAPES, Programa de Excelência Acadêmica (CAPES-PROEX), CAPES, Programa de Apoio à Pós-Graduação (CAPES-PROAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 307428/2015-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, fellowship 2012/11069-9; CLMF), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

Reprint requests: Ester Silveira Ramos, M.D., Ph.D., Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo 14.049-900, Brazil (E-mail: esramos@usp.br).

Fertility and Sterility® Vol. 111, No. 6, June 2019 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2019 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.036>

The disruption of epigenetics marks early in life in embryonic and fetal development can influence human biology and long-term health in adulthood (1, 2). Intrauterine adverse conditions appear to be related to developmental disorders and may lead to an increased risk of developing (metabolic) diseases during adulthood, such as type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases (3–5).

Loss of imprinting has been reported for paternally or maternally imprinted genes in first-trimester placentas (6). The occurrence of loss of imprinting can vary between tissues from the affected individual, which may reflect different time points during the developmental window where it occurs (7). Epimutations in these genes have been detected in embryonic and extraembryonic tissues of individuals conceived both naturally or with the help of artificial reproductive techniques (ART) (8, 9). The disruption of imprinting has also been reported in first-trimester human placentas from uncomplicated pregnancies, reflecting a dynamic process during the development of this organ (6).

Imprinting control region 2 (ICR2), which includes the KvDMR1 (KvLQT1 differentially methylated region 1), mapped to human chromosome 11p15.5 (Fig. 1A), is responsible for the imprinting regulation of several genes involved in placental and embryonic growth and development (10). KvDMR1 is a differentially methylated region (DMR) at the maternal allele, located in an intronic CpG island at the *KCNQ1* (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1), also known as *KvLQT1* (potassium voltage-gated channel subfamily long QT syndrome member 1). This region overlaps the promoter region of the paternally expressed long-noncoding RNA *KCNQ1OT1* (*KCNQ1* overlap transcript 1), also known as LIT1 (long intronic transcript 1), which regulates the expression of neighboring imprinted genes such as the maternally expressed *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) (11).

Alterations at the KvDMR1 are related to growth and developmental syndromes (12) as well as some tumors in humans (13). The prenatal period seems to be a sensitive devel-

opmental time window for epigenome perturbations affecting long-term adult health (2, 14). Considering the importance of the KvDMR1-regulated genes associated with imprinting disorders and placental development, there are few reports about the regulatory plasticity of this region, and just a small set of genes have been investigated during the first trimester in the placenta (15). Thus, we sought to evaluate the DNA methylation levels in the KvDMR1 region in embryonic and extraembryonic tissues from several human pregnancies.

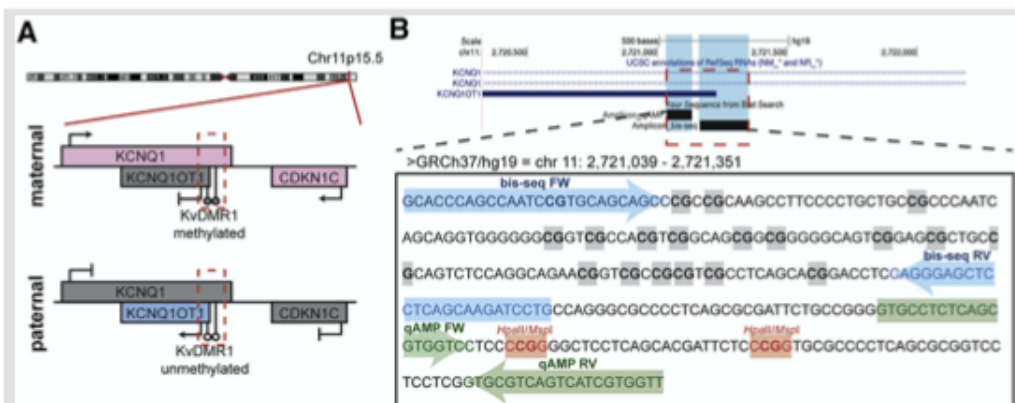
MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement and Sample Collection

Sample collection and use of the material from the first trimester was approved by the medical ethics committee of Leiden University Medical Center in the Netherlands (P08.087), and from the third trimester was approved by the research ethics committee of the University Hospital of the Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (HCFMRP-USP) (Process CAAE #0091.0.004.000-04). All tissues analyzed were donated with informed consent.

Embryonic and extraembryonic tissues, such as umbilical cord, chorionic villus, and amnion were collected from uncomplicated, naturally conceived first-trimester pregnancies, up to 12 weeks of gestation with single embryos (Supplemental Table 1, available online), without medical indication. Samples were collected after elective abortion (with aspiration). Additionally, extravillous trophoblasts (EVTs), collected from the top of individual chorionic villus, individual chorionic villi, pooled villi (bulk), and maternal decidua, as well as few samples of amnion, chorion, and umbilical cord were collected for

FIGURE 1



Structure of the KvDMR1 locus in humans. (A) Schematic representation of KvDMR1 imprinting domain in the Chr11p15.5. The methylation at the maternal allele (closed circles) in the intronic region of *KCNQ1* that overlaps with promoter of the *KCNQ1OT1*. The methylation at *KCNQ1OT1* silences this gene, while the *CDKN1C* and *KCNQ1* are maternally expressed. In the unmethylated paternal allele (open circles) the *KCNQ1OT1* is expressed and *CDKN1C* and *KCNQ1* are paternally silenced. (B) Genomic position with marked the sequences of the human KvDMR1 (<https://genome.ucsc.edu>) analyzed by bisulfite sequencing (bis-seq) and qAMP. In bold, CpG dinucleotides; in blue, primer annealing region for bis-seq; in green, primer annealing region for qAMP; in red, restriction recognition-sites of HpaII/MspI enzymes.

Miranda Furtado. KvDMR1 DNA methylation in human pregnancies. *Fertil Steril* 2019.

ORIGINAL ARTICLE: EARLY PREGNANCY

bisulfite sequencing (bis-seq) analysis. In total, 27 first-trimester pregnancies were collected.

Chorionic villi from 10 normal full-term placentas were collected after birth, single embryo, without gestational complications (see Supplemental Table 1). Individual chorionic villi were excised from each cotyledon immediately below the fetal surface. These fragments were washed in phosphate-buffered saline (PBS 1X) under a stereomicroscope (Olympus SZH10) to minimize blood contamination.

Isolation of Genomic DNA

Genomic DNA from embryonic and extraembryonic tissues as well as maternal decidua were isolated using the salting-out protocol (16) with some modifications. Briefly, samples were first washed in red-blood-lysis buffer (0.32 M sucrose, 1% [v/v] Triton X-100, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5) and centrifuged (13,000 *g*, 20 seconds). The sample pellets were then lysed (80 μ L proteinase-K buffer [0.375 M NaCl, 0.12 M EDTA, pH 8.0], 8 μ L proteinase K [25 mg/mL], 10 μ L 20% sodium dodecyl sulfate, and 280 μ L H₂O) overnight at 55°C with shaking. The samples were allowed to cool down, and 120 μ L of 5 M NaCl was added. The samples were then shaken vigorously for 8 seconds and centrifuged (13,000 *g*, 5 minutes, 4°C). Next, 400 μ L of the supernatant was mixed with 1 mL cold ethyl alcohol 98%, inverted a few times, and kept at -20°C overnight. The precipitated DNA was washed twice with cold ethyl alcohol 70% and centrifuged (13,000 *g*, 5 minutes, 4°C); the pellet was dried in air, resuspended in 50 μ L H₂O, and stored at -20°C.

In EVT_s and individual chorionic villi samples, the genomic DNA was lysed in 20 μ L of 1 mg/mL proteinase K (Qiagen) in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) for 1 hour at 56°C and was directly used for bisulfite conversion. The DNA concentration and integrity were evaluated using a spectrophotometer (Nanodrop 2000c; Thermo Fisher Scientific).

Quantitative Analysis of DNA Methylation Using Real-Time Polymerase Chain Reaction

The quantification of KvDMR1 DNA methylation was carried out using quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR (polymerase chain reaction, qAMP) (17). Briefly, genomic DNA (400 ng) was digested with HpaII (New England Biolabs) or mock-digested without restriction enzyme, according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 10 μ L. The same amount of DNA was digested with the methylation-nonsensitive enzyme MspI (New England Biolabs), an HpaII isoschizomer that was used as a control for digestion efficiency and to identify undesirable genetic polymorphisms.

Thereafter, primers flanking the restriction sites within CpG island at KvDMR1 (see Fig. 1B; Supplemental Table 2, available online) were used to amplify genomic DNA by quantitative PCR, as previously described elsewhere (18). The amplification was performed using 10 pmol of each primer and 2 μ L of digested (HpaII and MspI) and mock-digested DNA, in 10 μ L of final volume, using the StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with SYBR Green

PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each reaction was performed in triplicate, and an average of the threshold cycle values was obtained. The relative quantification of DNA methylation at the KvDMR1 was calculated using the average threshold cycle of HpaII digested (D) and undigested (UD) DNA using the formula $1/2^{(C_D - C_{UD})}$ (18).

DNA Methylation Analysis by Bis-seq

Bisulfite conversion and PCR amplification. Genomic DNA was used for DNA bisulfite conversion using the EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. The amplification of the KvDMR1 region was performed using Platinum-Taq DNA polymerase (Invitrogen) with primers containing adapters (see Fig. 1B; see Supplemental Table 2) as previously described elsewhere (19). The PCR conditions to amplify the KvDMR1 region were 95°C for 5 minutes, 50 cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds, annealing at 59°C for 45 seconds and extension at 72°C for 45 seconds, and a final extension step at 72°C for 10 minutes.

Next-generation sequencing. Bis-seq was performed using MiSeq (Illumina). The PCR products, containing the adapters, were barcoded and converted to Illumina-compatible next-generation sequencing libraries, and the sequencing was performed using the 600bp V3 reagents kit according to the manufacturer's instructions. The FASTQ files for individual samples were generated using Illumina's pipeline (bcl2fastq2-v2-20). The adapter and indexes were removed from the sequence using Cutadapt v1.9.1 (20) software with settings: -q 30 -minimum-length 50. The paired read sequences were merged using default settings of FLASH v1.2.11 (21) and aligned to the bisulfite converted genome using Bismark v0.18.2 with settings: -ambig_bam (22), which was also used to count the reads with different methylation patterns. Visualization of the methylated CpGs in the regions of interest was performed based on Tabsat v1.0.2 (23).

Statistical Analysis

From a power calculation considering a mean difference of 28% between the groups and a standard deviation of 22%, it was necessary to include 15 samples per group to have 90% statistical power with $P < .05$. The nonparametric Mann-Whitney *U* test for independent samples was used to compare the percentage of DNA methylation at the KvDMR1 between first- and third-trimester chorionic villi. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to compare the average of DNA methylation between different tissues from pregnancies (embryo, umbilical cord, chorionic villus, and amnion). All statistical analysis was performed using the computing environment R version 3.5.1. $P < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

We analyzed the methylation pattern of KvDMR1 (see Fig. 1A) using the qAMP assay based on the analysis of two CpG hot spots (see Fig. 1B) in different tissues from 21 first-trimester pregnancies (Fig. 2A). The methylation pattern of KvDMR1

showed high variation among different tissues analyzed within each individual from the first-trimester pregnancies, ranging from 12% to 99% in the embryo ($n = 16$), 17% to 80% in the umbilical cord ($n = 17$), 14% to 61% in the amnion ($n = 12$), and 14% to 82% in chorionic villi bulk ($n = 20$) (see Fig. 2A). Comparing the average DNA methylation in the KvDMR1 region in the first-trimester tissues analyzed by qAMP, the amnion showed a relatively lower percentage of DNA methylation ($33.50\% \pm 14.48\%$), but no statistically significant differences were observed ($P = .233$) when compared with the embryo ($47.90\% \pm 20.83\%$), umbilical cord ($46.82\% \pm 19.06\%$), or chorionic villi bulk ($43.11\% \pm 20.99\%$) (see Fig. 2C).

Next, we analyzed DNA methylation in the KvDMR1 region in chorionic villi from third-trimester (full-term) placenta ($n = 10$) using qAMP and observed an average percentage of DNA methylation of $42.60\% \pm 6.08\%$ (see Fig. 2C). When the average percentage of DNA methylation in the KvDMR1 was compared between full-term and first-trimester placenta ($43.11\% \pm 20.99\%$) no statistically significant difference ($P = .947$) was observed (see Fig. 2C).

To compare the results obtained using qAMP (measuring DNA methylation at two CGs) with the methylation of a longer region with more CGs (19 CGs) in the imprinting control region (see Fig. 1B), we investigated the pattern of DNA methylation in the KvDMR1 region in the first-trimester placenta ($N = 7$ different placentas) using bis-seq. To study this in great detail, we used bulk chorionic villi (several villi pooled), individual chorionic villi (containing the inner core of extraembryonic mesoderm and trophoctoderm-derived outer cells), and EVT collected from individual chorionic villi tops (containing only trophoctoderm-derived outer cells and no extraembryonic mesoderm). In this way, it would be possible to distinguish imprinting defects on the trophoctoderm-derived cells specifically.

The selected bis-seq region is adjacent (32 base pair distance) to the selected qAMP region (see Fig. 1B). Using bis-seq, we observed in the placentas analyzed ($n = 7$) consistently normal levels of DNA methylation between 35% and 65% in the chorionic villi (bulk and individual) analyzed, with few outliers per placenta (Fig. 3). This is suggestive of either biologic variation or technical bias, and it showcases the importance of having multiple samples for analysis. In addition, the individual EVTs of the placentas analyzed ($n = 7$) also showed normal levels of DNA methylation (see Fig. 3). The three samples of amnion included (T1–21, T1–24, T1–27) showed an average of methylated reads of $38.63\% \pm 3.25\%$. Unfortunately, we were unable to detect in the KvDMR1 region the presence of informative single-nucleotide polymorphisms, which would have allowed us to differentiate between DNA methylation in the maternal and paternal allele.

DISCUSSION

Our results showed a variation in the levels of DNA methylation in KvDMR1 region between pregnancies and also between different tissues of the same pregnancy. However, the embryos, umbilical cords, and chorionic villi (bulk, individ-

ual, or EVTs) presented average levels of DNA methylation between 35% and 65%, as expected for a bona fide imprinted region such as the KvDMR1 (24, 25). The amnion showed relatively lower levels of DNA methylation ($33.50\% \pm 14.48\%$ using qAMP, and $38.63\% \pm 3.25\%$ using bis-seq) when compared with the other tissues analyzed but was not statistically significant. The bis-seq confirmed the normal DNA methylation levels at the KvDMR1 in placentas from the first-trimester obtained by qAMP. Using whole chorionic villi (bulk or individual) or villi tops consisting only the trophoctoderm-derived EVTs showed similar results, suggestive of a normal imprinting pattern in the KvDMR1 region.

Although on average most (embryonic and extraembryonic) tissues showed a normal methylation pattern at the KvDMR1, individual samples presented hypomethylation and/or hypermethylation at this DMR. Alterations in the DNA methylation levels in the KvDMR1 region, such as hyper- or hypomethylation, could be related to gestational complications such as pre-eclampsia (26) or intrauterine growth restriction (27), or developmental syndromes such as Beckwith-Wiedemann syndrome (28), or could perhaps still be corrected during gestation (29). However, it is known that the level of DNA methylation in different DMRs may vary from the standard 50:50 ratio (24, 25, 30, 31). These values may be different among different tissues and even in individuals affected or unaffected by classical imprinting disorders (28, 32). The variation observed in the KvDMR1 region could reflect the physiologic fluctuations observed in normal adult tissues (25).

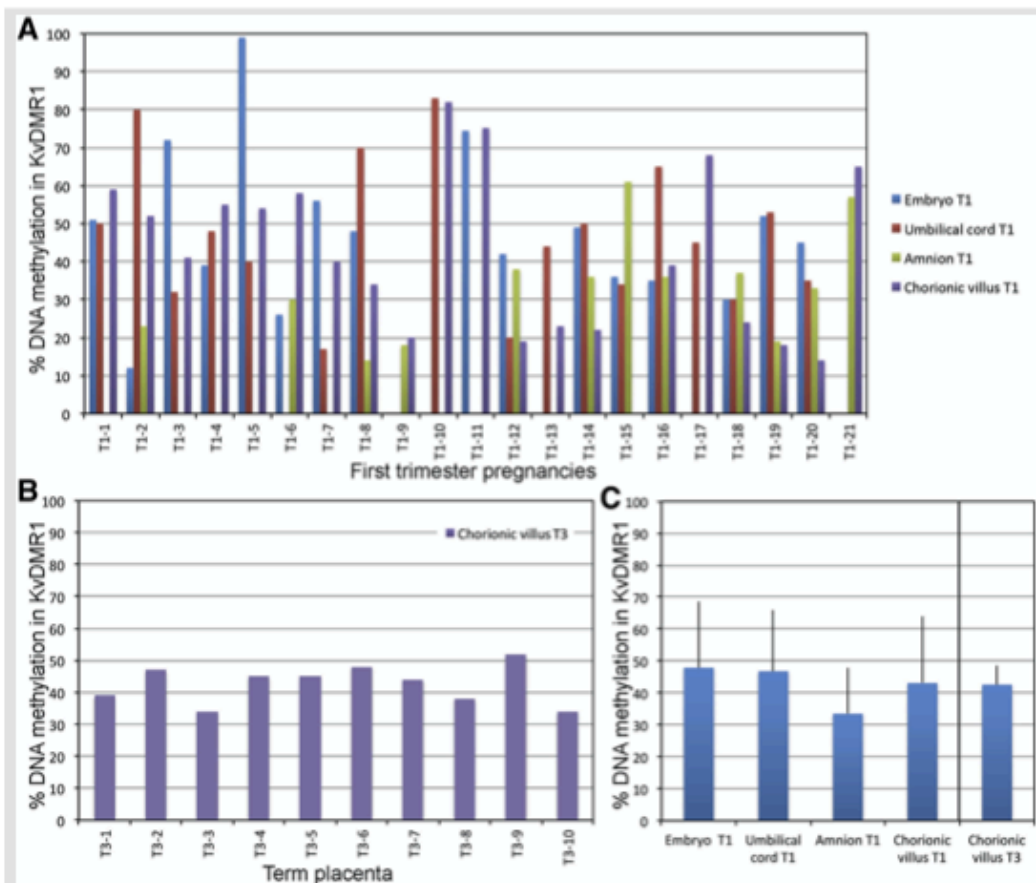
The methylation pattern based on parent-of-origin at ICR DMRs, which leads to parental-specific monoallelic gene expression, is generally maintained in somatic tissues. However, imprinting in the placenta is more dynamic, and some placenta-specific imprinted genes may escape epigenetic regulation (30, 31). Schroeder et al. (33) showed that 37% of the placental genome in the third trimester is covered by partially methylated domains, which are stable during gestation and between individuals. In gene bodies, disregarding the CpG islands, the average methylation was 48.2% in the partially methylated domains and 79.3% in the highly methylated domains. In promoter regions and CpGs islands, the percentage of DNA methylation was lower than in the other chromosomal domains.

The results from the qAMP technique were comparable to those obtained by bis-seq, suggesting that qAMP is a reliable technique to evaluate the levels of DNA methylation of a given region or gene in epigenetic studies. The qAMP technique is a quantitative method that can be used in a larger number of samples because quantitative real-time-based assays are relatively low cost when compared with other methods, and it is an accurate and sensitive method for the detection and quantification of nucleic acids (17).

Despite the variation observed at the KvDMR1, the absence of informative single-nucleotide polymorphisms does not allow us to conclude the parent-of-origin imprinting in the KvDMR1 region and hence interpret the variation observed. A limitation of this study is also the restricted number of pregnancies analyzed and the absence of karyotype information to exclude any genetic alterations that could alter the DNA methylation results. In addition, we cannot exclude

ORIGINAL ARTICLE: EARLY PREGNANCY

FIGURE 2



Percentage of DNA methylation in the KvDMR1 analyzed by qAMP. (A) Percentage of DNA methylation at the KvDMR1 region in embryonic and extraembryonic tissues of several first-trimester (T1) pregnancies. (B) Percentage of DNA methylation at the KvDMR1 region in chorionic villus of several term placentas (T3). (C) Average (and standard deviation) of the percentage of DNA methylation at the KvDMR1 region in embryos, umbilical cords, chorionic villi, and amnions from the first-trimester (T1) and chorionic villi from the term pregnancies (T3) analyzed.

Miranda Furtado. KvDMR1 DNA methylation in human pregnancies. *Fertil Steril* 2019.

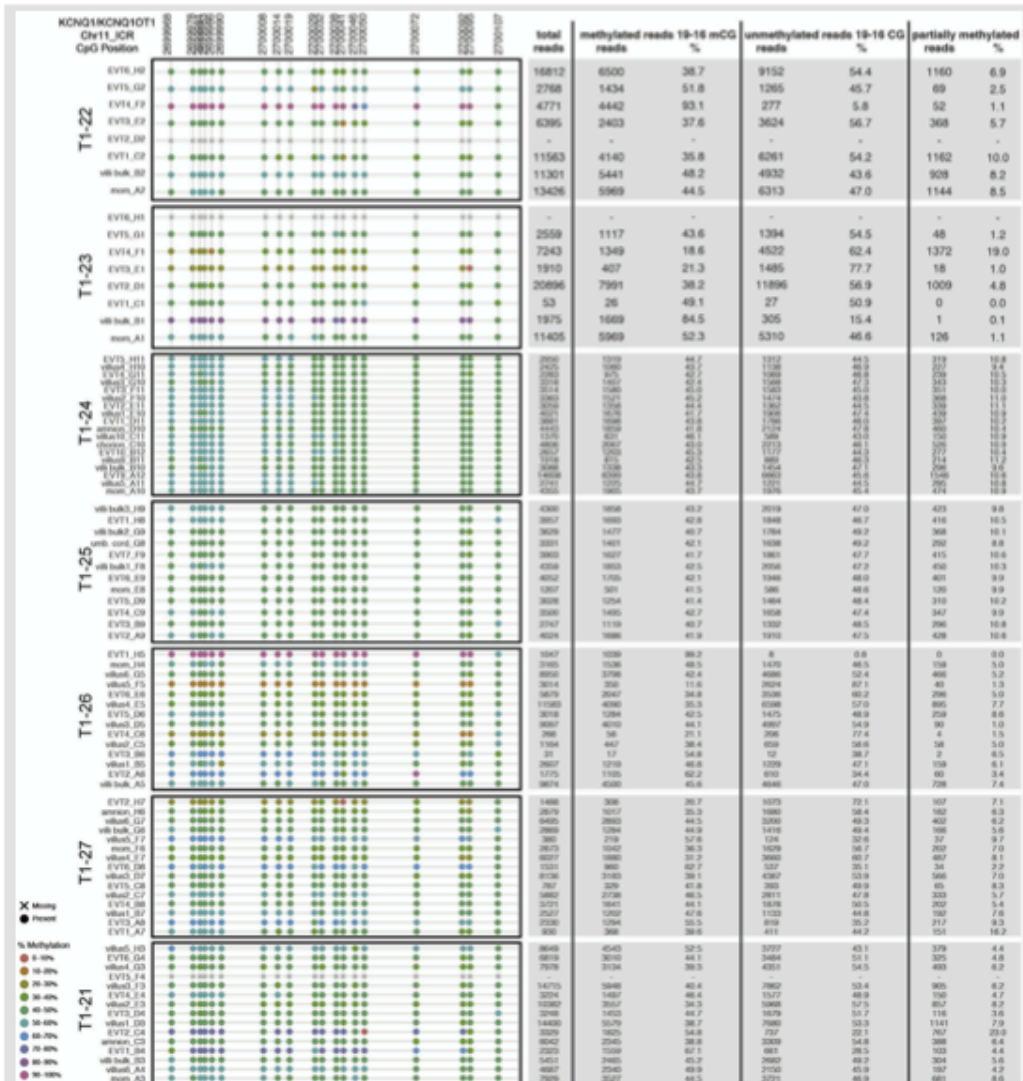
that some of the variation observed could have resulted from preanalytical technical bias, such as the DNA quality or efficiency of the enzymatic digestion. Hence, caution is necessary in interpreting the data.

Nevertheless, the KvDMR1 maps to an important ICR associated with human placental and embryonic growth and development. Developing and applying novel techniques can facilitate the evaluation of levels of DNA methylation for important ICRs during pregnancy, potentially predicting developmental and growth disorders such as Beckwith-Wiedemann syndrome. The variation observed in the levels of DNA methylation in the KvDMR1 region in embryonic and extraembryonic tissues is an important finding in understanding the epigenetic plasticity during the first trimester.

Alterations in KvDMR1 may be related to developmental disorders and long-term adult health. Loss of imprinting at this ICR may be a cause of recurrent miscarriage, and discerning the pattern of methylation may help us better understand early pregnancy loss before 20 weeks of gestational age. As the placenta and the intrauterine environment are essential for the proper development of the embryo, new efforts must be employed to understand the importance of different DMRs during pregnancy.

Acknowledgments: The authors thank the participants and their families. The authors also thank the Center for Contraception Sexuality and Abortion (CASA) in Leiden and den

FIGURE 3



KvDMR1 DNA methylation pattern analyzed by bisulfite sequencing (bis-seq). Extraembryonic tissues from seven different first-trimester human placentas (T1) and respective maternal decidua (morn) were analyzed. Extravillous trophoblast cells (EVTs) from individual chorionic villi, individual chorionic villi, and pooled chorionic villi (bulk) were analyzed. The average levels of DNA methylation per CpG per sample are represented by colored circles. On the right, a table shows [1] the total reads per sample; [2] methylated reads (containing between 19 and 16 methylated CpGs [mCG]) and percentage to the total reads; [3] unmethylated reads (containing between 19 and 16 unmethylated CpGs [CG]) and percentage to the total reads; and [4] partially methylated reads and percentage to the total reads.

Miranda Furtado. KvDMR1 DNA methylation in human pregnancies. *Fertil Steril* 2019.

Hague, the Netherlands; the members of the Delivery Room and Outpatient Care Sector, Department of Gynecology and Obstetrics, HC-FMRP-USP; L. van Iperen, Department of

Anatomy and Embryology LUMC, and R. Aparecido Vila and M. Vanni Galerani, Department of Genetics, FMRP-USP for the technical support.

ORIGINAL ARTICLE: EARLY PREGNANCY

REFERENCES

- Tobi EW, Slagboom PE, van Dongen J, Kremer D, Stein AD, Putter H, et al. Prenatal famine and genetic variation are independently and additively associated with DNA methylation at regulatory loci within IGF2/H19. *PLoS One* 2012;7:e37933.
- Tobi EW, Sliker RC, Stein AD, Suchiman HE, Slagboom PE, van Zwet EW, et al. Early gestation as the critical time-window for changes in the prenatal environment to affect the adult human blood methylome. *Int J Epidemiol* 2015;44:1211–23.
- Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171–4.
- Das R, Hampton DD, Jirtle RL. Imprinting evolution and human health. *Mamm Genome* 2009;20:563–72.
- Tremblay J, Hamet P. Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. *Metabolism* 2008;57(Suppl 2):S27–31.
- Pozharny Y, Lambertini L, Ma Y, Ferrara L, Litton CG, Diplas A, et al. Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:391.e1–8.
- Murphy R, Mackay D, Mitchell EA. Beckwith-Wiedemann imprinting defect found in leucocyte but not buccal DNA in a child born small for gestational age. *BMC Med Genet* 2012;13:99.
- Gomes MV, Huber J, Ferriani RA, Amaral Neto AM, Ramos ES. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod* 2009;15:471–7.
- Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 2009;24:741–7.
- Ager EI, Pask AJ, Gehring HM, Shaw G, Renfree MB. Evolution of the CDKN1C-KCNQ1 imprinted domain. *BMC Evol Biol* 2008;8:163.
- Beatty L, Weksberg R, Sadowski PD. Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. *Genomics* 2006;87:46–56.
- Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K, Maher ER, Cooper W, Reik W, et al. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2003;40:797–801.
- Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, et al. Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci* 2006;97:1147–54.
- Tobi EW, Goeman JJ, Monajemi R, Gu H, Putter H, Zhang Y, et al. DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nat Commun* 2014;5:5592.
- Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet* 2013;58:402–9.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- Oakes CC, La Salle S, Trasler JM, Robaire B. Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). *Methods Mol Biol* 2009;507:271–80.
- Gomes MV, Gomes CC, Pinto W Jr, Ramos ES. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. *Am J Med Genet A* 2007;143:625–9.
- Vertesy A, Arindarto W, Roost MS, Reinius B, Torrens-Juaneda V, Bialecka M, et al. Parental haplotype-specific single-cell transcriptomics reveal incomplete epigenetic reprogramming in human female germ cells. *Nat Commun* 2018;9:1873.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011;17:10–2.
- Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011;27:2957–63.
- Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 2011;27:1571–2.
- Pabinger S, Ernst K, Pulverer W, Kallmeyer R, Valdes AM, Metrusty S, et al. Analysis and visualization tool for targeted amplicon bisulfite sequencing on ion torrent sequencers. *PLoS One* 2016;11:e0160227.
- Huntriss J, Woodfine K, Huddleston JE, Murrell A, Rutherford AJ, Elder K, et al. Quantitative analysis of DNA methylation of imprinted genes in single human blastocysts by pyrosequencing. *Fertil Steril* 2011;95:2564–7, e1–8.
- Woodfine K, Huddleston JE, Murrell A. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. *Epigen Chromatin* 2011;4:1.
- Diplas AJ, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J, et al. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 2009;4:235–40.
- Yu L, Chen M, Zhao D, Yi P, Lu L, Han J, et al. The H19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 2009;30:443–7.
- Cohen MM Jr. Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* 2005;8:287–304.
- Coan PM, Vaughan OR, Sekita Y, Finn SL, Burton GJ, Constanca M, et al. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J Physiol* 2010;588:527–38.
- Hanna CW, Penaherrera MS, Saadeh H, Andrews S, McFadden DE, Kelsey G, et al. Pervasive polymorphic imprinted methylation in the human placenta. *Genome Res* 2016;26:756–67.
- Pervjakova N, Kasela S, Morris AP, Kals M, Metspalu A, Lindgren CM, et al. Imprinted genes and imprinting control regions show predominant intermediate methylation in adult somatic tissues. *Epigenomics* 2016;8:789–99.
- Bressan FF, De Bem TH, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV, et al. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta* 2009;30:823–34.
- Schroeder DI, Blair JD, Lott P, Yu HO, Hong D, Cray F, et al. The human placenta methylome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:6037–42.



Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolipídios em embriões bovinos produzidos *in vitro*
Partial replacement of fetal bovine serum during in vitro culture decreases phospholipid content in vitro produced bovine embryos

Carolina Gennari Verruma^{1*}, Anderson Mioranza², Tânia Petta³, Reginaldo Aparecido Vila¹,
 Cristiana Libardi Miranda Furtado⁴, Luiz Alberto Beraldo de Moraes⁵, Raysildo Barbosa Lôbo¹.

¹ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

² Biovita, Cascavel, PR, Brazil.

³ Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁴ Drug Research and Development Center, Postgraduate Program in Medical and Surgical Sciences, Federal University of Ceara, CE, Brazil.

⁵ Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Science and Language Science at Ribeirão Preto, Ribeirão Preto SP, Brazil.

*Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Avenida Bandeirantes, 3900; 14049-900

Resumo

Soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA) são componentes importantes do cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, porém são frequentemente associados ao acúmulo excessivo de lipídios, podendo prejudicar o desenvolvimento embrionário. Este estudo teve como objetivo substituir parcialmente o SFB por BSA V FAF durante o CIV de embriões bovinos, avaliar a produção embrionária e quantificar os lipídios dos embriões, SFB e dos meios de cultivo. Para isto, os embriões desenvolveram em meios de cultivo suplementados com 10% de SFB (SFB10%) ou 5% de SFB e 0.03g de BSA V FAF (SFB5%/BSA). O conteúdo lipídico foi avaliado por UHPLC-MS/MS. A análise estatística foi feita utilizando teste t e ANOVA. A substituição parcial de SFB por BSA V FAF não alterou a produção embrionária. Nos dois grupos foram identificados 10 fosfolipídios e três deles, DOPC (p=0,037), POPG (p=0,046) e C24:1-SM (p=0,009), apresentaram menores concentrações no meio SFB5%/BSA. Os fosfolipídios identificados nos embriões coincidem com os encontrados no SFB e meios de cultivo e quatro deles DOPC (p=0,013), DPPC (p=0,004), POPG (p=0,05) e C24:1-SM (p=0,003) diminuíram a concentração com a redução do SFB. A substituição parcial do SFB diminui a concentração de fosfolipídios sem prejudicar a produção embrionária, sugerindo uma melhora nas técnicas relacionadas ao cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Embriões bovinos; Produção *in vitro* (PIV); Fosfolipídios; UHPLC-MS/MS

Abstract

Fetal bovine serum (FBS) and bovine serum albumin (BSA) are important components during bovine embryo in vitro culture (IVC), but they are associated with excess of embryonic lipid, which might impair embryo development. This study aimed to partially replace FBS by BSA V FAF during bovine IVC, evaluate embryo production and quantify the phospholipid content in produced embryos, SFB and IVC medium. The embryos were in vitro cultured in medium supplied with 10% of FBS (FBS10%) or with 5% of FBS plus 0.03 g BSA V FAF (FBS5%/BSA). The lipid content was evaluated using UHPLC-MS/MS and statistical analysis was performed using t-test and ANOVA. The partial replacement of FBS by BSA V FAF did not alter embryo production. Ten phospholipids were identified in both groups and three of them, DOPC (p=0.037), POPG (p=0.046) and C24:1-SM (p=0.009) presented lower concentration in FBS5%/BSA culture medium. The phospholipids identified on embryos matches with those found on SFB and culture medium and four of them DOPC (p=0.013), DPPC (p=0.004), POPG (p=0.05) and C24:1-SM (p=0.003) reduced its concentration when FBS was reduced. These findings shown that the FBS partial replacement reduces phospholipids content in embryos but do not decrease embryo production, suggesting a technical improvement.

Keywords: Bovine embryo; In vitro production (IVP); Phospholipids; UHPLC-MS/MS

*Correspondência: verruma.cg@usp.br

Recebido: 04 de setembro de 2019

Aceito: 16 de abril de 2020



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

Introduction

Assisted reproductive technologies (ARTs) are frequently used in domestic animals and a high number of bovine embryos are produced annually, but these techniques still reduce the quality and embryo rate production (Cagnone and Sirard, 2014). The development of a zygote until blastocyst stage during *in vitro* culture (IVC) is considered the most critical period of *in vitro* production (IVP) of embryos (Loneragan et al., 2003). This stage requires exogenous components such as fetal bovine serum (FBS) and bovine serum albumin (BSA) that stimulate cell proliferation and differentiation (Varago et al., 2008).

Although FBS is considered important to embryo development, it has been shown that its presence on IVC increased 30% of embryo lipid concentration on day 6 of development (Leroy et al., 2005). The FBS may influence the embryo lipids uptake by changing the mitochondria metabolism (Abe et al. 2002; Pereira e Marques, 2008) leading to an abnormal accumulation of long chain saturated and unsaturated lipids in the cytoplasm, which may impair the embryonic development (Abe et al., 2004). Furthermore, the presence of FBS during IVC could alter the concentration, function and chemical property of phospholipids that are important to embryo development, with an essential role in the membrane fluidity and permeability (Edidin, 2003; Pitangui-Molina et al., 2017).

It has been shown that *in vitro* produced embryos seem to be more sensitive to cryopreservation when compared with embryos *in vivo* produced, due to the higher concentration of lipid droplets found in *in vitro* embryos (Sanches et al., 2013). The components captured by the embryo during IVC seems to influence its quality. Small changes in the IVC medium can significantly increase the quality of the produced embryos and it has already been shown that lower lipids content is beneficial for embryo survival, facilitating its storage, transport and trade (Varago et al., 2008). Based on FBS published data (Loneragan et al., 2003; Rizos et al., 2003; Abe et al., 2004; Gómez et al., 2008), we hypothesize that partial replacement of FBS during embryo culture reduces lipid content without impair embryo production and that FBS may be the phospholipid source to embryo during IVC. Therefore, this paper aimed to partially replace FBS by BSA V FAF during IVC and evaluate embryo production and phospholipid concentration on embryos, FBS and both IVC medium.

Material and Methods

In vitro production of bovine embryos

All experiments were performed on Medical School of Ribeirão Preto, SP (FMRP-USP), Brazil. The ovaries were collected from slaughtered cows. Follicles between 2-8 mm were aspirated using an 18-gauge needle connected to a 10 mL syringe. The oocytes were classified according to Leibfried and First (1979) and only those with more than three cumulus cells layers and homogenous ooplasm, grade I (GI) oocytes, were selected. The experiments were carried out in six replicates and a total of 946 cumulus oocytes complex (COCs) were selected. The oocytes were placed in microdrops (20 oocytes/microdrop) of 100 μ L of *in vitro* maturation (IVM) medium [TCM199 with Earle's salts, glutamine, NaHCO_3 , pyruvate (22 μ g/mL), 10% of FBS, FSH (0.5 mg/mL), LH (50 μ g/mL), amikacin (83 μ g/mL), and estradiol (1.0 μ g/mL)], during 22-24 hours, in maximum humidity, at 38.8 °C and 5% CO_2 .

At the end of IVM, the oocytes were transferred to *in vitro* fertilization (IVF) medium (TALP supplemented with heparin (10 mg/mL), pyruvate (22 μ g/mL), BSA FAF (Fatty acid free) (6 μ g/mL), and PHE solution (2 μ M of penicillamine, 1 μ M of hypotaurine, and 0.25 μ M of epinephrine) plus amikacin (83 μ g/mL) with the sperm to IVF. Each drop contained approximately two million sperm per milliliter (2×10^6 sperm/mL). Gametes stayed on IVF medium during 12 hours in maximum humidity, at 38.8 °C and 5% CO_2 .

Twelve hours post-insemination, the presumptive zygotes were removed from the IVF medium, divided into two groups, (1) FBS10% and (2) FBS5%/BSA, and transferred to *in vitro* culture (IVC) medium (day zero, D0). The FBS10% group developed in CR2 stock culture medium (Rosenkrans et al., 1993) supplemented with 10% of FBS, 0.03g of BSA V (Fraction V), 100 μ L of alanine, 100 μ L of glycine and amikacin (83 μ g/mL). The FBS5%/BSA group was culture in the same medium mentioned above with a reduction of 50% of FBS (only 5% of FBS) and addition of 0.03g of BSA V FAF. The



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

embryos were co-cultured in a cumulus cells monolayer system, without O₂ control, in maximum humidity, at 38.8 °C and 5% CO₂. The embryo production rate was obtained at day 7 of development (D7) based on number of blastocysts in relation to zygotes (D0). Expanded blastocysts were selected to phospholipids analysis, in which 35 embryos from each group were pooled and evaluated in experimental triplicate. Embryos were stored in 100 µL of 0.9% saline solution at -80°C until phospholipid analysis.

Phospholipid analysis

The phospholipid analysis was performed on expanded blastocysts from both FBS10% and FBS5%/BSA groups. To observe the phospholipids concentration in the medium components, 500 µL of FBS alone and the CR2 medium supplemented with FBS10% (CR2-FBS10%) or FBS5%/BSA (CR2-FBS5%/BSA) were evaluated.

Total lipid extraction was made following protocol adapted from Bligh and Dyer (1959). On each sample were added 250 µL of methanol (MeOH) and 125 µL of chloroform, and the solution was sonicated (four times, ten seconds each). Then, 100 µL of water and 125 µL of chloroform were added, shaking using a vortex. The sample was centrifuged for one minute at 1200 x g and two phases could be observed (upper phase: aqueous; lower organic phase: chloroform). The lower organic phase was carefully discarded, 250 µL of chloroform was added to the upper aqueous phase and the sample was centrifuged for one minute (this step was repeat two times in order to extract the maximum amount of material). With the extract separated from the rest of the sample, 300 µL of NaCl was added to the aqueous phase to prevent emulsion formation. The resulting organic layer was exposed to gas nitrogen to dry it. Samples were resuspended in 100 µL of MeOH, and an aliquot of 1 mL was injected to the UHPLC-MS/MS system.

Phospholipid identification by UHPLC-MS/MS

The ultra-high-performance liquid chromatography by mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analysis of phospholipids was performed in an *Acquity Ultra Performance Liquid Chromatographer H-Class* (Waters Corp., Milford, MA, USA) interfaced with the Xevo TQ-S mass spectrometer equipped with an orthogonal Z-spray electrospray ionization source (Waters Corp., Milford, MA, USA). The analyses were detected in the Multiple Reaction Monitoring scan mode (MRM) that is the most specific and accurate method based on the selection of certain precursor ions and their fragments. To optimize the analytical pure standards of phospholipids at 50 ng/mL was diluted in water/acetonitrile (1:1, v/v), ammonium acetate at 10 mM and introduced into the mass spectrometer by infusion at a flow of 10 µL/min and submitted to the fragmentation by CID (Collision Induced Dissociation) with argon. The experimental parameters used were: capillary voltage: 2.30V; source temperature: 150 °C; desolvation temperature: 350 °C; cone gas flow: 150 L/h; desolvation gas flow: 500 L/h; collision gas flow: 0.15 mL; nebulizer gas pressure: 7.00 bar; MRM transition cycle of 3.10⁻³s.

The electrospray ionization source (ESI) operated in both the positive and negative modes. The data obtained were processed in Masslynx 4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and are shown in supplementary material (Figure S1). The employed method was capable of identify 25 phospholipids classes. The phospholipid standards employed were described on supplementary table S1. For the chromatographic separation of compounds an UPLC BEH columns C4, (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with dimensions of 1.7 µm, 50 x 2.1 mm was employed. The elution of compounds was carried out by means of a binary gradient where phase A consisted of water/ammonium acetate 10 mM and phase B was acetonitrile ammonium acetate 10 mM. The elution gradient was varied in the following proportion: 50% B in 0 min, 70% B in 8.0 min, 100% B of 8.5 min to 10.5 min and 50% B from 11.0 until 15.0 min. The flow rate used was 0.5 mL/min. The parameters used for phospholipids analysis on UHPLC-MS/MS chromatograms in the MRM scan mode are shown in Table S2 and Figure S2 (Supplementary material).

The positive identification of a lipid species in the samples was accomplished by matching the MRM transition and retention time of the corresponding phospholipid standard. Comparison of phospholipid levels in the samples was accomplished by analysis of the relative intensities of the analytical signal of the identified phospholipids in the studied samples.



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

Statistical analysis

Statistical analysis was performed to evaluate the embryo production, phospholipids concentration on embryos cultured with FBS10% and FBS5%/BSA, FBS, CR2-FBS10% and CR2-FBS5%/BSA medium. The mean differences were compared using t-test and One-way ANOVA (Analysis of Variance) with post-hoc Tukey for multiple comparisons. All statistical analyses were carried out using SPSS 22 (IBM®, USA) *software* with a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Results

Embryo production

The *in vitro* production of embryos was not affected ($p=0.467$) by the partial replacement of FBS by BSA, as the percentage of produced embryos was $46.46\% \pm 7.4$ in the FBS10% group and $43.03\% \pm 5.0$ in the FBS5%/BSA group. Furthermore, the rate of expanded blastocysts was also not affected ($p=0.924$) by the partial replacement of FBS by BSA (Tab 1).

Tabela 1. Number of selected COCs and embryos cultured in FBS10% and FBS5%/BSA at the first day (D0) and seventh day (D7) of culture ($p < 0.05$).

Group	Selected COCs	Zygotas (D0)	Embryo production (D7) n (% \pm SD)	Expanded blastocysts D7 n (%)*
FBS10%	946	464	207 (46.46 \pm 7.4) ^a	170 (82.1) ^a
FBS5%/BSA		482	206 (43.03 \pm 5.0) ^a	174 (84.4) ^a

Note: Different letters in the same column means statistical difference ($p < 0.05$).

*Expanded blastocyst rates were calculated according to the total of blastocysts at D7.

COCs, cumulus-oocytes complex. FBS, fetal bovine serum. BSA, bovine serum albumin. D0, first day of culture. D7, seventh day of culture. SD, standard deviation.

Phospholipids analyses

A total of ten phospholipids were identified and quantified on expanded blastocysts from both FBS10% and FBS5%/BSA groups (Tab 2). The phospholipids DOPC ($p=0.037$), POPG ($p=0.046$), and C24:1-SM ($p=0.009$) were reduced in embryos cultured with FBS5%/BSA when compared to embryos cultured with FBS10% (Tab 2).

Tabela 2. Phospholipids content (area) in D7 embryos cultured with FBS10% and FBS5%/BSA ($p < 0.05$).

Phospholipids ^A	FBS10% Mean \pm SD (10 ⁶)	FBS5%/BSA Mean \pm SD (10 ⁶)	P value
DMPE	18.5 \pm 6.24	40.9 \pm 3.24	0.305
DOPC	1638.4 \pm 304.8	989.9 \pm 198.0	0.037
DOPE	110.3 \pm 48.1	80.8 \pm 17.8	0.376
DPPC	351.7 \pm 131.6	255.3 \pm 64.6	0.319
POPC	1969.2 \pm 718.5	1395.9 \pm 286.3	0.275
POPE	23.0 \pm 7.55	18.1 \pm 4.63	0.394
POPG	6.50 \pm 1.57	3.07 \pm 1.37	0.046
PS	44.8 \pm 21.0	31.5 \pm 17.2	0.445
C18-SM	127.5 \pm 45.1	79.5 \pm 40.1	0.240
C24: 1-SM	261.9 \pm 22.2	139.1 \pm 39.5	0.009

Note: In bold, $p < 0.05$.

^APhospholipids data were presented based on chromatograms areas.

SD, standard deviation. D7, seventh day of culture.

^ADMPE: dilauroyl phosphatidylethanolamine. DOPC: dioleoyl phosphatidylcholine. DOPE: dioleoyl phosphatidylethanolamine. DPPC: dipalmitoyl phosphatidylcholine. POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-3-phosphoethanolamine. POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]. PS: phosphatidylserine. C18-SM: N-(octadecanoyl)-sphinganine-1-phosphocholine. C24: 1-SM: N-(15Z-tetracosenoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

To evaluate the hypothesis that the phospholipids presented on embryos are also presented in the IVC medium, the FBS alone and both CR2-FBS10% and CR2-FBS5%/BSA medium were analyzed in the UHPLC-MS/MS. The same ten phospholipids found on embryos were found on FBS, CR2-FBS10% and CR2-FBS5%/BSA. Four of them, DOPC ($p=0.013$), DPPC ($p=0.004$), POPG ($p=0.05$) and C24:1-SM ($p=0.003$) showed reduced concentration in CR2-FBS5%/BSA in relation to CR2-FBS10% (Tab 3). It is important to observe that three phospholipids with reduced concentration (DOPC, POPG and C24:1-SM) on CR2-FBS5%/BSA medium also presented lower concentration in embryos cultured in this medium.

Tabela 3. Phospholipids content (area) found on FBS singly, FBS10% CR2 and FBS5%/BSA CR2 medium. ($p<0.05$).

Phospholipids ^A	FBS	CR2-FBS10%	CR2-FBS5%/BSA
	Mean \pm SD (10 ⁶)	Mean \pm SD (10 ⁶)	Mean \pm SD (10 ⁶)
DMPE	12024.89 \pm 4874.78 ^a	9029.57 \pm 2562.70 ^a	11269.77 \pm 1583.92 ^a
DOPC	12163.76 \pm 396.74 ^a	3821.95 \pm 211.03 ^b	2775.38 \pm 280.67 ^c
DOPE	42.59 \pm 3.75 ^a	46.93 \pm 57.72 ^a	7.71 \pm 1.36 ^a
DPPC	7063.87 \pm 144.57 ^a	1568.63 \pm 18.02 ^b	1005.19 \pm 166.88 ^c
POPC	8.99 \pm 1.77 ^a	1.36 \pm 0.36 ^b	0.45 \pm 0.40 ^b
POPE	44.35 \pm 1.44 ^a	19.24 \pm 15.48 ^b	5.02 \pm 1.02 ^b
POPG	76.16 \pm 2.54 ^a	25.55 \pm 9.70 ^b	10.69 \pm 3.94 ^c
PS	26.70 \pm 2.48 ^a	5.18 \pm 0.36 ^b	1.91 \pm 0.18 ^b
C18-SM	11115.91 \pm 796.78 ^a	1676.27 \pm 84.27 ^b	828.50 \pm 149.37 ^b
C24: 1-SM	17333.75 \pm 147.05 ^a	5772.75 \pm 728.06 ^b	3321.12 \pm 544.83 ^c

Note: Different letters in the same line means statistical difference ($p<0.05$).

^APhospholipids data were presented based on chromatograms areas.

[^]DMPE: dilauroyl phosphatidylethanolamine. DOPC: dioleoyl phosphatidylcholine. DOPE: dioleoyl phosphatidylethanolamine. DPPC: dipalmitoyl phosphatidylcholine. POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-3-phosphoethanolamine. POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]. PS: phosphatidylserine. C18-SM: N-(octadecanoyl)-sphinganine-1-phosphocholin. C24: 1-SM: N-(15Z-tetracosenoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine. SD, standard deviation.

Discussion

One frequent issue related to the use of FBS during IVP is the embryo lipid amount after *in vitro* culture (IVC). Our results shown that the partial replacement of FBS by BSA V FAF promotes a reduction of the phospholipids DOPC, POPG and C24:1-SM on expanded blastocysts, without impair the production rate. We observed that embryo production on D7 were about 40% in both tested groups what is consistent with the results published in the literature (Viana et al., 2012). The comparison of our results with literature data, shows that partial protein replacement seems to be more adequate than full substitution, since full FBS replacement by BSA during oocyte maturation and embryo culture decreased embryo production (Sena-Netto et al., 2020). One major challenge in IVP is to develop an appropriate growth medium, which mimics the essential components to the proper development of the embryo, reducing cell stress, loss of viability and allowing a technical improvement (Gómez et al., 2008; Cagnone and Sirard, 2014).

FBS and BSA are important components to embryonic early development and are often used during IVC (Crocco et al., 2013). The presence of FBS on IVC stimulates embryo development until blastocyst stage, albeit also influences the lipid content and impair embryo survival after cryopreservation (Rizos et al., 2003; Sudano et al., 2011). Several studies mentioned the relationship between lipid content on embryos and their influence in the success rate of ARTs and other related process. Among them, Sudano and colleagues (2012) showed that membrane phospholipids, for example, can be specie-specific and change its composition according to culture microenvironment, which may result on changes in membrane fluidity and embryo cryosurvival rate. It is clear that lipid metabolism is essential to mammal development (Ferreira et al., 2014) and has fundamental role in energy storage, cell structure and cell physical and metabolic changes (Sudano et al., 2012). Therefore, the quantification and classification of lipids present on embryos are important to understand the embryo metabolism, mainly those produced by



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

ARTs (Sudano et al., 2012; Melo et al., 2014).

Consistent with published literature (Sudano et al., 2011), our findings demonstrated that a 50% reduction of FBS on IVC did not alter embryo production. Although there was no difference in production rate, the reduction of FBS in the culture medium changed the phospholipids concentration on embryos. The concentrations of DOPC, POPG and C24:1-SM were higher in the FBS10% compared to FBS5%BSA group. Phospholipids play an important role during and after fertilization, being the major lipid class present in eukaryotic cell membranes (McEvoy et al., 2000; Annes et al., 2019). Preimplantation embryos have higher-mass lipids, such as ceramides, whereas the zona pellucida contains lower-mass lipids such as phosphatidic acid derivatives and phosphatidylethanolamides (Ferreira et al., 2014).

The phospholipids, such as the phosphatidylcholine (DOPC) and sphingomyelin (C24:1-SM) found reduced in the FBS5%/BSA group are structural lipids and membranes components with important role to embryo development, survival rate after cryopreservation techniques and pregnancy success due to its main influence in membrane signaling (Annes et al., 2019). Phosphatidylcholines (DOPC, DPPC and POPC, for example) are the most abundant phospholipids in eukaryotic cell membrane, important to embryogenesis, which may act like a cell messenger and play a role in apoptosis process. Besides that, this phospholipid class is important to endoplasmic reticulum biogenesis, an essential organelle to embryo development (Albi and Viola Magni, 2004; Vance and Vance, 2004; Diez et al., 2005). The sphingomyelins (C18-SM and C24: 1-SM) are structural lipids that participates of cellular signaling and its metabolism products such as ceramides and diacylglycerol, as well as the phosphatidylcholine, may influence cell functions, including cell proliferation and apoptosis (Paula-Lopes and Hansens, 2002; Leão et al., 2014). Furthermore, the sphingomyelins are part of functional membranes and influence membrane permeability and fluidity during temperature changes (Edidin, 2003; Sudano et al., 2012). Still, sphingomyelins could assist nuclear organization during cell division (Albi and Viola Magni, 2004).

To evaluate the hypothesis that the lipids found in bovine embryos are from FBS present in the IVC, we evaluated the phospholipid content of FBS alone and CR2 medium with FBS10% (CR2-FBS10%) and FBS5%/BSA (CR2- FBS5%/BSA). The UHPLC-MS/MS analysis identified the same ten phospholipids found on embryos. Four of them, DOPC, DPPC, POPG and C24:1-SM are phosphatidylcholines, phosphoglycerol and sphingomyelins, respectively, that reduced its concentration on CR2-FBS5%/BSA when compared to CR2-FBS10%. These results are in accordance with Vireque and colleagues (2017) that showed by MALDI-MS method that FBS has elevated phospholipid concentration, specially phosphatidylcholines and sphingomyelins. In addition, three of four phospholipids (DOPC, POPG and C24:1-SM) that presented lower concentrations in CR2-FBS5%/BSA medium were also reduced on embryos that were cultured on it. This corroborate with studies that highlighted the influence of culture medium components during embryo early development such as lipid content (Leroy et al., 2005; Pereira and Marques, 2008).

Despite the importance of the observed results, a limitation of this study was that we did not evaluate if the phospholipid concentration reduction in the FBS5%/BSA group could improve embryo survival rate after cryopreservation. To our knowledge, any study evaluated the association between FBS and phospholipid concentration in embryos cultured in CR2 culture medium with a co-culture system with cumulus cell monolayer and without an O₂ control. Although the studied phospholipids are essential to cell function, structure and organization, their reduction seems not to impair embryo development as observed in production rate results, suggesting that the embryo may capture essential nutrients to its development in other components available in the medium.

In conclusion, the partial replacement of FBS by BSA V FAF reduced the phospholipid content without changing the final embryo production. In addition, the results reinforce the idea that FBS may provide lipids sources to bovine embryos during IVP, since it was identified the same phospholipids on embryos and FBS. Finally, the partial replacement of the FBS reduced the concentration of the same phospholipids on IVC medium and embryos. These results may suggest an improvement of techniques related to IVC, since the reduction of lipid concentration on bovine embryos may increase resistance, improving its survivor and viability.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Process N° 2012/22672-8) and Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP).



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

References

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.57-66, 2002.
- Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hoshi H.** Review. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mam Ova Res*, v.21, p.22-30, 2004.
- Albi, E, Viola Magni MP.** The role of intranuclear lipids. *Biol Cell*. v.96, p.657-667, 2004.
- Annes K, Sudano MJ, Belaz KRB.** Lipid characterization of in vitro-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. *Zygote*, p.1-10, 2019.
- Bligh E, Dyer WJ.** A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, v.37, p.911-917, 1959.
- Cagnone G, Sirard MA.** The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology*, v.81, p.712-722, 2014.
- Crocco MC, Kelmansky DM, Mariano, MI.** Does serum cause lipid-droplet accumulation in bovine embryos produced in vitro, during developmental days 1 to 4. *J of Assist Reprod and Gen*; Published online, p.12, 2013. DOI 10.1007/s10815-013-0060-8
- Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CE, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, de la Varga S, Fernández A, Facal N, Carbajo M.** Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and development ability. *Theriogenology*, v.64, p.317-333, 2005.
- Eddidin M.** Review. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature: Mol Cell Biol*, v.4, p.414-418, 2003.
- Ferreira MS, Oliveira DN, Gonçalves RF, Catharino RR.** Lipid characterization of embryo zones by silica plate laser desorption ionization mass spectrometry imaging (SP-LDI-MSI). *Anal Chim Acta*, v.807, p.96-102, 2014.
- Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M., et al.** Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, v.69, p.1013-1021, 2008.
- Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Cabral EC, Franco MF, Ferreira CR, Eberlin MN, Filgueiras PL, Mingoti GZ.** Membrane lipid monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, p.1-10, 2014.
- Leibfried L, First NL.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*, v.48, p.76-86, 1979.
- Leroy JLMR, Genicot G, Donnay I, Van Soom A.** Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Dom Anim*, v.40, p.76-78, 2005.
- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Bolland MP.** Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, v.126, p.337-346, 2003.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK.** Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil*, v.188, p.163-170, 2000.
- Melo DH, Nascimento MZ, Oliveira DL, Neves LA, Annes K.** Algorithms for automatic segmentation of bovine embryos produced in vitro. *J Phy: Conf Ser*, 490, p.4, 2014.
- Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod*, v.66, p.1169-1177, 2002.
- Pitangui-Molina CP, Vireque AA, Tata A, Belaz KRA, Santos VG, Eberlin MN, Silva-de-Sá MF, Ferriani RA, Silva ACJSR.** Effect of soybean phosphatidylcholine on lipid profile of bovine oocytes matured in vitro. *Chem Phys Lipids*, v.204, p.76-84, 2017.
- Pereira RM, Marques CC.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, v.9, p.267-277, 2008.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, et al.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocysts development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biol Reprod*, v.68, p.236-243, 2003.
- Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL.** Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod*, v.49, p.459-462, 1993.



Verruma et al. Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo *in vitro* reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos *in vitro*

- Sanches BV, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM.** Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v.80, p.372-377, 2013.
- Sena-Netto SB, Sprigido JFW, Leme LO, Guimarães ALS, Caixeta FMC, Dode MAN, Pivato I.** The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. *Biopreserv Biobank*, v.18, p.171-179, 2020.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Magalhães LCO, Crocomo LF, Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga FC.** Lipid content and apoptosis of *in vitro*- produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v.75, p.1211-1220, 2011.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FDC.** Phosphatidylcholine and Sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus* and *Bos taurus taurus* *in vitro* and *in vivo* produced blastocysts. *Biol Reprod*, v.87, p.1-11, 2012.
- Vance JE, Vance DE.** Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol*, v.82, p.113-128, 2004.
- Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.100-109, 2008.
- Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA.** Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Animal Reprod*, v.9, p.12-18, 2012.
- Vireque AA, Tata A, Belaz KRA, Grázia JGV, Santos FN, Arnold DR.** MALDI mass spectrometry reveals that cumulus cells modulate the lipid profile of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Syst Biol Reprod Med*, v.63, p.86-99, 2017.

Zygote

cambridge.org/zyg

Research Article

Cite this article: Gennari Verruma C *et al.* (2021). Folic acid supplementation during oocytes maturation influences *in vitro* production and gene expression of bovine embryos. *Zygote*, page 1 of 8. doi: [10.1017/S0967199421000022](https://doi.org/10.1017/S0967199421000022)

Received: 11 March 2020

Revised: 26 October 2020

Accepted: 18 January 2021


Keywords:

Embryo early development; Epigenetics; Imprinted genes; Methyl donors; Oocyte supplementation

Author for correspondence:

Carolina Gennari Verruma. Genetics Department, Medical School of Ribeirão Preto, Bandeirantes Avenue, 3900, 14049-900, São Paulo University, SP, Brazil. Tel: +55 16 3315 4909. E-mail: verruma.cg@usp.br

Folic acid supplementation during oocytes maturation influences *in vitro* production and gene expression of bovine embryos

Carolina Gennari Verruma¹ , Matheus Credendio Eiras¹, Artur Fernandes¹, Reginaldo Aparecido Vila¹, Cristiana Libardi Miranda Furtado², Ester Silveira Ramos¹ and Raysildo Barbosa Lôbo¹

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil and ²Drug Research and Development Center, Postgraduate Programme in Medical and Surgical Sciences, Federal University of Ceara, CE, Brazil

Summary

Embryos that are produced *in vitro* frequently present epigenetic modifications. However, maternal supplementation with folic acid (FA) may improve oocyte maturation and embryo development, preventing epigenetic errors in the offspring. We sought to evaluate the influence of FA supplementation during *in vitro* maturation of grade I (GI) and grade III (GIII) bovine oocytes on embryo production rate and the expression of *IGF2* and *KCNQ1OT1* genes. The oocytes were matured *in vitro* with different concentrations of FA (0, 10, 30 and 100 µM), followed by *in vitro* fertilization and embryo culture. On the seventh day (D7) of culture, embryo production was evaluated and gene expression was measured using real-time qPCR. Supplementation with 10 µM of FA did not affect embryo production for GI and GIII oocytes. Moderate supplementation (30 µM) seemed to be a positive influence, increasing embryo production for GIII ($P = 0.012$), while the highest dose (100 µM) reduced embryo production ($P = 0.010$) for GI, and *IGF2* expression was not detected. In GIII, only embryos whose oocyte maturation was not supplemented with FA demonstrated detected *IGF2* expression. The lowest concentration of FA (10 µM) reduced *KCNQ1OT1* expression ($P = 0.05$) on embryos from GIII oocytes. Different FA concentrations induced different effects on bovine embryo production and gene expression that was related to oocyte quality. Despite the epigenetic effects of FA, supplementation seems to be a promising factor to improve bovine embryo production if used carefully, as concentration is an important factor, especially in oocytes with impaired quality.

Introduction

Folic acid (FA) is a synthetic and stable compound that is converted into folate, an essential component in cell division where it is required as a coenzyme for nucleotide and amino acid biosynthesis. During early embryo development, folate is required to prevent neural tube defects (NTD). As FA is not produced endogenously, a diet supplementation is needed (Scaglione and Panzavolta, 2014). Several years ago FA started to be added to basic dietary components such as wheat and corn flour (Berry *et al.*, 2010). However, these concentrations were not sufficient to prevent NTD and a daily dose of 0.4 mg is recommended for women who want to conceive; the dose, as well as the period of intake, may vary between countries (Gomes *et al.*, 2016; Krupenko, 2019; Hussain and Sharma, 2020).

Due to its role as a 'carry one-carbon' unit and in the transformation of homocysteine to methionine, FA is an important source of methyl groups during DNA methylation, an epigenetic marker that controls gene expression throughout development (Wagner, 2001). DNA methylation is the main mechanism behind genomic imprinting, an epigenetic process with monoallelic gene expression in a parent-of-origin effect, essential for mammalian development and placentation. The biallelic expression of imprinted genes or loss of imprinting (LOI) leads to growth and developmental disorders, such as large offspring syndrome (LOS) in bovines and others ruminants (Suzuki *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Urrego *et al.*, 2014).

At chromosome 29 in bovines, there are two important imprinting control regions (ICRs) that are differentially methylated regions (DMRs) in the maternal and paternal genomes. The H19 DMR is located upstream of the *H19* promoter and contains a CTCF-binding domain. CTCF is an insulator protein and, in the unmethylated maternal allele, blocks enhancer activity on the *IGF2* promoter, which is silenced during *H19* expression. In the paternal allele, methylation induces changes in the *H19* promoter, which is silenced, and enhancer-blocking activity is prevented, allowing paternal *IGF2* activation by the enhancer (Bell and Felsenfeld, 2000; Lewis

© The Author(s), 2021. Published by Cambridge University Press.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

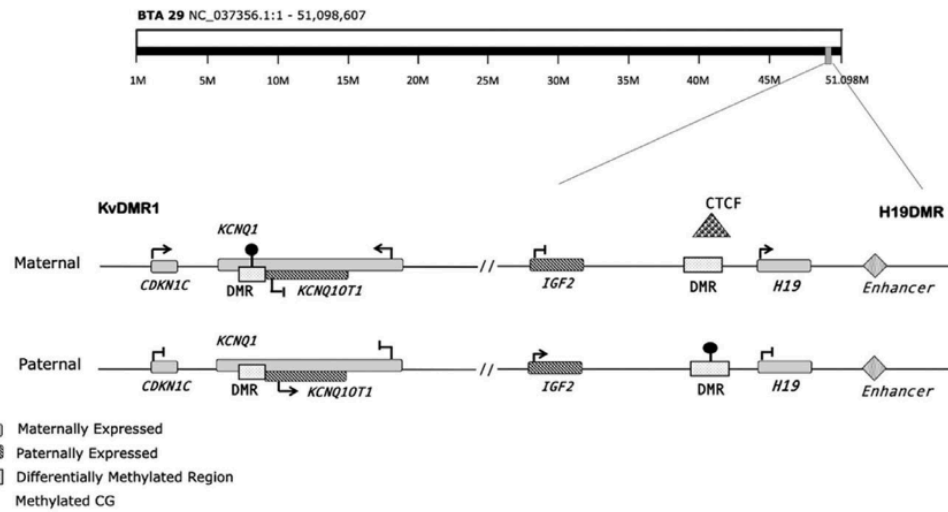


Figure 1. Schematic representation of H19 DMR and KvDMR1 imprinting control regions (ICRs) at bovine chromosome 29. The H19 DMR controls *H19* and *IGF2*, which are maternally and paternally expressed, respectively. This is an enhancer competition model with an insulator CTCF blocking activity. The maternal unmethylated allele allows binding of the CTCF protein that prevents *IGF2* activation by the enhancer, whereas *H19* is expressed. Paternal methylation blocks insulator activity, allowing *IGF2* activation by the enhancer and silencing of the *H19* gene. KvDMR1 is located in the promoter region of the *KCNQ1OT1* gene that overlaps with an intronic region of the *KCNQ1* gene. Methylation in the maternal allele silences *KCNQ1OT1*, whereas *KCNQ1* and *CDKN1C* neighbouring genes are expressed. In the paternal allele, KvDMR1 is unmethylated and allows *KCNQ1OT1* expression and the *KCNQ1* and *CDKN1C* are silenced.

and Reik, 2006). The second region, the KvDMR1, is located in the intronic region of the *KCNQ1* gene that overlaps with the promoter region of *KCNQ1OT1* (or *LIT1*). This region is methylated on the maternal allele, therefore the *KCNQ1OT1* gene is silenced, whereas the *KCNQ1* gene is maternally expressed. The opposite process occurs in the paternal allele, where *KCNQ1OT1* is expressed (Fig. 1). KvDMR1 also controls the maternally expressed *CDKN1C* gene (Mitsuya *et al.*, 1999; Horike *et al.*, 2000; O'Neill, 2005).

Establishment of maternal imprinting and other epigenetic markers during oogenesis is essential for oocyte competence, fertilization and embryo development (Reik *et al.*, 2001; Macdonald and Mann, 2014; DeAngelis *et al.*, 2018). Oocyte contributions towards organelles, mRNAs and nutrients are fundamental to the maintenance of early embryo development prior to zygotic genome activation (ZGA) and microenvironment modifications may affect epigenetic reprogramming in the oocyte (Meirelles *et al.*, 2004; Urrego *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2020).

Assisted reproductive technologies (ARTs), as in *in vitro* maturation of oocytes during *in vitro* production (IVP) of embryos, is related to aberrant expression of imprinted genes, directly affecting embryo production, pregnancy rate and adulthood health (Kussano *et al.*, 2016; DeAngelis *et al.*, 2018; Harper *et al.*, 2018). Even so, those technologies are important in the treatment of infertility, as well as in large-scale production of embryos of domestic animals and storage for lineage maintenance of genetically superior animals (Sirard, 2017; Viana, 2018).

It has been reported that FA may be beneficial for oocyte maturation and posterior embryo production, as early embryonic

development depends on endogenous folate stored during oocyte maturation (O'Neill, 1998; Kwong *et al.*, 2010; Kooistra *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016). FA supplementation during oocyte growth may influence embryo epigenetic reprogramming and, as consequence, alter the expression of important imprinted genes (Mann and Watson, 2013), therefore we evaluated the influence of different FA concentrations on *in vitro* maturation of bovine oocytes during embryo production and on expression of *IGF2* and *KCNQ1OT1* genes.

Materials and methods

In vitro production of embryo

In vitro maturation (IVM) of oocytes

Bovine ovaries were collected from slaughtered animals. Follicles sized between 2–8 mm were aspirated using an 18-gauge needle connected to a 10 ml syringe. Oocytes were selected according to Leibfried and First (1979) and, in total, 1087 grade I (GI) cumulus–oocyte complexes (COCS) and 1072 grade III (GIII) COCs were selected. Oocytes were matured in the absence or presence of 10 μ M, 30 μ M or 100 μ M FA (8758-5G, Thermo Fischer Scientific, USA). The groups (GI and GIII) without FA were placed in microdrops of IVM medium [TCM199 with Earle's salts, glutamine, NaHCO₃ pyruvate (22 μ g/ml), 10% of FBS, FSH (0.5 mg/ml), LH (50 μ g/ml), amikacin (83 μ g/ml), and estradiol (1.0 μ g/ml)], over 22–24 h at 38.8°C, high humidity and 5% CO₂. Oocytes treated with FA were matured in IVM medium supplemented with 10 μ M, 30 μ M or 100 μ M FA under the same conditions of temperature, humidity and CO₂ in air (20 oocytes/100 μ l microdrops).

In vitro fertilization (IVF)

Semen samples from a single bull and from same batch were used in all experiments. The semen sample was centrifuged (342 g) through a Percoll (Sigma-Aldrich, USA) gradient (45:90) for 30 min. After centrifugation, the pellet was analyzed for sperm concentration and motility; each microdrop of the IVF medium contained approximately 2×10^6 sperm/ml. After IVM, oocytes were washed twice with IVF medium (TALP) supplemented with heparin (10 mg/ml), pyruvate (22 µg/ml), BSA FAF (fatty acid free) (6 µg/ml), PHE solution (2 µM of penicillamine, 1 µM of hypotaurine, and 0.25 µM of epinephrine) and amikacin (83 µg/ml) and placed with sperm in IVF microdrops (20 oocytes/100 µl). The gametes were incubated for 18 h at 38.8°C, in high humidity and 5% CO₂ in air.

Embryos in vitro culture (IVC)

After the fertilization period, presumptive zygotes (1-cell embryo; day 0 – D0) were transferred to CR2 culture medium supplemented with 5% FBS, 0.03 g BSA V, 0.03 g BSA FAF V, 100 µl alanine, 100 µl glycine and amikacin (83 µg/ml). Embryos were cultured at 38.8°C, in high humidity and 5% CO₂ in air for 7 days for preimplantation development. On the seventh day of development (D7), embryos were classified according to the International Embryo Transfer Society guidelines as initial blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst or hatched blastocyst; embryo production was evaluated based on viable blastocysts on D7 in relation to zygotes that initiated culture on D0. To analyze gene expression, pools of 12 expanded blastocysts from each treatment were washed in phosphate-buffered saline and stored at -80°C until RNA extraction. Three experimental replicates were evaluated for each treatment.

IGF2 and KCNQ1OT1 gene expression

RNA extraction was performed using the RNeasy® MicroKit (Qiagen, USA) following the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed using the SuperScript® III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fischer Scientific, USA) and oligo(dT) and random hexamers primers (70/30 ratio), following the manufacturer's recommendations. IGF2 and KCNQ1OT1 gene expression was evaluated using quantitative PCR (qPCR) and the SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, USA) with the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Amplification conditions were: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 59°C for 1 min. Sequences for IGF2, KCNQ1OT1 and the reference gene GAPDH were obtained from the National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov). Primers were designed using PREMIER Biosoft software. Primers for the reference gene ACTB have been described previously by Rios *et al.* (2007). Primer sequences are listed in Table S1. The comparative quantification cycle (Cq) was used to evaluate gene expression based on the Pfaffl method (2001).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R platform; data distribution was evaluated using the Shapiro–Wilk test. To evaluate embryo production from GI and GIII oocytes and to compare the influence of FA treatment (10, 30 and 100 µM) the Mann–Whitney or Student's *t*-test was used, depending on data distribution. FA influence on IGF2 and KCNQ1OT1 gene expression was compared using analysis of variance followed by Tukey post-hoc test. All results were compared considering a level of significance of 5%.

Table 1. In vitro production of bovine embryos

Group	Selected COCs	Zygotes (D0)	D7 production (% ± SD)	P-value
GI	541	506	262 (51.8% ± 6.7)	0.00003*
GIII	540	506	183 (36.1% ± 4.8)	

GI, Grade I oocytes; GIII, Grade III oocytes; COCs, cumulus-oocytes complexes; D0, zygotes; D7, embryos at blastocyst stage; SD, standard deviation. *, *P* < 0.05.

Results

Embryo production

When comparing the embryo production from GI and GIII oocytes without FA addition, we observed a higher embryo production rate from GI oocytes (51.85% ± 6.7) compared with GIII oocytes (36.10% ± 4.8) (*P* = 0.00003) (Table 1).

Addition of FA to IVM medium altered the production rate depending on concentration and oocyte quality (Table 2). Addition of the lowest FA dose (10 µM) during GI and GIII oocyte maturation did not alter the embryo production rate (*P* = 0.181 and *P* = 0.075, respectively). When FA supplementation was increased to 30 µM during GIII oocyte maturation, an increase in embryo production was observed (*P* = 0.012). Conversely, 30 µM of FA in GI oocytes seemed not to affect embryo production (*P* = 0.600). Treatment with the highest FA concentration (100 µM) influenced GI oocyte maturation, reducing embryo production (*P* = 0.043), but did not influence embryo production from GIII oocytes (*P* = 0.362).

IGF2 and KCNQ1OT1 gene expression

Expression of IGF2 and KCNQ1OT1 genes was analyzed on pools of expanded blastocysts. IGF2 expression was detected in embryos derived from GI oocytes without FA supplementation and in the lowest FA concentrations (10 and 30 µM). Addition of FA to the IVM medium seemed not to affect IGF2 expression, irrespective of the concentration (10 µM, *P* = 0.680 and 30 µM *P* = 0.956) when compared with the control group (without FA supplementation). In addition, when 100 µM of FA was added, IGF2 expression was not detected. Finally, for embryos from GIII oocytes, IGF2 expression was detected only in the control group without FA supplementation.

Although IGF2 expression was detected in GI oocytes, expression levels were interestingly low compared with expression of the KCNQ1OT1 gene, which was observed in all groups. For expanded blastocysts from GI oocytes, KCNQ1OT1 expression was not altered after FA supplementation (10 µM, *P* = 0.998; 30 µM, *P* = 0.998; 100 µM, *P* = 0.458). However, for embryos from GIII oocytes, the lowest dose of FA (10µM) reduced KCNQ1OT1 expression (*P* = 0.05), while moderate (30 µM, *P* = 0.878) and high FA doses (100µM, *P* = 0.817) did not alter gene expression compared with the control group without FA. In addition, increased expression of KCNQ1OT1 in GIII oocytes with 30 µM FA (*P* = 0.038) was observed when compared with 10 µM (Fig. 2).

Discussion

Addition of FA during IVM of bovine oocytes influenced embryo production and gene expression depending on oocyte quality and FA concentration. Moderate FA concentrations (30 µM) improved embryo production from GIII oocytes whereas, in GI oocytes, the

Table 2. *In vitro* production of bovine embryos in GI and GIII oocytes matured in the absence or presence of folic acid

COCs quality	Folic acid concentration	Selected COCs	Zygotes (D0)	D7 production (% ±SD)	P-value ^a
GI	NA	541	506	262 (51.8% ± 6.7)	
	10 µM	185	185	84 (45.4% ± 5.7)	0.181
	30 µM	181	179	89 (49.7% ± 5.0)	0.600
	100 µM	181	174	69 (39.6% ± 4.2)	0.010*
GIII	NA	540	506	183 (36.1% ± 4.8)	
	10 µM	170	150	64 (42.3% ± 3.7)	0.075
	30 µM	181	173	72 (41.6% ± 1.3)	0.012*
	100 µM	180	176	75 (42.5% ± 9.4)	0.362

COCs, cumulus-oocytes complexes; NA, not added; D0, zygotes; D7, embryos at blastocyst stage; SD, standard deviation.
^aStatistical analysis between NA group and treatments. *, P < 0.05.

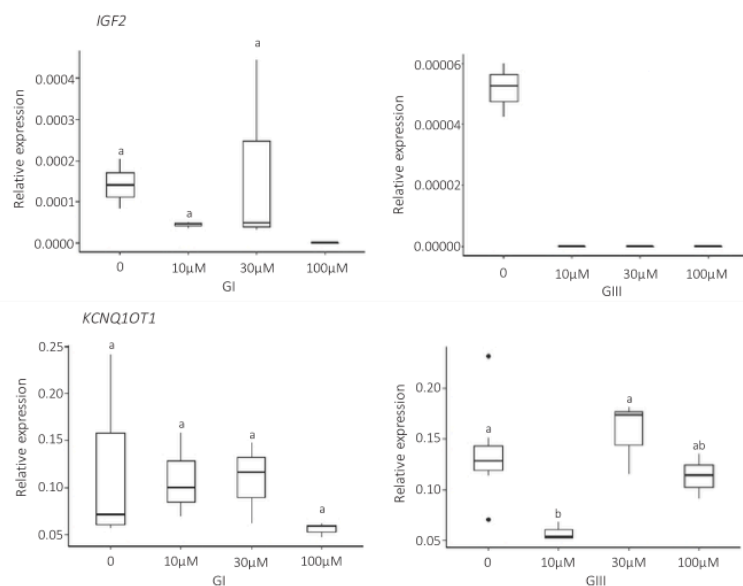


Figure 2. Relative expression of *IGF2* and *KCNQ1OT1* genes on expanded blastocysts from GI and GIII oocytes matured in the absence or presence of FA (10 µM, 30 µM and 100 µM). Note: different letters indicate a statistical difference ($P < 0.05$). FA, folic acid.

highest concentration (100 µM) reduced embryo production rate and *IGF2* gene expression. Conversely, the lowest concentration of FA (10 µM) decreased *KCNQ1OT1* expression in embryos derived from GIII oocytes.

FA is the synthetic form of folate, considered to be more stable and appropriate to be processed, cooked and stored (Institute of Medicine, 1998). Its daily ingestion is recommended during the periconceptional period and also during pregnancy to avoid, mainly, neural-tube defects (Smithells *et al.*, 1976; Czeizel and Dudás, 1992; Tamura and Picciano, 2006; Hoek *et al.*, 2019). Nevertheless, before incorporation into the folate pool, FA needs to be reduced by dihydrofolate reductase (DHFR) enzyme into smaller molecules such as tetrahydrofolate (THF). THF is converted to 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) and catalyzed by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) to form 5-methylenetetrahydrofolate (5-MTHF). 5-MTHF participates in

the one-carbon cycle, donating methyl groups to many chemical reactions (Yamada *et al.*, 2005; Troen *et al.*, 2006; Enciso *et al.*, 2016; Cornet *et al.*, 2019). As a consequence, only cells that contain DHFR and MTHFR enzymes are able to take up and metabolize to folate the FA present in its microenvironment. Kwong and colleagues (2010) demonstrated that these enzymes are present in bovine oocytes and preimplantation embryos, suggesting that they are able to perform this biochemical conversion.

Folate products are essential for early embryo development due to their participation in homocysteine methylation and thymidine synthesis, being important components of DNA replication during cell division (O'Neill, 1998; Benkhalifa *et al.*, 2010; Froese *et al.*, 2018). O'Neill (1998) also suggested that FA captured by oocytes during the maturation period could be used by embryos to assist metabolism during development up to ZGA. In animal models, a positive relationship between FA and oocyte maturation has been

shown previously after addition to the maturation medium, and was related to the uniform distribution of granulosa cells and formation of polar body in developing follicles (Huang *et al.*, 2013).

We observed that, without FA supplementation, morphological differences between oocytes before IVM seem to be enough to influence production rate, as embryo production from GI oocytes was higher compared with that from GIII oocytes. Morphological differences observed in bovine oocytes before IVM regarding the number of cumulus cells layers in the COCs and the ooplasm appearance (homogeneous or heterogeneous) separated the oocytes into three groups – GI, GII and GIII. These morphological characteristics may imply the ability to complete maturation and could determine the fertilization success rate, as those classified as GI were considered to be of better quality than the GIII group (Boni *et al.*, 2002; Saini *et al.*, 2015; Walker and Biase, 2020).

Addition of FA during the IVM improved embryo production depending on oocyte morphology. The lowest dose of FA (10 µM) during oocyte maturation did not affect embryo production rate on the seventh day, regardless of oocyte quality (GI or GIII). Similar results were found by Sato *et al.* (2013) when 10 µM FA was added during porcine oocyte maturation. Nevertheless, moderate FA concentrations (30 µM) increased the production rate of embryos in low quality oocytes (GIII group). Although it is still unclear how FA acts during oocyte maturation and early embryo development (Crider *et al.*, 2012), bovine oocytes seem to produce both DHFR and 5-MTHFR (Kwong *et al.*, 2010) enzymes, responsible for FA metabolism and that positively correlates with embryo production. Furthermore, adequate FA doses may assist oocyte maturation and competence, especially for low quality oocytes, directly affecting fertilization and early embryo development (Boxmeer *et al.*, 2009; Gaskins *et al.*, 2015; Schaefer and Nock, 2019). This finding is important when considering reproductive treatments in humans, as oocyte quality may be impaired depending on age and infertility.

Addition of the highest FA dose (100 µM) during IVM of GI oocytes seemed to be detrimental and reduced embryo production. In the murine model, high folate intake before and during pregnancy may be harmful, influencing the DNA methylation pattern, causing delay to embryo development and also impairing nervous system development, depending on the time of exposition (Pickell *et al.*, 2011; Mikael *et al.*, 2013; Rahimi *et al.*, 2019). FA incorporation by cells has a limit and conversion of FA into its active folate form is restricted by the action of DHFR. Excess levels of FA induce the formation of unmetabolized FA (UMFA) (Troen *et al.*, 2006; Banerjee and Ray, 2016; Pizano and Willimson, 2020) during pregnancy and may influence fetal growth, leading to the development of insulin resistance in childhood (Krishnaveni *et al.*, 2014; Patel and Sobczyńska-Malefora, 2017).

Addition of FA during oocyte maturation and its influence on embryo production as observed in those findings reinforced the hypothesis that some FA used by embryos during early development may be from gametes, especially from oocytes (O'Neill, 1998). During the maturation period, oocytes stock several essential components and mRNAs to assist early embryo development, mainly before the ZGA, to possibly prevent epigenetic disturbances in the offspring (Meirelles *et al.*, 2004; Assou *et al.*, 2010). ARTs are frequently associated with epigenetics changes, such as loss of DNA methylation in the offspring, which may alter the expression of important genes related to embryo growth and development, leading to many diseases, as imprinting disorders (Urrego *et al.*, 2014; Salilew-Wondim *et al.*, 2018; Hattori *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020). Addition of FA during ART may be useful, mainly

because FA acts as a methyl donor and acceptor, assisting nucleotide production during cell division and in the establishment and/or maintenance of epigenetic markers during gametic and embryonic reprogramming (Kim *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013; Friso *et al.*, 2020).

Understanding the influence of oocyte IVM on gene expression levels during early embryonic development is an important step to improve ARTs and increase the success rates in IVP (Moore, 2001; Goossens *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007). However, there is a lack of studies that describe possible influences of FA on imprinted genes. It is important to highlight that, in mammals, imprinted genes are about 1% of the genome and have important roles in embryo and fetus development (Busso *et al.*, 2020), as well as in placentation (Miranda-Furtado *et al.*, 2019). Abnormal expression of imprinted genes in the H19 DMR and KvDMR1 (Fig. 1) may lead to the development of LOS in ruminants, an overgrowth syndrome that has several phenotypic similarities to the Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) in humans (Chen *et al.*, 2013, 2015; Hattori *et al.*, 2019).

In addition to a similar phenotype, LOS and BWS also have similar epigenetic changes. Modifications in the DNA methylation pattern and *IGF2* and *KCNQ1OT1* gene expression have been reported in both ruminant and human syndromes (DeBaun *et al.*, 2003; Murrell *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013; Hattori *et al.*, 2019). The paternally expressed *IGF2* and *KCNQ1OT1* show different biological effects during development, whereas *IGF2* is one of the most important growth factors, the *KCNQ1OT1* gene transcribes a regulatory lncRNA that controls the expression of surrounding genes, as *CDKN1C*, beyond its function as a tumour suppressor (Mitsuya *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2006; Stampone *et al.*, 2018; Hattori *et al.*, 2019).

IGF2 expression was detected in embryos from GI oocytes without and at the lowest and moderate concentrations (10 and 30 µM) of FA. The addition of 10 and 30 µM of FA did not affect *IGF2* expression in GI oocytes, however the highest tested dose (100 µM) negatively affected *IGF2* expression, which was not detected. In addition, in embryos from GIII oocytes, *IGF2* expression was detected only in those cultured without FA supplementation. Although the appropriate dose of FA to be used in IVM has not been well established, there is evidence of its influence during oocyte maturation and embryo early development (Kim *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2013) and concentration seems to affect *IGF2* gene expression. It is possible that the stock of FA provided to the embryo could influence the DNA methylation pattern of the H19 DMR and, consequently, the *IGF2* expression. Steegers-Theunissen and colleagues (2009) associated FA periconceptional ingestion by the mother with increased DNA methylation in the H19 DMR and consequently alteration in *IGF2* expression in babies immediately after birth.

IGF2 was expressed at low levels on expanded blastocysts and its expression did not seem to be related to oocyte quality. These findings corroborates those of Jiang and colleagues (2015) that demonstrated low levels of *IGF2* transcripts in oocytes and during the preimplantation period. The *IGF2* gene product is an essential growth factor that influences body weight in cattle (Goodall and Schmutz, 2007), but biallelic expression of *IGF2* is related to overgrowth syndromes and cancer development in humans (Brioude *et al.*, 2013; Carli *et al.*, 2020). Overexpression of *IGF2* and the increased presence of some types of miRNAs are also related to LOS and BWS (Li *et al.*, 2019).

Unlike *IGF2*, expression of the *KCNQ1OT1* gene was detected in all groups. FA supplementation on embryos from GI oocytes did

not seem to affect *KCNQ1OT1* expression. Interestingly, in embryos from GIII oocytes, the lowest dose of FA (10 μ M) reduced *KCNQ1OT1* gene expression but, when 30 μ M of FA was added, its expression was increased. *KCNQ1OT1* is a paternally expressed gene whose expression can be detected at the first stages of early embryo development (Mohammad, et al., 2009). Its lncRNA is classified as a guide and acts in the cell nucleus in chromatin remodelling and the expression of surrounding genes, being able to silence them (Lewis et al., 2006; Mancini-DiNardo et al., 2006; Pandey et al., 2008; Bouckenheimer et al., 2016).

In general, lncRNAs are found at high concentrations during oocyte growth and embryo preimplantation period, however, in some of them, expression is stage specific. After genome activation, lncRNAs represent a great proportion of embryo transcripts, suggesting a fundamental role during developmental dynamics (Bouckenheimer et al., 2016). In overgrowth syndromes, LOI in KvDMR1 and biallelic expression of *KCNQ1OT1* are reported (DeBaun et al., 2002, 2003; Chen et al., 2013; Li et al., 2019) in several tissues from IVP-derived fetuses, which were detected at a lower frequency in *in vivo*-derived embryos (Chen et al., 2013, 2015).

In humans and animal models, ARTs might alter DNA methylation levels and expression of important genes for embryo development (DeBaun et al., 2003; Gomes et al., 2009; Katari et al., 2009; Weksberg et al., 2010; Chen et al., 2013; Hattori et al., 2019). Despite the important results regarding embryo production and gene expression, the absence of DNA methylation analysis of the H19 DMR and KvDMR1 may be considered a limitation of this study, as FA is an important methyl donor. The correlation between DNA methylation and gene expression of those regions may bring important contributions to our findings. However, to our knowledge, this report is one of the first to evaluate the effects of FA supplementation during bovine oocyte maturation and its consequences for embryo production and *IGF2* and *KCNQ1OT1* expression.

Epigenetic changes observed in *in vitro*-derived embryos seem to be mostly due to exposure to ART procedures, such as gamete and embryo manipulation, and their environmental conditions rather than to parent subfertility, as the same changes have been observed in bovines, ovines (Urrego et al., 2014; Smith et al., 2015; Hansen, 2020) and murines (Market-Velker et al., 2010). Animal models are of key relevance to understanding the mechanisms and pathways affected by ARTs, and to minimizing them, reducing developmental errors in the fetus, and increasing pregnancy rates and postnatal health. The addition of FA during IVM of oocytes influenced bovine embryo production and *IGF2* and *KCNQ1OT1* expression, depending on the oocyte quality and the concentration used. Further studies might provide new insights regarding the ideal FA concentration capable of improving embryo development. Nevertheless, FA supplementation during oocyte maturation seems to be a promising strategy to improve embryo production, especially in low quality oocytes, an important finding when considering reproductive treatments in human. These are the first steps to understanding the effects of FA supplementation on oocyte growth and embryo development, as well as their related molecular mechanisms and pathways.

Acknowledgements. The authors would like to thank Daniel Pascoalino Pinheiro for English review.

Financial support. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Associação

Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA).

Declaration of interest. There is no conflict of interest

Ethical standards. None

Supplementary material. To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S0967199421000022>

References

- Assou S, Boumela I, Haeuzi D, Anahory T, Dechaud H, Vos H and Hamamah S (2010). Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum Reprod Update* 17, 272–90.
- Banerjee A and Ray S (2016). Structural exploration and conformational transitions in MDM2 upon DHFR interaction from *Homo sapiens*: a computational outlook for malignancy via epigenetic disruption. *Scientifica* 2016, 1–11.
- Bell AC and Felsenfeld G (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482–5.
- Benkhalifa M, Montjean D, Cohen-Bacrie P and Ménézo Y (2010). Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil Steril* 93, 1585–90.
- Berry RJ, Bailey L, Mulinare J, Bower C and Dary O (2010). Fortification of flour with folic acid. *Food Nutr Bull* 31(Suppl 1), S22–35.
- Boni R, Cuomo A and Tosti E (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus–oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol Reprod* 66, 836–42.
- Bouckenheimer J, Assou S, Hou C, Philippe N, Sansac C, Lavabre-Bertand T, Commes T, Lemaitre J, Boureux A and Vos J (2016). Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. *Hum Reprod Update* 23, 19–40.
- Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J, Beckers NGM, Eijkemans MJC, Laven JSE, Steegers EAP and Steegers-Theunissen RPM (2009). IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum Reprod* 24, 1059–66.
- Brioude F, Lacoste A, Netchine I, Vazquez MP, Auber F, Audry G, Gauthier-Villars M, Brugieres L, Gicquel C, Le Bouc Y and Rossignol S (2013). Beckwith–Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Horm Res Paediatr* 80, 457–65.
- Busso D, Santander N, Salas-Pérez F and Santos JL (2020). Nutrients and gene expression in development. In R De Caterina, JA Martinez and M Kohlmeier (eds). *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition*, pp. 423–430. Elsevier Academic Press.
- Carli D, Riberi E, Ferrero GB and Mussa A (2020). Syndromic disorders caused by disturbed human imprinting. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 12, 1–16.
- Chen Z, Robbins KM, Wells KD and Rivera RM (2013). Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith–Wiedemann. *Epigenetics* 8, 591–601.
- Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE and Rivera RM (2015). Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *PNAS* 112, 4618–23.
- Cornet D, Clement A, Clement P and Ménézo Y (2019). High doses of folic acid induce a pseudo-methylenetetrahydrofolate syndrome. *SAGE Open Med Case Rep* 7, 1–4.
- Crider KS, Yang TM, Berry RJ and Bailey LB (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 3, 21–38.
- Czeizel AE and Dudás I (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Eng J Med* 327, 1832–5.
- DeAngelis AM, Martini AE and Owen CM (2018). Assisted reproductive technology and epigenetics. *Semin Reprod Med* 36, 221–32.

- DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP and Feinberg AP (2002). Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 70, 604–11.
- DeBaun MR, Niemitz EL and Feinberg AP (2003). Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. *Am J Hum Genet* 72, 156–60.
- Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulos L, Bristow S, Bowles M, Fragouli E, Delhanty J and Wells D (2016). Polymorphisms in the *MTHFR* gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet* 135, 555–68.
- Friso S, Santis D and Pizzolo F (2020). Vitamins and epigenetics. In V Patel (ed.) *Molecular Nutrition: Vitamins*, pp. 633–50. Elsevier Inc.
- Froese DS, Kopec J, Rembeza E, Bezerra GA, Oberholzer AE, Suormala T, Lutz S, Chalk R, Borkowska O, Baumgartner MR and Yue WW (2018). Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nat Commun* 9, 1–13.
- Gaskins AJ, Afeiche M, Wright DL, Toth TL, Williams PL, Gilman MW, Hauser R and Chavarro JE (2015). Dietary folate and reproductive success among women undergoing assisted reproduction. *Obstet Gynecol* 124, 801–9.
- Gomes MV, Huber J, Ferriani RA, Amaral Neto AM and Ramos ES (2009). Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod* 15, 471–7.
- Gomes S, Lopes C and Pinto E (2016). Folate and folic acid in the periconceptional period: Recommendations from official health organizations in thirty-six countries worldwide and WHO. *Public Health Nutr* 19, 176–89.
- Goodall JJ and Schmutz SM (2007). *IGF2* gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. *Anim Genet* 38, 154–61.
- Goossens K, Soom AV, Poucke MV, Vandaele L, Vandesompele J, Zevenen AV and Peelman LJ (2007). Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. *BMC Dev Biol* 7, 1–12.
- Hansen PJ (2020). Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. *Ann Rev Anim Biosci* 8, 395–413.
- Harper JC, Aittomaki K, Borry P, Cornet MC, Werts G, Dondorp W, Geraedts J, Gianaroli L, Ketterson K, Liebaers I, Lundin K, Mertes H, Morris M, Pennings G, Sermon K, Spits C, Soini S, van Montfort APA, Veiga A, Vermeesch JR, Viville S, Macek M Jr, on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology and European Society of Human Genetics (2018). Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet* 26, 12–33.
- Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyachi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T and Arima T (2019). Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenet* 1, 1–12.
- Hoek J, Koster MPH, Schoenmakers S, Willemsen SP, Koning AHJ, Steegers EAP and Steegers-Theunissen RPM (2019). Does the father matter? The association between the periconceptional paternal folate status and embryonic growth. *Fertil Steril* 111, 270–9.
- Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz TC, Shirayoshi Y and Oshimura M (2000). Targeted disruption of the human *LIT1* locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 2075–83.
- Huang X, Gao S, Hou S and Wu, Kun (2013). Folic acid facilitates *in vitro* maturation of mouse and *Xenopus laevis* oocytes. *Brit J Nutr* 109, 1389–95.
- Hussain NM and Sharma SC (2020). Flour fortification with folic acid to reduce risk of spina bifida. *BSDJ* 4, 45–9.
- Jiang Z, Dong H, Zheng X, Marjani SL, Donovan DM, Chen J and Tian X (2015). mRNA levels of imprinted genes in bovine *in vivo* oocytes, embryos and cross species comparisons with humans, mice and pigs. *Sci Rep* 5, 1–10.
- Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster G, Gaughan J, Coutifaris C, and Sapienza C (2009). DNA methylation and gene expression differences in children conceived *in vitro* or *in vivo*. *Hum Mol Genet* 18, 3769–78.
- Kim SE, Seo JS, Eum JH, Lim JE, Kim DH, Yoon TK and Lee DR (2009). The effect of folic acid on *in vitro* maturation and subsequent embryonic development of porcine immature oocytes. *Mol Reprod Dev* 76, 120–1.
- Kooistra M, Trasler JM and Baltz JM (2013). Folate transport in mouse cumulus-oocyte complexes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 89, 1–9.
- Krishnaveni GV, Veena SR, Karat SC, Yajnik CS and Fall CHD (2014). Association between maternal folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in Indian children. *Diabetologia* 57, 110–21.
- Krupenko NI (2019). Folate and vitamins B6 and B12. In R De Caterina, JA Martinez and M Kohlmeier (eds). *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition*, pp. 295–302. Academic Press.
- Kussano NR, Leme LO, Guimarães ALS, Franco MM and Dode MAN (2016). Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology* 85, 1167–76.
- Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R and Sinclair KD (2010). Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction* 139, 705–15.
- Leibfried L and First NL (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48, 76–86.
- Lewis A and Reik W (2006). How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* 113, 81–9.
- Lewis A, Green K, Dawson C, Redrup L, Huynh KD, Lee JT, Hemberger M and Reik W (2006). Epigenetic dynamics of the *Kcnq1* imprinted domain in the early embryo. *Development* 133, 4203–10.
- Li Y, Hagen DE, Ji T, Bakhtiarzadeh MR, Frederic WM, Trasler EM, Kalish JM and Rivera RM (2019). Altered microRNA expression profiles in large offspring syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics* 14, 850–76.
- Liu Y, Zhi L, Shen J, Li S, Yao J and Yang X (2016). Effect of *in ovo* folic acid injection on hepatic *IGF2* expression and embryo growth of broilers. *J Anim Sci Biotechnol* 7, 3–11.
- MacDonald WA and Mann MRW (2014). Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev* 81, 126–40.
- Mancini-DiNardo D, Steele SJS, Levorske JM, Ingram RS and Tilgham SM (2006). Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* 20, 1268–82.
- Mann MRW and Watson AJ (2013). Endogenous folate accumulation in oocytes and preimplantation embryos and its epigenetic implications. *Biol Reprod* 89, 1–2.
- Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC and Mann MRW (2010). Dual effects of superovulation: Loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 19, 36–51.
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (DC): National Academies Press, 592 pp.
- Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambola SF, Merighe GK and Garcia SM (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 82, 13–20.
- Mikael LG, Deng L, Paul L, Selhub J and Rozen R (2013). Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 97, 47–52.
- Miranda-Furtado CL, Salomão KB, Verruma CG, Leite SBP, Rios AFL, Bialecka M, Moustakas I, Mei H, Paz CCP, Duarte G, Lopes DMCS and Ramos ES (2019). Variation in DNA methylation in the KvDMR1 (ICR2) region in first-trimester human pregnancies. *Fertil Steril* 1, 1–7.
- Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP and Oshimura M (1999). *LIT1*, an imprinted antisense RNA in the human *KvLQT1* locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum Mol Genet* 8, 1209–17.
- Mohammad F, Mondal T and Kanduri C (2009). Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. *Epigenetics* 4, 277–86.
- Moore T (2001). Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction* 122, 185–93.

- Murakami K, Oshimura M and Kugoh H (2007). Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted *LIT1*. *J Hum Genet* 52, 926–33.
- Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher E and Reik W (2004). An association between variants in the *IGF2* gene and Beckwith–Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 13, 247–55.
- O'Neill C (1998). Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 13, 1312–6.
- O'Neill MJ (2005). The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. *Hum Mol Genet* 14, 113–20.
- Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-DiNardo D and Kanduri C (2008). *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell* 32, 232–46.
- Patel KR and Sobczyńska-Malefora A (2017). The adverse effects of an excessive folic acid intake. *Eur J Clin Nutr* 71, 159–63.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acid Res* 29, 16–21.
- Pickell L, Brown K, Li, D, Wang Z-L, Deng L, Wu, Q, Selhub J, Luo L, Jerome-Majewska L and Rozen R (2011). High intake of folic acid disrupts embryonic development in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91, 8–19.
- Pizano J and Williamson CB (2020). Nutritional influences on methylation. In D Noland, JA Drisko, L Wagner (eds). *Integrative and Functional Medical Nutrition Therapy*, pp. 269–84. Human Cham, Switzerland.
- Rahimi S, Martel J, Karahan G, Angle C, Behan NA, Chan D, MacFarlane AJ and Trasler JM (2019). Moderate maternal folic acid supplementation ameliorates adverse embryonic and epigenetic outcomes associated with assisted reproduction in a mouse model. *Hum Reprod* 34, 851–62.
- Reik W, Dean W and Walter J (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089–93.
- Rios AFL, Lemos DC, Fernandes MB, Andrea MV, Gomes MVM, Lôbo RB, Mazucato M and Ramos ES (2007). Expression of the CTCF gene in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Genet Mol Biol* 30, 1202–5.
- Saini N, Singh MK, Shah SM, Singh KP, Kaushik R, Manik RS, Singla SK, Palta P and Chauhan MS (2015). Developmental competence of different quality bovine oocytes retrieved through ovum pick-up following *in vitro* maturation and fertilization. *Animal* 9, 1979–85.
- Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Joelker M, Gebremedhn S, Poirier M, Pandey HO, Tholen E, Neuhoff C, Held E, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Fournier E, Gagné D, Sirard MA, Robert C, Gad A, Schellander K and Tesfaye D (2018). Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from *in vivo* embryos subjected to *in vitro* culture before, during or after embryonic genome activation. *BMC Genomics* 19, 1–19.
- Sato D, Sakurai K, Monji Y, Kuwayama T and Iwata H (2013). Supplementation of maturation medium with folic acid affects DNA methylation of porcine oocytes and histone acetylation of early developmental stage embryos. *J Mammal Ova Res* 30, 109–16.
- Scaglione F and Panzavolta G (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica* 44, 480–8.
- Schaefer E and Nock D (2019). The impact of preconceptional multiple-micronutrient supplementation on female fertility. *Clin Med Insights Womens Health* 12, 1–6.
- Siqueira LG, Silva MVG, Panetto JC and Viana JH (2020). Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. *Reprod Fertil Dev* 32, 82–97.
- Sirard MA (2017). The influence of *in vitro* fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *J Dev Origins Health Dis* 8, 1–7.
- Smith FM, Garfield AS and Ward A (2006). Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res* 113, 279–91.
- Smith LC, Therrien J, Filion F, Bressan F and Meirelles FV (2015). Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes *SNRPN*, *H19/IGF2*, and *IGF2R*. *Front Genet* 6, 1–6.
- Smithells RW, Sheppard S and Schorah CJ (1976). Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Childhood* 51, 944–50.
- Stampone E, Caldarelli I, Zullo A, Bencivenga D, Mancini FP, Ragione FD, Borriello A (2018). Genetic and epigenetic control of *CDKN1C* expression: Importance in cell commitment and differentiation, tissue homeostasis and human diseases. *Int J Mol Sci* 19, 1–24.
- Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, Slagboom PE and Heijmans BT (2009). Periconceptional maternal folic acid use of 400 µg per day is related to increased methylation of the *IGF2* gene in the very young child. *PLoS ONE*, 4, 1–5.
- Suzuki J, Therrien J, Filion F, Lefebvre R, Goff AK, Perecin F, Meirelles FV and Smith LC (2011). Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 84, 947–56.
- Tamura T and Picciano MF (2006). Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 73, 993–1016.
- Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnsin A, Wood B, Selhub J, McTiernan Yasui Y, Oral E, Potter JD and Ulrich CM (2006). Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *J Nutr* 136, 189–94.
- Urrego R, Rodriguez-Osorio N and Niemann H (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 9, 803–15.
- Viana J (2018). 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than *in vivo*-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer News* 36, 1–13.
- Wagner C (2001). Biochemical role of folate in cellular metabolism. *Clin Res Reg Affairs* 18, 161–80.
- Walker BN and Biase FH (2020). The blueprint of RNA storages relative to oocyte developmental competence in cattle (*Bos taurus*). *Biol Reprod* 102, 784–94.
- Weksberg R, Shuman C and Beckwith JB (2010). Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 18, 8–14.
- Yamada K, Strahler JR, Andrews PC and Matthews RG (2005). Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *PNAS* 102, 10454–9.

ANEXO A - Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP/USP).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais

FMRP
65 ANOS 1954-2019

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*ICR1 e ICR2 da massa celular interna e trofotoderma de embriões bovinos provenientes de diferentes técnicas de reprodução assistida*", registrado com o número **004/2019-1**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Ester Silveira Ramos**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de março de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ovários descartados de bovinos abatidos no Frigorífico Barra Mansa, Sertãozinho-SP. Vigência da autorização: 25/03/2019 a 30/11/2021.

We certify that the Protocol n° 004/2019-1, entitled "*ICR1 and ICR2 from inner cell mass and trophectoderm of bovine embryos from different assisted reproductive technologies*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/25/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 cattle ovaries from Barra Mansa Slaughter House, Sertãozinho-SP. This certificate is valid until 11/30/2021.

Ribeirão Preto, 25 de março de 2019

Alceu Afonso Jordão Júnior
Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Decano da CEUA-FMRP - USP

ANEXO B - 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 C - 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 D - 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