



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NÃO INVASIVOS PARA A
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ANA LUIZA SILVA GUIMARÃES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
SETEMBRO DE 2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NÃO INVASIVOS PARA A
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ANA LUIZA SILVA GUIMARÃES

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARGOT ALVES NUNES DODE

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 188D/2017

**BRASÍLIA/DF
SETEMBRO DE 2017**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

GUIMARÃES, A. L. S. **Identificação de marcadores não invasivos para a competência ovocitária em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017,113p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citadas às fontes.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SAN532i Silva Guimarães, Ana Luiza
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NÃO INVASIVOS PARA A
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS / Ana Luiza Silva
Guimarães; orientador Margot Alves Nunes Dode. -- Brasília,
2017.
113 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciência Animal) --
Universidade de Brasília, 2017.

1. Bovinos. 2. Expressão Gênica. 3. Antioxidantes. 4.
Metilação. I. Alves Nunes Dode, Margot, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NÃO INVASIVOS PARA A
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ANA LUIZA SILVA GUIMARÃES

**TESE DE DOUTORADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, DOUTOR, (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA - CENARGEN)
ORIENTADOR**

**IVO PIVATO, DOUTOR, (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB).
EXAMINADOR INTERNO**

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, DOUTOR, (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA - CENARGEN)
EXAMINADOR EXTERNO**

**JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO NETO, DOUTOR,
(UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES)
EXAMINADOR EXTERNO**

BRASÍLIA/DF, 29 de setembro de 2017.

**Com todo meu carinho, à minha família que sempre esteve ao meu lado, sendo
minha fortaleza nos momentos mais difíceis nesta jornada, *dedico...***

“Sonhar o sonho impossível,
Sofrer a angústia implacável,
Pisar onde os bravos não ousam,
Reparar o mal irreparável,
Amar um amor casto à distância,
Enfrentar o inimigo invencível,
Tentar quando as forças se esvaem,
Alcançar a estrela inatingível:
Essa é minha busca. ”

Miguel de Cervantes- Dom Quixote de La Mancha

AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor de infinita bondade, guiando sempre meus caminhos.

Aos meus queridos filhos Ana Sofia, Mateus e Ana Júlia, minha melhor parte, onde eu encontro o mais belo e puro amor. Todo o esforço que fizemos não teria sido possível sem o apoio e o amor incondicional que vivemos. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Ao meu querido esposo, amigo e companheiro de todas as horas, Demis Menezes, pois com seu exemplo de persistência e determinação me faz acreditar que podemos alcançar sonhos que parecem impossíveis. Obrigada por ser essa pessoa de alma tão nobre.

Aos meus pais Leoni e Odília e mãe Francisca (*in memorian*), que em toda minha vida sempre me apoiaram nas minhas escolhas, vibraram comigo nas minhas conquistas, incentivaram para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Sempre com carinho e dedicação. Acredito que apenas palavras não são suficientes para expressar a enorme gratidão por tudo que fizeram por mim! Amo vocês.

Aos manos João Marcelo e Leoni Jr que estiveram torcendo por mim, com palavras de incentivo, nos momentos de descontração. Sempre juntos!

À Dra. Margot Dode, muito obrigada pelos ensinamentos durante todo esse período que estive na Embrapa- Cenargen.

Aos pesquisadores da Embrapa Cenargen- Dr. Maurício Machaim Franco, Dr. Ricardo Alamino, Dr. Eduardo Melo e Dra. Bianca Damiani, pela contribuição de todo ensinamento científico.

Aos Analistas Regivaldo Vieira e Ana Cristina Gomes da Embrapa Cenargen, pela ajuda, paciência e ensinamentos na arte da microscopia.

Aos funcionários do Campus Experimental Sucupira, que sempre foram muito solícitos em ajudar.

À minha querida amiga e confidente, de momentos de alegria e incertezas, Andrielle Mendes, obrigada por todo auxílio no experimento, pelas conversas, ombro amigo, abraço apertado, das risadas no corredor... Lembranças boas ficarão sempre na minha memória!

À querida amiga Ligi Leme, pelo apoio na execução do experimento de expressão gênica. Por todos os bons momentos que compartilhamos durante o doutorado, Agradecida!

À Anelise Mendonça, agradeço pela dedicação e empenho para a execução do experimento de metilação desse projeto.

Ao Amigo Andrei Fidelis, no auxílio com as análises estatísticas.

Aos demais amigos e colegas de laboratório, Felipe, Thi, José Felipe, José Carvalho, Luzia, Venâncio, Sarah, Márcia, Gabi, Naiara, Nay K., Thaís, que direta ou indiretamente me ajudaram na execução do experimento de doutorado; nos momentos de descontração, de estudo, fazendo com que algumas situações pudessem se tornar mais leves.

Ao frigorífico Qualimax- Luziânia (GO), no fornecimento de material biológico para os experimentos realizados.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte estrutural e financeiro para a execução do projeto.

À Universidade de Brasília, pelo suporte acadêmico e curso ofertado.

À CAPES / CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos

Página

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xxi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1 Objetivo Geral	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
1.2 Hipótese	4
1.3 Justificativa	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Maturação e competência ovocitária	6
2.2 Métodos de seleção de ovócitos	10
2.3 Interação ovócito-células do <i>cumulus</i>	12
2.4 Efeitos do cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões	13
2.5 Uso de antioxidantes durante a Produção <i>in vitro</i> de embriões	15
2.6 Estudo do perfil de transcritos de genes candidatos a marcadores moleculares para competência ovocitária	18
2.7 Metilação do DNA e sua importância como um mecanismo epigenético durante o desenvolvimento inicial	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2	
1 RESUMO	35
2 ABSTRACT	37
3 INTRODUÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Delineamento Experimental	41
4.1.1 Efeito do sistema de cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões	41

4.1.2 Efeito da adição de ácido fólico e ITS no cultivo individual de embriões bovinos	42
4.2 Preparo de placas de cultivo individual com CORNING® Cell Tak e microgotas de 20 µL	43
4.3 Recuperação e seleção dos ovócitos	44
4.4 Maturação <i>in vitro</i>	45
4.5 Seleção espermática e fecundação <i>in vitro</i>	45
4.6 Cultivo <i>in vitro</i>	46
4.7 Avaliação da qualidade do embrião: número total de células e fragmentação de DNA pelo teste Transferase desoxinucleotidil Terminal dUTP (TUNEL)	46
4.8 Extração do DNA genômico por lise celular	47
4.9 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio	48
4.10 Amplificação do DNA por PCR	48
4.11 Clonagem dos produtos da PCR, extração do DNA plasmidial, sequenciamento do DNA e análise das sequências	49
4.12 Análise Estatística	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Resultados	51
5.1.1 Experimento 1- Efeito do sistema de cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões	51
5.1.2 Experimento 2 - Efeito de ácido fólico e ITS no cultivo individual de embriões bovinos	55
5.2 Discussão	64
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 3	
1 RESUMO	77
2 ABSTRACT	79
3 INTRODUÇÃO	81
4 MATERIAL E MÉTODOS	83
4.1 Delineamento Experimental	83
4.1.1 Efeito da biópsia nas células do <i>cumulus</i> de CCOs de bovinos submetidos ao cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões	83

4.1.2 Quantificação dos níveis de RNAm de genes candidatos em biópsias de células do <i>cumulus</i> de ovócitos bovinos imaturos e maturados de acordo com a capacidade de desenvolvimento embrionário	84
4.2 Recuperação e Seleção dos ovócitos	85
4.3 Biópsia de células do <i>cumulus</i> antes e após a maturação individual de CCOs	85
4.4 Avaliação do número de células do <i>cumulus</i> de biópsias imaturas e maduras através da citometria de fluxo	86
4.5 Maturação <i>in vitro</i>	87
4.6 Seleção espermática e fecundação <i>in vitro</i>	87
4.7 Cultivo <i>in vitro</i>	88
4.8 Avaliação da qualidade do embrião: número total de células e fragmentação de DNA pelo teste Transferase desoxinucleotidil Terminal dUTP (TUNEL)	88
4.9 Extração do RNA e produção do cDNA e quantificação dos níveis de transcritos de genes candidatos à competência	89
4.10 Análise Estatística	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 Resultados	93
5.1.1 Experimento 1: Efeito da biópsia nas células do <i>cumulus</i> de CCOs de bovinos submetidos ao cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões	93
5.1.2 Experimento 2: Quantificação dos níveis de RNAm de genes candidatos em biópsias de células do <i>cumulus</i> imaturas e maturadas de ovócitos bovinos com capacidade de desenvolvimento embrionário.	97
5.2 Discussão	103
6 CONCLUSÕES	107
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

1. RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NÃO INVASIVOS PARA A COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS

Ana Luiza Silva Guimarães¹, Margot Alves Nunes Dode^{1,2}.

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF.

O presente estudo objetivou determinar o melhor sistema de cultivo individual a ser utilizado e a quantidade relativa de RNAm de genes candidatos à marcadores de competência em biópsias de células do *cumulus* (CC) imaturas e maturadas de ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*. Foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro foram testados o efeito de dois tipos de cultivo individual (microgotas 20 µL e *Cell Tak*) na produção de embriões, o uso de ácido fólico como antioxidante em diferentes concentrações (0, 10, 20, 50 e 500 µM) na produção embrionária e no padrão de metilação de regiões do α - satélite e IGF2 e, o uso de ácido fólico isolado ou conjugado com ITS durante o cultivo em sistema individual na produção e qualidade dos embriões. Já no segundo foi determinada a quantidade relativa de RNAm para os genes GPC4, PTGS2, LUM, ALCAM, FSHR, PGR, GPX3, SERPINE2, HAS2, PRDX3, por PCR em tempo-real (qPCR) em biópsias de CC imaturas e maturadas. As biópsias utilizadas para o qPCR foram agrupadas conforme o resultado da produção de embriões em: CCOs que formaram blastocisto em D7(embrião); CCOs que não clivaram (não clivado) e, CCOs que clivaram, mas que não chegaram a blastocisto (clivado).

No primeiro experimento, foi observado que o grupo *Cell Tak* apresentou menor taxa de clivagem ($P \leq 0,05$) e menor produção de embriões ($P \leq 0,05$) em D7 e D8 em relação ao grupo controle e microgotas de 20 μL . Em relação às diferentes concentrações de ácido fólico, o grupo 500 μM apresentou uma redução nas taxas de clivagem em D6 ($P \leq 0,05$) em relação aos demais. Em D7, não houve diferença entre os grupos quando comparados ao grupo controle. Em relação a metilação da região α - Satélite, os grupos Controle, 20 μM e 500 μM apresentaram padrão semelhantes ($P > 0,05$), que era hipometilado. Já para a região do éxon 10 do gene IGF2, o padrão de metilação foi diferente nos grupos 20 μM e 500 μM em relação ao controle ($P \leq 0,05$). Quanto ao uso de ácido fólico e ITS, isolados ou associados durante o cultivo individual, foi observado que somente no grupo individual na presença de ITS, produção de embriões foi semelhante ao cultivado em grupo ($P > 0,05$). No segundo experimento, dos 10 genes avaliados nas biópsias de CCs imaturas e maturadas, 2 genes apresentaram diferenças no nível de RNAm entre os grupos. O gene LUM mostrou-se mais expresso ($P = 0,02$), enquanto que FSHR mostrou-se menos expresso ($P = 0,09$), ambos em CC maturadas de CCOs que desenvolveram em embrião, comparado as do grupo que não desenvolveu embrião. Conclui-se que o cultivo em gotas na presença de ITS proporcionou as melhores taxas de embriões e, que apesar do ácido fólico não afetar a produção altera o padrão de metilação do DNA. A expressão dos genes LUM e FSHR, em CCs maturadas está associada a capacidade do ovócito de formar embrião, podendo ser utilizados como marcadores não invasivos da competência ovocitária.

Palavras-Chaves: antioxidantes, biópsia, competência ovocitária, cultivo individual, metilação de DNA, RNAm

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF NON-INVASIVE MARKERS FOR BOVINE OOCYTE COMPETENCE

Ana Luiza Silva Guimarães¹, Margot Alves Nunes Dode^{1,2}.

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, DF.

The present study aimed to determine the best individual culture system to be used *in vitro* embryo production and to determine the quantity of genes transcripts in immature and matures *cumulus* (CC) cells biopsies obtained from *cumulus*-oocytes-complexes (COCs) with high and low capacity to produce embryos. Two experiments were carried out, in the first one the effect of two types of individual culture (microdroplets 20 μ L and *Cell Tak*) on embryo production, the use of folic acid at different concentrations (0, 10, 20, 50 and 500 μ M) on embryo production and methylation pattern, and the use of folic acid alone or in combination with ITS during individual culture on embryo production and quality were evaluated. In the second experiment, the relative amount of mRNA for GPC4, PTGS2, LUM, ALCAM, FSHR, PGR, GPX3, SERPINE2, HAS2 and PRDX3 genes was determined by real-time PCR (qPCR) in immature and mature CC biopsies. The biopsies were pooled according to the embryo production results as CCOs that formed blastocyst in D7 (embryo); CCOs that did not cleave (not cleaved) and CCOs that cleaved but did not reach the blastocyst (cleaved). On the first experiment, it was observed that the *Cell Tak* group presented lower cleavage at D2 and

blastocyst rates at D7 and D8 compared to the control and the 20 μ L microdroplets groups. Regarding the different concentrations of folic acid, the 500 μ M group showed lower rates of cleavage and blastocyst at D6 ($P \leq 0.05$), compared to the others groups. On D7, no differences were observed between the groups and the control. As for methylation, α -Satellite region, all treatments were similar, ($P > 0.05$) and presented a hypomethylated pattern. For the exon 10 region of the IGF2 gene, it observed that, the groups exposed to acid folic, either 20 μ M or 500 μ M, had a difference methylation pattern compared to the control group ($P \leq 0.05$). The results for the use of folic acid and ITS isolated or in combination during individual culture, showed that only the individual group exposed to ITS had similar embryo production to the control group ($P > 0.05$). In the second experiment, from 10 genes evaluated in CCs biopsies, two genes had differences in mRNA levels. The LUM gene was more expressed ($P = 0.02$), whereas FSHR was less expressed ($P = 0.09$) in maturated CC obtained from CCOs that developed into embryo, compared to the ones that did not. It can be concluded that individual culture in microdrops in the presence of ITS gave the highest embryo production and that although folic acid does not increase embryo development it changes their methylation pattern. In addition, the expression of the LUM and FSHR genes in CC is associated with the ability of the oocyte to form an embryo and can used as noninvasive markers of oocyte competence.

Keywords: antioxidants, biopses, oocyte competence, individual culture, gene expression, DNA methylation, RNAm.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Capítulo 2		
Figura 2.1.	Preparo de placas com o adesivo celular CORNING® Cell Tak e cultivo individual em microgotas de 20 µL. A: aplicação do produto na placa. B: Lavagem de fundo da placa com água ultrapura para posterior uso na PIVE. C: CCOs imaturos fixados ao fundo da placa. D: Placa de Petri devidamente preparada com microgotas para MIV, FIV e CIV de CCOs e embriões, totalmente individual.	44
Figura 2.2.	Embriões bovinos em D7 de desenvolvimento, submetidos à coloração para avaliação do número total de células, (A) com núcleo de células coradas em azul pelo corante fluorescente Hoeschst 33342; (B) células com fragmentação do DNA coradas em verde pelo método do TUNEL.	47
Figura 2.3	Exemplos de alinhamentos realizados no programa BiQ Analyzer entre as sequências depositadas no <i>GenBank</i> (linha superior) e os produtos de sequenciamento (linha inferior) para as regiões (A) α -Satélite e (B) éxon 10 de IGF2. Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas. O retângulo preto marcado na imagem B identifica o 10º sítio CG, o qual no exemplo acima encontra-se desmetilado.	58
Figura 2.4	Padrão de metilação da região α -Satélite em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> utilizando suplementação com diferentes doses de ácido fólico no cultivo. Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da citosina. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que repetiram o padrão de metilação estão representadas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetir. (A) Embriões do grupo Controle, sem suplementação de ácido fólico durante o cultivo embrionário; (B) Embriões produzidos com suplementação de 20 µM de ácido fólico durante o cultivo embrionário e (C) Embriões produzidos com suplementação de 500 µM de ácido fólico durante o cultivo embrionário. As taxas de metilação estão apresentadas no gráfico (D) como média \pm DP.	59

Figura 2.5. Padrão de metilação do éxon 10 de IGF2 em embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando suplementação com diferentes doses de ácido fólico no cultivo. Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da citosina. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que repetiram o padrão de metilação estão representadas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetir. (A) Embriões do grupo controle, sem suplementação com ácido fólico durante o cultivo embrionário; (B) Embriões produzidos com suplementação de 20 μM de ácido fólico durante o cultivo embrionário e (C) Embriões produzidos com suplementação de 500 μM de ácido fólico durante o cultivo embrionário. As taxas de metilação estão apresentadas no gráfico (D) como média \pm DP. 60

Capítulo 3

Figura 3.1 A- Disposição de gotas de líquido folicular para realização de biópsia. B- Momento da realização de biópsia em CCO imaturo. C- Biópsia de CCO imaturo. D- Após maturação, CCOs foram submetidos novamente à biópsia. E- Momento da realização da biópsia em CCO maturado. F- Biópsia de CCO maturado. 86

Figura 3.2 Contagem de células do *cumulus* das biópsias obtidas antes e/ou após a maturação, por citometria de fluxo. Gráfico mostra a obtenção da concentração de células por mililitros (mL) nos grupos Biópsia antes da maturação (preto); Biópsia após a maturação (Branco) e no grupo onde o mesmo CCO foi submetido à Biópsia antes e após a MIV - Imaturo e Maturado (Cinza). a,b letras diferentes nas barras, significam diferenças estatísticas ($P < 0,05$). Avaliado por Kruskal-Wallis. 94

Figura 3.3 Nível de transcritos dos genes LUM e FSHR analisados por qRT-PCR de biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (imaturas) e após a MIV (maturadas) de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 14 amostras e avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média \pm EP. 100

Figura 3.4. Nível de transcritos dos genes ALCAM, SERPINE 2, HAS2, PTGS2, PGR, E PRDX3, analisados por qRT-PCR de biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (imaturas) e após a MIV (maturadas) de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 14 amostras e avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média±EP 101

Figura 3.5. Nível de transcritos dos genes GPC4 e GPX3, analisados por qRT-PCR em biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (Imaturo) e após (Maturado) a MIV, provenientes de e 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (EMBRIÃO), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (CLIVADO) e CCOs que não clivaram (NÃO CLIVADO). Cada grupo possuía 14 amostras e foram avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média±EP. 102

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
 Capítulo 2	
Tabela 2.1.	Identificação dos <i>loci</i> utilizados nas avaliações de metilação de DNA, sequências dos iniciadores, acesso ao <i>GenBank</i> e tamanho dos fragmentos amplificados. 48
Tabela 2.2.	Condições de amplificação dos <i>locus</i> α -Satélite e IGF2 por PCR utilizando DNA tratado com bissulfito de sódio. 49
Tabela 2.3.	Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , expresso em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D7 e D8 de cultivo, comparando o grupo controle (cultivo em grupo), com o cultivo individual (individual em microgotas de 20 μ L e Cell Tak) 54
Tabela 2.4.	Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D6 e D7 de cultivo, expostos à diferentes doses (0, 10, 20, 50 e 500 μ M) de ácido fólico durante o cultivo <i>in vitro</i> 56
Tabela 2.5.	Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , expresso em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D6 e D7 de cultivo, comparando o grupo controle (cultivo em grupo), e o cultivo individual em microgotas de 20 μ L, suplementado com ácido fólico 20 (μ M), 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio (ITS) ou conjugado (ácido fólico+ITS) durante o cultivo <i>in vitro</i> . 62
Tabela 2.6.	Porcentagem, mensuração e número total de células e média de células apoptóticas de embriões D7 submetidos ao cultivo individual, suplementado com 20 μ M de ácido fólico, ou 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio, (ITS) ou conjugados, durante o cultivo <i>in vitro</i> . 63

Capítulo 3

- Tabela 3.1. Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos em pares de base (pb), concentração dos primers em nM e referência de acesso ao *GenBank* para análise do qPCR em tempo real. 91
- Tabela 3.2. Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), de clivagem em D2, taxa de blastocistos em D6 e D7 de cultivo, dos grupos controle (cultivo em grupo), controle individual sem biópsia e grupos cultivados individualmente e submetidos à biópsia antes e/ou após a maturação. 95
- Tabela 3.3. Número total de células e média de células apótóticas de embriões bovino em D7, oriundos de CCOs submetidos à biópsia antes e/ou após a maturação, comparado ao controle grupo e controle individual (CCOs sem biópsia). 96
- Tabela 3.4. Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), da clivagem em D2, taxa de blastocistos em D6 e D7, cultivados individualmente e submetidos à biópsia antes e depois da maturação (BAD), comparados com o grupo controle 98

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

µg- microgramas
µL- microlitro
µM- micro molar
µm- micrômetro
AI- anáfase I
AC- adenilato ciclase
ALCAM-molécula ativadora de leucócito e adesão celular
AMPC- adenosina monofostato cíclica
ANOVA- análise de variância
ATP- adenosina trifosfato
Bi- blastocisto inicial
Bl- blastocisto
BX- blastocisto expandido
Bn- blastocisto em eclosão
Be- blastocisto eclodido
BCB- brilhante cresil azul
BSA- albumina séria bovina
CC- células do *cumulus*
CCO- complexo *cumulus* ovócito
Cdk1- quinase dependente de ciclina 1
CIV- cultivo *in vitro* (CIV).
DP- desvio padrão
DMR- Região diferencialmente metilada
DNA – ácido desoxirribonucleico
EGF- fator de crescimento epidermal
EGFR- receptor de fator de crescimento epidermal
EP- erro padrão
ERK1/2: quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
FGF- fator de crescimento do fibroblasto
FIV- fecundação *in vitro*
FSH – hormônio folículo estimulante
FSHR- receptor de FSH
g- giros
GAPDH- gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase (GAPDH)
GMPc- guanosina monofostato cíclica
GPC4- glicana 4
GPX3- glutathione peroxidase 3
GSH- glutathione na forma reduzida
GVBD- rompimento da vesícula germinativa
HAS2- hialurona sintetase
IGF2- fator de crescimento semelhante à insulina- 2
ITS- insulina, transferrina e selênio
LH – hormônio luteinizante
LRA- laboratórios de reprodução animal (LRA)
LUM- lumican
M- molar
MI- metáfase I

MII- metáfase II
MIV- maturação *in vitro*
mL- mililitro
mm- milímetro
MAPK- proteína quinase ativadora de mitógenos
MPF- fator promotor da meiose
N- número total
NaCl- solução salina
O₂- oxigênio
P₄- progesterona
PGR- receptor de progesterona
PBS – solução salina em tampão fosfato
PDE- fosfodiesterases
PIVE– produção *in vitro* de embriões
PKA- proteína quinase A
PTGS2 - prostaglandina endoperoxidase sintase
PRDX3- peroxiredoxina 3
PVP- polivinilpirrolidona
RNA- ácido ribonucléico
RNA_m- ácidoribonucléico mensageiro
ROS- espécies reativas de oxigênio
SERPINE2- Serpina pertencente à família E, membro 2
SFB – soro fetal bovino
SLC2A1- soluto carreador de glicose, pertencente à família 2, membro 1
SOD- superóxido dismutase
SOFaaci- fluído sintético de oviduto suplementado com aminoácidos
TI- telófase I
TCM – meio de cultivo celular
TRAS- técnicas de reprodução assistida
TUNEL- terminal deoxinucleotidil transferase dUTP nick end labeling
UI- unidade internacional
VG– vesícula germinativa
VGBD– quebra da vesícula germinativa
WOW- well-of-the-well
ZP- zona pelúcida

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de reprodução assistida (TRAs), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) certamente merece destaque pois permite ampliar o número de progênie/ vaca/ ano e é fundamental para o desenvolvimento e uso das demais biotécnicas. Dentre as etapas da PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) é uma das mais importantes, pois a qualidade dos ovócitos é fundamental para o sucesso das demais etapas. Os ovócitos utilizados na PIVE são geralmente obtidos a partir de uma população heterogênea de folículos, conseqüentemente, possuem graus de competência diferente e variam quanto à qualidade (Racedo *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013). A competência de desenvolvimento se refere à capacidade intrínseca do ovócito para retomar a meiose, ser fecundado pelo espermatozoide, clivar e ter o desenvolvimento embrionário adequado (Sirard *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2014). O sucesso da produção de embriões, portanto, está diretamente ligado com a qualidade/competência do ovócito selecionado para a PIVE.

O método mais utilizado para seleção de complexos-*cumulus*-ovócitos (CCOs), baseia-se em parâmetros morfológicos, tais como citoplasma de coloração homogênea e camadas de células do *cumulus* (CC) ao redor do ovócito (Wrenzycki e Stinshoff, 2013). Entretanto, essa avaliação é subjetiva e não permite diferenciar os ovócitos mais competentes dos menos competentes. Por essa razão, torna-se fundamental a busca de outros parâmetros indicativos da qualidade ovocitária, de modo a viabilizar uma seleção mais acurada e, conseqüentemente, um aumento na eficiência das técnicas de reprodução assistida (TRAs) em animais e humanos.

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a qualidade dos ovócitos, mas grande parte dessas técnicas utilizadas são invasivas e impossibilitam o uso posterior dos mesmos. Atualmente os estudos nessa área estão voltados para métodos não invasivos, dentre os quais se destacam a identificação de marcadores nas CC e identificação de metabólitos no meio de maturação e cultivo. Esses métodos não invasivos podem ser utilizados para predizer a competência sem prejudicar o ovócito (Munoz *et al.*, 2014; Wydooghe *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015; Krisher *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016). Entretanto, até o presente não se tem estabelecido quais os parâmetros (metabólitos ou genes diferencialmente expressos) podem ser utilizados como marcadores não invasivos da competência de ovócitos bovinos.

Para esse tipo de estudo é fundamental que os ovócitos sejam cultivados individualmente desde a maturação até o cultivo *in vitro*, de forma que seja possível identificar seu desenvolvimento embrionário. Outros experimentos foram realizados com a finalidade de testar o uso de cultivo individual (Pereira *et al.*, 2005; Matoba *et al.*, 2010; Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016) porém, os resultados apresentaram uma redução nas taxas de blastocistos (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Montag *et al.*, 2013; Bunel *et al.*, 2015; Krisher *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016), sendo necessário aperfeiçoar o cultivo individual antes de realizar a identificação dos possíveis marcadores para competência.

Portanto, é preciso estabelecer um método de cultivo individual, que permita o acompanhamento de CCOs em todo processo de desenvolvimento embrionário. Com esse sistema seria possível validar genes que apresentem expressão diferencial em CCs provenientes de CCOs que comprovadamente dão ou não origem a embriões. A identificação desses marcadores contribuirá para o estabelecimento de um padrão de expressão característico da capacidade de formar embriões, podendo ser utilizado rotineiramente em laboratórios, permitindo uma seleção de ovócitos mais acurada e não invasiva.

1.1. Objetivos

1.1.1 Geral

Validar marcadores para a competência de ovócitos bovinos em biópsias de CCs.

1.1.2 Específicos

- Otimizar um sistema de cultivo individual de ovócito e embriões.
- Avaliar se há o efeito de antioxidantes no cultivo embrionário individual;
- Avaliar o efeito da biópsia nas CC imaturas e maturadas na taxa de blastocisto;
- Quantificar o nível de transcritos de genes possivelmente candidatos marcadores moleculares para a competência ovocitária, em biópsias de células do *cumulus* de CCOs, coletadas antes e após a maturação, que comprovadamente originaram embriões.

1.2. Hipótese

- Cultivo individual e suplementação com antioxidantes do meio não afeta o desenvolvimento embrionário;
- Padrão na expressão de genes específicos nas biópsias de células do *cumulus* imaturas e maturadas de CCOS que desenvolveram em embriões indicam a competência dos ovócitos.

1.3. Justificativa

Devido ao grande interesse em estabelecer critérios mais objetivos e confiáveis para a seleção de ovócitos, muitas pesquisas têm sido realizadas com modelos animais e humanos. Várias tentativas têm sido feitas para identificação da competência do ovócito, tais como o número e compactação das CCs, aspecto morfológicos do citoplasma, tamanho do folículo, momento da clivagem, quantidade e distribuição de organelas citoplasmáticas e avaliação dos níveis de transcritos de genes (Ajduk e Zernicka-Goetz, 2013; Montag *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015).

No entanto, essas abordagens podem ser consideradas insuficientes para prever a competência de desenvolvimento, ou são invasivas e inviabilizam a utilização posterior do ovócito (Dode *et al.*, 2006; Caixeta *et al.*, 2009; Ajduk e Zernicka-Goetz, 2013; Bessa *et al.*, 2013; Montag *et al.*, 2013; Van Hoeck *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015), havendo, a necessidade de identificar outras metodologias para seleção de ovócitos de qualidade (Montag *et al.*, 2013; Bunel *et al.*, 2015).

Na tentativa de melhorar as estratégias de seleção de CCOs, métodos não invasivos como a avaliação de CC vêm sendo desenvolvidos. O uso das CCs é uma alternativa viável para selecionar, os melhores CCOs, sem afetar o ovócito. A comunicação bi-direcional existente entre ovócito e CC permite o trânsito de nutrientes e fatores de sinalização que são importantes para o crescimento, aquisição da competência e maturação dos ovócitos (Gilchrist *et al.*, 2004; Gilchrist e Thompson, 2007). Portanto, o estudo da expressão de genes em células do *cumulus* e ovócitos, pode contribuir para identificar parâmetros que estejam associados com a qualidade do ovócito (Lonergan *et al.*, 2003) e, portanto, para a identificação de potenciais marcadores para a competência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maturação e Competência Ovocitária

O processo de maturação ovocitária inicia-se em resposta ao pico pré-ovulatório de LH e abrange um complexo conjunto de alterações nucleares e citoplasmáticas (Fair *et al.*, 2001; Dieleman *et al.*, 2002). Durante todo o período de desenvolvimento folicular, os ovócitos ficam retidos em estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

Portanto, ovócito de um folículo pré-ovulatório encontra-se nesse estágio e, somente após o pico de LH é estimulado a retomar a meiose e sofrer o processo de maturação, completando a primeira divisão meiótica. Essa ação do LH é mediada por peptídeos específicos secretados pelas células murais da granulosa, que são os Fatores Epidermais semelhantes ao Fator de Crescimento, do inglês, *Epidermal Like Growth Factor*- EGF- Like (principalmente a ampirregulina e epirregulina) (Richani *et al.*, 2014). Esses fatores, por via parácrina, ligam-se a receptores EGF (EGFR) nas células da granulosa e do *cumulus* e induzem a maturação do ovócito (Sugimura *et al.*, 2015).

Os EGF-Like além de estimularem a retomada da meiose, induzem a expansão das CCs através da expressão de genes relacionados à produção de ácido hialurônico, um componente da matriz extracelular (Hemmings *et al.*, 2012). A expansão das CCs é importante para o processo de captação do ovócito pelas células da tuba uterina após a ovulação (Zhang *et al.*, 2009; Richani *et al.*, 2014; Sugimura *et al.*, 2015).

A maturação nuclear se refere à retomada do primeiro bloqueio meiótico e a progressão até metáfase II (MII) (Tripathi *et al.*, 2010). Portanto, envolve a quebra da vesícula germinativa – GVBD (do inglês, *germinal vesicle break down*), condensação dos

cromossomos, marcando o final da prófase I e progressão pelos estágios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica passando rapidamente para metáfase (MII). Ao final da TI, os cromossomos homólogos estarão divididos, sendo que metade do número de cromossomos permanece no ovócito (célula haplóide) e a outra metade é liberada no primeiro corpúsculo polar. Dessa forma, os ovócitos serão mantidos em metáfase II até o momento da fecundação, quando a ativação do estímulo realizado pela penetração do espermatozoide desencadeia o término do ciclo da meiose e inicia o desenvolvimento embrionário (Dode e Adona, 2001; Van Den Hurk e Zhao, 2005).

Estudos para a determinação da cinética de maturação nuclear, mostram que o tempo requerido para maturação nuclear pode variar entre espécies. Em bovinos, a quebra da vesícula germinativa ocorre entre 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e TI de 15-18 horas e MII de 20-24 horas após a retirada do ovócito do ambiente folicular (Dode e Adona, 2001; Wu *et al.*, 2006). Os ovócitos bovinos podem atingir a metáfase II mesmo na ausência de qualquer agente estimulador, como por exemplo, as gonadotrofinas (Dode e Adona, 2001). A taxa de maturação nuclear, em ovócitos bovinos é de cerca de 80% (Dode e Adona, 2001; Adona e Leal, 2004; Guimaraes *et al.*, 2015), quando maturados *in vitro*. Blondin e colaboradores (1997) não observaram diferença quanto à taxa de maturação nuclear entre ovócitos maturados *in vivo* versus *in vitro*.

O principal fator para a manutenção da retenção do ovócito no estágio de VG são os altos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) intraovocitário (Luciano *et al.*, 2011). Sua concentração é regulada por duas enzimas principais: as adenilato ciclases (ACs) e as fosfodiesterases (PDEs), as quais são responsáveis pela síntese e degradação do AMPc, respectivamente. Existem vários tipos de fosfodiesterases, onde a PDE tipo 3, em bovinos, é específica do ovócito, enquanto a PDE tipo 4 está envolvida no metabolismo de AMPc nas células somáticas (Thomas *et al.*, 2004). Além do AMPc, as células da granulosa também produzem outras substâncias regulatórias, como a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), um inibidor das PDEs ovocitárias transportada via junções gap (Sasseville *et al.*, 2009).

Os altos níveis de AMPc no ovócito inibem a atividade do fator promotor da maturação (MPF) através de um mecanismo dependente da proteína quinase A (PKA). O MPF é um heterodímero formado por duas subunidades, uma regulatória, a ciclina B, e uma catalítica, a p34cdc2, que é uma proteína dependente de ciclina (Cdk1). A

desfosforilação que ativa o MPF e induz a retomada da meiose, é desencadeada por uma queda na concentração de AMPc intraocitário (Tripathi *et al.*, 2010; Rose *et al.*, 2013).

Várias enzimas são coordenadas de modo a controlar a maquinaria de envio de sinais extracelulares para o ambiente intracelular, de forma a estimular os efeitos mitogênicos. Um grupo dessas enzimas é proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) (Adona e Leal, 2004). Ela atua na fosforilação de diversos substratos, incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto, responsável pela manutenção do estágio em MII da segunda retenção meiótica (Adona *et al.*, 2006). Pelo fato das MAPKs serem ativadas por sinais extracelulares, as suas principais isoformas são chamadas de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1 e ERK 2). A ativação das MAPKs em ovócitos bovinos ocorre após a ativação do MPF (Dekel, 2005; Zhang *et al.*, 2009), com aumento de atividade após a VGBD e sua atividade máxima em MII, permanecem alta até a formação dos pró- núcleos. Esses relatos sugerem que a MAPK não é requerida no início da meiose, mas é essencial em eventos pós – VGBD (Tripathi *et al.*, 2010).

Na maturação citoplasmática, ocorre a reorganização de organelas, que é mediada pelos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto. As mitocôndrias, que são organelas responsáveis pela produção de ATP, são deslocadas para áreas de maior gasto energético. O padrão de atividade mitocondrial ovocitária varia durante a maturação com o grau de competência meiótica, de acordo com o tamanho do folículo e o grau de atresia folicular (Adona *et al.*, 2006). Os grânulos corticais, produtos do complexo de Golgi, e que se localizavam inicialmente na região central do ovócito, durante o processo de maturação, migram para a periferia do mesmo, ancorando na membrana citoplasmática. Após o estímulo causado pela entrada do espermatozoide na fecundação, os grânulos corticais se fundem com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico, provocando mudanças estruturais na zona pelúcida (ZP) que irão impedir a poliespermia (Adona *et al.*, 2006; Picton *et al.*, 2008).

A maturação molecular é um evento bioquímico que está relacionado ao armazenamento, transcrição e processamento de RNAm, que são expressos pelos cromossomos e traduzidos pelos ribossomos na forma de proteína. A fase de armazenamento dos transcritos é considerada de extrema importância, pois com a retomada da meiose a expressão gênica é comprometida (Guixue *et al.*, 2001). Assim, falhas no armazenamento do RNAm materno irá interferir na competência ovocitária. As proteínas produzidas a partir desse RNAm são muito importantes na maturação do

ovócito, para que o mesmo possa suportar a fecundação e na fase inicial do desenvolvimento embrionário até a transição materno-zigótica (Brown *et al.*, 2017).

A redução na taxa de desenvolvimento embrionário muitas vezes observada nas TRAs se deve à falta de competência do ovócito, seja para suportar a maturação nuclear, citoplasmática, ou a molecular. Isso porque, somente os ovócitos competentes tem condições de maturar e ter desenvolvimento embrionário normal (Dode e Adona, 2001). Competência ovocitária é definida, portanto, como a capacidade do ovócito para maturar, ser fecundado e dar origem a uma prole normal e saudável. (Sirard *et al.*, 2006). A aquisição da competência ovocitária está associada ao crescimento do folículo e se refere à diversas modificações no citoplasma e no núcleo na fase final do crescimento folicular. Essas modificações incluem: síntese de proteínas e armazenamento de RNAm, desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, alterações na atividade do fator de promoção da meiose (MPF) e da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e redistribuição das organelas citoplasmáticas (Blondin *et al.*, 1997; Adona *et al.*, 2006; Morató *et al.*, 2008).

Existe uma correlação evidente entre o tamanho do folículo e a competência do ovócito (Caixeta *et al.*, 2009; Jee *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013). Em bovinos, durante a fase de crescimento do ovócito, o diâmetro dos gametas aumentam de cerca de 22 μm no folículo primordial para mais de 70 μm no folículo terciário (Bessa *et al.*, 2013). *In vitro*, a retomada da meiose ocorre de forma abrupta e espontaneamente, independente da competência adquirida. Dessa forma, alguns ovócitos reassumem a meiose sem ter adquirido plena competência (Adona *et al.*, 2006; Gilchrist *et al.*, 2008) e, portanto, podem apresentar sua capacidade de desenvolvimento embrionário comprometido. Os mecanismos pelo quais ocorre essa aquisição de competência ainda não foram totalmente elucidados. O entendimento dos padrões de expressão gênica do ovócito e como eles mudam em relação ao seu ambiente, podem ajudar a desvendar os processos moleculares e celulares que determinam essa competência. Alguns genes já foram identificados e correlacionados com a competência ovocitária (Dode *et al.*, 2006; Caixeta *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013), sugerindo que as diferenças dos perfis de transcritos e abundância de RNAm, podem ser indicadores de competência e de potencial desenvolvimento embrionário (Sirard *et al.*, 2006; Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

2.2 Métodos de seleção de ovócitos

Um dos critérios de seleção mais utilizados para ovócitos submetidos à MIV é a morfologia dos CCOs (Blondin *et al.*, 1997; Hyttel *et al.*, 2001). As avaliações morfológicas do CCOs são baseadas na quantidade e compactação das células do *cumulus* e homogeneidade de citoplasma (Stojkovic *et al.*, 2001; Lonergan *et al.*, 2003). A classificação de CCOs pode ser descrita em quatro categorias, sendo o grau 1 aqueles CCOs que possuem citoplasma homogêneo com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do *cumulus*, o grau 2, apresenta citoplasma com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e *cumulus* compacto menor do que na categoria 1, mas com pelo menos cinco camadas completas. Já o grau 3, compreende um ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, coberto com pelo menos três camadas de células do *cumulus* e/ou com pequenas áreas desnudas, e o grau 4, ovócito com citoplasma pigmentado e *cumulus* completamente/parcialmente ausente ou expandido (Stojkovic *et al.*, 2001; Caixeta e Dode, 2008).

Outra ferramenta de seleção do ovócito é por meio da detecção da atividade de G6PDH - glicose-6-fosfatodesidrogenase, enzima que é sintetizada durante o crescimento do ovócito e tem sua atividade diminuída em ovócito completamente crescido (Alm *et al.*, 2005). Isso porque a sua atividade pode ser medida pela coloração com Azul Cresil Brilhante, *do inglês, Brilliant Cresyl Blue*- BCB, que indica se a atividade da G6PDH está alta ou baixa, sem causar qualquer dano aos ovócitos. Os resultados obtidos com o emprego desta técnica indicam que o teste BCB é uma forma eficiente para selecionar ovócitos mais competentes para a produção de embriões *in vitro* (Pujol *et al.*, 2004; Salviano *et al.*, 2015). Entretanto, a competência dos ovócitos BCB positivo pode variar de acordo com o diâmetro do ovócito, maturidade sexual e estimulação com gonadotrofinas (Wu *et al.*, 2006). É importante ressaltar que o teste BCB seleciona apenas os ovócitos que atingiram o crescimento total, sendo esta característica somente um dos fatores envolvidos na aquisição da competência ovocitária.

A organização estrutural de organelas, microtúbulos e microfilamentos pode ser avaliada através da coloração com marcadores fluorescentes como o FITC e lecitina de soja para microtúbulos, microfilamentos e grânulos corticais; o Mitotracker, para mitocôndria. Sabe-se que o citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) e a disposição de organelas como grânulos corticais e mitocôndrias estão relacionados à competência dos ovócitos (Hyttel *et al.*, 2001; Lonergan *et al.*, 2003; Adona *et al.*, 2006), sendo todos

necessários para a progressão da maturação e bloqueio da poliespermia (Stojkovic *et al.*, 2001).

Outra ferramenta utilizada para avaliação da qualidade do ovócito é a análise em CCOs da expressão de genes envolvidos com o processo que regula a aquisição da competência ovocitária. Diversos trabalhos mostram padrão diferencial de determinados genes entre ovócitos mais competentes e menos incompetentes (Robert *et al.*, 2000; Donnison e Pfeffer, 2004; Mourot *et al.*, 2006; Racedo *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013). O tamanho do folículo tem sido utilizado como modelo para a obtenção de ovócitos com diferentes graus de competência. Quando esse modelo foi utilizado, alguns autores relatam a maior expressão de genes como Oct4, , SLBP e GDF9 , CDC5L, RGS16, PRDX1, PSMB2, SKIIP, CCNB2, CKS1, PTTG1 DYNLL1, DYNC1I1 e H2A em ovócitos de folículos maiores quando comparados aos menores (Donnison e Pfeffer, 2004; Mourot *et al.*, 2006; Racedo *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2009). Para o gene HDAC2 foi observado uma diminuição do seu nível de transcritos em ovócitos competentes quando comparados com os menos competentes (Bessa *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a avaliação da expressão de genes no próprio ovócito contribui para o conhecimento sobre os eventos e alterações moleculares que na aquisição da competência. Entretanto, essa avaliação utiliza o ovócito, tornando-o inviável para seu uso na PIVE e que, portanto, outras ferramentas para avaliação da competência, que não inviabilizem o ovócito são necessárias.

2.3 Interação ovócito-células do *cumulus*

Em mamíferos, a foliculogênese e a ovogênese requerem uma cuidadosa e orquestrada comunicação entre ovócito e células somáticas foliculares. Isso porque, durante o período de crescimento desse folículo, o ovócito é envolto por uma camada de células da granulosa (CG) que ainda não possuem diferenciação (Gilchrist *et al.*, 2004; Gilchrist e Thompson, 2007). Posteriormente, há a formação da cavidade preenchida de líquido, formando o folículo antral. A partir dessa etapa de desenvolvimento do folículo, as células tornam-se específicas quanto a sua função: as células murais da granulosa, têm um papel importante na esteroidogênese e as células do *cumulus*, que estão intimamente ligadas ao ovócito e são importantes para os processos de maturação (Sirard *et al.*, 2006; Uyar *et al.*, 2013).

Ovócitos de folículos em crescimento necessitam de substratos energéticos para uma maior biossíntese celular, por isso a importância da intercomunicação entre essas células. As CCs comunicam-se entre si e com o ovócito através das junções gap, que permite a troca metabólica e transporte de moléculas sinalizadoras. A unidade fundamental das junções gap são as conexinas (Cx). As Cx 37 e 43 estão relacionadas com a competência para o desenvolvimento (Gilchrist *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2009). Em humanos foi demonstrado que a redução da expressão da Cx 43 em CCOs, ocorreu juntamente com a retomada da meiose e o fechamento das junções gap (Hasegawa *et al.*, 2007). A expansão das CCs é considerada um fator importante para a maturação do ovocitária e a captação desse pelas fímbrias da tuba uterina. Durante esse processo as CC secretam ácido hialurônico que se deposita entre elas formando uma matriz visco elástica e gelatinosa (Gilchrist *et al.*, 2004). *In vivo*, a expansão é induzida pelo pico de LH, que simultaneamente induz a retomada da meiose (Opiela *et al.*, 2014). Nesse processo, a fosfodiesterase 3A (PDE3A) é ativada e passa a agir causando hidrólise e diminui a concentração de AMPc no ovócito. Outros fatores como GDF-9 e BMP-15, quando secretados pelo ovócito, parecem desempenhar um papel fundamental na expansão das CCs (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2008; Paulini e Melo, 2011).

A ligação metabólica entre ovócito e CCs permite um intercâmbio de moléculas que tem como função nutrir e regular o ovócito (Sutton-Mcdowall *et al.*, 2006). Portanto, a comunicação existente entre as células do *cumulus* e o ovócito permite que as mesmas possam ser utilizadas para predizer a qualidade do ovócito sem danificá-lo.

2.4 Efeitos do cultivo individual na produção *in vitro* de embriões

Vários estudos têm sugerido que o sistema de cultivo, envolvendo meio, atmosfera gasosa, temperatura e entre outros fatores, têm um grande impacto sobre a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Stokes *et al.*, 2005; Montag *et al.*, 2013; Wydooghe *et al.*, 2014). Os primeiros meios de cultivo para a produção *in vitro* foram soluções salinas ao qual eram adicionados glucose e fosfato. Subsequentemente, formulações de meios de cultivo mais complexos com a adição de aminoácidos não essenciais, agentes quelantes, vitaminas e antibióticos foram introduzidos (Gardner e Lane, 1996; Lane e Gardner, 1996).

No início do estabelecimento da PIVE, mesmo com meios mais ricos, muitos embriões paravam o desenvolvimento entre duas e 16 células. Para evitar esse bloqueio, os pesquisadores iniciaram o uso de co-cultivo de embriões com outras células somáticas. As células somáticas mais utilizadas foram as células da tuba uterina, células da granulosa, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (Buffalo Rat Liver Cells) entre outras (Montag *et al.*, 2013). Posteriormente, na década de 90, foi desenvolvido um meio de cultivo denominado *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF), baseado no fluido do oviduto de ovelhas, posteriormente modificado, o qual continua sendo amplamente utilizado (Tervit *et al.*, 1972). Dentre as características embrionárias que são afetadas pelos dos meios de cultivo, pode-se destacar o número de células da massa celular interna, a cinética de desenvolvimento e, melhoria no aspecto geral do embrião (Lim e Hansel, 1996). Atualmente com algumas variações em sua composição, o meio SOF proporciona uma produção de embriões que pode variar de 35-50% (Pereira *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2013; Guimaraes *et al.*, 2015).

Outro fator que afeta a produção de embriões *in vitro* é a densidade de embriões na gota. Apesar do sistema de cultivo em grupo ser amplamente utilizado em práticas laboratoriais, o sistema de cultivo individual se tornou importante ferramenta para a pesquisa, pois com esse sistema, é possível acompanhar individualmente o desenvolvimento do ovócito até o estágio de blastocisto (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Montag *et al.*, 2013; Krisher *et al.*, 2015; Krisher *et al.*, 2015a). Alguns estudos relatam que o embrião cultivado em grupo ou em um menor volume, apresenta maior viabilidade do que o cultivado individualmente (Pereira *et al.*, 2005; Wydooghe *et al.*, 2014). Isso

porque, os embriões possuem a capacidade de liberar fatores considerados importantes para estimular seu crescimento e dos demais embriões que estão ao seu redor. Vários trabalhos analisando um sistema ideal para o cultivo individual foram realizados, mas resultados obtidos são divergentes. Alguns pesquisadores relatam taxa de embriões semelhante entre cultivo em grupo e individual (Pereira *et al.*, 2005; Matoba *et al.*, 2010), enquanto outros trabalhos mostram uma redução na taxa de blastocisto (Kussano *et al.*, 2016). Dentre alternativas propostas para realizar o cultivo individual pode-se citar o sistema chamado ‘well of the well’ (WOW), onde pequenos poços cilíndricos em forma de ‘V’ no fundo da placa de cultivo, formando um microambiente e permitem o cultivo de vários embriões sob a mesma gota de meio, mas de forma individualizada (Vajta *et al.*, 2000). Uma vantagem desse sistema é que como os embriões ficam imersos sob a mesma gota, são cultivados individualmente, mas não perdem o benefício do cultivo em grupo.

Pereira e colaboradores (2005) comparando o sistema WOW e o microgotas de 20 μ L mostraram que tanto a taxa de clivagem quanto a de produção de blastocistos foram semelhantes para todos os tratamentos. Entretanto, Vajta *et al.* (2000) observaram que quando o embrião é cultivado tanto em gota individual de 20 μ L como no poço do WOW, coberto com gota de 20 μ L as taxas de embriões são inferiores comparadas com os cultivados em WOW imersos sob a mesma gota de meio de cultivo.

Outro sistema utilizado e previamente testado por diferentes grupos de estudo (Stokes *et al.*, 2005; Gopichandran e Leese, 2006; Matoba *et al.*, 2010), é o *Cell Tak* que utiliza uma proteína derivada de um molusco marinho que forma uma matriz adesiva no fundo da placa de cultivo. Essa matriz faz com que as estruturas fiquem aderidas no fundo da placa, permitindo fazer o cultivo completo dos embriões sob a mesma gota sem que as mesmas se misturem. Além desse, o sistema de cultivo individual em microgotas imersas em óleo (Pereira *et al.*, 2005; Nagao *et al.*, 2008; Goovaerts *et al.*, 2010; Kussano *et al.*, 2016) e entre filamentos de malha de poliéster (Matoba *et al.*, 2010), também têm sido relatados, entretanto os resultados quanto ao desenvolvimento embrionário são divergentes.

Em uma tentativa de melhorar as condições de cultivos de embriões bovinos na ausência de soro, alguns autores têm sugerido a substituição do soro fetal bovino por albumina sérica bovina (BSA) associada à insulina, transferrina e selênio (ITS). O uso dessas duas substâncias aumentaram as taxas de desenvolvimento de blastocisto em cultivo individual de embriões de bovinos (Wydooghe *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015).

Esta combinação de BSA e ITS têm sido descrito como uma alternativa não só para o cultivo de células somáticas, mas também para a produção *in vitro* de embriões bovinos (George *et al.*, 2008; Wydooghe *et al.*, 2014). George e colaboradores (2008) mostraram que o SOF suplementado com BSA e ITS também pode ser utilizado para o cultivo de embriões de bovinos em pequenos grupos de cinco embriões.

2.5. Uso de antioxidantes durante a Produção *in vitro* de embriões

Estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio na quantidade produzida de espécies reativas de oxigênio (ROS), também denominadas de radicais livres (Andrade *et al.*, 2010). *In vivo*, a diminuição da ocorrência do estresse oxidativo nos gametas é influenciada pela presença de antioxidantes nas secreções do trato reprodutivo masculino e feminino. Diversos fatores, como o consumo de oxigênio, a interferência da luz, os próprios espermatozoides e leucócitos, bem como a ativação ovocitária mediada pelo espermatozoide e a ativação do genoma embrionário, podem aumentar a produção de ROS (Wang *et al.*, 2014). Ovócitos e embriões parecem estar protegidos do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes do fluido folicular e da tuba uterina. Porém, quando os ovócitos são retirados de seu ambiente natural, e submetidos à PIVE, eles perdem a sua defesa natural, e, portanto, cuidados especiais, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo, devem ser tomados para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da produção *in vitro* de embriões (Wang *et al.*, 2014).

Antioxidante pode ser definido como substâncias capazes de inibir a ação de radicais livres que são gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, dificultando a sua ação sobre lipídeos, aminoácidos, ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e bases do DNA. Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais, pois eles neutralizam as ROS excessivas e previnem danos da estrutura celular. Dentre os antioxidantes enzimáticos podemos citar: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx) (Ebisch *et al.*, 2007).

Antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de

compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, insulina, transferrina, folato, ácido úrico, ácido α -lipóico (Kim *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2010; Wydooghe *et al.*, 2014). Esses antioxidantes podem atuar de duas maneiras: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular. Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque o ácido fólico e o composto antioxidante formado pela insulina, transferrina e selênio.

O folato, encontrado em sua forma natural em vegetais faz parte do complexo de vitamina B, e é um substrato importante na síntese de pirimidinas e purinas. Além disso, é um importante fornecedor de grupamento metil para remetilação da homocisteína em metionina (Ikeda *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2012). O derivado da metionina, S-adenosilmetionina (SAM) é o doador de metil mais importante no organismo para a metilação de lípidos, proteínas e DNA. O metabolismo do folato é a principal fonte de grupamento metil para várias reações celulares, incluindo modificações epigenéticas como metilação do DNA e de histonas (Anckaert *et al.*, 2010). Esta afirmação é apoiada por estudos de biologia molecular, que indicam que tanto a privação de ácido fólico, forma sintética da vitamina B e de folato, pode afetar os padrões de metilação (Ikeda *et al.*, 2010).

Para humanos, a suplementação de ácido fólico já é bem estabelecida (Kwong *et al.*, 2010). Durante o período pré-concepção, a exigência de folato é maior. Isso porque, após a fecundação o embrião sofre um amplo processo do padrão de reprogramação de metilação do genoma (Ikeda *et al.*, 2010). A suplementação alimentar de ácido fólico afeta a concentração de folato e homocisteína total no fluido folicular (Kim *et al.*, 2009). Esse fato foi previamente demonstrado em estudos anteriores que, fornecendo ácido fólico na dieta alimentar de pacientes submetidas à estimulação hormonal, mostraram um aumento de folato e diminuição da homocisteína total (HcyT) no fluido folicular, tendo uma influência no ambiente folicular e melhoria na maturação dos ovócitos. (Boxmeer *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2010).

A insulina é um hormônio polipeptídico que tem uma importante atividade mitogênica (Acevedo *et al.*, 2007). Os embriões internalizam insulina materna através de endocitoses mediadas por receptores, e esta insulina proporciona uma estimulação da síntese de DNA e RNA, proteínas e lipídeos, regulando assim as funções celulares (Lee *et al.*, 2005). Estudos na espécie suína evidenciaram que a adição de insulina durante a

MIV e CIV, aumentou o potencial de maturação ovocitária e de desenvolvimento embrionário, além de incrementar as concentrações de GSH e de tirosina-quinase (Lee *et al.*, 2005). A transferrina, além de participar como transportadora de ferro intracelular, também atua como uma molécula desintoxicante removendo metais tóxicos presentes no meio de cultivo celular. Além disso, tem ação como estimulante da proliferação celular. O selênio é um importante elemento que atua em vários processos fisiológicos (Zhang *et al.*, 2015).

Em cultivos celulares, onde há uma alta proporção de oxigênio atmosférico e consequentemente uma grande produção de radicais livres, o selênio previne o dano oxidativo, reduzindo principalmente a quantidade de radicais livres e diminuindo a peroxidação de lipídeos (Paczkowski *et al.*, 2014). Além disso, o selênio é um constituinte do sítio ativo da enzima glutathione peroxidase, regulando desta forma sua atividade biológica e indiretamente prevenindo o dano oxidativo nos cultivos celulares (Bu *et al.*, 2004). Em estudos utilizando a combinação das três substâncias, insulina-transferrina-selênio (ITS) como antioxidante em meios de cultivo celular, foi observado uma redução na produção de radicais livres e peroxidação de lipídios (Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005).

A adição de 10 mg/L de insulina, 5 mg/L de transferrina e 5,5 ng/L de selênio no meio de MIV juntamente com ácido polivinílico (PVA) ou líquido folicular de suíno melhorou a concentração de glutathione, a habilidade dos ovócitos de formarem pró-núcleos masculinos e feminino, bem como o desenvolvimento adequado de embriões clone e PIVE (Kim *et al.*, 2005). Os dados encontrados sugerem que a adição de ITS no meio de cultivo *in vitro* exerceu um efeito benéfico, pois melhorou o desenvolvimento *in vitro*, aumentou a capacidade de expansão e de eclosão de blastocistos, e o número total de células por blastocisto.

Hammami e colaboradores (2012) testaram o efeito conjunto da suplementação do meio com ITS e ácido ascórbico (AA) e vários níveis hormonais durante diferentes períodos da MIV de ovócitos de cabras pré-púberes sobre a produção e qualidade de blastocistos. A adição de AA, ITS e um baixo nível de hormônios durante as primeiras 12 horas de MIV nos ovócitos de animais pré-púberes mantiveram a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*, aumentando assim a sua sobrevivência durante o processo de criopreservação, porém não houve acréscimo na quantidade de blastocistos produzidos.

2.6 Estudo do perfil de transcritos de genes candidatos a marcadores moleculares para competência ovocitária

A inexistência de uma estratégia de avaliação em prever a competência do ovócito de forma objetiva, precisa e não invasiva, é um dos principais desafios encontrados nas TRAs. Nesse contexto, as células do *cumulus* refletem características do ovócito, fornecendo informações de maneira não invasiva para avaliá-lo quanto à sua qualidade. Especificamente, o perfil transcriptômico das CCs pode ajudar a identificar marcadores de competência de ovócitos com potencial para desenvolvimento embrionário (Uyar *et al.*, 2013; Kussano *et al.*, 2016). Vários genes já foram identificados, sendo relacionados com a competência ovocitária e/ou potencial de desenvolvimento embrionário (Caixeta *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013; Kussano *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017).

O gene GPC4 pertence à família das glicanas, e está associado a eventos de sinalização celular, modulando a sinalização mediada por moléculas extracelulares como, por exemplo, proteínas morfogenéticas de osso (BMPs) e os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) (Melo *et al.*, 2017). Estudos anteriores relataram o aumento no nível de transcritos de GPC4 em biópsias de CCs imaturas bovinas provenientes de CCOs que desenvolveram em embrião (Kussano *et al.*, 2016). Além disso, esse gene também apresentou expressão diferencial em CC oriundas de CCOs obtidos de folículos de diferentes tamanhos, sugerindo ser esse gene um provável marcador para competência dos ovócitos (Melo *et al.*, 2017).

A prostaglandina sintase 2 (PTGS2), também conhecido como cicloxigenase 2 (COX-2) catalisa a reação que transforma o ácido aracônico em prostaglandina (Marei *et al.*, 2014). Estudos mostraram que a PTGS2 desempenha um papel crítico na expansão das CC e na maturação de ovócitos, podendo ser considerado como um marcador de competência ovocitária em bovinos (Assidi *et al.*, 2010) e em humanos (Gebhardt *et al.*, 2011).

A molécula de adesão celular leucocitária ativada (ALCAM) faz a mediação de interações célula a célula, é expressa em CC de CCOs maturados e também está envolvido na expansão das CC e no processo inicial da implantação do embrião humano (Feuerstein *et al.*, 2007; Ekart *et al.*, 2013). A diminuição nos níveis de expressão de ALCAM em CCs humanas depois de maturadas pode ser um indicativo de diminuição da competência

ovocitária (Adriaenssens *et al.*, 2011). O ALCAM promove a adesão celular e está distribuída na superfície de células da granulosa, células do *cumulus*, epitélio do endométrio e blastocistos.

Em um estudo anterior, Ekart e colaboradores (2013), observaram os níveis de expressão gênica em CCs humanas para a seleção de ovócitos com capacidade de desenvolvimento embrionário. Os níveis médios de RNAm foram significativamente maiores para HAS2 e PR em CCs associadas a ovócitos que desenvolveram à blastocisto de boa qualidade em comparação com o CCs associado com ovócitos que não atingiram um estágio viável de blastocisto. No entanto, os níveis médios de FSHR, ALCAM e NRP1 não diferiram em CCs de ovócitos que formaram blastocistos de boa qualidade morfológica ou não conseguiram alcançar esse estágio.

Serpina inibidor da protease pertencente à família E, membro 2 (SERPINE2) desempenha um papel importante na proteólise, e é essencial para o processo de diferenciação e funções do ovário durante a foliculogênese (Devjak *et al.*, 2012). Esse gene também está envolvido com o processo de formação da matriz extracelular (Li *et al.*, 2015). Estudos mostraram que a quantidade de RNAm de SERPINE2 pode ser influenciado pelo estágio de maturação dos ovócitos, sendo aumentado pela ação de FSH (Kao *et al.*, 2006) e diminuído após o pico de LH em células da granulosa em bovinos. Esses resultados corroboram com o estudo de Devjak et al (2012), onde CC de ovócitos MII mostraram os níveis de RNAm de SERPINE2 menores do que em CC de ovócitos MI.

O Lumican (LUM) é uma proteoglicana, expressa em diferentes tecidos (Malinowski *et al.*, 2012). Desempenha um papel importante na regulação da matriz extracelular, no processo de expansão das células do *cumulus* e maturação do ovócito e também pode estar envolvido no processo de proliferação celular, migração, apoptose e angiogênese (Kao *et al.*, 2006). Mamo e colaboradores (2011), observaram em ovócitos bovinos maturados *in vivo* e *in vitro*, um aumento progressivo do nível de transcritos do gene LUM após a retomada da meiose, alcançando seu maior nível após a maturação. Bunel et al., (2015) mostraram que os níveis de transcritos para o gene LUM estavam reduzidos em biópsias de CC imaturas, e essa redução foi associada a capacidade do CCO de alcançar o estágio de blastocisto.

O FSH é considerado um hormônio central na reprodução de mamíferos. O FSHR é altamente expresso em CC imaturas (Kawashima *et al.*, 2008) e seu nível de expressão diminui junto com a progressão da meiose de ovócitos bovinos *in vitro* e *in*

vivo (Salhab *et al.*, 2011). Entretanto, estudos em humanos avaliando o nível de expressão de FSHR nas CC e associação com a formação embrionária inicial (Dia 3 de desenvolvimento), mostraram resultados inconsistentes, não podendo confirmar esse gene como marcador de qualidade do CCO (Feuerstein *et al.*, 2007; Ekart *et al.*, 2013). Melo *et al.* 2017, encontram menor expressão de FSHR em CCs de ovócitos oriundos de folículos de 1 a 3 mm, comparado com os folículos maiores. Em contraste, Calder *et al.*, (2003) observaram maior expressão de FSHR em CCOs de melhor qualidade, confirmando a inconcistência nos resultados.

Os níveis de PRDX3 foram estudados em relação à competência de desenvolvimento de ovócitos humanos, onde foi sugerido que seu aumento no nível de transcritos nas CC estava associado com menor qualidade embrionária, reforçando a função do gene, que é ativo em resposta ao estresse oxidativo, produção de ROS no CCO.

2.7 Metilação do DNA e sua importância como um mecanismo epigenético durante o desenvolvimento inicial

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, as células passam a se diferenciar e especificar-se de maneira coordenada. Essas modificações pelas quais passam são determinadas por mecanismos epigenéticos que regulam e estabelecem o padrão célula-específico da cromatina e da expressão gênica, como nas células germinativas (Monk, 2015). Essas modificações epigenéticas garantem a especificidade celular, são estáveis e herdáveis e passíveis de serem alteradas por influência do ambiente, diferentemente da informação contida no DNA (Ferreira e Franco, 2012).

Dentre os fatores epigenéticos, a metilação do DNA é um dos mais estudados, e envolve a adição de um grupamento metil no carbono 5 do anel da citosina de um dinucleotídeo CpG, formando uma base 5 metilcitosina – 5 mC (Mendonça *et al.*, 2015). A metilação do DNA é um dos processos que garantem mais estabilidade ao DNA, e regula mecanismos essenciais como o *imprinting* genômico, a repressão de retrotransposons, e a inativação do cromossomo X (compensação de dose) (Monk, 2015), dentre outros.

A família de enzimas responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos padrões de metilação são as DNA metiltransferases (DNMTs), bem caracterizadas em camundongos e humanos (Ooi *et al.*, 2009). Consistem em cinco membros e são: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT1 é considerada a

enzima responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA devido à sua maior afinidade pelo substrato de DNA hemimetilado sobre o DNA não metilado, sendo que as DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação *de novo* após a fecundação (O'Dorotheey *et al.*, 2011).

Uma correta reprogramação do padrão de metilação do DNA e manutenção das marcas epigenéticas durante a gametogênese são essenciais para o desenvolvimento embrionário pré-implantação normal (Newell-Price *et al.*, 2000) e a manutenção da gestação (Lucifero *et al.*, 2004).

A gametogênese, compreendendo desde a formação e o desenvolvimento das células germinativas, e o início da embriogênese são períodos cruciais na determinação, aquisição e manutenção do padrão de *imprinting* genômico, sendo a regulação dos genes *imprinted* essencial para o crescimento fetal e a função placentária (Diederich *et al.*, 2012). O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético que restringe a expressão de um determinado gene para um dos dois cromossomos parentais (Barlow e Bartolomei, 2014). Portanto, a metilação do DNA é vital para a regulação da expressão monoalélica de genes *imprinted*. Durante a desmetilação global que ocorre no genoma logo após a fecundação, os genes *imprinted* ficam protegidos desse evento e não sofrem desmetilação. Se o alelo de um determinado gene se encontra metilado no espermatozoide, necessariamente estará desmetilado no genoma do ovócito (Reik e Walter, 2001).

O melhor entendimento do processo de reprogramação da metilação do DNA que ocorre durante a gametogênese pode contribuir para aumentar a eficiência das tecnologias de reprodução assistida (TRAs), especialmente porque eventos epigenéticos podem ser suscetíveis a efeitos ambientais (Xu e Sinclair, 2015).

Dentre os genes *imprinted* que têm participação no processo de desenvolvimento embrionário e fetal, destaca-se a importância do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF2). O gene IGF2 foi o primeiro gene *imprinted* a ser identificado em mamíferos, sendo considerado um fator de crescimento e diferenciação fetal (Huang *et al.*, 2014). O gene IGF2 bovino está localizado no cromossomo 29, que abrange um locus de característica quantitativa (QTL) para carne e leite (Huang *et al.*, 2014). Em estudos na espécie bovina, foi possível observar que o gene IGF2 possui 10 éxons (Gebert *et al.*, 2006). Na maioria dos tecidos fetais bovinos, apenas o alelo paterno desse gene é expresso, enquanto o alelo materno é transcricionalmente silenciado (Dindot *et al.*, 2004).

Os mecanismos que determinam o *imprinting* e a expressão monoalélica do gene IGF2 é um dos mais estudados e revelam o envolvimento de uma região diferencialmente

metilada (DMR) que se encontra não metilada no alelo materno e metilada no alelo paterno (Ooi *et al.*, 2009). Além disso, estudos em bovinos observaram a presença de uma DMR intragênica, que se apresenta altamente metilada em espermatozoides (Carvalho *et al.*, 2012; Gebert *et al.*, 2006) e hipometilada em ovócitos (Gebert *et al.*, 2006; Fagundes *et al.*, 2011; Mendonça *et al.*, 2015). Esta DMR metilada está envolvida na ativação transcricional do IGF2 (Zhang *et al.*, 2015). Experimentos evidenciaram que a metilação anormal é um fator importante para a repressão da transcrição de genes em embriões clones (Huang *et al.*, 2014; Kaneda *et al.*, 2017).

A sequência de DNA repetitivo alfa satélite (α -satélite) caracteriza-se por estar presente em milhares de cópias repetidas ao longo do genoma, sendo altamente conservada em mamíferos (Enukashvily e Ponomartsev, 2013). Essas sequências estão localizadas na cromatina pericentromérica, podendo representar uma fonte significativa de informação sobre funções genômicas, incluindo organização e segregação cromossômica (Urrego *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

A desmetilação de elementos repetitivos como α -satélite é associada à reativação de retrotransposons presentes ao longo do genoma e promove eventos de inserção destes no genoma (Zhang *et al.*, 2017). Portanto, é possível que as sequências α -satélite e outras sequências repetitivas sejam mais resistentes a mudanças no padrão metilação do DNA e podendo ter seus próprios mecanismos de regulação (Diederich *et al.*, 2012). Além disso, suas taxas de transcrição têm papéis funcionais na formação e manutenção da estrutura de heterocromatina e foram relacionados ao estresse, embriogênese, mitose e carcinogênese (Enukashvily e Ponomartsev, 2013).

As sequências α -satélite foram analisadas em embriões sendo observadas modificações em seus padrões de metilação. Em bovinos, foi observado um padrão hipermetilado na sequência α -satélite em embriões clones, comparados com embriões produzidos *in vivo*, onde esse resultado sugeriu uma perturbação durante a reprogramação epigenética (Urrego *et al.*, 2017).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N.; DING, J.; SMITH, G. D. Insulin signaling in mouse oocytes. **Biol Reprod**, v. 77, n. 5, p. 872-9, 2007.

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, n. 3, p. 197-204, 2004.

ADONA, P. R. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1, p. 49-65, 2006.

ADRIAENSSENS, T. et al. The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 1, p. 31-40, 2011.

AJDUK, A.; ZERNICKA-GOETZ, M. Quality control of embryo development. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 5, p. 903-18, 2013.

ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, 2005.

ANCKAERT, E. et al. Effects of Low Methyl Donor Levels in Culture Medium During Mouse Follicle Culture on Oocyte Imprinting Establishment. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 377-386, 2010.

ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ASSIDI, M. et al. Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured with Follicle-Stimulating Hormone and/or Phorbol Myristate Acetate In Vitro. **Biology of reproduction** v. 79, p. 209–222, 2008.

BARLOW, D.P.; BARTOLOMEI, M.P. Genomic Imprinting in Mammals. **Perspect Biol.**, v.6, a018382, 2014.

BESSA, I. R. et al. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 5, p. 781-9, 2013.

BLONDIN, P.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 803-813, 1997.

BOXMEER, J. C. et al. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. **Fertil Steril**, v. 89, n. 6, p. 1766-70, 2008.

BU, S. et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol**, v. 223, n. 1-2, p. 85-93, 2004.

BUNEL, A. et al. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 228-37, 2015.

BROWN, H. et al. Failure to launch: aberrant cumulus gene expression during oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction**, v.153, p. 109-120, 2017.

CAIXETA, E. S.; DODE, M. A. N. Dissecção Folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Séries Documentos 260**, p. 21, 2008.

CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CALDER, M.D. et al. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reprod. Biol. and Endocrinol.**, v.1, n. 14, p. 1-14, 2003.

CARVALHO, J.O. et al. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Mol. Reprod. Dev**, v. 79, p.77-84, 2012.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molec. and Cellular Endoc.**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DEVJAK, R. et al. Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47106, 2012.

DIAS, F. C. et al. Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 149, n. 1-2, p. 80-9, 2014.

DIEDERICH, M. et al. DNA methylation and mRNA expression profiles in bovine oocytes derived from prepubertal and adult donors. **Reproduction**, v. 144 p. 319-330, 2012.

DIELEMAN, S. J. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 2002.

DINDOT, S. V. et al. Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, n. 12, p. 966-974, 2004.

DODE, M. A. et al. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 3, p. 288-97, 2006.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3, p. 171-180, 2001.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of Genes Associated with Developmentally Competent Bovine Oocytes and Quantitation of Their Levels During Development. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813-1821, 2004.

EBISCH, I. M. et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 2, p. 163-74, 2007.

EKART, J. et al. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 2930-42, 2013.

ENUKASHVILY, N.I.; PONOMARTSEV, N.V. Mammalian satellite DNA: A speaking Dumb. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, Burlington: Academic Press, v. 90, cap. 2, p. 31-65, 2013.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 122-131 2001.

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. **Mol Hum Reprod**, v. 17, n. 2, p. 85-91, 2011.

FAIR, T. et al. Immunolocalization of Nucleolar Proteins During Bovine Oocyte Growth, Meiotic Maturation, and Fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1516-1525, 2001.

FERREIRA, A.R.; FRANCO, M.M. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.1, p.3-9, 2012.

FEUERSTEIN, P. et al. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3069-77, 2007

GARDNER, D. K.; LANE, M. Fertilization and early embryology: Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. **Human Reproduction**, v. 11, n. 12, p. 2703-2712,, 1996.

GEBERT, C. et al. The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. **Genomics**, v. 88, n. 2, p. 222-9, 2006.

GEBHARDT, K.M. et al. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 47-52, 2011.

GEORGE, F. et al. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 612-23, 2008.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, 2004.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, 2007.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 2, p. 159-77, 2008.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1509-1520, 2010.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H. J. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 269-77, 2006.

GUIMARAES, A. L. et al. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52-7, 2015.

GUIXUE, Z. et al. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-43, 2001.

HASEGAWA, J. et al. Reduction of connexin 43 in human cumulus cells yields good embryo competence during ICSI. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 10, p. 463-6, 2007.

HEMMINGS, K. E.; LEESE, H. J.; PICTON, H. M. Amino acid turnover by bovine oocytes provides an index of oocyte developmental competence in vitro. **Biol Reprod**, v. 86, n. 5, p. 165, 1-12, 2012.

HUANG, Y. Z. et al. Intragenic DNA methylation status down-regulates bovine IGF2 gene expression in different developmental stages. **Gene**, v. 534, n. 2, p. 356-61, 2014.

HYTTEL, P. et al. Nucleolar Protein Allocation and Ultrastructure in Bovine Embryos Produced by Nuclear Transfer from Embryonic Cells. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 69-82, 2001.

- IKEDA, S. et al. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 313, n. 3, p. 129-36, 2010.
- JEE, B. C.; CHEN, H. Y.; CHIAN, R. C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertil Steril**, v. 91, n. 5 Suppl, p. 2037-42, 2009.
- KAO, W. W. et al. Focus on molecules: lumican. **Experimental eye research**, v. 82, n. 1, p. 3-4, 2006.
- KANEDA, M. et al. Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 365-375, 2017
- KATZ-JAFFE, M. G. et al. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 5, p. 271-7, 2009.
- KAWASHIMA, I. et al. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. **Reproduction**, v. 136, n. 1, p. 9-21, 2008.
- KIM, E. S. et al. The effect of folic acid on in vitro maturation and subsequent embryonic development of porcine immature oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 2, p. 120-1, 2009.
- KIM, S. et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 72, n. 1, p. 88-97, 2005.
- KOYAMA, H. et al. Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. **Reprod Domest Anim**, v. 47, n. 6, p. 921-7, 2012.
- KRISHER, R. L. et al. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. **Reprod Fertil Dev**, 2015.
- KRISHER, R. L.; SCHOOLCRAFT, W. B.; KATZ-JAFFE, M. G. Omics as a window to view embryo viability. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 333-41, 2015a.
- KUSSANO, N. R. et al. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167-76, 2016.
- KWONG, W. Y. et al. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 705-15, 2010.
- LANE, M.; GARDNER, D. K. Fertilization and early embryology: Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. **Human Reproduction**, v. 11, n. 9, p. 1975-1978, 1996.

- LEE, M. S. et al. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biol Reprod**, v. 73, n. 6, p. 1264-8, 2005.
- LI, S. H. et al. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 93, 2015.
- LIM, J.; HANSEL, W. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 8, p. 1199-1205, 1996.
- LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n. 3, p. 369-78, 2003
- LUCIANO, A. M. et al. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-1259, 2011
- LUCIFERO, D. et al. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Hum Mol Genet.**, v. 15; n. 8, p. 839-49, 2004.
- MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, 2009.
- MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v.12, p.151-165, 2011.
- MALINOWSKI, M. et al. Effect of Lumican on the migration of human mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells: involvement of matrix metalloproteinase-14. **PLOS one**, v. 7, n. 12 p. e50709, 2012.
- MAREI, W.F. et al. Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, p. 388–400, 2014
- MATOBA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 839-851, 2010.
- MELO, E. O. et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal genetics**, v. 48, n. 1, p. 19-29, 2017.
- MENDONÇA, A.S. et al. Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0142072, 2015.

MONK, D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 67, p. 128-38, 2015.

MONTAG, M.; TOTH, B.; STROWITZKI, T. New approaches to embryo selection. **Reprod Biomed Online**, v. 27, n. 5, p. 539-46, 2013.

MORATÓ, R. et al. Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 1, p. 191-201, 2008.

MOUROT, M. et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 11, p. 1367-1379, 2006.dietric

MUNOZ, M. et al. Metabolomic prediction of pregnancy viability in superovulated cattle embryos and recipients with fourier transform infrared spectroscopy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 579-608, 2014.

NAGAO, Y.; IJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. **Zygote**, v. 16, n. 02, p. 127-133, 2008.

NEWELL-PRICE, J.; CLARK, A.J.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 11, n. 4, p. 142-8, 2000.

OOI, S.K.; O'DONELL, A.H.; BESTOR, T.H. Mammalian cytosine methylation at a glance. **Journal of Cell Science**, v.122, p. 2787-2791, 2009.

O'DOHERTY, A.M.; O'SHEA, L.C.; FAIR, T. Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinate with the expression of the DNMT3 family proteins. **Biol Reprod.**, v. 86, n. 3, p. 67-75, 2012.

PACZKOWSKI, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; KRISHER, R. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. **Reproduction**, v. 148, p. 429-39, 2014.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 2, p. 354-61, 2011.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1131-41, 2005.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-15, 2008.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.-T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735-744, 2004.

RACEDO, S. E. et al. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 1, p. 17-25, 2008.

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

RICHANI, D. et al. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 5, p. 422-435, 2014.

ROBERT, C. et al. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 167-175, 2000.

ROSE, R. D. et al. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 142-8, 2013.

SALHAB, M. et al. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 90-104, 2011.

SALVIANO, M. B. et al. Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo in vitro maturation, fertilisation and embryonic development. **Zygote**, p. 1-7, 2015. I

SANTOS, E. C. et al. Rapid and noninvasive technique to assess the metabolomics profile of bovine embryos produced in vitro by Raman spectroscopy. **Biomed Opt Express**, v. 6, n. 8, p. 2830-9, 2015.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 2, p. 415-25, 2009.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 234-241, 2006.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.

STOKES, P. J.; ABEYDEERA, L. R.; LEESE, H. J. Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo 'cross talk' in vitro. **Developmental Biology**, v. 284, n. 1, p. 62-71, 2005.

SUGIMURA, S. et al. Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. **Developmental Biology**, v. 403, n. 2, p. 139-149, 2015.

SUTTON-MCDOWALL, M. L. et al. Glucosamine supplementation during in vitro maturation inhibits subsequent embryo development: possible role of the hexosamine pathway as a regulator of developmental competence. **Biol Reprod**, v. 74, n. 5, p. 881-8, 2006.

TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E. A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, n. 3, p. 493-497, 1972.

THOMAS, R. E. et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biol Reprod**, v. 71, n. 4, p. 1142-9, Oct 2004.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **J Cell Physiol**, v. 223, n. 3, p. 592-600, 2010.

URREGO, R. et al. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in *Bos indicus* blastocysts produced in vivo and in vitro. **Zygote**, v. 25, n. 2, p. 131-140, 2017.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 979-97, 2013.

VAJTA, G. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VAN HOECK, V. et al. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? **Anim Reprod Sci**, v. 149, n. 1-2, p. 19-29, 2014.

XU, Z.; SINCLAIR, K.D. One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. **Reprod Fertil Dev.**, v.7, n. 4, p. 667-76, 2015.

WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 101, n. 2, p. 577-86, 2014.

WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reprod Domest Anim**, v. 48 Suppl 1, p. 38-43, 2013.

WU, D. et al. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. **Biol Reprod**, v. 75, n. 4, p. 547-54, 2006.

WYDOOGHE, E. et al. Replacing serum in culture medium with albumin and insulin, transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual culture. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 5, p. 717-24, 2014.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biol Reprod**, v. 80, n. 5, p. 1072-80, 2009.

ZHANG, B. et al. Both the folate cycle and betaine-homocysteine methyltransferase contribute methyl groups for DNA methylation in mouse blastocysts. **FASEB J**, v. 29, n. 3, p. 1069-79, 2015.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 7, p. 399-409, 2009.

ZHANG, S. et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2017.

CAPÍTULO 2

USO DE ANTIOXIDANTES EM CULTIVO INDIVIDUAL NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Ana Luiza Silva Guimarães¹, Anelise dos Santos Mendonça², Andrei Antonioni Guedes Fidelis¹, Maurício Machaim Franco³, Margot Alves Nunes Dode^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação do Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil.

1. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo melhorar as condições do cultivo individual e para isso foi proposto avaliar o tipo de sistema a ser utilizado e o efeito de substâncias com atividade antioxidantes como o ácido fólico e a combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS). Inicialmente foi comparado o cultivo em microgotas de 20 μL e aderência de complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) em fundo de placa pelo adesivo biológico *Cell Tak* durante a maturação, fecundação e cultivo embrionário. Os dados de desenvolvimento embrionário e cinética do desenvolvimento foram avaliados por ANOVA e teste de Tukey e os dados de número total de células e células apoptóticas por Kruskal-Wallis, sendo $P \leq 0,05$ considerado significativo. Para a taxa de clivagem, o grupo *Cell Tak* apresentou uma redução em relação ao grupo controle e microgotas de 20 μL . Para a cinética de desenvolvimento, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tipos de cultivo individual (*Cell Tak* e microgotas 20 μL) em relação ao controle. A taxa de blastocisto em D6 e D7 mostrou que o grupo *Cell Tak* foi inferior aos grupos controle e microgotas de 20 μL . No segundo experimento foram testadas inicialmente diferentes concentrações de ácido fólico (0, 10, 20, 50 e 500 μM) durante o cultivo embrionário e se a sua adição durante o cultivo individual afetaria o padrão de metilação dos embriões produzidos *in vitro*. Em D2, foi observado uma redução na taxa de clivados ($P \leq 0,05$) do grupo 500 μM em relação aos demais grupos. Da mesma forma, para a taxa de blastocisto em D6, o grupo 500 μM apresentou uma redução nos embriões produzidos em relação aos outros grupos. Para a taxa de blastocisto em D7 não houve diferença entre os grupos quando comparados ao grupo controle. Quanto à cinética de desenvolvimento, os resultados mostraram que em D6 os grupos 10 μM , 20 μM e 50 μM apresentaram maior percentagem de embriões em estágio de BX ($P \leq 0,05$) do que os grupos controle e 500

μM . A taxa de BX não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Foi avaliado o padrão de metilação dos grupos controle, 20 μM e 500 μM para a DMR (região diferencialmente metilada) presente no éxon 10 do gene IGF2 e para a região de DNA repetitivo α -Satélite. Para a região α - Satélite, todos os tratamentos foram semelhantes, ($P > 0,05$), apresentando um padrão hipometilado. Já para o IGF2, foi observado uma diferença no padrão de metilação dos grupos 20 μM ($37,5 \pm 35,2\%$) e 500 μM ($32,8 \pm 40,2\%$) em relação ao controle ($4,2 \pm 4,5\%$) ($P \leq 0,05$). Quanto ao uso de ácido fólico e ITS, isolado ou conjugado, durante o cultivo individual, observou-se que a clivagem dos grupos de cultivo individual mostrou uma redução na taxa quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), exceto o grupo individual que utilizou o ITS mostrou-se semelhante ao cultivo em grupo ($P > 0,05$). Com relação à taxa de blastocisto em D6, apenas o grupo individual com ácido fólico foi menor, comparado aos demais. Para a cinética de desenvolvimento, não foi observado diferença entre os grupos ($P > 0,05$). Em D7, os grupos controle e individual suplementado com ITS, as taxas foram semelhantes e superiores aos demais grupos ($P < 0,05$). Para a contagem total do número de células embrionárias e células apoptóticas, não foi observada diferença entre os grupos ($P > 0,05$). Conclui-se que o melhor sistema de cultivo individual é o microgotas de 20 μL e que o uso de de ácido fólico como antioxidante nas concentrações de 20 20 μM e 500 20 μM pode influenciar o padrão de metilação do IGF2 de forma a assemelhar-se com embriões *in vivo*.

Palavras chaves: antioxidantes, bovino, cultivo individual, embrião, metilação, ovócito

2. ABSTRACT

The aim of this study was to improve the conditions of individual culture, for this it proposed to evaluate the type of system to be used and the effect of substances with antioxidant activity such as folic acid and the combination of insulin, transferrin and selenium (ITS). Initially, was compared the culture in 20 μ L microdroplets and adhesion of CCOs on Petri dish by the biological adhesive *Cell Tak* during maturation, fertilization and embryo culture. Embryo development and kinetic of development data were evaluated by ANOVA and Tukey test; Kruskal-Wallis for total number of cells and apoptotic cells data, with $P \leq 0.05$ being considered significant. For the cleavage rate, the *Cell Tak* group presented lower rates compared to the control group and 20 μ L microdroplets. For development kinetics, there was no difference ($P > 0.05$) between the individual culture types (*Cell Tak* and 20 μ L microdroplets) compared to the control. The blastocyst rate in D6 and D7 showed that the *Cell Tak* group was lower than the control and 20 μ L microdroplets. In the second experiment, different concentrations of folic acid (0, 10, 20, 50 and 500 μ M) were previously tested. Average the cleavage rate ($P \leq 0.05$) of the 500 μ M group was lower, compared to the other groups. Similarly, for the blastocyst rate in D6, the 500 μ M group showed a reduction in the percentage of embryos produced compared to the other groups. For the blastocyst rate in D7 there was no difference between the groups when compared to the control group. Regarding development kinetics, the results showed that in D6 at the 10 μ M and 20 μ M groups had a higher percentage of embryos in the BX stage ($P \leq 0.05$) than the control and 500 μ M groups; concentration of 50 μ M was similar to all treatments. The BX rate did not differ ($P > 0.05$)

between treatments. The methylation pattern of the control groups, 20 μM and 500 μM , evaluated for the DMR region present in exon 10 of IGF2 and α -Satellite region. For the α -Satellite region, all treatments were similar, ($P > 0.05$), presenting a hypomethylated pattern. On the other hand, for IGF2, there was a difference in the methylation pattern of the 20 μM ($37.5 \pm 35.2\%$) and 500 μM ($32.8 \pm 40.2\%$) groups compared to the control group ($4.2 \pm 4.5\%$) ($P < 0.05$). The use of folic acid and ITS, isolated or conjugated, during individual culture, observed that the cleavage of individual culture groups showed lower rates when compared to the control group ($P < 0.05$), except for the individual group which used the ITS, was similar to the group culture ($P > 0.05$). The blastocyst rate in D6, only the individual group with folic acid was lower, compared to the others; For development kinetics, no difference observed between the groups ($P > 0.05$). In D7, the Control group and the individual with ITS, the rates were similar and superior to the other groups ($P < 0.05$). Total cell number and apoptotic cells, no observed differences between the groups ($P > 0.05$). It is concluded that the best individual culture system is the 20 μL microdroplets and the use of folic acid as an antioxidant may influence the methylation pattern of IGF2, to resemble *in vivo* embryos.

Keywords: antioxidants, bovine, individual culture, embryo, methylation, oocyte

3. INTRODUÇÃO

Apesar do sistema de cultivo *in vitro* de embriões em grupo ser amplamente utilizado em práticas laboratoriais, o sistema de cultivo individual se tornou importante para a pesquisa, pois com esse sistema é possível acompanhar individualmente o todas as etapas da PIVE, desde a maturação até o desenvolvimento do embrionário (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Montag *et al.*, 2013; Krisher *et al.*, 2015; Krisher *et al.*, 2015a).

Em relação ao cultivo individual, um método de produção individual de embriões foi desenvolvido para ovócitos bovinos, chamado ‘well of the well’ (WOW). Esse sistema consiste de pequenos poços cilíndricos em forma de ‘V’ no fundo da placa de cultivo, formando assim um microambiente favorável para o cultivo individual. A vantagem desse sistema é que os embriões ficam imersos sob a mesma gota de meio de cultivo, não perdendo assim todo o benefício do cultivo em grupo. (Vajta *et al.*, 2000).

Outra forma de cultivo individual que vem sendo utilizada é o cultivo em microgotas, onde as estruturas são dispostas em uma mesma placa, sem que os CCOs compartilhem do mesmo microambiente. Neste sistema os resultados da taxa de blastocisto são variáveis quando comparados ao grupo de cultivo em grupo com (Pereira *et al.*, 2005; Goovaerts *et al.*, 2010; Kussano *et al.*, 2016) ou sem soro (Goovaerts *et al.*, 2012; Wydooghe *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015) adicionado ao meio.

Sob as condições de cultivo, seja em grupo ou individual, há a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) que promovem lesões no DNA (Agarwal *et al.*, 2014). As ROS podem aumentar a demanda de enzimas antioxidantes para manter o controle homeostático e evitar o comprometimento do potencial de desenvolvimento subsequente (Correa *et al.*, 2008). Dessa forma, evidencia-se a importância do uso de antioxidantes no meio de cultivo, a fim de reduzir a ocorrência de estresse oxidativo e das taxas de produção *in vitro* de embriões (Wang *et al.*, 2014).

Os antioxidantes são substâncias que podem prevenir ou retardar a ação de oxidação de um determinado substrato presente no meio de cultivo. Resultados demonstraram que a adição de ITS como agente antioxidante no meio de maturação de ovócitos suínos melhorou a concentração de glutatona, a habilidade dos ovócitos na formação dos pro-núcleos e desenvolvimento de embriões clone (Kim *et al.*, 2005). Para bovinos, o ITS adicionado na MIV promoveu um incremento na produção de blastocisto, além de refletir na qualidade dos mesmos (Wydooghe *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015; Guimaraes *et al.*, 2016).

Outro antioxidante que pode ser utilizado é o ácido fólico, presente no fluido folicular de mamíferos, com ação de proteção para o ovócito contra o estresse oxidativo (Kwong *et al.*, 2010; Twigt *et al.*, 2015), além de estar diretamente envolvido como mecanismo de divisão celular (Ly *et al.*, 2017). Foi demonstrado que a suplementação de ácido fólico altera significativamente os níveis de ácido fólico e homocisteína no fluido folicular (Boxmeer *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado com pacientes portadoras de síndrome do ovário policístico, foi observado que a deficiência de vitamina B12 [cofator que utiliza o grupamento metil obtido de 5- metiltetrahidrofolato, oriundo do ácido fólico – (Ikeda *et al.*, 2010)] no fluido folicular, ocasiona uma diminuição nos níveis de homocisteína, sendo associado com a baixa qualidade do ovócito e embrião (Hamel *et al.*, 2010). Isso porque o ácido fólico faz parte do ciclo da metionina, doando grupamento metil, importante na via de metilação de mecanismos epigenéticos (Anckaert *et al.*, 2010). Além disso, o ácido fólico participa ativamente na síntese de aminoácidos e lipídeos (Twigt *et al.*, 2015). A doação do grupamento metil pelo ácido fólico é essencial para os mecanismos de metilação do DNA. Portanto, no ciclo da metionina, o folato serve como substrato para a remetilação de homocisteína em metionina. Posteriormente, a metionina adenosiltransferase (MAT) metaboliza a metionina em S-adenosil-metionina (SAM), que é o substrato para praticamente todas as reações de metilação (Twigt *et al.*, 2011).

Portanto, este estudo teve o objetivo de comparar diferentes formas de cultivo individual de embriões, assim como avaliar o efeito da adição de ITS e ácido fólico durante o cultivo de embriões bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A menos que indicado, os reagentes utilizados nesse experimento foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, EUA).

4.1. Delineamento Experimental

4.1.1. Efeito do sistema de cultivo individual na produção *in vitro* de embriões

Neste experimento, foi proposto avaliar dois sistemas de cultivo individual de embriões. Para isso, esse experimento comparou o sistema *Cell Tak* ao cultivo individual em microgotas 20 μ L. Foram realizadas 5 réplicas, com o total de 290 CCOs, nos seguintes grupos:

- 1) Grupo Controle: CCOs maturados, fecundados e cultivados em grupo;
- 2) *Cell Tak*: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente aderidos no fundo da placa, imersos no mesmo volume de 100 μ L de meio, conforme descrito por Matoba *et al.*, (2013);
- 3) Individual 20 μ L: CCOs distribuídos individualmente em microgotas de 20 μ L. Em D2 os embriões foram avaliados para a taxa de clivagem e em D7 e D8 para a taxa de blastocisto e cinética do desenvolvimento embrionário.

4.1.2 Efeito da adição de ácido fólico e ITS no cultivo individual de embriões bovinos

De acordo com os resultados obtidos na primeira etapa desse estudo, optou-se por utilizar o sistema de cultivo em gota de 20 μL . Para melhorar as condições do cultivo individual, foi proposto avaliar o uso de substâncias com atividade antioxidante como o ácido fólico e a combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS). Inicialmente, foi realizado experimento para determinar a melhor concentração de ácido fólico a ser utilizada. Baseado em estudos prévios que utilizaram o ácido fólico como antioxidante, foram testadas 4 diferentes concentrações em cultivo em grupo e, seu efeito foi avaliado pela produção de embriões. Foram utilizados 1234 CCOs em um total de 10 réplicas, sendo que os CCOs foram MIV, FIV e posteriormente distribuídos nos seguintes tratamentos:

- 1) Controle: cultivo embrionário sem adição de ácido fólico;
- 2) 10 μM : SOF suplementado com 10 μM de ácido fólico;
- 3) 20 μM : SOF suplementado com 20 μM de ácido fólico;
- 4) 50 μM : SOF suplementado com 50 μM de ácido fólico;
- 5) 500 μM : SOF suplementado com 500 μM de ácido fólico.

Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem, e em D6 e D7 para taxa de blastocisto e cinética do desenvolvimento embrionário. Em D7 os embriões foram lavados em gotas de 50 μL de PBS por 3 vezes e, armazenados por tratamento e por estágio (Bx), em pools de 5 estruturas para análise de metilação de DNA. Como não houve diferença na produção de blastocistos entre as doses de 10, 20 e 50 μM , optou-se por usar a concentração de 20 μM de ácido fólico. Esse foi então adicionado ao meio SOF, associado ou não ao ITS. A concentração de ITS foi de 5mg/mL de insulina, 5,5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio, descrito por Guimarães *et al.* (2016). Para esta etapa foram utilizados 465 CCOs, distribuídos nos seguintes grupos:

- 1) Controle: CCOs MIV, FIV e CIV em grupo e SOF sem suplementação de ITS e/ou ácido fólico;
- 2) Controle Individual: MIV, FIV e CIV individual e SOF sem suplementação de ITS e/ou ácido fólico;
- 3) Individual + Ácido Fólico: MIV, FIV e CIV individual e SOF suplementado com 20 μM de ácido fólico;

- 4) Individual + ITS: MIV, FIV e CIV individual e SOF suplementado com 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio;
- 5) Individual + ITS +Ácido Fólico: MIV, FIV e CIV individual e SOF suplementado com 5mg/mL de insulina, 5,5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio e 20µM de ácido fólico.

Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem, em D6 e D7 para taxa de blastocisto e cinética de desenvolvimento. Em D7, os embriões produzidos em estágio de BX foram corados para a realização da contagem do número de células e fragmentação do DNA utilizando o teste de TUNEL, usando o Click-iT[®] TUNEL Alexa Fluor[®] Imaging Assay Protocol.

4.2 Preparo de Placas de cultivo individual com CORNING[®] Cell Tak e microgotas de 20 µL

O adesivo celular *Cell Tak* (Corning[®], Bedford, MA, EUA) é uma solução de proteína desenvolvida para ser utilizada como imobilizador de tecidos celulares em meio de cultivo. A solução de uso foi preparada na concentração de 1mg/mL em 5% de ácido acético e utilizado para o tratamento das placas conforme recomendado pelo fabricante. Placas de Petri (TPP[®], Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) com 35 mm de diâmetro foram tratadas com 2 µL/CCOs a ser fixada ao fundo da placa, num total de 32 µL, ou seja, preparo para fixação de 16 CCOs ao fundo da placa. Ao final da aplicação do produto, as placas foram secas em temperatura ambiente em fluxo laminar, permitindo que houvesse uma evaporação completa do ácido acético. Posteriormente, o local em que foi aplicado o *Cell Tak* foi lavado com água ultrapura e colocadas para secar nas mesmas condições descritas acima. Uma vez tratadas, as placas poderiam ser armazenadas por até uma semana a 2-8°C (figura 2.1). Já para o cultivo em microgotas, adotou-se a metodologia anteriormente descrita por Kussano *et al.*, (2016). Nesse sistema foram feitas 16 microgotas de 20 µL devidamente identificadas em uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro e imersas em óleo mineral.

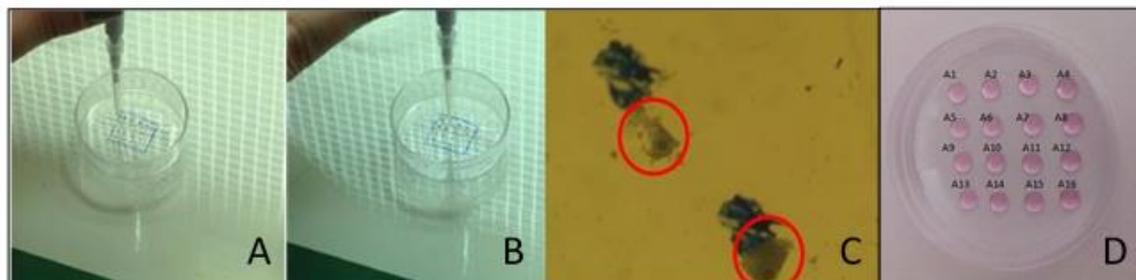


Figura 2.1: Preparo de placas com o adesivo celular CORNING® Cell Tak e cultivo individual em microgotas de 20 µL. A: aplicação do produto na placa. B: Lavagem de fundo da placa com água ultrapura para posterior uso na PIVE. C: CCOs imaturos fixados ao fundo da placa. D: Placa de Petri devidamente preparada com microgotas para MIV, FIV e CIV de CCOs e embriões, totalmente individual.

4.3 Recuperação e Seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados em abatedouros locais de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*), imediatamente após o abate e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/mL e penicilina G - 100 UI/mL) à temperatura de 35-36° C. O tempo de coleta do abate até o momento da aspiração dos folículos foi observado para não exceder o tempo limite de 4 horas.

Os CCOs foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de seringa de 10 mL acoplada com agulha descartável de calibre 18G. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 mL (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) e após a sedimentação do mesmo foi retirado 10 mL do líquido folicular sobrenadante, que foi centrifugado por 5 minutos a 37°C e a 700g e utilizado para procura e seleção dos CCOs. O sedimento contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica. Os ovócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos quatro camadas de células e com citoplasma homogêneo foram selecionados para serem utilizados para a maturação.

4.4 Maturação *in vitro*

Imediatamente após a seleção, os CCOs foram transferidos para o meio de maturação, que consistiu de TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com 0,075 mg/mL de amicacina, 10% de SFB, 0,1 mM/mL de cisteamina, 1 µg/mL de L-glutamina, 12UI/mL de LH e 0,01 UI/mL de FSH, em gotas de 200µL com até 30 estruturas, cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®). O sistema individual em microgotas de 20 µL ou em placa com *Cell Tak*, foi preparado conforme descrito anteriormente. Os ovócitos foram maturados por 22-24 horas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar.

4.5 Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Após a MIV, a fecundação foi realizada utilizando-se em todas as manipulações, sêmen congelado da mesma partida de touro da raça Nelore, previamente testado para o sistema PIVE do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa/Cenargen. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C em banho-maria e posteriormente selecionado pelo gradiente de *Percoll* 90% (400µL) e 45% (400µL), preparados em microtubos de 1,5 mL, centrifugado por 5 minutos a 5.400g (Machado *et al.*, 2009). Após esse período, o pellet obtido foi transferido para 1 mL de meio TALP (Parrish *et al.*, 1995) e novamente centrifugado às mesmas condições anteriores. O pellet obtido nesta etapa foi ressuspendido em meio de fecundação que consistia de meio TALP suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 mM de epinefrina e 10µg/mL de heparina. O volume a ser adicionado na gota de FIV, foi calculado de acordo com a concentração espermática, motilidade e volume da gota de forma a obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Os ovócitos foram lavados duas vezes e posteriormente transferidos para gotas de 200 µL de meio de fecundação, cobertas com óleo siliconado onde foram co-incubados com os espermatozoides a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como D0. Para o sistema em microgotas de 20 µL, onde o volume a ser utilizado para a inseminação era muito pequeno, foi preparado um volume de 350 µL em que os espermatozoides foram adicionados de forma a manter a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. A partir desse meio contendo os

espermatozoides eram então preparadas as microgotas de FIV de 20 μ L em que os ovócitos maturados eram adicionados e levados para o co-cultivo.

4.6 Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação, os possíveis zigotos foram gentilmente pipetados, lavados duas vezes e transferidos para o meio de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 0,4% de BSA [SOFaaci– (Holm *et al.*, 1988)], em gotas de 200 μ L cobertas por óleo mineral, incubados em estufa a 38,5°C e com 5% de CO₂ em ar. Para o cultivo em microgota de 20 μ L, os prováveis zigotos foram retirados do meio FIV, lavados em meio SOF e transferidos para a nova placa de cultivo contendo 16 microgotas de meio SOF, na mesma posição que ocupavam na placa de fecundação. Os embriões foram avaliados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 e D8 para a cinética de desenvolvimento e taxa de blastocisto.

4.7 Avaliação da qualidade do embrião: número total de células e fragmentação de DNA pelo teste Transferase desoxinucleotidil Terminal dUTP (TUNEL)

Para determinar o número total de células e de células apoptóticas, os embriões expandidos foram avaliados pelo teste TUNEL e 3,4 bisbenzimidine (Hoeschst 33342), com o *Kit Click-iT[®] TUNEL Alexa Fluor[®] Thermofisher (Waltham, MA, EUA)*. Inicialmente, os embriões em estágio de BX foram lavados em PBS suplementado com polivinil pirrolidona (PVP) (1 mg / mL) e posteriormente fixados em paraformaldeído a 3,7% por 15 minutos. Após lavagem em 1 mg/mL de PVP, os blastocistos foram incubados em 0,5% Triton-X durante 20 minutos. Subsequentemente, o grupo controle positivo foi desnaturado em solução de DNase na concentração de 50 UI/mL e controle negativo e amostra permaneceram em PBS suplementado com PVP durante meia hora em câmara úmida à 37°C. Por fim, os embriões foram expostos ao mix enzimático TUNEL e Alexa Fluor 488 por 1 hora, à 37 °C e, posteriormente, ao Hoeschst 33342 por 10 minutos. Os embriões corados foram lavados com PVP, montados em lâminas de vidro e observados sob um microscópio de fluorescência, usando os filtros para captação de comprimento de onda de 495/519 nm de excitação para Alexa Fluor 488 e 350/461 nm de excitação para Hoeschst 33342. Para cada blastocisto, o número total de células

individuais (núcleos azuis, Hoeschst 33342) e o número total de células apoptóticas (núcleos verdes, TUNEL) foram determinados (figura 2.2).

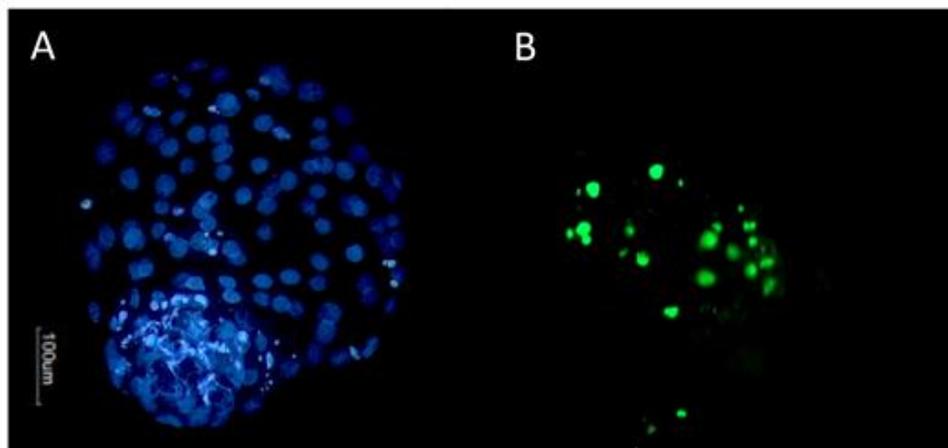


Figura 2.2: Embriões bovinos em D7 de desenvolvimento, submetidos à coloração para avaliação do número total de células, (A) com núcleo de células coradas em azul pelo corante fluorescente Hoeschst 33342; (B) células com fragmentação do DNA coradas em verde pelo método do TUNEL.

4.8 Extração do DNA Genômico por lise celular

No experimento 2, para a quantificação do padrão de metilação, foram utilizados 10 embriões em estágio de Bx em D7 de desenvolvimento para cada tratamento experimental (tratamentos: Controle, 20 μ M e 500 μ M de ácido fólico) divididos em duas réplicas (pools de 5 embriões/cada). Para a obtenção do DNA, inicialmente os embriões referentes a cada grupo foram colocados em uma solução de PBS e pronase E a 10 mg/mL para promover a digestão da zona pelúcida. As amostras foram incubadas em termociclador (PXE 0.5 Thermal Cyclor, Electron Corporation, Asheville, NC, USA) a 37°C por 30 minutos e posteriormente a 85°C por 15 minutos para a inativação da enzima. O DNA foi obtido por lise celular através de choque térmico, em nitrogênio líquido e a aquecimento a 95°C por 1 minuto em termociclador. Esse processo foi repetido por 5 vezes. O material resultante foi armazenado em *freezer* a -20°C.

4.9 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio

Para o tratamento do DNA com bissulfito de sódio utilizou-se o kit EZ DNA Methylation Kit® (Zymo Research, Irvine, CA, USA) conforme as recomendações do fabricante. O DNA tratado foi armazenado em *freezer* a -80°C para posterior amplificação por PCR.

4.10 Amplificação do DNA por PCR

As amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio foram amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos para as regiões de DNA repetitivo α -Satélite e para uma ilha CpG presente no éxon 10 do gene IGF2. As sequências dos *primers* utilizados, o número de acesso das sequências no *GenBank* e os tamanhos dos fragmentos amplificados estão presentes na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Identificação dos *loci* utilizados nas avaliações de metilação de DNA, sequências dos iniciadores, acesso ao *GenBank* e tamanho dos fragmentos amplificados.

<i>Locus</i>	Sequência de iniciadores (5' - 3')	Acesso ao <i>GenBank</i>	Tamanho do amplicon
α -Satélite*	F: TTTTTTTTGATTTGGATAGGAG R: TATATTTAAAACCAAAAATTTTTCC	AJ293510	277 pb
IGF2 externo**	F: TGGGTAAGTTTTTTTAATATGATATT R: TTTAAAACCAATTAATTTTATACATT	X53553.1	455 pb
IGF2 interno**	F: TAATATGATATTTGGAAGTAGT R: ACATTTTTAAAATATTATTCT	X53553.1	420 pb

*Silveira et al., 2016, ** Gebert et al., 2006.

As reações de PCR para o *locus* α -Satélite foram conduzidas utilizando solução tampão 1 X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,4 mM, 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 μ M de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), sendo o volume final de cada reação ajustado para 20 μ L com água deionizada. Já as reações de PCR para o gene IGF2 foram conduzidas utilizando solução tampão 1 X, MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,4 mM, 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 μ M de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), sendo o

volume final de cada reação ajustado para 20 μ L com água deionizada. Foram realizadas 4 replicatas para cada *locus* a fim de aumentar a quantidade de *amplicons* para posterior purificação. O volume de DNA utilizado e as condições de amplificação de cada uma das reações estão mostrados na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Condições de amplificação dos loci α -Satélite e IGF2 por PCR utilizando DNA tratado com bissulfito de sódio.

Gene	Reação	Volume da amostra de DNA	Desnaturação inicial	Ciclos (45 para α - Satélite e 45 para IGF2)			Extensão final
				Desnaturação	Anelamento	Extensão	
α -Satélite	1 ^a Reação	3,0 μ L	94°C/3 min.	94°C/45 seg.	45°C/40 seg	72°C/1 min.	72°C/15 min.
IGF2	1 ^a Reação	3,0 μ L	94°C/3 min.	94°C/40 seg.	45°C/1 min.	72°C/1 min.	72°C/15 min.
	2 ^a Reação					0,5 μ L	94°C/3 min.

4.11 Clonagem dos produtos da PCR, extração do DNA plasmidial, sequenciamento do DNA e análise das sequências

Após a PCR, os *amplicons* foram purificados a partir de um gel de agarose utilizando o Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, os *amplicons* purificados foram inseridos no vector TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen, CA, EUA) e clonados em células DH5 α utilizando um protocolo de choque térmico. Em seguida o DNA plasmidial foi isolado utilizando o QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e as amostras individuais foram submetidas à digestão utilizando a endonuclease *EcoRI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para a confirmação do inserto no vetor. Posteriormente as amostras foram sequenciadas utilizando a metodologia de dideoxi com o iniciador universal M13 *reverse*. A qualidade do sequenciamento foi analisada pelo programa Chromas[®]. Já para a quantificação do padrão de metilação utilizou-se o programa BiQ Analyser[®], comparando as sequências obtidas com a depositada no *GenBank*, tanto para

o *locus* α -Satélite (AJ293510) quanto para o gene IGF2 (X53553.1). Foram avaliados 18 sítios CpGs para o *locus* α -Satélite e 28 para o gene IGF2. Neste estudo considerou-se para as análises apenas as sequências que apresentaram no mínimo de 95% de conversão pelo bissulfito de sódio (taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina) e no mínimo 90% de identidade (quando comparadas com a sequência de referência).

4.12. Análise Estatística

As comparações entre os tratamentos dos resultados obtidos das taxas de blastocisto foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), utilizando teste de Tukey para comparação entre grupos. Os dados relativos à cinética de desenvolvimento embrionário, contagem do número de células, células apoptóticas e padrão de metilação do DNA foram analisados por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Todas as análises foram avaliadas utilizando-se o programa Prophet Statistics, versão 5.0 (BBN Systems & Technologies, Cambridge, MA, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS

5.1.1. Experimento 1: Efeito do sistema de cultivo individual na produção in vitro de embriões

No primeiro experimento foram testados dois sistemas, o cultivo com aderência utilizando o Corning® *Cell Tak* e microgotas de 20 µL, os resultados de clivagem em D2 e taxa de blastocistos em D7 e D8 são apresentados na tabela 2.3. O grupo *Cell Tak* apresentou uma taxa de clivagem menor que o grupo controle e o microgotas de 20 µL. Para a cinética de desenvolvimento, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tipos de cultivo individual (*Cell Tak* e microgotas 20 µL) e o controle. Entretanto, quando a produção de embriões foi analisada, o grupo *Cell Tak* apresentou taxa de blastocisto inferior aos grupos Controle e microgotas 20 µL.

Tabela 2.3 Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D7 e D8 de cultivo, comparando o grupo controle (cultivo em grupo), com o cultivo individual (individual em microgotas de 20 μ L e *Cell Tak*).

Grupo	N. ovócitos	D2 ($\% \pm DP$)	D7 ($\% \pm DP$)				D8 ($\% \pm DP$)				
			Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total	Bl	Bx	Bn/Be	Total
Controle Individual	130	99(76,2\pm17,7)a	7 (18 \pm 0,6)a	6 (15,3 \pm 1,0)a	25 (64,1 \pm 2,9)a	1 (2,6 \pm 1)a	39(30\pm12,6)a	9 (20 \pm 1,0)a	26 (58 \pm 1,5)a	10 (22,2 \pm 1,5)a	45 (35\pm9,5)a
Individual 20 μ L	80	45 (56,2\pm5,0)b	4 (20 \pm 0,6)a	3 (15 \pm 1,7)a	13 (65 \pm 1,0)a	0 (0)a	20 (25\pm6,8)a	4 (19 \pm 1,0)a	14 (66,7 \pm 1,5)a	3 (14,3 \pm 1,0)a	21(26,2\pm3,7)a
<i>Cell Tak</i>	80	27 (34,1,7)c	1 (11,1 \pm 0,6)a	4 (44,4 \pm 1,5)a	4 (44,4 \pm 1,0)a	0 (0)a	9(11,2\pm2,3)b	3 (25 \pm 1,7)a	7 (58,3 \pm 1,0)a	2 (16,7 \pm 1,1)a	12(15\pm2,6)b

a,b,c Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. ($P \leq 0,05$). Por ANOVA e teste de Tukey (Tx blastocisto $P \leq 0,01$) e Kruskal-Wallis (cinética desenvolvimento $P \leq 0,05$). Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be)

5.1.2 Experimento 2: Efeito de ácido fólico e ITS durante o cultivo individual de embriões bovinos

Para definir a dose de ácido fólico a ser utilizada no cultivo de embriões bovinos, foram testadas diferentes concentrações em cultivo em grupo. Os resultados referentes ao desenvolvimento embrionário são apresentados na tabela 2.4. Pode-se observar que houve diferença ($P \leq 0,05$) entre os grupos de 500 μM em relação aos demais grupos para a taxa de clivagem. Da mesma forma, para a taxa de blastocisto em D6, o grupo 500 μM apresentou-se inferior em relação aos outros grupos. Para a taxa de blastocisto em D7 não houve diferença entre os grupos quando comparados ao controle. Quando a velocidade de desenvolvimento foi avaliada, os resultados mostraram que em D6 a porcentagem de embriões que estavam em estágio de BX foi maior ($P \leq 0,05$) nos grupos 10 μM e 20 μM do que os grupos Controle e 500 μM , sendo o 50 μM semelhante a todos os tratamentos. Entretanto, no D7 a taxa de BX não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Como as concentrações de 10 μM , 20 μM e 50 μM de ácido fólico não apresentaram diferenças, optou-se por utilizar a segunda dose para a continuidade do experimento, pelo fato de ser a dose com registro prévio em literatura para outras espécies.

Considerando que o ácido fólico, além de antioxidante, também está envolvido no processo de metilação do DNA, avaliou-se se a concentração final utilizada poderia afetar o padrão de metilação dos embriões produzidos *in vitro*. Para tanto, os grupos controle, 20 μM e 500 μM de ácido fólico foram avaliados quanto ao padrão de metilação do DNA para a região α -Satélite e a DMR do éxon 10 do gene IGF2. As sequências analisadas no programa BiQ Analyzer e que tiveram taxas de identidade e conversão pelo bissulfato de sódio adequadas ($> 95\%$) foram consideradas para as análises. Exemplos de alinhamentos para as regiões α -Satélite e IGF2 estão representados na figura 2.3. Foram realizadas as análises de 18 sítios CpG para o *locus* α -Satélite e 28 para o IGF2. O padrão de metilação encontrado para α -Satélite e IGF2, para as concentrações de 0 (controle), 20 e 500 μM de ácido fólico foram analisadas e estão apresentadas nas figuras 2.4 e 2.5, respectivamente.

Tabela 2.4 Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D6 e D7 de cultivo, expostos à diferentes doses (0, 10, 20, 50 e 500 μM) de ácido fólico durante o cultivo *in vitro*.

Grupo	N. ovócitos	D2 ($\% \pm DP$)	D6 ($\% \pm DP$)				D7 ($\% \pm DP$)				
			Bi	Bl	Bx	Total	Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total
Controle	257	213 (82,9\pm10,7)a	19 (65,5 \pm 1,0)a	8 (27,5 \pm 0,6)a	2 (6,8 \pm 0,6)a	29 (11,3\pm8,3)a	18 (17,8 \pm 2,0)a	30 (33,0 \pm 1,5)a	40 (44,0 \pm 1,5)a	3 (3,2 \pm 1,7)a	91(35,4\pm19,8)a
10 μM	239	189 (79,12,5\pm)a,c	15 (42,8 \pm 2,0)b	11 (31,4 \pm 3,7)a	9 (25,7 \pm 1,7)b	35 (14,7\pm6,0)a	16 (20,0 \pm 1,0)a	24 (30,0 \pm 1,1)a	38 (47,5 \pm 2,5)a	2 (2,5 \pm 0,6)a	80(33,5\pm18,1)a
20 μM	242	201 (83,1\pm35,5)a	19 (55,8 \pm 1,1)a	7 (20,5 \pm 1,5)a	8 (23,5 \pm 1,1)b	34 (14,4\pm6,6)a	19 (21,8 \pm 2,3)a	30 (34,5 \pm 3,2)a	37 (42,5 \pm 2,5)a	1 (1,1 \pm 0,6)a	87(36,0\pm19,0)a
50 μM	253	200 (79,1\pm20,2)a	20 (60,6 \pm 3,7)a	9 (27,2 \pm 2,7)a	4 (12,2 \pm 0,7)a,b	33 (13,0\pm8,1)a	20 (25,9 \pm 4,0)a	26 (33,7 \pm 1,5)a	29 (37,6 \pm 3,4)a	2 (2,6 \pm 1,0)a	77(30,4\pm14,7)a
500 μM	243	182(74,9\pm16,7)b,c	13 (68,4 \pm 2,5)a	6 (31,6 \pm 1,7)a	0 (0)a	19 (7,8\pm6,5)b	15 (20,8 \pm 5,0)a	30 (41,6 \pm 2,0)a	2 (36,1 \pm 1,9)a	1 (1,4 \pm 0,6)a	72(29,6\pm15,7)a

a,b,c. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. ($P \leq 0,05$). Taxa de blastocisto por ANOVA ($P \leq 0,05$). Cinética de desenvolvimento por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be).

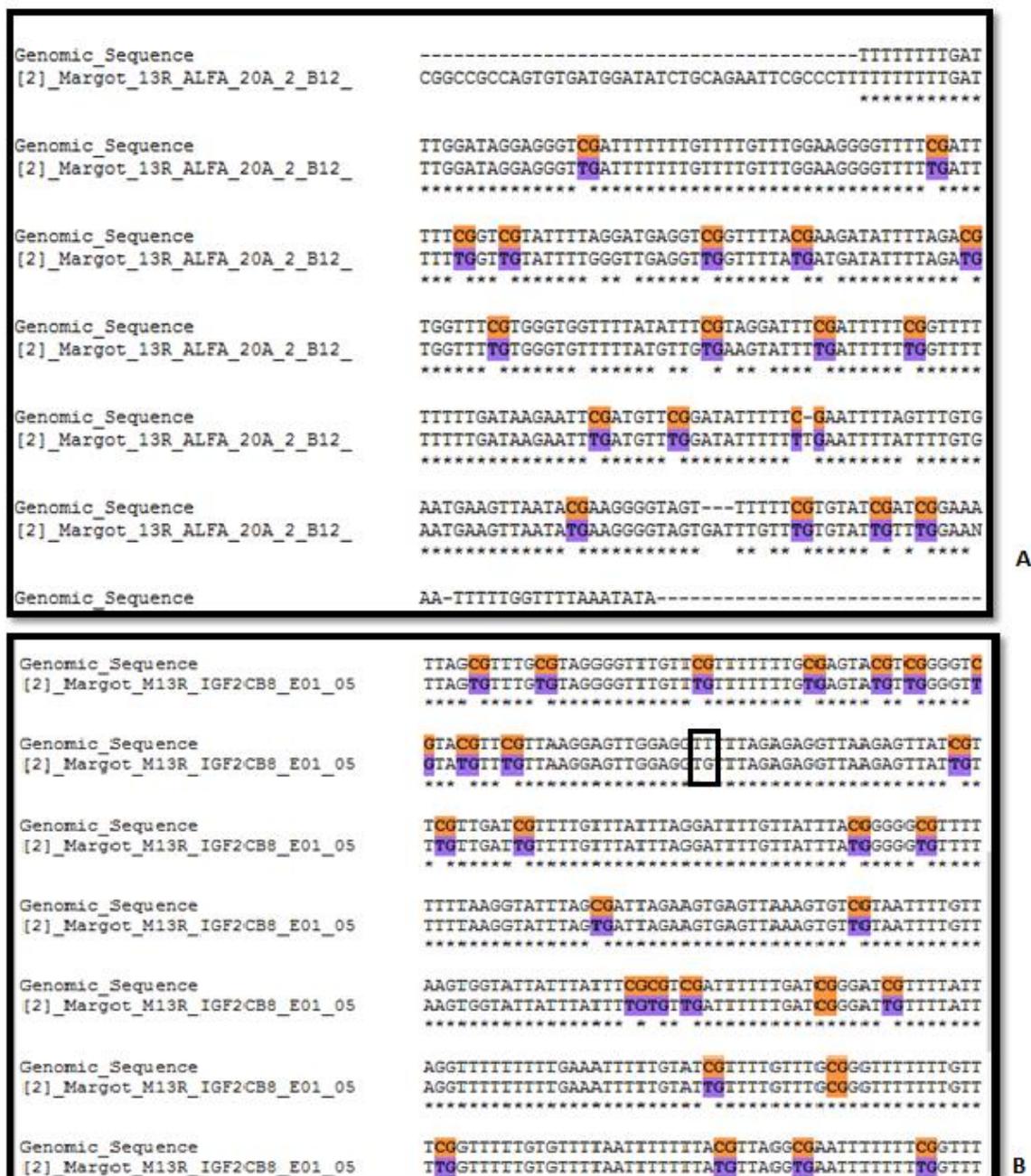


Figura 2.3 Exemplos de alinhamentos realizados no programa BiQ Analyzer entre as sequências depositadas no *GenBank* (linha superior) e os produtos de sequenciamento (linha inferior) para as regiões (A) α -Satélite e (B) éxon 10 de IGF2. Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas. O retângulo preto marcado na imagem B identifica o 10º sítio CG, o qual no exemplo acima encontra-se desmetilado.

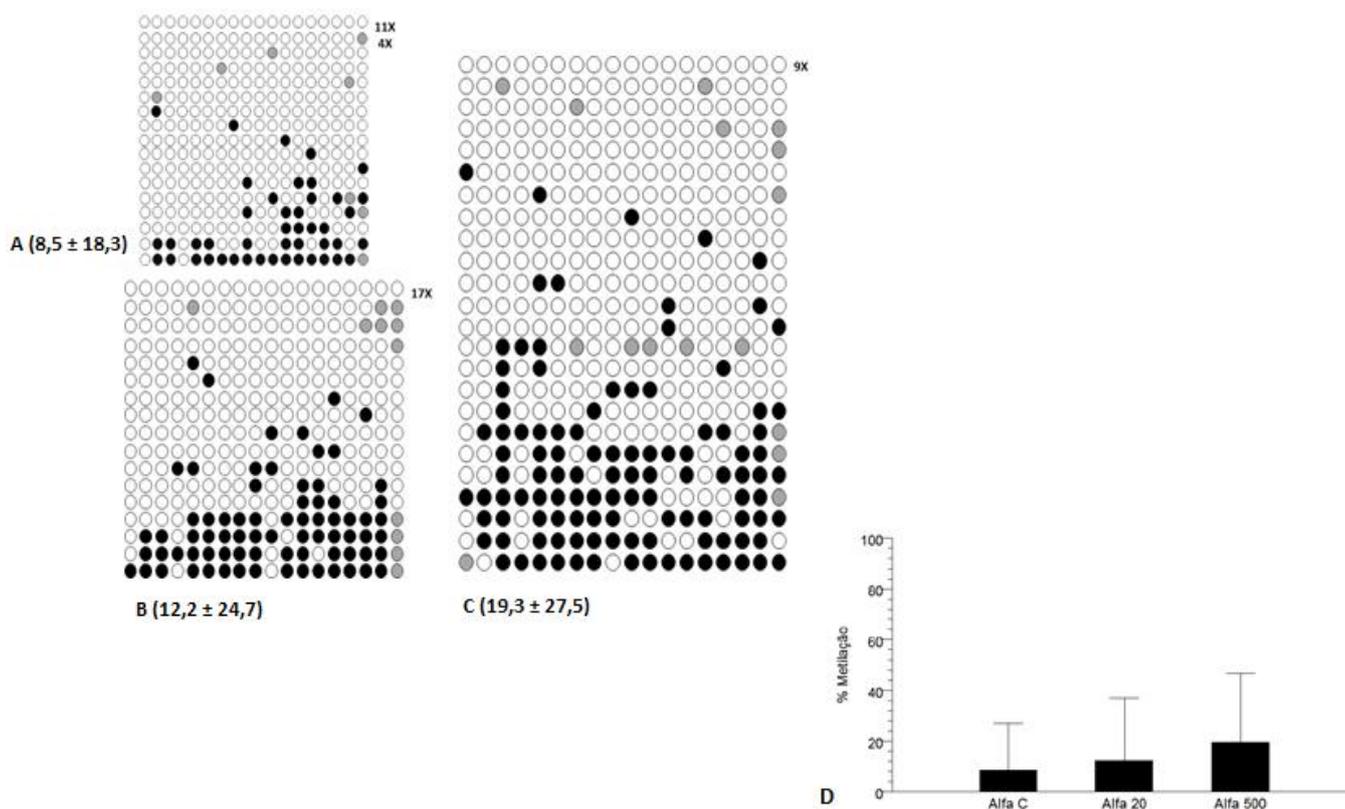


Figura 2.4 - Padrão de metilação da região α -Satélite em embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando suplementação com diferentes doses de ácido fólico no cultivo. Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da citosina. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que repetiram o padrão de metilação estão representadas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetir. (A) Embriões do grupo Controle, sem suplementação de ácido fólico durante o cultivo embrionário; (B) Embriões produzidos com suplementação de 20 μ M de ácido fólico durante o cultivo embrionário e (C) Embriões produzidos com suplementação de 500 μ M de ácido fólico durante o cultivo embrionário. As taxas de metilação estão apresentadas no gráfico (D) como média \pm DP.

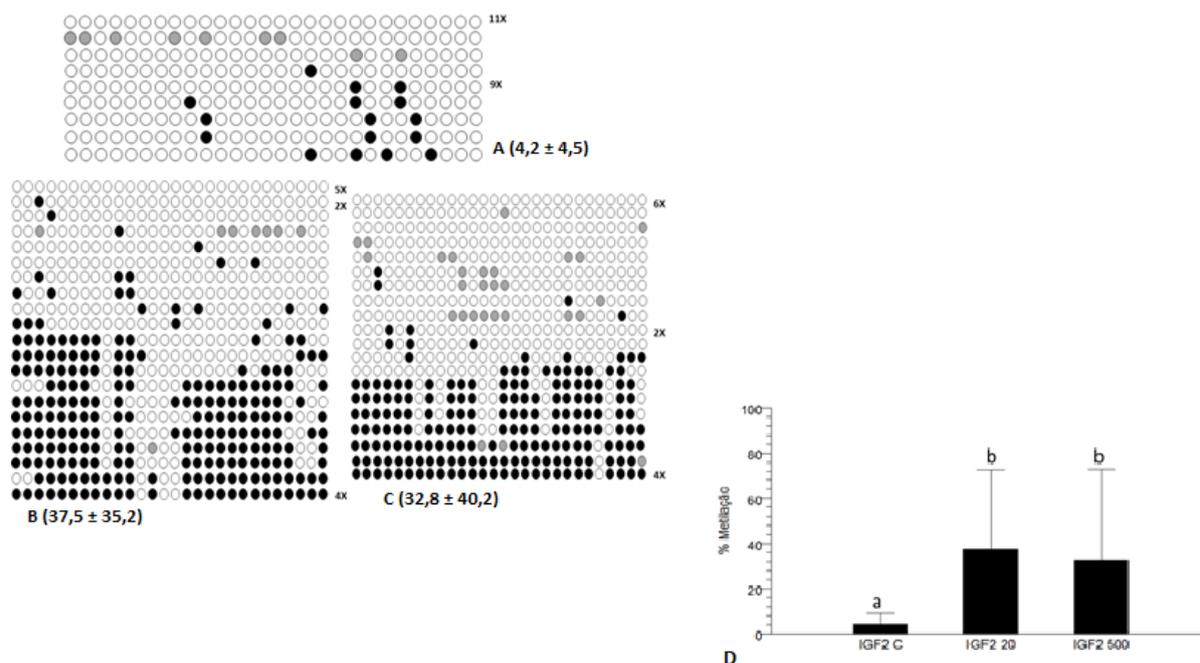


Figura 2.5 - Padrão de metilação do éxon 10 de IGF2 em embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando suplementação com diferentes doses de ácido fólico no cultivo. Cada linha representa um clone, onde cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica metilação enquanto círculo branco indica não metilação da citosina. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento. Sequências que repetiram o padrão de metilação estão representadas uma única vez, seguido do número de vezes que se repetir. (A) Embriões do grupo controle, sem suplementação com ácido fólico durante o cultivo embrionário; (B) Embriões produzidos com suplementação de 20 μM de ácido fólico durante o cultivo embrionário e (C) Embriões produzidos com suplementação de 500 μM de ácido fólico durante o cultivo embrionário. As taxas de metilação estão apresentadas no gráfico (D) como média \pm DP.

Não houve diferença entre os padrões de metilação de DNA entre os grupos suplementados com 20 e 500 μM quando comparados ao grupo controle para o *locus* α-Satélite ($P > 0,05$). Já para os mesmos grupos avaliados e analisando a região do éxon 10 do gene IGF2, observou uma diferença do grupo controle em relação ao grupo 20 μM ($P = 0,002$) e ao grupo 500 μM ($P = 0,05$), onde os grupos suplementados com ácido fólico apresentaram-se mais metilados. Entre os grupos 20 μM e 500 μM de ácido fólico, não foi encontrado diferença quanto ao padrão de metilação entre eles ($P > 0,05$).

Após definir a concentração de ácido fólico a ser utilizada, o mesmo e o ITS, foram adicionados isoladamente ou em conjunto, durante o cultivo individual *in vitro*

de embriões. Os resultados de taxas de embriões em D2, D6 e D7 são apresentados na tabela 2.6. Para a taxa de clivagem não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos de cultivo individual, sendo que o grupo individual suplementado com ITS, permaneceu semelhante ao controle. Quanto à velocidade de desenvolvimento em D6, todos os tratamentos foram semelhantes. Entretanto, ao observar a taxa de produção de blastocisto, apenas o grupo suplementado com ácido fólico, diferiu dos demais tratamentos.

Em D7, a velocidade de desenvolvimento dos embriões produzidos nos grupos com ácido fólico isolado ou conjugado foi menor em relação aos demais. Já para a taxa de blastocisto, os grupos de cultivo individual não diferiram entre si, e novamente com exceção ao grupo suplementado com ITS, em que a produção foi semelhante ($P\leq 0,05$) ao grupo controle. Em relação aos dados de avaliação dos embriões (tabela 2.5), nenhuma diferença foi encontrada em relação ao tamanho dos embriões produzidos em grupo ou cultivados individualmente (tabela 2.6). Da mesma forma, não foi observada diferença ($P>0,05$) para a contagem do número total de células e a média de células apoptóticas entre os grupos.

Tabela 2.5 Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), avaliando clivagem em D2, taxa de blastocisto em D6 e D7 de cultivo, comparando o grupo controle (cultivo em grupo), e o cultivo individual em microgotas de 20 μ L, suplementado com ácido fólico 20 (μ M), 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio (ITS) ou conjugado (ácido fólico+ITS) durante o cultivo *in vitro*.

Grupo	N. ovócitos	D2 ($\% \pm DP$)	D6 ($\% \pm DP$)				D7 ($\% \pm DP$)				
			Bi	B1	Bx	Total	Bi	B1	Bx	Bn/Be	Total
Controle	145	113(78\pm22,5)^a	19 (44,1 \pm 1,7) ^a	16 (37,2 \pm 2,4) ^a	8 (18,3 \pm 0,8) ^a	43(30\pm18,1)^a	9 (15,2 \pm 1,3) ^a	23 (39 \pm 2,0) ^a	26 (44 \pm 1,9) ^a	1 (1,7 \pm 0,4) ^a	59 (40,6\pm15,8)^a
Controle Individual	80	51 (64\pm5,1)^b	11 (61,1 \pm 1,5) ^a	5 (27,7 \pm 0,5) ^a	2 (11,1 \pm 0,5) ^a	18(22,5\pm7,4)^a	2 (9,5 \pm 0,6) ^a	10 (47,6 \pm 0,5) ^a	9 (43 \pm 1,6) ^a	0 (0) ^a	21 (26,2\pm6,5)^b
Individual +Ac. Fólico	80	49 (61,2\pm5,5)^b	9 (60 \pm 1,0) ^a	4 (26,6 \pm 0,5) ^a	2 (13,3 \pm 0,5) ^a	15(18,7\pm6,9)^b	6 (33,3 \pm 1,9) ^b	8 (44,4 \pm 1,4) ^a	4 (22,2 \pm 0,5) ^b	0 (0) ^a	18 (22,5\pm6,3)^b
Individual +ITS	80	57 (71,2\pm3,6)^{a,b}	8 (38 \pm 1,8) ^a	10 (47,6 \pm 2,0) ^a	3 (14,3 \pm 0,9) ^a	21(26,2\pm7,5)^a	5 (18,5 \pm 0,9) ^a	13 (48,1 \pm 1,4) ^a	9 (33,3 \pm 0,6) ^a	0 (0) ^a	27 (33,7\pm6,9)^{a,b}
Individual +Ac. Fólico+ITS	80	51 (64\pm5,5)^b	8 (50 \pm 1,4) ^a	5 (31,2 \pm 0,5) ^a	3 (18,7 \pm 0,6) ^a	16 (20\pm5,6)^a	7 (35 \pm 0,6) ^b	8 (40 \pm 1,0) ^a	5 (25 \pm 0,5) ^b	0 (0) ^a	20 (25\pm5,2)^b

a,b Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. ($P \leq 0,05$). Taxa de blastocisto por ANOVA e teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Cinética de desenvolvimento por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (B1), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be)

Tabela 2.6 Mensuração, número total de células e média de células apoptóticas (\pm DP) de embriões D7 submetidos ao cultivo individual, suplementado com 20 μ M de ácido fólico, ou 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio, (ITS) ou conjugados, durante o cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Mensuração embrião (média \pmDP)	N° de células (média \pmDP)	N° de células apoptóticas (média \pmDP)
Controle	161,5 \pm 16,8	128,2 \pm 41,9	6,2 \pm 4,5
Controle Individual	160,1 \pm 6,8	111,6 \pm 24,4	5,2 \pm 3,3
Individual +Ac. Fólico	155,1 \pm 11,3	108,2 \pm 47,6	4,9 \pm 3,3
Individual +ITS	160,0 \pm 18,6	117,3 \pm 33,6	4,0 \pm 2,2
Individual +Ac. Fólico+ITS	158,5 \pm 16,1	103,4 \pm 34,2	5,1 \pm 3,4

Avaliado por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

5.2 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, onde os ovócitos cultivados individualmente possam ser acompanhados até o estágio de mórula ou blastocisto, é de grande interesse para vários campos de estudo. Isso porque, permite caracterizar e acompanhar o ovócito desde a fecundação até seu desenvolvimento embrionário.

Considerando que há uma variação quanto aos resultados acerca do cultivo individual (Vajta *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2005; Stokes *et al.*, 2005; Matoba *et al.*, 2010; Wydooghe *et al.*, 2014; Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016), o objetivo deste estudo foi comparar sistemas de cultivo individual. Foi proposto a utilização do adesivo celular *Cell Tak*, onde as estruturas ficam individualmente imobilizadas no fundo da placa, mas imersos sob a mesma gota de meio de cultivo não perdendo assim todos os benefícios do cultivo em grupo e, o cultivo individual em microgotas de 20 µL, anteriormente descrito por Kussano e colaboradores (2016).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que no cultivo utilizando o sistema com adesivo *Cell Tak*, as taxas de produção de blastocistos foram inferiores quando comparado ao cultivo em grupo e ao sistema de cultivo individual em microgotas.

Alguns fatores que podem estar envolvidos na menor produção de embriões nesse sistema são o uso de substâncias tóxicas para o embrião como o ácido acético, o qual é utilizado para o tratamento das placas de cultivo e a fixação da estrutura em posição única, podendo afetar a polaridade embrionária, processo que se inicia em estágios precoce de desenvolvimento, onde algumas células assumem a configuração polar para a formação do trofotoderma e apolar, formando a massa celular interna (Anani *et al.*, 2014). Esse processo de polarização nas estruturas aderidas pelo *Cell Tak* pode estar comprometido, uma vez que os mesmos não conseguem estabelecer o seu domínio apical.

Relatos acerca da utilização da metodologia *Cell Tak* são variados. Stokes e Colaboradores (2005), observaram que a produção de embriões suínos apresentaram-se semelhantes aos embriões controle quanto à qualidade pelo aumento do número de células da massa celular interna e trofoblasto usando esse sistema. Já Matoba *et al.*, (2010), conduziram um estudo para avaliar a competência ovocitária, utilizando o *Cell Tak* para cultivo individual, os resultados obtidos mostraram que as taxas de clivagem e de blastocisto foram afetadas, apresentando-se mais baixas quando comparadas às taxas do cultivo em grupo.

Estudo conduzido em nosso laboratório, onde foi testado o sistema de cultivo WOW, cujo princípio é o mesmo do cultivo com *Cell Tak*, apresentou resultados não satisfatórios, apresentando uma redução nas taxas de produção de blastocisto, em relação ao grupo cultivado em grupo e ao grupo individual cultivado em microgotas. O *Cell Tak* possui vantagens sobre o WOW pelo fato de manter a circulação de moléculas como proteínas, aminoácidos e lipídios, importantes para o desenvolvimento embrionário, onde essa livre circulação é limitada no WOW. Um fator que há de se considerar é que todas as etapas da PIVE foram realizadas de forma individualizada e que a manipulação para esse tipo de cultivo demanda um pouco mais de tempo de exposição, podendo induzir o estresse oxidativo (Kelley e Gardner, 2017). Além disso, as taxas de blastocistos obtidas nesse experimento estão de acordo com autores que utilizaram a mesma metodologia de cultivo individual para microgotas (Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016). Portanto optou-se por utilizar o sistema de microgotas de 20 μ L.

A segunda etapa desse estudo teve por objetivo avaliar o efeito de substâncias antioxidantes durante o cultivo individual, para tentar minimizar a ação de ROS que são formadas nesse período. Antioxidantes como o ácido fólico e o ITS foram escolhidos para serem utilizados. O ácido fólico, além de atividade antioxidante, tem papel fundamental na reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário, Já o ITS, dados obtidos em nosso laboratório, observou seus benefícios durante o cultivo de embriões *in vitro*. Apesar da concentração de ácido fólico está bem estabelecida para humanos, ratos e suínos (Ebisch *et al.*, 2007; Anckaert *et al.*, 2010; Ikeda *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2012), as informações para bovinos são limitadas, para isso necessitou a realização desse experimento inicial.

Os resultados obtidos apresentaram que as concentrações de 10, 20 μ M e 50 μ M não afetaram o desenvolvimento embrionário, entretanto a concentração de 500 μ M houve um comprometimento no desenvolvimento dos mesmos. Kim e colaboradores (2009) observaram que o uso de 20 μ M de ácido fólico durante a maturação em ovócitos suínos, aumentou a concentração de glutatona durante a MIV, reduzindo a taxa de apoptose das células do *cumulus*. Esses dados mostraram também uma melhora no desenvolvimento embrionário, com o aumento das células da massa celular interna e trofoblasto. Com o uso de ácido fólico na concentração máxima de 500 μ M, observou-se a cinética de desenvolvimento. Por ser considerada uma dose alta de antioxidante, a sua suplementação nessa concentração pode causar uma espécie de falha no sistema de defesa, facilitando o aparecimento de ROS em sua forma reduzida (Truong *et al.*, 2016).

Devido à importância do ácido fólico na reprogramação epigenética, pois é responsável pelo fornecimento de grupamento metil a ser adicionado aos ácidos nucleicos e proteínas, foi decidido realizar o estudo do perfil de metilação de embriões produzidos. Nesta etapa do experimento, foram avaliados os padrões de metilação do DNA para as regiões de DNA repetitivo α -Satélite e para uma ilha CpG localizada no éxon 10 do gene IGF2 para os grupos suplementados com 20 e 500 μ M de ácido fólico, comparados com o grupo controle. A região α -Satélite está presente em milhares de cópias repetidas ao longo do genoma, sendo o maior componente da heterocromatina de eucarioto, tendo como função assegurar a segregação normal dos cromossomos durante a divisão celular (Kato *et al.*, 2007; Couldrey e Lee, 2010) e representa cerca de 46% de todas as regiões repetitivas do genoma bovino (Adelson *et al.*, 2009). Portanto, os níveis de metilação do DNA em regiões repetitivas são considerados de grande importância, pois podem refletir os níveis de metilação global do genoma, considerando que estão presentes em milhares de cópias ao longo do genoma (Yamanaka *et al.*, 2011; Kaneda *et al.*, 2017).

O padrão de metilação para a região α -Satélite foi semelhante para todos os grupos, se apresentando como hipometilado. Resultado semelhante ao encontrado por Couldrey e Wells (2013), onde observaram uma redução na taxa de metilação para embriões bovinos produzidos *in vitro*. Um estudo conduzido por Zhang e Colaboradores (2017), corroboram também com os resultados obtidos neste estudo, pois foi avaliado a metilação da região α Satélite em ovócitos, espermatozoides e embriões PIV e clones. Os resultados mostraram que os embriões PIV apresentaram também um padrão hipometilado, diferentemente dos embriões clones que apresentaram um padrão hipermetilado. A desregulação no padrão de metilação pode causar um crescimento excessivo de fetos e anexos placentários, bem como a morte perinatal em animais clones (Perecin *et al.*, 2009).

Em um estudo comparando embriões produzidos *in vivo* versus *in vitro*, não foi observado diferença entre as categorias, onde os embriões apresentaram cerca de 36% de metilação (Urrego *et al.*, 2017). Avaliando tecidos placentários de animais clones, foi observado que a região α -Satélite apresentou um padrão hipometilado comparado com os anexos placentários de animais produzidos por inseminação artificial (Silveira *et al.*, 2016). A observação de elementos repetidos em milhares de cópia no DNA como a região α -Satélite pode refletir os padrões de metilação global e sua influência na reprogramação epigenética. (Urrego *et al.*, 2014; Urrego *et al.*, 2017). A alteração do padrão de metilação da região α -Satélite é sugerido causar um padrão global aberrante, de forma a contribuir

na ineficiência da produção de embriões produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (Kang *et al.*, 2005; Couldrey e Lee, 2010; Couldrey e Wells, 2013).

O IGF2 possui um papel crucial no crescimento fetal e desenvolvimento da placenta (Fagundes *et al.*, 2011). Em vários estudos, o IGF2 é apresentado como *imprinted* em várias espécies (Huang *et al.*, 2014) e o seu correto padrão *imprinted* é essencial para o desenvolvimento normal em mamíferos (Gebert *et al.*, 2009). Estudos prévios em nosso laboratório avaliaram a influência do uso de TRAS nos processos que envolvem a reprogramação epigenética. Mendonça e colaboradores (2015) caracterizaram o padrão de metilação da região do éxon 10 do gene IGF2 em ovócitos durante a foliculogênese bovina, onde foi apresentado o estabelecimento de um padrão menos metilado para todos os grupos de ovócitos analisados em relação a espermatozoide, que apresenta um padrão hipermetilado (Carvalho *et al.*, 2012). Os seus resultados corroboram com os de Fagundes *et al.*, (2011), onde ovócitos apresentaram-se com um padrão hipometilado para o IGF2. Avaliando embriões bovinos em D14 de desenvolvimento, foi possível observar que não houve diferenças entre embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, observando um padrão hipometilado para o IGF2 (Carvalho *et al.*, 2014). Nesse estudo foram encontrados 28 dinucleotídeos CpG em todos os clones avaliados para o gene IGF2. O mesmo resultado foi encontrado por Fagundes *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012 e Mendonça *et al.*, 2015, onde avaliaram gametas bovinos provenientes de animais mestiços caracterizando um polimorfismo, possivelmente existente entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (Fagundes *et al.*, 2011).

O padrão de metilação para IGF2 nos grupos suplementados com ácido fólico nas concentrações de 20 e 500 μM , apresentou-se maior em relação ao grupo controle. E esse aumento no padrão de metilação pode estar de acordo com a função exercida pelo IGF2, que é de controle de divisão celular e crescimento embrionário (Urrego *et al.*, 2014). O padrão de metilação obtido nesse trabalho para embriões produzido *in vitro* e cultivados na presença de ácido fólico apresentou-se semelhante ao resultado encontrado por Gebert e colaboradores (2009) para embriões produzidos *in vivo*, sugerindo que esses embriões cultivados na presença de ácido fólico podem ser de melhor qualidade. Também relataram que a diferença de padrão de metilação é sexo-específico, pois embriões machos apresentam um padrão mais metilado que embriões fêmeas. Nossos resultados mostraram que o uso do ácido fólico no cultivo embrionário influenciou a reprogramação da metilação do DNA para essa região estudada, mimetizando o que ocorre *in vivo*,

baseando-se nos resultados de Gebert *et al.*, (2009). É possível que isso ocorra porque o folato faz parte do ciclo da metionina, contribuindo para a doação de mais grupamento metil. Estudos prévios de Ikeda *et al.*, (2010), utilizando a homocisteína no cultivo embrionário, mostraram que os embriões foram capazes de utilizar fontes exógenas de nutrientes relacionados ao processo de metilação e influenciando as modificações epigenéticas em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

Em relação ao uso do ácido fólico isolado ou em combinação com o ITS durante o cultivo individual, nossos resultados apontaram que as taxas de clivagem, e desenvolvimento embrionário em D6 e D7, o cultivo individual suplementado com ITS permaneceu semelhante ao grupo controle, enquanto que os demais foram inferiores na produção embrionária.

Outro antioxidante que foi testado para a definição do meio de cultivo a ser utilizado no cultivo individual é o ITS. Dentre suas diversas funções, podemos citar a importante proteção que exerce no CCOs contra a produção de radicais livres, resultado do metabolismo do folículo. Alguns estudos demonstram sua importância durante o cultivo de folículos pré-antrais, estimulando o seu crescimento. A adição de transferrina isolada ou em combinação com insulina, aumenta o desenvolvimento de blastocistos bovinos cultivados em grupos (Wydooghe *et al.*, 2014). O selênio é também capaz de proteger as células de danos oxidativos por causa da sua atividade na via de glutathione-peroxidase (Kwong *et al.*, 2010).

Ao avaliar a integridade do DNA, os embriões não diferiram em relação ao número de células e taxa de células apoptóticas. Esses resultados sugerem que apesar de não ter um incremento na taxa de blastocisto, o uso de antioxidantes como o ácido fólico e o ITS de forma isolada ou conjugada, conseguiram minimizar o estresse oxidativo do cultivo individual. Wydooghe e colaboradores (2014) observaram que ao utilizar o ITS conjugado ou cada componente isolado em cultivo individual de embriões bovinos, a adição de insulina ou transferrina no meio de cultivo é crucial para suportar o desenvolvimento individual do embrião até o dia 7. E sem de adição de insulina ou transferrina ao meio de cultura, observou um atraso na alocação de células para a MCI, resultando em menor desenvolvimento embrionário. Alguns estudos adicionando o ITS no meio de cultivo observaram embriões com número total de células elevado e/ou menor taxa de apoptose (Kim *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2010; Wydooghe *et al.*, 2014; Guimaraes *et al.*, 2016). Os resultados desse experimento sugerem que o cultivo individual na

presença de ITS não afetou o desenvolvimento embrionário, apesar de não incrementar a sua produção.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir com os resultados obtidos neste experimento que o cultivo individual em microgotas de 20 μ L permanece sendo a melhor forma de cultivo individual, e que o uso de ácido fólico como antioxidante não afeta o padrão de metilação para a região α -satélite, entretanto para a região do éxon 10 do gene IGF2, foi observado um efeito sobre os embriões PIV, mimetizando o padrão de metilação de embriões produzidos *in vivo*. Já o uso de ITS como antioxidante durante o cultivo embrionário não foi observado efeito sobre o desenvolvimento embrionário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELSON, D. L.; RAISON, J. M.; EDGAR, R. C. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12855-60, 2009.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v. 12, p. 112-124 2014.

ANANI, S. et al. Initiation of hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. **Development**, v. 141, p. 2813-2824, 2014.

ANCKAERT, E. et al. Effects of Low Methyl Donor Levels in Culture Medium During Mouse Follicle Culture on Oocyte Imprinting Establishment. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 377-386, 2010.

BOXMEER, J. C. et al. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. **Fertil Steril**, v. 89, n. 6, p. 1766-70, 2008.

BUNEL, A. et al. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 228-37, 2015.

CARVALHO, J.O. et al. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Mol. Reprod. Dev**, v. 79, p.77-84, 2012.

CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Methylation pattern of IGF2 gene in trophoblast cells from d14 bovine embryo: effect of in vitro culture. IN: Proceedings of the 28 th Annual Meeting of Brazilian Embryo Technology Society. **Anim. Reprod**, v. 11, n. 3, p. 464, 2014.

CORREA, G. A. et al. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p. 132-42, 2008.

COULDREY, C.; LEE, R. S. DNA methylation patterns in tissues from mid-gestation bovine fetuses produced by somatic cell nuclear transfer show subtle abnormalities in nuclear reprogramming. **BMC developmental biology**, v. 10, p. 27, 2010.

COULDREY, C.; WELLS, D. N. DNA Methylation at a Bovine Alpha Satellite I Repeat CpG Site during Development following Fertilization and Somatic Cell Nuclear Transfer. **PLoS One**, San Francisco, USA, v. 8, n. 2, p. e55153, 2013.

EBISCH, I. M. et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 2, p. 163-74, 2007.

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. **Mol Hum Reprod**, v. 17, n. 2, p. 85-91, 2011.

GEBERT, C. et al. DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics**, v. 94, n. 1, p. 63-9, 2009.

GOOVAERTS, I. G. et al. Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 8, p. 1084-92, 2012.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1509-1520, 2010.]

GUIMARAES, A. L. et al. Effect of insulin-transferrin-selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during in vitro maturation on in vitro bovine embryo development. **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 890-899, 2016.

HAMEL, M. et al. Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 8, p. 548-56, 2010.

HOLM, P. et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285-1299, 1988.

HUANG, Y. Z. et al. Intragenic DNA methylation status down-regulates bovine IGF2 gene expression in different developmental stages. **Gene**, v. 534, n. 2, p. 356-61, 2014.

IKEDA, S. et al. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 313, n. 3, p. 129-36, 2010.

KANEDA, M. et al. Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 365-375, 2017.

KANG, Y. K. et al. Varied patterns of DNA methylation change between different satellite regions in bovine preimplantation development. **Mol Reprod Dev**, v. 71, n. 1, p. 29-35, May 2005.

KATO, Y. et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 19, p. 2272-80, 2007.

KATZ-JAFFE, M. G. et al. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 5, p. 271-7, 2009.

KELLEY, R. L.; GARDNER, D. K. In vitro culture of individual mouse preimplantation embryos: the role of embryo density, microwells, oxygen, timing and conditioned media. **Reprod Biomed Online**, 2017.

KIM, E. S. et al. The effect of folic acid on in vitro maturation and subsequent embryonic development of porcine immature oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 2, p. 120-1, 2009.

KIM, S. et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 72, n. 1, p. 88-97, 2005.

KOYAMA, H. et al. Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. **Reprod Domest Anim**, v. 47, n. 6, p. 921-7, 2012.

KRISHER, R. L. et al. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. **Reprod Fertil Dev**, 2015.

KRISHER, R. L.; SCHOOLCRAFT, W. B.; KATZ-JAFFE, M. G. Omics as a window to view embryo viability. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 333-41, 2015a.

KUSSANO, N. R. et al. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167-76, 2016.

KWONG, W. Y. et al. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 705-15, 2010.

LY, L. et al. Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. **Molec. Hum. Reprod**, v.23, n.7 p. 461–477, 2017.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, 2009.

MATOBA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 839-851, 2010.

MENDONÇA, A.S. et al. Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0142072, 2015.

MONTAG, M.; TOTH, B.; STROWITZKI, T. New approaches to embryo selection. **Reprod Biomed Online**, v. 27, n. 5, p. 539-46,2013.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PERECIN, F. et al. Imprinted gene expression in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetics and Molec. Res.** v. 8, n.1, p. 76-85, 2009.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1131-41, 2005.

SILVEIRA, M.M. et al. DNA methylation profile at a bovine alpha satellite region in placenta of a cloned animal. IN: **62ºAnual Brazilian-International Congress of Genetics**. 11 a 14 de setembro de 2016, Caxambu, MG, Brasil.

STOKES, P. J.; ABEYDEERA, L. R.; LEESE, H. J. Development of porcine embryos *in vivo* and *in vitro*; evidence for embryo ‘cross talk’ *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 284, n. 1, p. 62-71, 2005.

TRUONG, T. T.; SOH, Y. M.; GARDNER, D. K. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. **Human Reproduction**, v. 31, n. 7, p. 1445-54, 2016.

TWIGT, J. M. et al. Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 2, p. E322-9, 2011.

TWIGT, J. M. et al. Preconception folic acid use influences the follicle fluid proteome. **European journal of clinical investigation**, v. 45, n. 8, p. 833-41, 2015.

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

URREGO, R. et al. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in *Bos indicus* blastocysts produced *in vivo* and *in vitro*. **Zygote**, v. 25, n. 2, p. 131-140, 2017.

VAJTA, G. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertil Steril**, v. 101, n. 2, p. 577-86, 2014.

WYDOOGHE, E. et al. Replacing serum in culture medium with albumin and insulin, transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual culture. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 5, p. 717-24, 2014.

WYDOOGHE, E. et al. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, n. 1, p. 505-520, 2015.

YAMANAKA, K. et al. DNA methylation analysis on satellite I region in blastocysts obtained from somatic cell cloned cattle. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho**, v. 82, n. 4, p. 523-30, 2011.

ZHANG, S. et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2017.

CAPÍTULO 3

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA: UM MÉTODO NÃO-INVASIVO

Ana Luiza Silva Guimarães¹, Andrielle Thainar Mendes Cunha², Ligiane de Oliveira Leme¹, Maurício Machaim Franco³, Margot Alves Nunes Dode^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil.

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil.

1. RESUMO

O presente estudo objetivou detectar a quantidade de RNAm de genes candidatos possivelmente associados à competência ovocitária, em biópsias de células do *cumulus* (CC) de ovócitos imaturos e maturados *in vitro* correlacionando com sua capacidade de produzir embriões. Inicialmente, foi avaliado se a biópsia nas CCs poderia afetar a produção de embriões. Os complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) foram distribuídos em cinco grupos: 1) controle (CCOs cultivados em grupos); 2) controle Individual (CCOs cultivados individualmente no sistema de microgotas de 20 μ L); 3) Individual Biópsia Antes (CCOs cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L, submetidos a uma biópsia nas CC antes da maturação *in vitro*- MIV); 4) Individual Biópsia Depois (CCOs cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L, submetidos a uma biópsia nas CC após a MIV) e 5) Individual Biópsia Antes/ Depois (CCOs cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L, submetidos a uma biópsia nas CC antes e após a MIV). Posteriormente, foi avaliado o nível de transcritos dos genes GPC4, PTGS2, LUM, ALCAM, FSHR, PGR, GPX3, SERPINE2, HAS2 e PRDX3, por PCR em tempo-real (qPCR) em biópsias de CCs imaturas e maturadas. As biópsias foram identificadas de acordo com o resultado da produção de embriões individual em microgotas, em: CCOs que formaram blastocisto em D7 (Embrião); CCOs que não clivaram (Não Clivado) e, CCOs que clivaram, mas que não chegaram a blastocisto (Clivado). Os dados de desenvolvimento embrionário e cinética do desenvolvimento foram avaliados por ANOVA e os dados de número total de células e células apoptóticas por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). A produção de embriões em D6 e D7 foi inferior ($P < 0,05$) nos grupos cultivados individualmente do que no controle, entretanto a biópsia não afetou ($P > 0,05$) a produção de blastocistos dos grupos cultivados individualmente. Dos 10 genes avaliados nas

biópsias de CCs, o gene LUM mostrou-se mais expresso ($P=0,02$), enquanto que FSHR mostrou-se menos expresso ($P= 0,09$), ambos em CC maturadas de CCOs que desenvolveram em embrião, comparado ao que não desenvolveu embrião. Conclui-se que a biópsia, não afeta o desenvolvimento embrionário e que a expressão dos genes LUM e FSHR, em CC está associada à capacidade do ovócito de formar embrião e, pode ser utilizada como marcador não invasivo da competência ovocitária.

Palavras chaves: bovino, competência ovocitária, cultivo individual, embrião, expressão gênica, ovócito.

1. ABSTRACT

The present study aimed to quantify the level of mRNA of candidate genes possibly associated with oocyte competence in *cumulus* cells biopsies (CCs) immature and *in vitro* matured from oocyte with high and low developmental potential. Initially, the effect of the CCs biopsy on embryo production was evaluated. The *cumulus* oocyte complexes (CCOs) distributed into five groups: 1) Control (CCOs cultured in groups); 2) Individual Control (individually cultured CCOs in the 20 μ L microdroplets); 3) Individual Biopsy Before (COCs individually cultured in 20 μ L microdroplets, submitted to biopsy in CC before *in vitro* maturation -IVM); 4) Individual Biopsy After (COCs individually cultured in 20 μ L microdroplets, CC biopsied after IVM) and 5) Individual Before/After biopsy (COCs individually cultured in 20 μ L microdroplets, CC biopsied before and after IVM). Then, the levels of GPC4, PTGS2, LUM, ALCAM, FSHR, PGR, GPX3, SERPINE2, HAS2 and PRDX3 transcripts were evaluated by real-time PCR (qPCR) in immature and mature CC biopsies. Each biopsied COCs was individually tracked, by culturing them in a microdroplet, and categorized based on their fate as embryo at blastocyst stage at D7 (Embryo), cleaved and arrested (Cleaved) and not cleaved (Not Cleaved). Data of embryonic development and kinetic of were evaluated by ANOVA and data from total and apoptotic cells number by Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). Embryo production at D6 and D7 was lower ($P > 0.05$) on the groups cultured individually than in the control group. However, biopsy did not affected embryo production on the groups cultured individually. Of the 10 genes evaluated in the CCs biopsies, two genes were differentially expressed. The LUM gene was overexpressed ($P = 0.02$), whereas FSHR was underexpressed ($P = 0.09$), in matured CC from CCOs that developed into embryo compared to those that had not cleaved. It can be concluded that the biopsy does not affect the embryonic development and that the

expression of the LUM and FSHR genes in matured CC is associated with the oocyte's ability to form embryo and can be used as a non-invasive marker for oocyte competence.

Key words: bovine, oocyte competence, individual culture, embryo, gene expression, oocyte

2. INTRODUÇÃO

A eficiência na produção *in vitro* de embriões (PIVE), está ligada à disponibilidade de ovócitos competentes a serem utilizados. Isso porque, somente ovócitos competentes tem a capacidade de realizar uma maturação completa, serem fecundados e suportarem o desenvolvimento embrionário inicial (Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003; Dode *et al.*, 2006; Kussano *et al.*, 2016). Entretanto, a aquisição da competência está relacionada com modificações morfológicas e moleculares ovócitos. Portanto, a capacidade de prever a competência do ovócito apenas por avaliações quanto à morfologia do CCOs por vezes é subjetiva, limitando os resultados obtidos no emprego de técnicas da reprodução.

Para uma correta aquisição de competência, é necessária uma interação do ovócito com as células do *cumulus* (CC). O principal papel desempenhado pela comunicação bidirecional das CCs com o ovócito através das junções gap, é realizar o transporte de aminoácidos, metabólitos e moléculas sinalizadoras que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do mesmo (Paulini e Melo, 2011; Gilchrist *et al.*, 2016). Esta interação é de fundamental importância, uma vez que a remoção das CCs ou o bloqueio das junções gap antes da maturação *in vitro*, resulta em queda significativa da capacidade do ovócito em sustentar o desenvolvimento embrionário (Gilchrist *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2011), demonstrando que essas células são essenciais para a aquisição da competência (Gilchrist *et al.*, 2008; Assidi *et al.*, 2015).

Desta forma, essa íntima ligação estabelecida entre ovócito e CC pode fornecer informações importantes acerca dos processos envolvidos durante a maturação. Além disso, a avaliação molecular de genes expressos nas CC e relacionados a competência ovocitária, pode representar uma alternativa para a identificação de marcadores da competência do ovócito de modo não-invasivo (Assou *et al.*, 2008; Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016).

De fato, vários estudos tem sido realizados utilizando CC para identificar genes marcadores de competência, através de quantificação do nível de transcritos, os quais podem ser avaliados antes ou após a maturação *in vitro* (Hamel *et al.*, 2010; Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017). Desta forma, a avaliação da quantificação de transcritos de genes antes e após a maturação e sua correlação com a produção de embriões pode ser uma ferramenta valiosa para auxiliar o entendimento dos processos que ocorrem durante a maturação.

Para esta avaliação, é necessário o sistema de cultivo individual dos ovócitos, podendo acompanhar qual CCOs deram origem ou não a um embrião. Além disto, é necessário avaliar se a biopsia antes e/ou após a MIV não afeta a produção embrionária a partir dos COCs biopsiados. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo validar genes candidatos a marcadores de competência em CCs provenientes de CCOs que comprovadamente dão ou não origem a embriões.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Ao menos que indicado, os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.1 Delineamento Experimental

4.1.1 Efeito da biópsia das células do cumulus de CCOs de bovinos antes e após a MIV na produção in vitro de embriões

Este experimento teve por objetivo avaliar se a biópsia realizada em CCs de CCOs bovinos antes e/ou após a maturação, afeta a produção *in vitro* de embriões. Para isso, uma biópsia das CCs de CCOs grau I e II, foi removida utilizando escalpe e agulha de insulina. Foram realizadas sete réplicas com um total de 961 CCOs, com 112 biópsias para os grupos antes ou após a maturação e 224 para o grupo submetidos à biópsia antes e após a maturação e distribuídos nos seguintes tratamentos:

- 1) Controle: CCOs maturados, fecundados e cultivados em grupo, sem realização de biópsia;
- 2) Controle Individual sem Biópsia: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L em cada etapa, sem realização de biópsia;
- 3) Individual biópsia antes: CCOs foram submetidos à biópsia e então maturados, fecundados e cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L;

4) Individual biópsia depois: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L e a realização de biópsia após a MIV;

5) Individual biópsia antes e depois: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente em microgotas de 20 μ L em cada etapa, com realização de biópsia antes e após a MIV.

Após a realização das biópsias, as mesmas foram lavadas e armazenadas em tubos de 0,2 μ L e imediatamente utilizadas para a realização da contagem do número de células utilizando o FlowSight[®] Imaging Flow Cytometer (AMNIS, Seattle, WA). Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem e D6 e D7 para taxa de blastocisto e cinética de desenvolvimento. Ao final do cultivo, os embriões no estágio de blastocisto (Bx) foram avaliados, realizando a contagem do número de células e fragmentação de DNA, utilizando o método do TUNEL.

4.1.2 Experimento 2: Quantificação dos níveis de RNAm de genes candidatos em biópsias de células do cumulus de ovócitos bovinos imaturos e maturados de acordo com a capacidade de desenvolvimento embrionário

Esse experimento teve por objetivo identificar os níveis de transcritos de RNAm de genes candidatos para competência ovocitária em células do *cumulus* bovina. De acordo com os resultados obtidos nos experimentos 1, foi realizado nesta etapa a biópsia antes e após a maturação das CCs para posterior análise da expressão gênica. Para isso, foram realizadas 10 réplicas, utilizando um total de 625 CCOs, distribuídos nos seguintes grupos:

1) Controle: CCOs maturados, fecundados e cultivados em grupo, sem realização de biópsia;

2) Controle Individual: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente, sem realização de biópsia;

3) Individual Biópsia: CCOs maturados, fecundados e cultivados individualmente, realizando biópsia em CC antes e após a maturação.

Após a realização das biópsias, as mesmas foram lavadas em PBS e armazenadas em tubos de 0,2 μ l com RNAlater[®] e imediatamente congeladas a -20°C para posterior análise. Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem e D6 e D7 para taxa de blastocisto e cinética de desenvolvimento. Para a etapa de qPCR, as biópsias de CC foram separadas em 3 grupos de acordo com o resultado da PIV: 1) CCOs que formaram

Blastocisto em D7 (Embrião); 2) CCOs que clivaram após a FIV, mas que não chegaram ao estágio de blastocisto (Clivado); 3) CCOs que não clivaram após a FIV (Não Clivado). Foram formados 3 pools de 14 biópsias para os grupos descritos acima.

4.2 Recuperação e Seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados em abatedouros locais de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Imediatamente após o abate, os ovários foram transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/mL e penicilina G - 100 UI/mL) à temperatura de 35-36° C. O tempo de coleta do abate até o momento da aspiração dos folículos foi observado para não exceder o tempo limite de 4 horas. Os CCOs foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de seringa de 10 mL acoplada com agulha descartável de calibre 18 G. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 mL e, após a sedimentação do mesmo, foi retirado 10 mL do líquido folicular sobrenadante, que foi centrifugado por 5 minutos, à 37°C e 700g, e utilizado para procura e seleção dos CCOs. O sedimento contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica. Os ovócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos quatro camadas de células e com citoplasma homogêneo foram selecionados para serem utilizados para a maturação.

4.3 Biópsia de Células do *Cumulus* antes e após a maturação individual de CCOs

Foram realizadas biópsias de células do *cumulus* de CCOs imaturos e maturados, conforme descrito por Bunel *et al.* (2015). Os CCOs foram colocados individualmente em gotas de 50µL de líquido folicular. Uma pequena biópsia das CCs de CCOs grau I e II, foi removida com escalpe e agulha de insulina (Ultra Fine 8,0x0,30 mm Bencton Dickinson, BD[®], NJ, USA). Os CCOs biopsiados foram lavados em meio MIV e colocados para maturar conforme descrito anteriormente. Já para biópsias de CCs de CCOs maturados, após o período de 22-24h de maturação, estes foram submetidos novamente à biópsia. As biópsias de CCs imaturas e maturadas foram lavadas em PBS e armazenadas individualmente em RNAlater (Ambion[®] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a -20°C, até o momento de seu uso (figura 3.1).

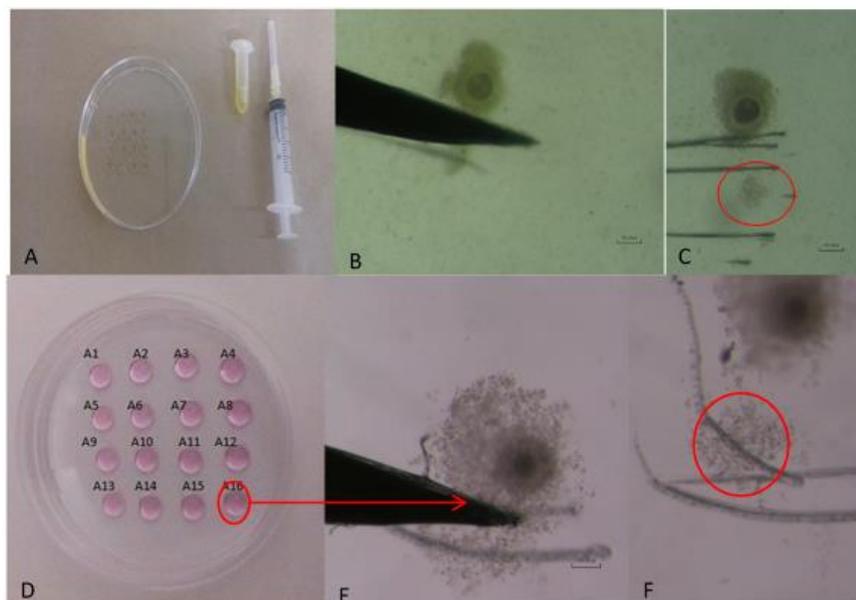


Figura 3.1. A- Disposição de gotas de líquido folicular para realização de biópsia. B- Momento da realização de biópsia em CCO imaturo. C- Biópsia de CCO imaturo. D- Após maturação, CCOs foram submetidos novamente à biópsia. E- Momento da realização da biópsia em CCO maturado. F- Biópsia de CCO maturado.

4.4 Avaliação do Número de Células do *Cumulus* de biópsias imaturas e maduras através da citometria de fluxo.

As avaliações das biópsias de células do *cumulus* imaturas e maturadas foram realizadas por meio de citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas através do software de INSPIRE, AMNIS FlowSight® (AmnisCorp., Seattle, WA, EUA). Foram captados a quantidade de eventos *single cell* disponível em cada momento/grupo. Para isto foi criado um *template* de aquisição próprio para células do *cumulus*, onde apenas eventos compatíveis ao tamanho e emissão de fluorescência para o Hoechst 33342 (bisBenzimide H33342) foram adquiridos. A coloração com o H33342 foi utilizada de acordo com Hallap *et al.*, (2006) para excluir possíveis debris celulares ou sujidades. Para isto, as células foram previamente incubadas por 15 minutos em uma solução tampão contendo H33342 (0,01mg/mL). Os sinais emitidos pelo corante fluorescente Hoechst 33342 foram coletados por excitação a laser de 405 nm a 30 mW. Os resultados obtidos

foram posteriormente analisados com o uso do software IDEAS V5.0 onde a concentração celular de cada amostra foi avaliada.

4.5 Maturação *in vitro*

Imediatamente após a seleção, os CCOs foram transferidos para o meio de maturação, que consistiu de TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com 0,075 mg/mL de amicacina, 10% de SFB, 0,1 mM/mL de cisteamina, 1 µg/mL de L-glutamina, 12UI/mL de LH e 0,01 UI/mL de FSH, em gotas de 200µL com até 30 estruturas, cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®) e, maturados por 22-24 horas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar. Já para o cultivo em microgotas, adotou-se a metodologia descrita por Kussano *et al.*, (2016). No cultivo individual de 20 µL, eram feitas 16 microgotas devidamente identificadas em uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro, imersas em óleo mineral.

4.6 Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Após a MIV a fecundação foi realizada utilizando-se em todas as manipulações, sêmen congelado da mesma partida de touro da raça Nelore, previamente testado para o sistema PIVE do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa/Cenargen. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C em banho-maria, e posteriormente selecionado pelo gradiente de *Percoll* 90% (400µL) e 45% (400µL), preparados em microtubos de 1,5 mL, centrifugado por 5 minutos a 5.400g (Machado *et al.*, 2009). Após esse período, o pellet obtido foi transferido para 1 mL de meio TALP (Parrish *et al.*, 1995) e novamente centrifugado às mesmas condições anteriores. O *pellet* obtido nesta etapa foi ressuspenso em meio de fecundação que consiste de meio TALP suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 mM de epinefrina e 10µg/mL de heparina. O volume a ser adicionado na gota de FIV, foi calculado de acordo com a concentração espermática, motilidade e volume da gota de forma a obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Os ovócitos após serem lavados duas vezes, foram transferidos para gotas de 200 µL de meio de fecundação (grupo controle), cobertas com óleo siliconado onde foram co-incubados com os espermatozoides a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por um período de 18

horas. O dia da inseminação foi considerado como D0. Para o sistema em microgotas de 20 µL, onde o volume a ser utilizado para a inseminação era muito pequeno, foi preparado um volume de 350 µL em que os espermatozoides foram adicionados de forma a manter a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. A partir desse meio contendo os espermatozoides, eram preparadas as microgotas de FIV de 20 µL em que os ovócitos maturados eram adicionados e levados para o co-cultivo.

4.7 Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação, os possíveis zigotos foram lavados duas vezes e transferidos para o meio de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77 mM de mio- inositol, 0,4% de BSA [SOFaaci– (Holm *et al.*, 1988)], e 5mg/mL de insulina, 5.5 mg/mL de transferrina e 5ng/mL de selênio- ITS em gotas de 200µL (grupo controle) cobertas por óleo mineral, incubados em estufa a 38,5°C e com 5% de CO₂ em ar. Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem e em D6, D7 e D8 para a cinética de desenvolvimento e taxa de blastocisto. Para o cultivo em microgotas de 20µL, os prováveis zigotos foram retirados do meio FIV, lavados em meio SOF e transferidos para a nova placa de cultivo contendo 16 microgotas de meio SOF, na mesma posição que ocupavam na placa de fecundação. Os embriões foram avaliados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, e D7 para a cinética de desenvolvimento e taxa de blastocisto.

4.8 Avaliação da qualidade do embrião: número total de células e fragmentação de DNA pelo teste Transferase desoxinucleotidil Terminal dUTP (TUNEL)

Para determinar o número total de células e de células apoptóticas, os embriões em estágio de blastocisto expandido foram submetidos ao teste TUNEL e 3,4 bisbenzimidine (Hoeschst 33342), com o *Kit Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Thermofisher (Waltham, MA, EUA)*. Inicialmente, os embriões Bx foram lavados em PBS suplementado com polivinil pirrolidona (PVP) (1 mg/mL) e posteriormente fixados em paraformaldeído a 3,7% por 15 minutos. Posteriormente, os embriões foram incubados em 0,5% Triton-X durante 20 minutos. Subsequentemente, o grupo controle positivo foi incubado em solução de DNase na concentração de 50 UI/mL enquanto o controle negativo e amostra permaneceram em PBS suplementado com PVP durante meia hora

em câmara úmida à 37°C. Por fim os embriões foram expostos ao mix enzimático TUNEL e Alexa Fluor 488 por 1 hora, à 37°C e, posteriormente, ao Hoeschst 33342 por 10 minutos. Finalmente, os embriões foram lavados com PVP, montados em lâminas de vidro e observados sob um microscópio de fluorescência, usando os filtros para captação de comprimento de onda de 495/519 nm de excitação para Alexa Fluor 488 e 350/461 nm de excitação para Hoeschst 33342. Para cada blastocisto, o número total de células individuais (núcleos azuis, Hoeschst 33342) e o número total de células apoptóticas (núcleos verdes, TUNEL) foram determinados.

4.9 Extração do RNA, produção do cDNA e quantificação dos níveis de transcritos de genes candidatos à competência ovocitária

Os dez genes avaliados foram selecionados (glicana 4 - GPC4, prostaglandina endoperoxidase sintase 2 - PTGS2, receptor de FSH - FSHR, receptor de progesterona - PGR, hialurona sintetase 2 - HAS2, Lumican- LUM, molécula ativadora de leucócito e adesão celular - ALCAM, glutathione peroxidase 3 - GPX3, serpina pertencente à família E membro 2 - SERPINE2, peroxiredoxina 3 - PRDX3) de acordo com a sua função, para serem avaliados pelo qPCR. O qPCR foi realizado em um 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA) usando 3 réplicas biológicas, com pool de 14 biópsias de CCs em cada tratamento/réplica. As biópsias para quantificação dos genes foram obtidas com a mesma metodologia descrita anteriormente. O RNA total foi extraído usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen[®], Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante, com pequenas modificações. O volume total de RNA utilizado para síntese de cDNA, que foi realizada usando SuperScriptIII (200 U/μL, Invitrogen[®]) e primer Oligo-dT (0,5 μg/μL, Invitrogen[®]) em um volume final de 22 μL. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 minutos e 50 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85 °C por 15 minutos.

A análise do qPCR foi realizada usando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (80 – 110%) por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume

final de 25 μ L usando cDNA correspondente a 0,38 biópsia. As condições dos ciclos do PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento a 60 °C por 1 minuto. O nome, a sequência e concentração dos primers, tamanho do amplicon e o número de acesso da sequência no Gene Bank estão listadas na tabela 3.1. O nível de expressão dos três genes constitutivos [Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -Actin (*ACTB*) e Peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*)] foram submetidos ao programa de análise GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), que indicou o *GAPDH* como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$, com correção da eficiência pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 3.1 Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos em pares de base (pb), concentração dos primers em nM e referência de acesso ao *GenBank* para análise do qPCR em tempo real.

Genes	Sequência de Primers	Fragmento Amplificado (bp)	Concentração do Primer (nM)	GeneBank Número de acesso/referência
<i>GAPDH</i>	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2
<i>GPC4</i>	F: TGG TGA ATC CCA CAA CCC AGT GTA R: TCT CAG CCA CCA TCA GCA TAG CAT	192	300	NM_001205784.1
<i>LUM</i>	F: GTC TCC CAG TGT CTC TTC TAA R: GAG ATC CAG CTC CAA CAA AG	179	300	NM_173934.1
<i>PTGS2</i>	F: GAG GAA CTT ACA GGA GAG AAG R: CGG GAG AGC ATA TAG GAT TAC	193	250	NM_174445.2
<i>ALCAM</i>	F: GGA CAG CCT GAA GGA ATT AG R: CCA ATC TGC TTA GTC ACC TC	182	300	NM_174238.1
<i>FSHR</i>	F: GGA TGC CAT CAT CGA CTC TG R: TGA CTC GAA GCT TGG TGA GAA C	133	300	NM_174061
<i>GPX3</i>	F: GCT AGA CCC TTT ACT GTT ACA C R: GTT CCT CTC TGG CAT TCT TC	189	300	NM_174077.4
<i>PGR</i>	F: TCAGGCTGGCATGGTTCTTGG R: CTTAGGGCTTGGCTTTTCGTTTGG	126	300	NM_001205356.1
<i>SERPINE2</i>	F: GAC TCC TTT CCT ACA TCT TTC C R: CAG TAC AGT GTT CCA CCA TC	158	300	NM_174669.2
<i>HAS2</i>	F: GGG TTC TTC CCT TTC TTT CT R: CCA CCC AGC TTT GTT TAT TG	240	250	NM_174079.2
<i>PDRX3</i>	F: GGC AGG AAC TTT GAT GAG AT R: GTG TGT AGC GGA GGT ATT TC	205	300	NM_174643.1

F: primer forward; R: primer reverse

4.10 Análise Estatística

As comparações entre os tratamentos dos resultados obtidos das taxas de blastocisto foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), utilizando teste de Tukey para comparação entre grupos. Os dados relativos à cinética de desenvolvimento embrionário, número total de células e células apoptóticas foram analisados por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Os dados de quantificação da expressão relativa de cada gene foram calculados usando o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl, utilizando o Teste t (Welch-Satterthwaite approximation), ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Valor de $P \leq 0,1$ foi considerado significativo. Todas as análises foram avaliadas utilizando-se o programa Prophet Statistics, versão 5.0 (BBN Systems & Technologies, Cambridge, MA, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS

5.1.1. Experimento 1: Efeito da biópsia das células do cumulus de CCOs de bovinos antes e após a MIV na produção in vitro de embriões

Neste experimento foi avaliado se o momento da realização da biópsia afeta o desenvolvimento embrionário. Os resultados de clivagem em D2 e taxa de blastocistos em D6 e D7 são apresentados na tabela 3.2. Para a taxa de clivagem, os grupos biopsiados antes e/ou após a maturação, apresentaram menor taxa que o grupo controle em grupo, sendo que o grupo controle individual sem biópsia não diferiu do grupo controle em grupo. Em relação a taxa de blastocisto em D6 e D7, os grupos submetidos à biópsia, apresentaram menores taxas que o controle em grupo, sendo semelhante ao grupo controle individual. Para a cinética de desenvolvimento, foi observado que em D6 os COCs submetidos à biópsia apresentavam estágios embrionários semelhantes aos do grupo controle em grupo, tendo uma menor porcentagem de embriões em Bi e B1 do que os demais grupos. Já em D7, não foi observada diferença entre os grupos na velocidade de desenvolvimento. Em relação à contagem de célula, as CC de biópsias obtidas antes e/ou após a maturação, foi observado que os fragmentos de biópsias dos grupos Biópsia Antes (7.751,7 cels./mL) e Biópsia Antes/Após - Imaturo (5.204,8 cels./mL) apresentaram maior concentração de células/mL ($P \leq 0,05$) que os grupos Biópsia Após - Maturado (1.212,1 cels./mL) e Biópsia Antes/Após - Maturado (656,4 cels./mL) (figura 3.2). Quanto ao número de células dos embriões e fragmentação do DNA os resultados estão

apresentados na tabela 3.3. Foi observado que embriões do grupo controle em grupo apresentaram maior número de células do que os grupos controle individual e biopsados antes e/ou após a maturação ($P \leq 0,05$). Para fragmentação de DNA, os grupos submetidos à biópsia antes e antes e após a maturação, apresentaram maior número de células apoptóticas quando comparados aos demais tratamentos.

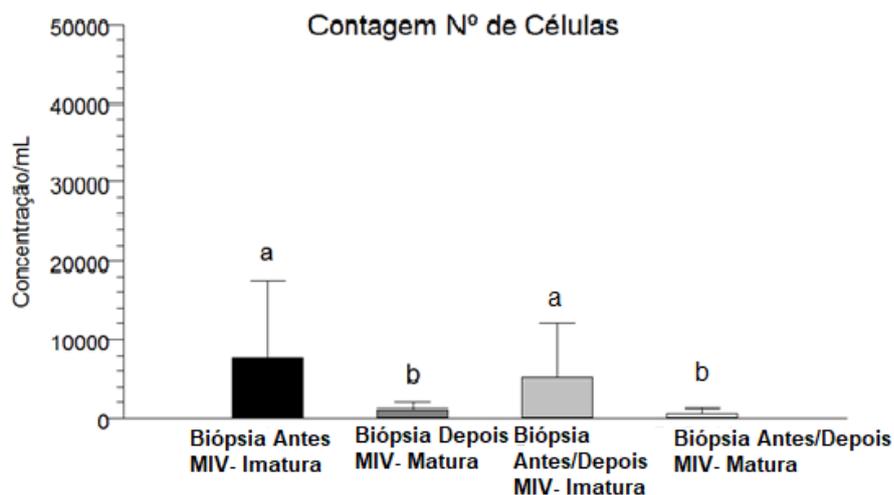


Figura 3.2 Contagem de células do *cumulus* das biópsias obtidas antes e/ou após a maturação, por citometria de fluxo. Gráfico mostra a obtenção da concentração de células por mililitros (mL) nos grupos Biópsia antes da maturação (Imatura); Biópsia após a maturação (Matura) e no grupo onde o mesmo CCO foi submetido à Biópsia antes e após a MIV – (Biópsia Antes/Depois- Imatura e Matura). ^{a,b} letras diferentes nas barras, significam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$). Avaliado por Kruskal-Wallis.

Tabela 3.2 Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), de clivagem em D2, taxa de blastocistos em D6 e D7 de cultivo, dos grupos controle (cultivo em grupo), controle individual sem biópsia e grupos cultivados individualmente e submetidos à biópsia antes e/ou após a maturação

Grupo	N. ovócitos	D2 ($\% \pm DP$)	D6 ($\% \pm DP$)				D7 ($\% \pm DP$)				
			Bi	Bl	Bx	Total	Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total
Controle Grupo	177	135 (76,2\pm5,0)^a	26 (58 \pm 3,2) ^a	13 (29 \pm 2,5) ^a	6 (14 \pm 1,0)	45 (25,4\pm3,2)^a	19 (28 \pm 1,6)	25 (37 \pm 1,5)	24 (35 \pm 8,0)	0 (0)	68(38,4\pm7,8)^a
Controle Individual	112	76 (68\pm17,4)^{a,b}	15 (79 \pm 2,0) ^b	4 (21 \pm 0,6) ^a	1 (5,2 \pm 0,6)	19 (17\pm4,5)^{a,b}	12 (32,4 \pm 4,9)	16 (43,2 \pm 3,0)	9 (24,4 \pm 1,0)	0 (0)	37(33\pm5,1)^{a,b}
Individual Biópsia.Antes	112	63 (56,2\pm8,5)^b	11 (84,7 \pm 2,1) ^b	2 (15,3 \pm 0,6) ^b	0(0)	13 (11,6\pm4,5)^b	9 (29 \pm 1,2)	16 (52 \pm 3,5)	6 (19 \pm 1,0)	0 (0)	31 (28\pm4,2)^b
Individual Biópsia Depois	112	70 (62,5\pm7,1)^b	13 (93 \pm 4,1) ^b	2 (12,5 \pm 1,1) ^b	1 (6,25 \pm 0,6)	16 (14,2\pm4,9)^b	6 (21,6 \pm 0,6)	15(53,5 \pm 3,0)	7 (25 \pm 0,7)	0 (0)	28 (25\pm4,3)^b
IndividualBiópsia.Antes/Depois	112	67(60\pm4,0)^b	7 (58,4 \pm 1,0) ^a	3 (25 \pm 0,8) ^a	2 (16,6 \pm 1,1)	12 (11\pm3,0)^b	13 (45 \pm 1,1)	9 (31 \pm 0,6)	7(24 \pm 2,3)	0 (0)	29 (26\pm3,5)^b

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Taxa de blastocisto por ANOVA ($P \leq 0,05$). Cinética de desenvolvimento por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be).

Tabela 3.3 Número total de células (média ± DP) e média de células apoptóticas (média ± DP) de embriões em estágio de blastocisto expandido em D7, oriundos de CCOs submetidos à biópsia antes e/ou após a maturação, comparado ao grupo controle em grupo e controle individual (CCOs sem biópsia).

Tratamentos	Nº de células (média ± DP)	Nº de células apoptóticas (média ± DP)
Controle Grupo	134 ±24,8 ^a	5,0 ±2,7 ^a
Controle Individual	118 ±18,1 ^b	4,5 ±2,7 ^a
Individual Biópsia antes	113 ±20,2 ^b	7,6 ±3,2 ^b
Individual Biópsia depois	119,2 ± 19,3 ^b	6,7 ±3,1 ^a
Individual Biópsia antes/depois	115,5 ±19 ^b	8,7 ±3,4 ^b

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Avaliado por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

5.1.2 Experimento 2: Quantificação dos níveis de RNAm de genes candidatos em biópsias de células do cumulus imaturas e maturadas de ovócitos bovinos com capacidade de desenvolvimento embrionário.

Quando foi analisado o desenvolvimento de CCOs que foram submetidos à biópsia antes e após a maturação, observou-se que a mesma não afetou ($P>0,05$) a produção de embriões em relação ao grupo controle cultivado individualmente (tabela 3.4). Entretanto, foi identificado uma redução na taxa de blastocisto nos grupos cultivados individualmente em relação aos COCs cultivados em grupo. Quanto à cinética de desenvolvimento em D6, os grupos cultivados individualmente apresentaram mais embriões em estágio de Bi do que o grupo controle cultivado em grupo, não sendo encontrado diferença na velocidade de desenvolvimento em D7.

Tabela 3.4 Estágio de desenvolvimento de embriões bovinos, expressos em número (N), porcentagem \pm desvio padrão ($\% \pm DP$), da clivagem em D2, taxa de blastocistos em D6 e D7, cultivados individualmente e submetidos à biópsia antes e depois da maturação (BAD), comparados com o grupo controle.

Grupo	N. ovócitos	D2 ($\% \pm DP$)	D6 ($\% \pm DP$)				D7 ($\% \pm DP$)				
			Bi	Bl	Bx	Total	Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total
Controle	305	252(82,6\pm27,7)^a	33 (32 \pm 3,6) ^a	35 (34 \pm 3,6)	35 (34 \pm 4,1)	103 (33,7\pm4,1)^a	24 (20,6 \pm 2,6)	31 (26,7 \pm 3,1)	61 (52,5 \pm 7,3)	2 (1,7 \pm 0,9)	116(38,0\pm29,5)^a
Controle Individual	160	100(62,5\pm14,4)^b	30 (79 \pm 7,5) ^b	8 (21 \pm 2,6)	0 (0)	38 (23,7\pm14,4)^b	14 (28,5 \pm 3,4)	12 (24,4 \pm 1,1)	19 (38,7 \pm 4,1)	4 (8,1 \pm 1,3)	49 (30,6\pm7,5)^b
Ind BAD	160	98 (61,2\pm21,9)^b	14 (42,4 \pm 2,8) ^a	18 (54,5 \pm 3,6)	1 (3 \pm 0,6)	33 (20,6\pm8,8)^b	13 (48,2 \pm 1,9)	15 (32,7 \pm 5,2)	18 (39,1 \pm 3,4)	0 (0)	46 (28,7\pm9,6)^b

a,b Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Taxa de blastocisto por ANOVA ($P \leq 0,05$). Cinética de desenvolvimento por Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be)

A quantidade de RNAm para os 10 genes selecionados variou de acordo com os grupos. A abundância relativa de transcritos do gene LUM foi maior ($P = 0,02$) nas CCs maturadas de ovócitos que geraram blastocisto, comparado com o grupo de ovócitos que não clivaram. Para o gene FSHR foi observado uma diminuição ($P = 0,09$) em CCs maturadas de ovócitos que formaram embriões quando comparadas ao grupo que clivaram, mas não formaram embriões (figura 3.3).

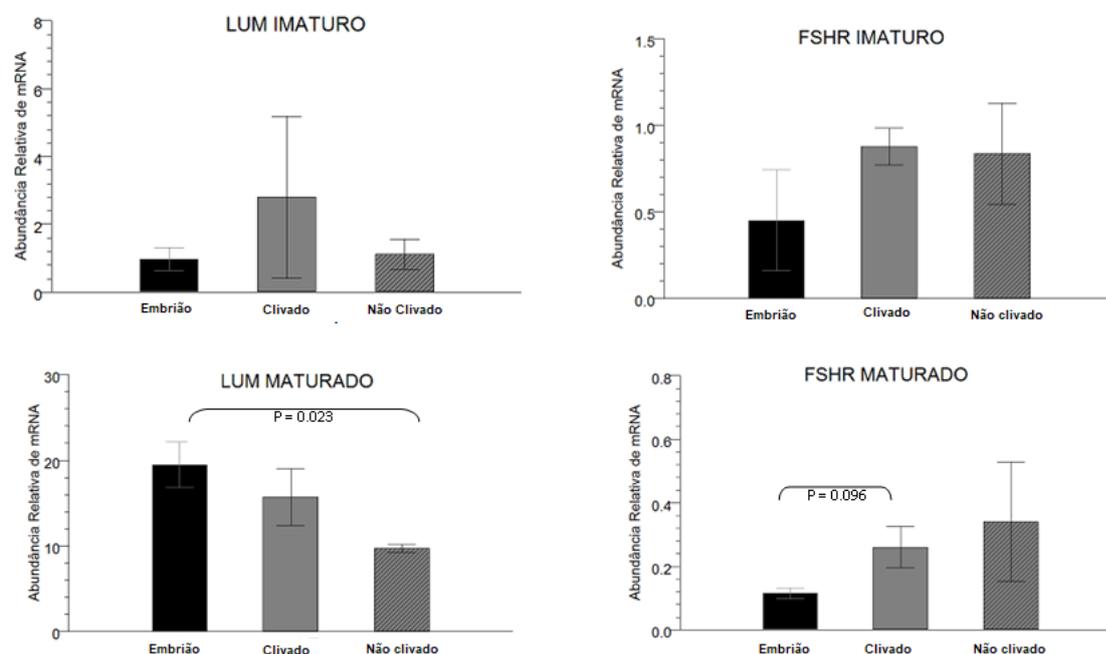


Figura 3.3. Nível de transcritos dos genes LUM e FSHR analisados por qRT-PCR de biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (imaturas) e após a MIV (maturadas) de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 14 amostras e avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média±EP.

Em relação aos genes ALCAM, SERPINE2, HAS2, PTGS2, PGR e PRDX3, nenhuma diferença foi observada no nível de transcritos entre os grupos que chegaram a embrião e os que não clivaram, apenas entre os grupos maturados e imaturos (figura 3.4).

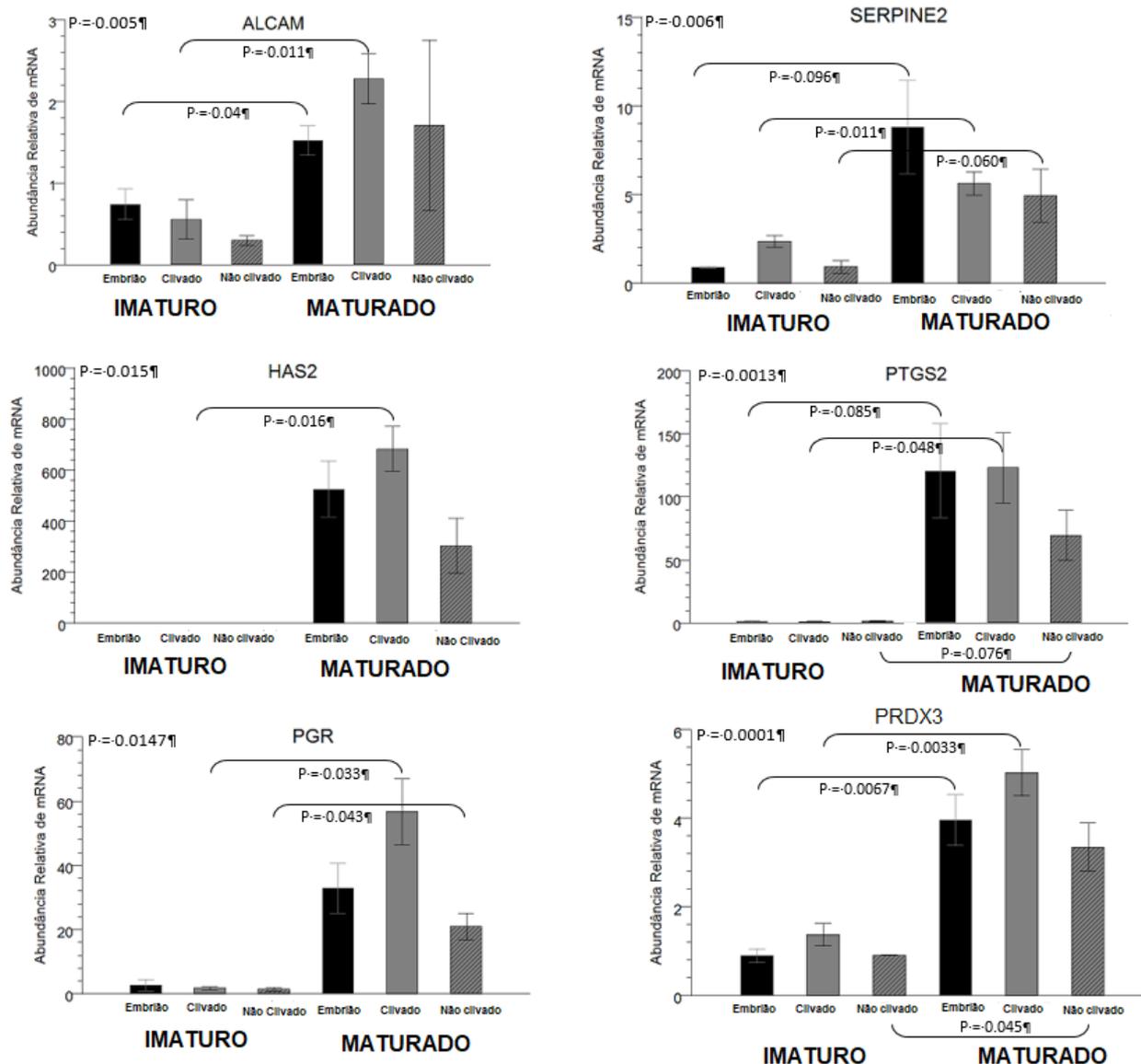


Figura 3.4 Nível de transcritos dos genes ALCAM, SERPINE 2, HAS2, PTGS2, PGR, E PRDX3, analisados por qRT-PCR de biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (imaturas) e após a MIV (maturadas) de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Os dados são referentes à média \pm EP.

Em relação aos genes GPC4 e GPX3, não foi observado diferenças no nível de transcritos quanto à formação de embriões ou em relação aos grupos de CCs imaturas e maturadas (figura 3.5).

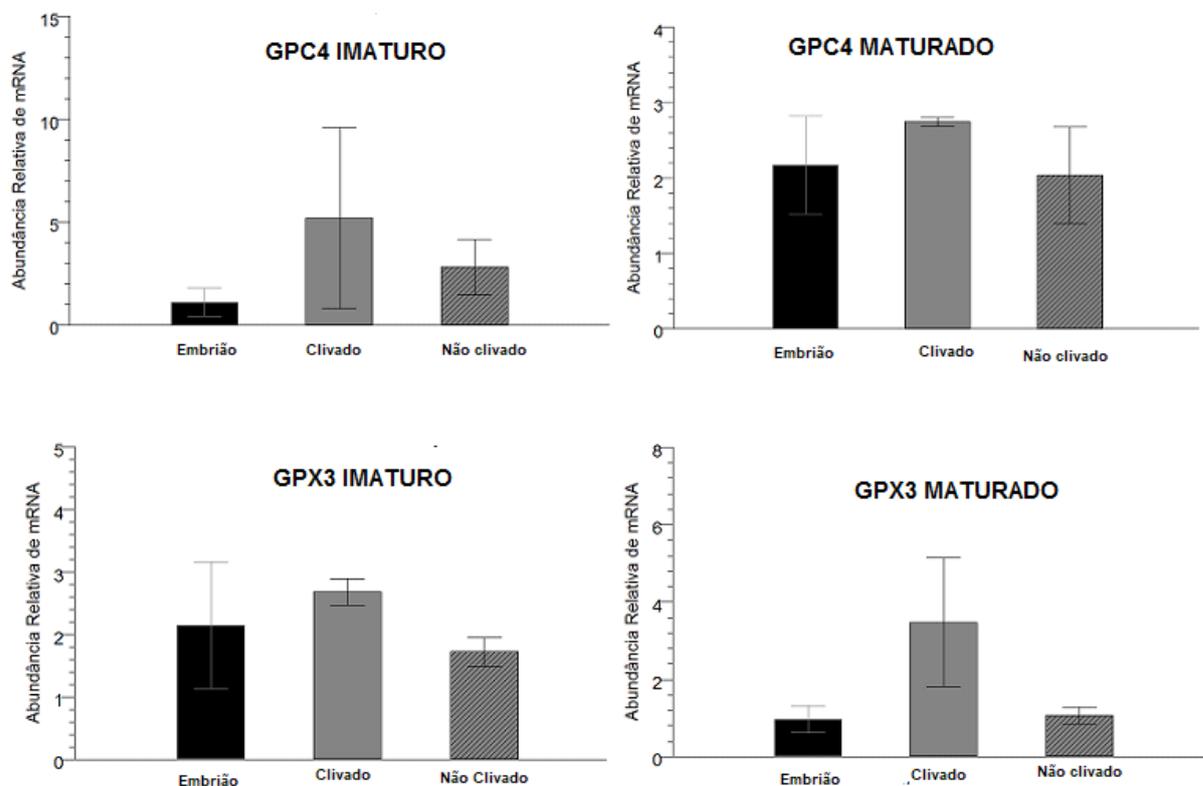


Figura 3.5 Nível de transcritos dos genes GPC4 e GPX3, analisados por qRT-PCR em biópsias de células do *cumulus* bovinas obtidas antes (Imaturo) e após (Maturado) a MIV, provenientes de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (EMBRIÃO), CCOs que clivaram, mas não chegaram a blastocisto (CLIVADO) e CCOs que não clivaram (NÃO CLIVADO). Cada grupo possuía 14 amostras e foram avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média \pm EP.

5.2 DISCUSSÃO

A competência ovocitária é adquirida de forma gradual, sendo resultado de interações entre ovócitos e células foliculares (Sirard *et al.*, 2006; Krisher, 2013). As células do *cumulus* são células somáticas que mantêm uma mútua relação com o ovócito e estão envolvidas no suporte da maturação e aquisição da competência (Sasseville *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2014). Portanto, a validação de genes marcadores nas células do *cumulus* para competência ovocitária é uma alternativa para selecionar ovócitos mais competentes de modo não invasivo.

Apesar de vários estudos já realizados para validação e/ou identificação de possíveis genes marcadores de competência em células do *cumulus*, existem algumas lacunas sobre o comportamento de genes em CC imaturas e maturadas. Desta forma, este estudo propõe validar alguns genes para competência ovocitária em biópsias de CCOs, correlacionando a sua capacidade de formar ou não embriões.

No primeiro experimento foi verificado o efeito da biópsia nas CCs antes e/ou após a maturação no desenvolvimento embrionário. Isso porque, relatos de trabalhos que utilizaram biópsia de CCs antes e após a maturação são escassos. Inicialmente, foi verificado o número de células obtido por biópsias de CCs no citômetro de fluxo, onde foi possível observar que biópsias de CCs de CCOs imaturos possuíam concentração maior de células do que em biópsias provenientes de COCs maturados. Essa variação pode ser devido a forma de realização da biópsia ou do estágio de maturação, que difere entre CCOs.

Em relação ao desenvolvimento embrionário, foi identificado que os grupos de cultivo individual com biópsia realizada antes e/ou após a maturação não afetou o desenvolvimento embrionário, quando comparado ao mesmo sistema de cultivo individual sem a biópsia. Entretanto, os grupos biopsiados apresentaram menores taxas de blastocisto em relação ao grupo controle com COCs cultivados em grupo. Considerando que resultados da taxa de blastocisto em cultivo individual em bovinos apresentam resultados variáveis (Vajta *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2005; Matoba *et al.*, 2014; Wydooghe *et al.*, 2014), acredita-se que o resultado obtido seja devido ao fato de embriões cultivados em grupo compartilham fatores produzidos para si e para os embriões vizinhos, importantes para os mecanismos de regulação de estresse oxidativo e para o

desenvolvimento embrionário, enquanto que esse efeito benéfico no cultivo individual é perdido (Gardner *et al.*, 2013; Wydooghe *et al.*, 2014; Wydooghe *et al.*, 2015). Os resultados obtidos semelhantes ao encontrado por Kussano e colaboradores (2016), que observaram uma redução nas taxas de blastocistos do cultivo individual em microgotas de 20 μ L e realização de biópsia nas CC de CCOs imaturos. Da mesma forma, Matoba *et al.*, (2010), utilizando diferentes sistemas de cultivo individual, encontraram uma produção de blastocisto inferior ao tratamento cultivo em grupo. Wydooghe *et al.* (2014), observaram através da análise do número total de células e células apoptóticas que o cultivo individual de CCOs bovinos produziram embriões de qualidade inferior quando comparados à CCOs cultivados em grupo. Entretanto, Bunel e colaboradores (2015), não observaram diferenças para o grupo cultivado individualmente em relação aos CCOs cultivados em grupo.

O segundo experimento teve por objetivo validar genes marcadores para a competência ovocitária em biópsias de CCs de CCOs que se desenvolveram ou não em embrião. Neste trabalho, diferentemente dos relatos na literatura, foi quantificado o nível de transcritos de genes candidatos à competência em biópsias de CC imaturas e maturadas e sua correlação com o desenvolvimento embrionário. O gene LUM apresentou maior ($P = 0,02$) quantidade de transcritos nas CCs maturadas de ovócitos que chegaram a blastocisto, comparado com o grupo de ovócitos que não clivaram. O gene FSHR apresentou maior ($P = 0,09$), quantidade de transcritos em CCs maturadas de ovócitos que clivaram, mas não formaram embriões. Os genes PTGS2, ALCAM, PGR, PDRX3, SERPINE2 e HAS2, a quantificação de RNAm diferiu apenas entre as CC maturadas e imaturas, enquanto que os genes GPC4 e PTX3, nenhuma diferença no nível de transcritos foi observada.

Dentre os genes avaliados, o LUM apresentou maior expressão em CC após a maturação de CCOs que clivaram e originaram embriões, comparado ao grupo que não obteve desenvolvimento embrionário. O gene LUM desempenha papel importante na regulação da matriz extracelular, importante no processo de expansão das células do *cumulus* e maturação do ovócito e também pode estar envolvido no processo de proliferação celular, migração, apoptose e angiogênese (Kao *et al.*, 2006). Mamo e colaboradores (2011), avaliando o nível de transcritos do gene LUM em ovócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*, observaram aumento progressivo na quantidade de RNAm desse gene após a retomada da meiose, sendo encontrado maior nível de

expressão após a maturação. Entretanto, Bunel et al. (2015) encontraram um aumento no nível de transcritos desse gene em biópsias de CC imaturas, de CCOs cultivados individualmente e que clivaram e não desenvolveram embrião. Uma possível razão para esta diferença é que os folículos utilizados para obtenção dos CCOs, pertencem à uma classe heterogênea de folículos, podendo estar em fase de recrutamento ou atresia, o que poderia influenciar nos graus de competência do ovócito.

Em relação à quantidade de RNAm do gene FSHR, foi possível observar que houve uma redução no nível de transcritos desse gene, no grupo das CC de CCOs que desenvolveram embrião, comparado ao grupo que não desenvolveu embrião, em CC maturadas. O FSHR é altamente expresso em CC imaturas e é fundamental para maturação de ovócitos (Kawashima *et al.*, 2008) e sua expressão diminui junto com a progressão da meiose de ovócitos bovinos, seja *in vitro* ou *in vivo* (Salhab *et al.*, 2011). Dejak e colaboradores (2012), avaliaram o nível de transcritos de FSHR em CCs humanas, correlacionado com seu estágio de maturação, onde observaram que a expressão de FSHR em CCs imaturas foi maior do que em CCs maturados. Outros estudos conduzidos com CC humanos avaliando o gene FSHR e sua ligação com a formação inicial embrionária (Dia 3 de desenvolvimento), não foi encontrado diferença no nível de transcritos do gene FSHR em CC de ovócitos que geraram ou não embrião, não sendo possível afirmar se este gene pode ou não realmente ser um marcador de qualidade do CCO que resulta em embrião (Feuerstein *et al.*, 2007; Ekart *et al.*, 2013). A aquisição do FSHR é essencial para as ações da FSH, pois *in vivo*, à medida que o folículo chega em sua fase final de crescimento, há uma inibição parcial da sua liberação. Talvez isso possa explicar os níveis menores de FSHR detectados em CC de CCOs que originaram embrião. Portanto, espera-se que o nível de transcritos de FSHR nas CC de CCOs competentes sejam mais abundantes (Caixeta *et al.*, 2009), e que na progressão da meiose, ocorra uma diminuição gradativa de seus níveis.

Neste trabalho ainda foi possível observar que os níveis de transcritos dos genes ALCAM, PTGS2, PGR, HAS2, SERPINE2 e PRDX3, estão envolvidos com a maturação. Resultados semelhantes são encontrados na literatura (Feuerstein *et al.*, 2007; Assidi *et al.*, 2010; Gebhardt *et al.*, 2011; Ekart *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; McNatty e Pitman, 2016; Brown *et al.*, 2017). Porém, nenhuma correlação foi observada para as CC de CCOs que originaram embrião dos que apenas clivaram ou não clivaram. Já para os

genes GPC4 e GPX3, nenhuma diferença foi observada, seja em relação ao estágio da maturação ou capacidade de gerar embrião.

Um gene marcador não invasivo para competência deve indicar aqueles ovócitos que têm competência para o desenvolvimento e os que não têm potencial para se desenvolverem. Essa diferenciação é o passo mais importante para a identificação de uma identificação precoce no cultivo embrionário. Entretanto, é sugerido que os resultados obtidos podem ser influenciados por vários fatores, como tamanho do folículo utilizado (Bessa *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2017), condições de cultivo e composição do meio (Salhab *et al.*, 2011), que podem ser refletidos nos estudos dos níveis de transcritos de gene candidatos à competência.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a biópsia de células do *cumulus* de COCs antes e/ou após a maturação gera menores taxas de blastocisto em relação ao cultivo de COCs em grupo. Entretanto, a taxa de blastocisto é semelhante entre os COCs cultivados individualmente com ou sem biópsia.

Além disto, foi validada a expressão diferencial dos genes LUM e FSHR em biópsias de células do cumulus de ovócitos maturados que deram origem a embriões em D7, podendo os mesmos serem utilizados como marcadores não invasivos de competência ovocitária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 835-52, 2010.

ASSIDI, M.; MONTAG, M.; SIRARD, M. A. Use of both cumulus cells' transcriptomic markers and zona pellucida birefringence to select developmentally competent oocytes in human assisted reproductive technologies. **BMC genomics**, v. 16 Suppl 1, p. S9, 2015.

ASSOU, S. et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 12, p. 711-9, 2008.

BESSA, I. R. et al. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 5, p. 781-9, 2013.

BROWN, H. M. et al. Failure to launch: aberrant cumulus gene expression during oocyte in vitro maturation. **Reproduction**, v. 153, n. 3, p. R109-R120, 2017

BUNEL, A. et al. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 228-37, 2015.

CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

DIAS, F. C. et al. Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 149, n. 1-2, p. 80-9, 2014.

DEVJAK, R. et al. Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47106, 2012.

DODE, M. A. et al. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 3, p. 288-97, 2006.

EKART, J. et al. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 2930-42, 2013.

FEUERSTEIN, P. et al. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3069-3077, 2007.

GARDNER, D. K. et al. Human and mouse embryonic development, metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient in vitro. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 49-61, 2013.

GEBHARDT, K. M. et al. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 96, n. 1, p. 47-52, 2011.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, 2004.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, 2008.

GILCHRIST, R. B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. 143-157, 2016.

HALLAP et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v.65, n.6, p.1122-36, 2006.

HAMEL, M. et al. Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 8, p. 548-56, 2010.

HOLM, P. et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285-1299, 1988.

KAO, W. W. et al. Focus on molecules: lumican. **Experimental eye research**, v. 82, n. 1, p. 3-4, 2006.

KAWASHIMA, I. et al. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. **Reproduction**, v. 136, n. 1, p. 9-21, 2008.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual review of animal biosciences**, v. 1, p. 393-417, 2013.

KUSSANO, N. R. et al. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167-76, 1 2016.

LI, S. H. et al. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 93, 2015.

LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n. 3, p. 369-78, 2003.

LUCIANO, A. M. et al. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-1259, 2011.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, 2009.

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v.12, p.151-165, 2011.

MATOBA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 839-851, 2010.

MATOBA, S. et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 2, p. 337-45, 2014.

MCNATTY, K. P.; PITMAN, J. L. Methods of selection of mammalian oocytes. **United States Patent Application Publication**: p. 1-4, 2016.

MELO, E. O. et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal genetics**, v. 48, n. 1, p. 19-29, Feb 2017.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 2, p. 354-61, 2011.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1131-41, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

SALHAB, M. et al. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence,

cumulus apoptosis and progesterone secretion. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 90-104, Jan 01 2011.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 2, p. 415-25, 2009.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-36, 2006.

VAJTA, G. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

VAMDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, vol. 3, n. 7, p.1-12, 2002.

WYDOOGHE, E. et al. Replacing serum in culture medium with albumin and insulin, transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual culture. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 5, p. 717-24, 2014.

WYDOOGHE, E. et al. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, n. 1, p. 505-520, 2015.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biol Reprod**, v. 80, n. 5, p. 1072-80, May 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente vários estudos estão sendo conduzidos com o intuito estabelecer parâmetros que identifiquem ovócitos competentes, pois as técnicas de reprodução assistidas disponíveis, como por exemplo, a produção *in vitro* de embriões, depende da qualidade dos ovócitos disponíveis. Nesse contexto, as células do *cumulus* por manter uma íntima ligação com o ovócito e exercerem um papel fundamental para maturação e desenvolvimento da competência ovocitária, podem fornecer informações relevantes sobre a qualidade do ovócito.

Considerando o avanço já obtido na identificação dos genes marcadores para competência, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um sistema de obtenção de biópsias, agregado ao cultivo individual que permitisse obter respostas de quais genes foram mais ou menos expressos em ovócitos que desenvolveram ou não em embriões. Portanto, foi proposto testar diferentes formas de cultivo individual na PIVE; Realizar algumas melhorias no meio de cultivo embrionário por meio de uso de antioxidantes; Avaliar o efeito da biópsia nas CCs, e validar genes marcadores de competência ovocitária.

Quando testamos diferentes tipos de cultivo individual (*Cell Tak* e microgotas de 20 μ L), observamos que o grupo *Cell Tak* apresentou menor taxa de clivagem e menor produção de embriões em D7 e D8 de desenvolvimento embrionário em relação ao grupo controle e microgotas de 20 μ L. Para um segundo momento, foi proposto, o uso de ácido fólico em diferentes concentrações (0, 10, 20, 50 e 500 μ M), onde o grupo 500 μ M

apresentou uma redução nas taxas de clivagem em relação aos demais. Nesses embriões foi avaliado o se o ácido fólico afetaria o padrão de metilação.

A avaliação da região α - Satélite, mostrou que os grupos controle, 20 μ M e 500 μ M possuíam um padrão de metilação similar, que era hipometilado. Já para a região do éxon 10 do gene IGF2, observamos que o ácido fólico foi capaz de modificar o padrão de metilação de embriões dos grupos 20 μ M e 500 μ M, mais metilado em relação ao controle; Estes achados são importantes pois permitiram observar que esse padrão encontrado no presente estudo se assemelha aos padrões observados em estudos anteriores aos de embriões produzidos *in vivo*. Quanto ao uso de ácido fólico e ITS, isolados ou associados durante o cultivo individual, somente no grupo individual na presença de ITS a produção de embriões foi semelhante ao cultivado em grupo.

Por fim, avaliamos a quantificação de genes candidatos à competência em biópsias de CCs imaturas e maturadas e sua ligação com CCOs capazes de desenvolvimento embrionário. Dentre 10 genes avaliados, apenas os genes LUM e FSHR foram diferencialmente expressos, ambos em CC maturadas de CCOs que desenvolveram em embrião, comparado as do grupo que não desenvolveu embrião, podendo ser utilizados como marcadores não invasivos da competência ovocitária.

Apesar de esforços em estabelecer mais informações acerca da competência ovocitária, não foi possível validar um maior número de genes correlacionados com a capacidade do ovócito em desenvolver-se em embrião. Acredita-se que fatores como como tamanho do folículo utilizado, condições de cultivo e composição do meio podem influenciar nos estudos acerca de gene candidatos à competência. Portanto, mais estudos acerca da validação de genes candidatos à competência são necessários.