

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA CLONAGEM NA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO  
X E DA REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO METABOLISMO DA  
METIONINA NA QUALIDADE OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ALLICE RODRIGUES FERREIRA

Botucatu - SP

Julho/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA CLONAGEM NA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO  
X E DA REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO METABOLISMO DA  
METIONINA NA QUALIDADE OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ALLICE RODRIGUES FERREIRA

Tese apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Roberto Sartori Filho

Co-Orientador: Pesq.Dr.Maurício Machaim Franco

Nome do Autor: Allice Rodrigues Ferreira

Título: **EFEITOS DA CLONAGEM NA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E DA REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO METABOLISMO DA METIONINA NA QUALIDADE OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Ph.D. Roberto Sartori Filho  
Presidente e Orientador  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Ph.D. Milo Charles Wiltbank  
Membro  
Dairy Science  
University of Wisconsin-Madison, EUA

---

Prof<sup>a</sup>.Ph.D. Margot Alves Nunes Dode  
Membro  
Laboratório de Reprodução Animal  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Prof.Dr. José Buratini Jr  
Membro  
Departamento de Fisiologia  
Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu

---

Prof.Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 01 de Julho de 2013.

*Dedico a quem me fez acreditar que chegar aqui seria possível...  
Ao meu orientador Maurício Machaim Franco.*

*(“Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez.” Jean Cocteau)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por essa conquista. Pois foi Ele, a minha bússola e o meu combustível.

À minha família, alicerce de sustentação. Pelo apoio, amor e companheirismo. Obrigada por tudo que fizeram por mim, pela ajuda, companhia e paciência. Pai, mãe e irmã...vocês são tudo para mim!

Ao Giovani, por seu amor e dedicação. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Há quatro pessoas, além da minha família, que gostaria de agradecer de forma especial. Durante esta fase final de Doutorado mostraram ser verdadeiros amigos. Para eles, não havia hora de acordar, nem de deitar...não havia motivo para um abraço ou para uma conversa. E hoje, reconheço o quanto foram e são essenciais. Obrigada pela amizade sincera: Isabela (Isinha do...), Nayara (Tabajara), Thiago (Tchirica) e Chico (vulgo Vladinis).

Às minhas amigas que estão sempre presentes em minha vida, mesmo longe me apoiaram com palavras de carinho e estímulo: Anna, Robertha, Juliana, Viviane e Priscilla. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

Ao George, pelo apoio e companheirismo durante estes anos de estudos longe de casa.

Ao meu co-orientador Dr. Maurício Machaim Franco. A você dediquei este trabalho, pois não tenho palavras para agradecer o quanto me ajudou a crescer pessoalmente/profissionalmente durante esses anos. Por acreditar que sou capaz. Obrigada por levantar minha cabeça, por entender minhas "crises" e quase sempre me dar razão, mesmo sabendo que nem sempre merecia ter. Admiro muito seu trabalho, a sua inteligência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Sartori, pela oportunidade e pelas sugestões que sempre engrandeceram meu trabalho. Pela oportunidade dada de ter estudado em uma excelente Instituição sob sua orientação, um profissional que sempre admirei. Agradeço por ter aberto as portas, juntamente com o Dr. José Buratini, para concretização do meu Doutorado Sanduíche.

A Dra Margot, sempre prestativa. Agradeço pelas orientações, sugestões e críticas sempre muito construtivas. Obrigada por todos esses anos de “co-orientação”, sem dúvida ajudou muito na minha formação como profissional.

À Minha segunda família, meus amigos de Brasília, estagiários e alunos. Não posso descrever como sentirei falta de cada momento do dia ao lado de vocês. Guardo todos em meu coração. Já sinto saudades: Zezim (companheiro de viagens e de perrengues), Rosana, Ju, Grazi, Andrei, Mateus, Ana Luíza, Andrielle, Anelise, Mirelinha, Andressa, Thaís, Tais, Zezão, Carolle, Heitor, Eleonora, Gilberto, Ligi, Sidney, Oscar.

Ao Chivas, pela disponibilidade em ajudar, sempre. Agradeço por sua amizade e estímulo.

Esterzinha, por ter me recebido e me feito companhia durante o ano que morei em Botucatu. Obrigada por tudo que fez por mim. Sou eternamente grata.

Aos amigos que fiz em Botucatu, saudades do tempo vivido com vocês! Moram no meu coração: Fernanda Zinsly, Du, Camila, Eduardo, Rosiara, Carol. Obrigada pelas ajudas, pelas saídas para distrair, pelas rizadas!

Ao PhD Kevin D Sinclair, por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Nottingham. Uma experiência única.

A Maria Giovanna, querida amiga Italiana. Um anjo que apareceu em Nottingham para me fazer companhia, e permanecerá para sempre em minha vida.

Aos estagiários, Luiz Fernando e Enoque, e pós-graduanda Anelise. Obrigada pelo carinho, empenho e dedicação. Sem vocês nada poderia ter acontecido.

A equipe de funcionários da fazenda Sucupira: Eduardo, Falamansa, Sidney, Weber, Zequinha, Pelé, Urias, Adolfo, Eurípedes e Arlindo. Foram fundamentais para realização do meu experimento. Obrigada pela dedicação de todos! Pelo almoço da D. Mara, pelo cuidado da D. Lia. O tempo vivido perto de vocês foi muito prazeroso.

A equipe que me ajudou na parte laboratorial: Zezão, Mateus, Ligi, Margot, Urias. E na parte de aspiração e coleta: Bianca, Ivo, Zezão. Agradeço pela dedicação e tempo dispensado em me ajudar.

A empresa GENEAL Genética e Biotecnologia Animal S/A.

Ao Instituto Sabin através do Núcleo de Apoio à Pesquisa, pela realização das dosagens sanguíneas.

Agradeço aos pesquisadores da Embrapa e parceiros pela ajuda no delineamento do experimento de nutrição: Davi (Kemin industries, Inc.), Roberto Guimarães (Embrapa Cerrados), Ivo Pivato, Ricardo Alamino, Margot Dode, Eduardo Melo e Bianca Damiani e Regivaldo.

Aos membros titulares da banca: Dr José Buratini Júnior, Dra Margot Dode, Dr João Ferreira, Dr Milo, por aceitarem o convite.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Botucatu, pela gentileza e boa vontade em ajudar, sempre.

À Kemin industries, Inc. pelo fornecimento de DL- metionina (MetiPEARL™) e hidrocloreto de colina (CholiPEARL™).

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2010/07971-3) através da bolsa de estudos concedida.

À UNESP pelo curso oferecido, e aos ótimos professores da Pós-Graduação.

À EMPRAPA pela oportunidade de realização dos experimentos e pelo financiamento, assim como ao CNPq.

*“De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando  
A certeza de que é preciso continuar  
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de  
terminarmos.  
Devemos fazer da interrupção um caminho novo,  
Da queda uma dança  
Do medo uma escada  
Do sonho uma ponte  
Da procura um encontro”.*

*Fernando Sabino (O Encontro)*



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Reprogramação epigenética na gametogênese e embriogênese inicial.....	6
2.1.1 Reprogramação epigenética em embriões produzidos por transferência nuclear	11
2.2 Reprogramação epigenética e nutrição.....	14
CAPÍTULO 2	
Trabalho Científico: “Caracterização da expressão alelo-específica do gene MAO-A e inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e por transferência nuclear” .....	23
RESUMO .....	24
INTRODUÇÃO.....	25
RESULTADOS.....	27
Experimento 1.....	27
Experimento 2.....	30
DISCUSSÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
Experimento 1- Expressão alelo-específica para o gene MAO-A em embriões produzidos <i>in vivo</i>	
Extração de DNA e genotipagem do gene MAO-A.....	40
Coleta de embriões.....	41

Micromanipulação para biópsia embrionária.....	42
Sexagem embrionária.....	42
Extração de RNA e Transcrição Reversa.....	43
RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A.....	43
Sequenciamento do gene MAO-A.....	44
Experimento 2- Expressão alelo-específica para o gene MAO-A em embriões produzidos por transferência nuclear	
Coleta de ovários, seleção de ovócitos e maturação <i>in vitro</i> .....	44
Desnudação e seleção de ovócitos para TN.....	45
Cultivo de células somáticas.....	45
Transferência nuclear.....	46
Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	46
Separação da massa celular interna e trofoblasto.....	47
Extração de RNA e Transcrição Reversa.....	47
RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A.....	47
ANÁLISE DOS DADOS.....	48
AGRADECIMENTOS.....	48
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 3	
Trabalho Científico: “Efeitos dos diferentes níveis de enxofre e cobalto da dieta sobre parâmetros bioquímicos do ciclo da metionina, expressão gênica e viabilidade de ovócitos bovinos”.....	59
RESUMO.....	60
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
Animais.....	63
Dieta.....	63
Análises Bioquímicas.....	66

Aspiração folicular e manipulação de ovócitos.....	67
Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	68
Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos (MIV).....	68
Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	68
Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIV).....	69
Extração de RNA total e Transcrição Reversa.....	69
Expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	70
Forma de Análise dos Resultados.....	71
RESULTADOS.....	72
Peso corporal e Consumo diário de alimentos.....	72
Perfil metabólico no plasma.....	74
Dados da aspiração, quantidade de ovócitos e produção embrionária.....	77
Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	79
DISCUSSÃO.....	80
AGRADECIMENTOS.....	86
DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES.....	87
LITERATURA CITADA.....	87
DISCUSSÃO GERAL.....	93
CONCLUSÕES GERAIS.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	110

## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 1- Fenotipagem pó RT-PCR-RFLP do gene MAO-A e sequenciamento.....	30
Tabela 2- Frequência alelo-específica do gene MAO-A na massa celular interna e trofoblasto de biópsias de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear.....	30
Tabela 3- Expressão alelo-específica para o gene MAO-A na massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF) obtidos a partir de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear.....	31
CAPÍTULO 3	
Tabela 1- Composição química da cana-de-açúcar e mineral premix.....	66
Tabela 2- Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) .....	71
Tabela 3- Composição e consumo das dietas experimentais.....	73
Tabela 4- Efeito da dieta -S-Co nos níveis de metabólitos do ciclo de um carbono, IGF-I, Insulina e Glicose na circulação periférica.....	74
Tabela 5- Efeito da dieta +Met+Col nos níveis de metabólitos do ciclo de um carbono, IGF-I, Insulina e Glicose na circulação periférica.....	75
Tabela 6- Comparações múltiplas para o nível sanguíneo de ácido fólico, B12, IGF-I e Glucose nos diferentes tempos.....	76
Tabela 7- Efeitos das dietas no número total de ovócitos por animal, recuperados por <i>ovum pick up</i> .....	78
Tabela 8- Comparações múltiplas para o número de folículos aspirados e número de ovócitos totais nos diferentes tempos de OPU.....	78
Tabela 9- Percentagem de embriões produzidos in vitro, nos dias 7 e 8 de desenvolvimento com relação ao número de ovócitos totais, número de blastocistos totais e blastocistos eclodidos.....	78

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Figura 1- Ciclo de um carbono e metabolismo da colina.....	16
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Figura 1- Gel de agarose 2,5 % corado combrometo de etídeo, mostrando dados da fenotipagem para o gene MAO-A.....	28
Figura 2- Cromatograma de parte da sequência do gene MAO-A em embriões em estágio de mórula (Mc) e em MCI (M) e TF (T) de blastocisto expandido (Bx).....	30
Figura 3 - Gel de agarose 2,5 % representativo mostrando os resultados da RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A na massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF) de embriões produzidos por transferência nuclear.....	31
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Figura 1- A figura mostra o fornecimento de dieta para os animais.....	65
Figura 2- Gráfico mostrando o peso ( $\pm$ DP) dos animais (n=10 por grupo) durante todo o período que a dieta foi fornecida.....	73
Figura 3- Abundância relativa de mRNA dos genes MAT2B e DNMT1 determinado pelo método de RT-PCR e normalizado utilizando os genes GAPDH e $\beta$ -actina em células do cumulus de ovócitos aspirados de animais dos grupos controle e -S-Co. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP.....	79
Figura 4- Ciclo de um carbono esquematizando acúmulo de homocisteína...	82
Figura 5- Ciclo de um carbono esquematizando a deficiência de B12.....	83

FERREIRA, A.R. **EFEITOS DA CLONAGEM NA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E DA REGULAÇÃO NUTRICIONAL DO METABOLISMO DA METIONINA NA QUALIDADE OVOCITÁRIA EM BOVINOS**. Botucatu, 2013. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar a expressão alelo-específica do gene monoamina oxidase de tipo A (MAOA), presente no cromossomo X e sujeito a inativação, em embriões produzidos *in vivo* e por transferência nuclear (TN). Para análise foram utilizadas biópsias da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF) dos embriões; 2) Avaliar se a carência de S e Co (Grupo -S-Co) na dieta, ou a suplementação com Metionina e Colina encapsuladas (Grupo +Met+Col) afetaria os níveis bioquímicos sanguíneos de componentes do ciclo da metionina e do metabolismo de glicose, expressão de genes ligados ao ciclo de um carbono em células do cumulus, qualidade ovocitária e taxa de embriões. Foram oferecidas três dietas com níveis diferentes de Co e S para novilhas da raça Nelore, alocadas em 10 animais/grupo. Após 3 meses de dieta os folículos ovarianos das novilhas foram aspirados semanalmente durante 7 semanas. Para a ICX, nos embriões *in vivo* detectou-se a presença dos dois alelos, tanto na MCI quanto no TF. Da mesma forma, encontrou-se a expressão dos dois alelos do gene MAO-A em embriões TN, mas com uma prevalência da detecção do alelo A comparado ao G na MCI e no TF. Nenhuma diferença foi encontrada entre +Met+Col e o grupo controle. O grupo -S-Co teve diferença do grupo controle para homocisteína (13,7 vs. 10,6;  $p < 0,001$ ), ácido fólico (29,6 vs. 26,0;  $p = 0,011$ ), B12 (143,8 vs. 165,6;  $p < 0,001$ ), IGF-I (375,3 vs. 410,2;  $p = 0,034$ ), e glicose (82,2 vs. 76,2;  $p = 0,003$ ). Os genes MAT2B e DNMT1 foram menos expressos no grupo - S-Co comparado ao controle quando normalizados pelos genes endógenos GAPDH (MAT2B  $p = 0,05$ ; DNMT1  $p = 0,03$ ) e  $\beta$ -Actina (MAT2B  $p = 0,06$ ; DNMT1  $p = 0,01$ ). As novilhas do grupo -S-Co produziram menor número de ovócitos por animal comparado ao grupo controle (13,81 vs 17,79;  $p = 0,0438$ ), sem diferença para a produção embrionária.

**Palavras-chave:** gametogênese, inativação do cromossomo X, metilação, metabolismo, metionina.

FERREIRA, A.R. **EFFECTS OF CLONING ON THE X CHROMOSOME INACTIVATION AND EFFECTS OF NUTRITIONAL REGULATION OF THE METHIONINE CYCLE ON OOCYTE QUALITY IN BOVINES.** Botucatu, 2013. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

The objectives of this study were: 1) to assess allele-specific expression of the monoamine oxidase type A (MAO-A) gene, which is located on the X chromosome, in inner cell mass (ICM) and trophoblast (TF) of embryos produced *in vivo* and by somatic cell nuclear transfer (SCNT); 2) to evaluate the influence of different levels of dietary sulfur (S), cobalt (Co), methionine and choline on the blood plasma levels of homocysteine, folic acid, B12, IGF-I, glucose and insulin; oocyte and *in vitro* embryo production; and the expression of genes codifying key enzymes of the one-carbon cycle and DNA methylation in cumulus cells. Three diets with different levels of Co, S, methionine and choline were given for Nellore heifers (n=10 per group). Regards to the MAO-A expression, both alleles were detected in *in vivo* and by SCNT produced embryos both in ICM and TF. However, a higher frequency of the mono-allelic expression of a specific allele was observed in SCNT embryos. No differences were found between the +Meth+Chol and control groups. The -S-Co group differed from the control in homocysteine levels (13.7 vs. 10.6;  $p<0.001$ ), folic acid levels (29.6 vs. 26.0;  $p=0.011$ ), B12 levels (143.8 vs. 165.6;  $p<0.001$ ), IGF-I levels (375.3 vs. 410.2;  $p=0.034$ ), and glucose levels (82.2 vs. 76.2;  $p=0.003$ ). The MAT2B and DNMT1 genes were expressed less in the -S-Co group compared to the control when normalized by the GAPDH (MAT2B  $p=0.05$ ; DNMT1  $p=0.03$ ) and  $\beta$ -Actin (MAT2B  $p=0.06$ ; DNMT1  $p=0.01$ ) endogenous genes. Heifers from the -S-Co group produced lower numbers of oocytes per animal compared to the control group (13.81 vs. 17.79;  $p=0.0438$ ), but no differences were observed in embryo production.

**Keywords:** gametogenesis, X chromosome inactivation, methylation, metabolism, methionine.

## **CAPÍTULO 1**



## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de várias biotecnologias de reprodução como: inseminação artificial (IA); superovulação, coleta e transferência de embriões (TE); produção *in vitro* de embriões (PIVE); e clonagem por transferência nuclear (TN), pode contribuir enormemente com os programas de melhoramento animal (FRANCO e MELO, 2006) e de conservação de raças naturalizadas em risco de extinção. De acordo com Viana (2012), o Brasil detém a maior produção de embriões bovinos produzidos *in vitro* do mundo. Com a utilização dessas técnicas, consegue-se um incremento muito grande na multiplicação animal quando comparado ao sistema tradicional. Apesar do grande aumento na taxa embrionária conseguido com essas tecnologias, sua eficiência ainda é muito baixa. Exige-se hoje uma busca contínua pelo aperfeiçoamento destas técnicas, tornando prioritária a prospecção de marcadores moleculares para qualidade de ovócitos e embriões. A PIVE e a clonagem ainda não possuem uma eficiência satisfatória, tendo como possível causa as etapas de reprogramação epigenética, principalmente no âmbito da clonagem.

Com relação à PIVE, a taxa de blastocisto varia de 25 a 50% e a taxa de concepção de 30 a 50%. Vários fatores podem afetar a eficiência dessas técnicas, como a qualidade da nutrição e o estado corporal da doadora de ovócitos; a manipulação dos ovócitos e embriões; as condições ambientais *in vitro*, principalmente a composição dos meios de cultivo, pois comprometem a qualidade do ovócito (DODE, 2006).

Para obter um ovócito de qualidade, capaz de ser fecundado e gerar um embrião, se faz necessária uma correta reprogramação epigenética. Entender essa reprogramação e os efeitos da nutrição sobre ela é essencial para o desenvolvimento e adaptação de novos protocolos de maturação de ovócitos e cultivo de embriões *in vitro*. Além disso, abre possibilidades de se estabelecer dietas nutricionais específicas para doadoras de ovócitos, objetivando a obtenção de gametas de melhor qualidade. Isso nos possibilitará almejar melhores índices de sucesso na produção *in vitro* de embriões, otimizando os custos de produção de embriões e conseqüentemente popularizando o uso dessa tecnologia a todos os produtores.

A maioria dos embriões clonados é eliminada na fase uterina e os poucos que se desenvolvem a termo mostram uma alta incidência de anormalidades epigenéticas como, por exemplo, um incorreto processo de inativação do cromossomo X (ICX) (XUE et al., 2002; NOLEN et al., 2005). A ICX representa um dos maiores paradigmas da epigenética, sendo um evento herdável através das divisões celulares (LUCIFERO et al., 2004), equalizando a expressão gênica entre os sexos (HEARD e DISTECHE, 2006), e conhecido como mecanismo de compensação de dose (LYON, 1961). O padrão de inativação do cromossomo X pode ser usado como um marcador molecular para a qualidade embrionária em sistemas de produção *in vitro* de embriões, sendo um evento epigenético, a ICX está suscetível a interferências do meio, como as condições de maturação e o próprio cultivo *in vitro* (KATARI et al., 2009).

Em um experimento realizado previamente em nosso Laboratório (FERREIRA et al., 2010), o padrão de expressão do gene MAO-A, um gene localizado no cromossomo X e “desligado” no processo de ICX (BENJAMIN et al., 2000; XUE et al., 2002; STABELLINI et al., 2009), foi estabelecido com o objetivo de se compreender o processo de ICX em embriões bovinos produzidos *in vitro*. A ICX é determinada por eventos epigenéticos como a metilação de DNA e as alterações das histonas, podendo ser susceptível a condições ambientais como a nutrição e o próprio cultivo *in vitro*. Logo, torna-se candidato a marcador para avaliar a qualidade embrionária, considerando ser o maior evento epigenético que acontece durante o desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos.

Portanto, baseando-se no fato de que é necessário que ocorra uma correta reprogramação epigenética para a formação de gametas e embriões viáveis, e há possibilidade de ser susceptível a variações ambientais como nutrição, manipulação e cultivo *in vitro*, realizamos dois experimentos. O objetivo do primeiro trabalho foi caracterizar o padrão de ICX avaliando a expressão alelo-específica do gene MAO-A em embriões produzidos *in vivo* e por TN. No segundo experimento buscamos testar o efeito da nutrição sobre a qualidade ovocitária, avaliando se a carência de enxofre e cobalto na dieta afetaria os níveis bioquímicos sanguíneos de componentes do ciclo da metionina e do metabolismo de glicose, expressão de genes codificadores de enzimas do ciclo de um carbono em células do cumulus, qualidade ovocitária e taxa de embriões.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Reprogramação Epigenética na Gametogênese e Embriogênese Inicial

Durante o desenvolvimento do feto, por volta da terceira semana de gestação, nascem do endoderma do saco vitelino, as células germinativas primordiais, que migram para as gônadas em desenvolvimento e sofrem extensiva proliferação celular e quando chegam aos cordões sexuais primários, sofrem diferenciação e são chamados de ovogônias que posteriormente dão origem aos ovócitos ou espermatogônias, dando origem aos espermatozóides (SADEU et al., 2006).

Uma vez formadas, as ovogônias entram no processo de meiose e diferenciam-se em ovócitos primários (AERTS e BOLS, 2008), que ficam retidos na prófase I da primeira divisão meiótica ou estágio de vesícula germinativa e, permanecem deste modo até pouco antes da ovulação. Em seguida, por estímulos hormonais retomam a meiose até o estágio de metáfase II da segunda divisão meiótica (WANG e SUN, 2007) e termina seu processo de divisão meiótica caso seja fertilizado, culminando com a formação do ovócito haploide fecundado, num processo conhecido como ovogênese (FAIR et al., 2003).

As células germinativas são as únicas células que sofrem meiose, e são responsáveis pela transmissão da informação genética e epigenética para a próxima geração de indivíduos (COMBES E WHITELOW, 2010).

Durante o processo de ovogênese, as informações requeridas para um desenvolvimento embrionário inicial normal são transcritas, traduzidas e armazenadas sob a forma de RNAm, ou proteína (ALLARD et al., 2005), e vai diminuindo durante o crescimento do folículo e ovócito, de forma que no momento da ovulação, o ovócito do folículo pré-ovulatório, basicamente cessa sua produção de transcritos (DE LA FUENTE e EPPIG, 2001).

Um evento de extrema importância para o ovócito e embrião é a reprogramação epigenética que estas células precisam sofrer para a fecundação e a formação de um embrião viável. Sabe-se que essa reprogramação refere-se a modificações programadas do genoma e deve ser plenamente estabelecida durante a gametogênese e embriogênese e regulam a atividade dos genes sem alteração da seqüência primária de DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (REIK., 2007; WANG et al., 2010).

Em mamíferos, umas das mais estáveis modificações epigenéticas é a metilação do DNA, e seu estabelecimento e a manutenção de seus padrões constituem um papel crucial na regulação da expressão gênica, no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X, e no desenvolvimento embrionário normal (REIK et al., 2001). Essa modificação epigenética ocorre na formação do gameta, nas células germinativas, onde os padrões de metilação são apagados e um aumento global de metilação do DNA ocorre durante o crescimento e diferenciação do ovócito e espermatozóide (KAGEYAMA et al, 2007), e no desenvolvimento embrionário, quando após a fecundação, o zigoto sofre uma intensa desmetilação e apaga, com exceção dos genes imprinted, praticamente todo o padrão de metilação parental herdado. Ocorre então a metilação *de novo* durante desenvolvimento embrionário inicial, determinando os padrões de metilação do embrião (MANN e BARTOLOMEI, 2002).

Os genomas do espermatozoide e do ovócito estão transcricionalmente inativos e altamente metilados antes da fecundação (BESTOR, 2000). Em camundongos, após quatro horas da fecundação, o genoma do espermatozoide é ativamente desmetilado, enquanto no genoma do ovócito acontece de maneira passiva, durante as sucessivas clivagens devido à remoção da DNMT1 do núcleo, após o estágio de

duas células, até oito-16 células (SASAKI e MATSUI, 2008). Em bovinos, a desmetilação também ocorre logo após a fecundação (DEAN et al., 2001). Esse processo de desmetilação do genoma no início do desenvolvimento só ocorre para regiões metiladas não *imprinted*. Os genes *imprinted* permanecem com o seu padrão de metilação advindo dos gametas, apesar do estado hipometilado em que se encontra o genoma (REIK e WALTER, 2001).

Em camundongos, a metilação *de novo* ocorre no estágio de blastocisto na MCI, enquanto o trofoblasto é praticamente desprovido de metilação, sugerindo um papel importante na diferenciação das linhagens celulares (SANTOS et al., 2002). Em bovinos acontece no estágio de oito-16 células, concomitante com a ativação do genoma embrionário (MAALOUF et al., 2008).

Ambas, as modificações pós-traducionais de histonas e o padrão de metilação do DNA, são fundamentais para a regulação da expressão gênica, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico e modificação da cromatina (REIK et al., 2001).

A S-adenosilmetionina (SAM), é o substrato precursor essencial para o fornecimento de grupos metil no processo de metilação de DNA (JAENISCH e BIRD, 2003). O ciclo da metionina desempenha um papel importante nos processos de metilação do DNA, sendo transportada ativamente para os ovócitos e convertida em S-adenosilmetionina (MENEZO et al., 1989). As vitaminas B12, B6, ácido fólico (B9) e colina também podem influenciar os níveis de metilação do DNA através da sua participação no ciclo de metionina (VAN DEN VEYVER, 2002).

Em células de mamíferos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em citosinas de dinucleotídeos CpG e é catalisada por duas classes importantes de DNA metiltransferases. A DNMT1, que age como metiltransferase de manutenção na fase S de replicação celular (CHUANG et al., 1997; LI et al., 1992) e as DNMT3a e

DNMT3b, que são responsáveis principalmente pela metilação global *de novo*, que estabelece um novo status de metilação de DNA depois da implantação (OKANO et al., 1999). A DNMT2 e DNMT3L são membros da família das DNMTs, mas não apresentam atividade de metiltransferases (OKANO et al., 1998; AAPOLA et al., 2000). A enzima DNMT3L pode regular a metilação do DNA de genes matematicamente *imprinting* através da interação com DNMT3a e DNMT3b (BOURC'HIS et al., 2001; HATA et al., 2002). Pouco se conhece sobre a expressão da DNMT2, embora sua expressão já tenha sido observada em embriões de bovinos (LONG et al., 2006).

A vulnerabilidade de embriões na fase pré-implantacional devido à perturbação epigenética foi demonstrada em várias espécies, incluindo humanos, ratos, ovinos e bovinos. Tanto o meio de cultivo do embrião, quanto a nutrição da doadora, podem influenciar o padrão de metilação do DNA de regiões específicas do genoma, causando conseqüências no desenvolvimento embrionário (YOUNG et al., 2001; MANN et al., 2004; WATERLAND e JIRTLE, 2004). Sendo um evento epigenético, a ICX está suscetível a interferências do meio, como as condições de maturação e o próprio cultivo *in vitro* (KATARI et al., 2009).

A inativação de um cromossomo X em fêmeas equaliza a expressão gênica entre os sexos. Em mamíferos placentários, a inativação do cromossomo X afeta o cromossomo X paterno ou materno de uma maneira aleatória durante o desenvolvimento embrionário, sendo que o estado inativo é herdado de forma estável, gerando adultos de dois tipos celulares (HEARD e DISTECHE, 2006). Ou seja, nestes indivíduos, devido à escolha ao acaso do cromossomo X a ser inativado em cada célula somática, o organismo como um todo é um mosaico dos produtos gênicos ligados ao X.

A iniciação do processo de inativação do cromossomo X é dependente de um *locus* denominado centro de inativação do cromossomo X (CIX) (RUSSEL, 1963). O evento inicial que ocorre no CIX é a transcrição do gene XIST (*X Inactivation-Specific Transcript*), com o acúmulo de seu RNA sobre o cromossomo X a ser inativado (PENNY et al., 1996). Outro gene importante nesse processo é o TSIX, um transcrito *antisense* do gene XIST, que está envolvido na inativação aleatória e *imprinting* do X (DEBRAND et al., 1999). É expresso em células não diferenciadas antes da inativação e parece opor-se à expressão de XIST em *cis* (HEARD et al., 2001), inibindo fisicamente a transcrição do XIST pela interferência no recrutamento de RNA polimerase (LUIKENHUIS et al., 2001; STAVROPOULOS et al., 2001).

Em marsupiais a ICX é *imprinting*, onde o Xp é escolhido para a inativação (COOPER et al., 1971). Em humanos, a inativação aleatória parece ocorrer em ambos, tecido embrionário e extra-embrionário (MELLO et al., 2010). No entanto, em camundongos, a espécie mais estudada, a ICX é inicialmente *imprinting* (TAKAGI E SAZAKI, 1975), silenciando o Xp a partir do estágio de 4-8 células seguido pela ICX aleatória na MCI (NAVARRO et al., 2008, 2010; OKAMOTO et al., 2004). Esta segunda onda, que inativa aleatoriamente, é acompanhada de eventos como inibição dos fatores de pluripotência como *Nanog*, *Oct4/Pou5f1* e *Sox2*, ativação de *Xist* por fatores de competência ligados ao X sensível à inativação como *Rnf12*, e regulação aleatória monoalélica de *Xist* via seu transcrito *antisense*, *Tsix*. (ESCAMILLA-DEL-ARENAL et al., 2011).

Em coelhos e humanos, a ICX parece ser mais tardia do que camundongos (OKAMOTO et al., 2011), além disso o *Xist* parece não ser responsável pelo *imprinting*; isto pode ser justificado pelo fato de que em camundongos seja necessário devido ao rápido desenvolvimento pré-implantacional (OKAMOTO et al., 2005). A

maior diferença entre estas três espécies é que para coelhos e humanos a expressão de Xist é alta em ambos os cromossomos na maioria dos blastômeros, o que é raramente observada em camundongo *in vivo*. Esta expressão de Xist nos dois cromossomos em coelhos tem consequências na expressão gênica, a ICX se inicia em ambos os cromossomos concomitantemente e depois rapidamente esta situação se resolve para uma inativação aleatória. Em humanos embora expresse Xist em ambos os cromossomos, a ICX somente começa depois do estágio de blastocisto (OKAMOTO et al., 2011).

De La Fuente et al. (1999), trabalhando com embriões bovinos produzidos *in vitro*, sugerem que a inativação ocorra por volta do estágio de blastocisto.

Em um experimento realizado recentemente em nosso laboratório com embriões bovinos produzidos *in vitro*, foi caracterizado pela primeira vez o processo de inativação do cromossomo X nesta espécie (FERREIRA et al., 2010). Neste trabalho mostrou-se que o Xm estava ativo e o Xp inativo em mórula, sendo que o Xp foi novamente reativado no estágio seguinte, de blastocisto.

### **2.1.1 Reprogramação Epigenética em Embriões Produzidos por Transferência Nuclear**

Bourc'his et al. (2001) relataram alterações no padrão de metilação do DNA de embriões bovinos de quatro e oito células produzidos por transferência nuclear. Dean et al. (2001), em seus achados com embriões clones, notaram que tanto o processo de desmetilação passiva quanto o de metilação *de novo* não aconteceram nos mesmos padrões dos embriões normais. Dean et al. (2001) observaram que, no estágio de blastocisto, o estado de metilação das células da MCI estava relativamente



normal, enquanto as células do trofoblasto encontravam-se anormalmente hipermetiladas.

A metilação de histonas está vinculada à configuração da cromatina e influencia processos relacionados à transcrição e reparo do DNA (STEWART et al., 2005). A metilação da H3K9, por exemplo, está relacionada à repressão da cromatina e é suficiente para induzir a repressão da transcrição, também está relacionada com a formação do pró-núcleo paterno e ativação do DNA genômico (PARK et al., 2007). O estado de metilação da lisina 9 da H3 também mostrou um padrão semelhante, com altos níveis de metilação no trofotoderma do blastocisto de bovinos clones (SANTOS et al., 2003).

Além disso, os animais clones frequentemente apresentam anormalidades, como alterações no desenvolvimento placentário e fetal e morte perinatal (YOUNG et al., 2003), que são típicas de alterações em genes *imprinted*. Um padrão de desmetilação aberrante poderia levar à perda de marcações *imprinted* em regiões do DNA onde geralmente são mantidas estas marcas, como, por exemplo, na diferenciação dos tecidos na linhagem germinativa, onde não se sabe se todas as células do tecido em formação irão manter estas marcas (REIK e WALTER, 2001). Defeitos epigenéticos descritos em animais clones incluem erros no processo de inativação do cromossomo X (XUE et al., 2002), no *imprinting* genômico (MANN et al., 2003), no padrão de metilação do DNA em genes específicos e em sequências repetitivas (BOURC'HIS et al., 2001), no padrão de acetilação e metilação de histonas (SANTOS et al., 2003), bem como alterações generalizadas na expressão gênica (HUMPHERYS et al., 2002).

A literatura mostra que o processo de ICX em embriões clones apresentam algumas aberrações (XUE et al., 2002; NOLEN et al., 2005). Em embriões bovinos

produzidos por TNCS, a desmetilação passiva é pouco eficiente, e uma desmetilação ativa pode acontecer tardiamente, no desenvolvimento pré implantacional (BOURC'HIS et al., 2001). No estágio de mórula os núcleos dos blastômeros encontram-se altamente metilados, semelhante aos das células somáticas doadoras, já diferenciadas (BOURC'HIS et al., 2001).

Normalmente, a ICX em embriões clones parece ser aleatóriária na MCI, apresentando falhas no padrão *imprinting* na placenta. Alguns trabalhos mostraram falhas na expressão de genes ligados a placenta localizados no cromossomo X, com uma inativação preferencial do X inativo da célula doadora (SENDA et al., 2004; NOLEN et al., 2005).

Uma ampla análise transcricional de embriões clones revelou uma diminuição específica e recorrente da expressão de genes ligados ao cromossomo X e à persistência da expressão de Xist (gene responsável pelo início do processo de ICX) no cromossomo X ativo (INOUE et al., 2010). A inibição da função de Xist antes do estágio de mórula restaurou a expressão de genes ligados ao cromossomo X e aumentou o desenvolvimento implantacional e pós implantacional em embriões clones em mais de oito vezes (INOUE et al., 2010; MATOBA et al., 2011).

Nolen et al. (2005) mostraram que embriões TNCS de camundongos, podem reativar o cromossomo X silenciado, embora a reativação possa ser incompleta. No entanto, observaram um número significativo de anomalias em todas as fases de desenvolvimento, incluindo a falta de um cromossomo X inativo em algumas células de blastocistos TNCS e ausência de XCI *imprinting* em blastocistos e placentas em fase avançada (NOLEN et al., 2005).

## 2.2 Reprogramação Epigenética e Nutrição

Os animais ingerem vários tipos de nutrientes através da dieta que podem afetar as funções fisiológicas, incluindo a formação dos ovócitos e dos embriões pré-implantação (SINCLAIR et al., 2007; ASHWORTH et al., 2009; KWONG et al., 2010).

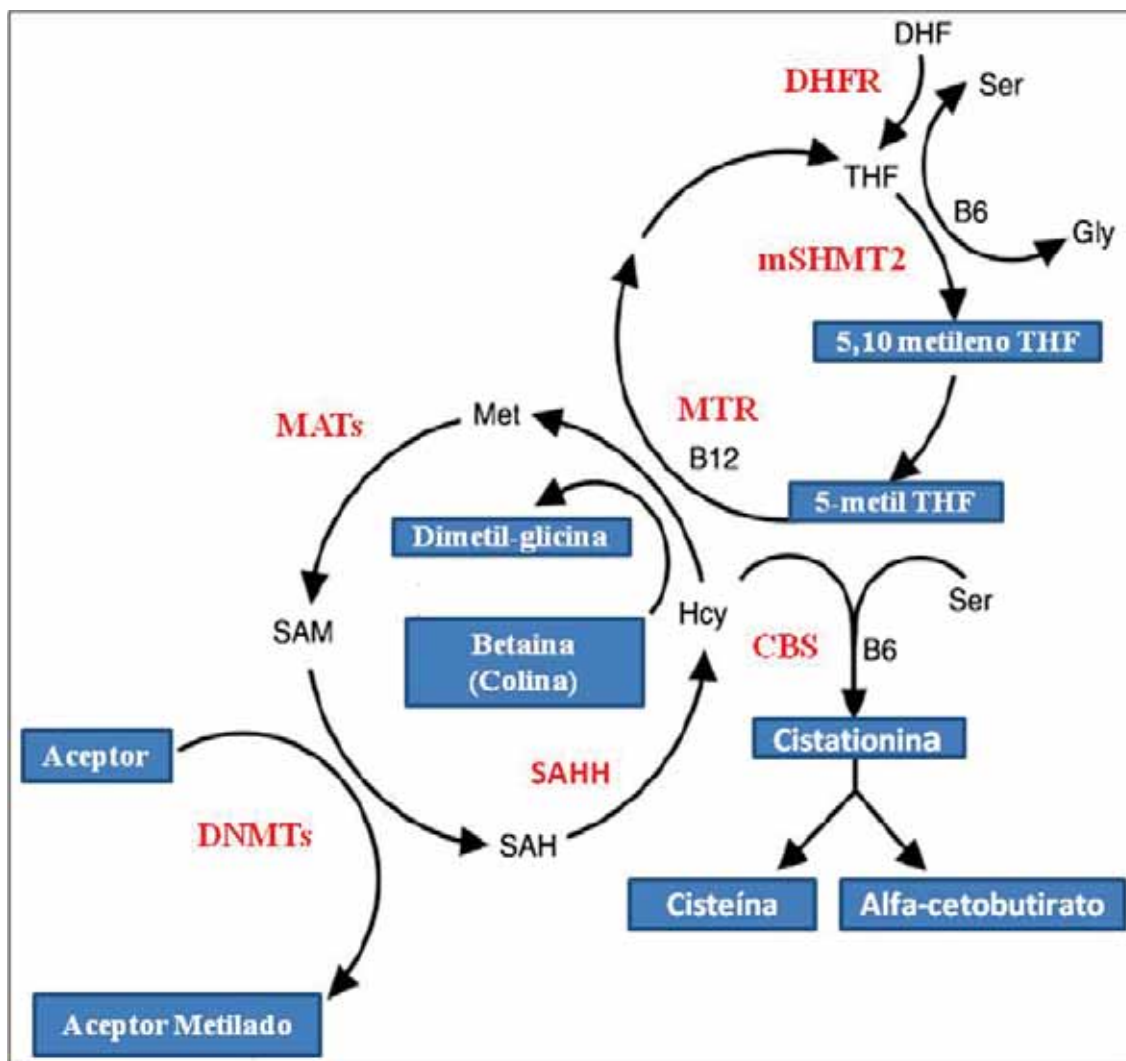
A metionina é um aminoácido sulfurado essencial, e tem múltiplas funções biológicas. Ela participa na iniciação de síntese proteica em eucariotos, é fonte de reguladores redox (cisteína e glutatona), e também é precursora de grupamento metil, que são doadores para as reações de metilação (BROSNAN e BROSNAN et al., 2006; MÉTAYER et al., 2008). Ela pode ser derivada da dieta, assim como da remetilação da homocisteína, onde o grupamento metil é transferido a partir do 5-metil tetrahydrofolato (THF) ou da betaína, um derivado da colina (SAW et al., 2001; OLTHOF et al., 2003). A metionina é convertida a S-adenosil-metionina que é demetilada para formar S-adenosil-homocisteína, a qual é em seguida hidrolisada a adenosina e homocisteína, que pode ser metabolizada pelo ciclo da remetilação ou pela via da transsulfuração (Figura 1).

No ciclo da remetilação, a homocisteína é reciclada para metionina através de duas reações diferentes. No fígado, uma parte da homocisteína é remetilada pela betaína homocisteína metiltransferase, com a betaína atuando como um doador do grupo metil. Na maioria dos outros tecidos, a remetilação é catalisada pela metionina sintetase com o 5 metiltetrahydrofolato (5-metil THF) atuando como doador do grupo metil. A formação desse doador depende da presença do 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-metil THF) (derivado do folato da dieta) e da enzima 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) (SELHUB e D'ANGELO, 1997; REFSUM et al., 1998).

Quando a via da remetilação está saturada ou quando a cisteína é necessária, a homocisteína é dirigida para a via da transsulfuração, onde é irreversivelmente convertida juntamente com a serina, em cistationina pela cistationina  $\beta$  sintase (C $\beta$ S) e depois em cisteína. A vitamina B6 é um cofator essencial para esta reação. A cisteína é posteriormente metabolizada para sulfato e excretada na urina (SELHUB e D'ANGELO, 1997; REFSUM et al., 1998). A combinação desta rede de metabólitos é chamada de ciclo de um carbono (FOX e STOVER, 2008; LAANPERE et al., 2010).

Na célula, a metionina é utilizada para a síntese proteica, ou entra no ciclo metabólico de um carbono. Na primeira fase do ciclo, a metionina é ativada como uma doadora de grupamento metil pela S-adenosilmetionina sintase (MAT), formando S-adenosilmetionina (SAM). Inúmeras metilases compõem o grupo de usuários de SAM e catalisam reações de transmetilação que geram S-adenosilhomocisteína (SAH) (FINDELSTEIN, 1990).

O metabolismo da homocisteína envolve enzimas que requerem folato e vitamina do complexo B (B9, B12, B6) como substrato e cofatores. A adição de homocisteína no meio de cultivo de embriões diminui o desenvolvimento de blastocisto de murino (MENEZO et al., 1989) e bovinos (IKEDA et al., 2010) em embriões pré-implantação. A homocisteína é auto-oxidada para produção de vários tipos de espécies reativas que podem exercer efeitos citotóxicos (WELCH e LOSCALZO, 1998).



**FIGURA 1-** Ciclo de um carbono e metabolismo da colina. SAHH= S-adenosil homocisteína hidrolase; CBS= cistationina  $\beta$ -sintase; DHFR= dihidrofolato redutase; DNMT= DNA metiltransferase; Hcy= homocisteína; MATs: MAT1A= metionina adenosiltransferase 1A; MAT2A= metionina adenosiltransferase 2A; MAT2B = metionina adenosiltransferase 2B; MTHFR= metileno tetrahidrofolato redutase; MTR= metionina sintase; SAM= S-adenosilmetionina; SAH= S-adenosilhomocisteína; Gly= glicina; Ser= serina; mSHMT2= serina hidroximetil transferase; THF= tetrahidrofolato; DNMT= DNA metiltransferases.

A maior função deste ciclo é assegurar que as células sempre tenham um fornecimento adequado de SAM, mesmo quando a ingestão de grupamentos metil como metionina, betaína ou colina é baixa (INOUE-CHOI et al., 2012).

A colina e seus metabolitos são necessários para o metabolismo de grupamentos metil, transporte e metabolismo de lipídeos, integridade estrutural e funções de sinalização de membrana celular e neurotransmissão (ZEISEL e BLUSZTAJN, 1994). Existem dados que sugerem que a colina tem um papel crítico no desenvolvimento fetal (ZEISEL, 2006) e que a gestação pode representar um momento marcante no aumento do requerimento de colina materna (MOLLOY et al., 2005). Como um doador de metil, a colina é derivada da betaina e pode ser usada para remetilação de homocisteína para metionina. Por ter influência na produção de SAM, a viabilidade de colina/betaína tem efeitos na viabilidade de grupamentos metil no cérebro (e outros tecidos), na expressão gênica, e na programação fetal (WATERLAND e JIRTLE, 2004; DAVISON et al., 2009)

Dois estudos em humanos, demonstraram que quando a ingestão de grupos metil (isto é, metionina e colina lábeis) é modificada, a síntese *de novo* de grupos metil de metionina é afetada (MUDD e POOLE 1975; MUDD et al., 1980). Adaptações semelhantes as alterações também foram observados em ratos (ELORANTA et al., 1990).

Em um trabalho realizado por Ikeda et al. (2012), utilizando um antimetabolito da metionina no meio de cultivo embrionário, demonstram que a interrupção do metabolismo da metionina provoca perturbações da transição de mórula para blastocisto durante o desenvolvimento pré-implantação de bovino, em parte através da deficiência de SAM, causando uma hipometilação do DNA e, conseqüentemente,

provocando uma expressão alterada de genes importantes de desenvolvimento, o que resultou na diminuição do desenvolvimento do blastocisto.

Tanto as alterações pós-traducionais das histonas quanto o padrão de metilação do DNA são cruciais para a regulação da expressão gênica, e a SAM é o precursor ou substrato essencial para o fornecimento de grupamentos metil para o estabelecimento da metilação *de novo* e do padrão de metilação de manutenção (JAENISCH e BIRD, 2003). A molécula de SAH pode atuar como inibidor da atividade da enzima DNA metiltransferases (DMNTs) via metionina/ácido fólico com a interrupção do ciclo (ROSS, 2003). Além disso, o uso do SAM para a biossíntese resulta na produção de SAM descarboxilada, que é também um inibidor competitivo das DMNTs (YOUNG et al., 2004).

A viabilidade de SAM como um doador de metil para a metilação de DNA depende da disponibilidade destes nutrientes envolvidos no ciclo de um carbono. Estudos de nutrição tem mostrado que a baixa ingestão de nutrientes do ciclo de um carbono resulta em uma diminuição nos níveis de SAM e aumento de SAH no fígado (BALAGHI et al., 1993; MILLER et al., 1994). Além da aquisição via dieta desses nutrientes, a variação nas atividades das enzimas do ciclo de um carbono pode interferir na disponibilidade de SAM (INOUE-CHOI et al., 2012).

Sinclair et al. (2007), trabalhando com dietas deficientes em cobalto e enxofre fornecidas a ovelhas doadoras de embriões, mostraram que as progênes obtidas desses animais apresentaram, além de várias alterações fenotípicas e fisiológicas, variações no padrão de metilação do DNA, claramente comprometendo a saúde desses animais e possivelmente sua fertilidade. Waterland e Jirtle (2003), trabalhando com uma linhagem de camundongos agouti, mostraram que quando o promotor do *locus* agouti está hipometilado os animais são amarelos e por efeitos pleiotrópicos do

gene, obesos. Quando o gene é silenciado por metilação, os animais são pseudoagouti. Dolinoy et al. (2006), utilizando genisteína, um fitoestrógeno da soja, durante a gestação de camundongos, conseguiram mudar a pelagem da progênie de amarelo agouti para pseudoagouti, protegendo os animais da obesidade. Dolinoy et al. (2007), utilizando bisphenol A, mostraram que durante o desenvolvimento inicial pode mudar o fenótipo da progênie por alteração estável do seu epigenoma. Fraga et al. (2005), estudando gêmeos monozigóticos, observaram que os padrões de metilação do DNA eram iguais ao nascimento, mas divergiam ao longo da vida dos indivíduos.

Insuficiente remetilação de homocisteína para metionina leva à diminuição da produção de SAM e diminui a proporção de SAM/SAH, levando a hipometilação de DNA. Disponibilidade insuficiente de SAM, prejudica todas reações de metilação, e anomalias nos padrões de metilação podem levar a expressão bialélica ou repressão dos genes imprinting, e induzir a malformação (SCHAEFER et al., 2007). Este fato é devido a metilação *imprinting* na fêmea ser estabelecida juntamente com a maturação do ovócito (FAGUNDES, 2009), logo, o estado metabólico da fêmea durante o período de crescimento folicular antes da ovulação pode exercer efeitos importantes no processo de metilação.

Recentemente, ovócitos e embriões de mamíferos foram reportados expressarem inúmeras enzimas chaves do metabolismo de um carbono (IKEDA et al., 2010; KWONG et al., 2010), sugerindo que ovócitos de mamíferos e embriões pré-implantação podem independentemente utilizar e metabolizar nutrientes no metabolismo de um carbono, como metionina, colina, betaina, folatos e vitaminas do complexo B.



Fatores ambientais como o *status* nutricional de doadoras de gametas e embriões e as condições de maturação de gametas e cultivo *in vitro* podem alterar o padrão de metilação do DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (YOUNG et al., 2001; MANN et al., 2004). As mudanças endócrinas e metabólicas são acompanhadas por alteração na composição do fluido folicular, que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (LEROY et al., 2008)

Quando ocorre uma alta concentração de homocisteína, ou por deficiência de vitamina B12 (cofator da enzima MTR) ou diminuição na síntese de SAM, há uma alta concentração de homocisteína no ambiente do ovócito (EBISCH et al., 2006) e do embrião é prejudicial, porque induz o efluxo de metionina (MENEZO et al., 1989), que, em seguida, tem um impacto negativo sobre o processo de metilação, direta ou indiretamente. Além disso, Wang e colaboradores (2013), em estudos com camundongos, observaram que o aumento de homocisteína promove a gliconeogênese para aumentar a produção de glicose, contribuindo para a ocorrência de resistência à insulina. Sinclair et al. (2007), obteve o mesmo resultado de resistência à insulina, mas foi em progênie resultantes de ovelhas doadoras de ovócitos que foram submetidas a uma dieta deficiente em B12 e folato.

Existem inúmeras evidências na literatura de que há associação entre a nutrição e a função ovariana, e de que o sistema glicose-insulina-IGF seja um dos principais mecanismos que elucidam esta afirmação (ARMSTRONG et al., 2001; SCARAMUZZI et al., 2006; MARTINS et al., 2008). A maior parte do IGF1 circulante é derivada a partir da sua síntese no fígado, regulado pelo hormônio de crescimento (GH), pela insulina, e ingestão nutricional (YAKAR et al., 2004).

Os IGFs são de grande importância para os estágios iniciais da foliculogênese, podendo causar um comprometimento severo do desenvolvimento folicular pré antral e antral (BURATINI, 2006; WEBB et al., 2004). Durante o período de final do desenvolvimento de folículos antrais, o ovócito passa pelas fases iniciais da maturação nuclear e citoplasmática preparando para ovulação e fecundação, e estes processos são sensíveis aos níveis e atividades de várias proteínas e esteróides prevalentes no ambiente folicular interno e externo (DRIANCOURT e THUEL, 1998).

## **CAPÍTULO 2**

*Trabalho a ser enviado para a revista: Molecular Reproduction and Development (normas em anexo).*

**Caracterização da expressão alelo-específica do gene MAO-A e inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos *in vivo* e por transferência nuclear.**

A.R. Ferreira<sup>2</sup>; R. Sartori<sup>2</sup>; G.M. Machado<sup>1</sup>; J.F.W. Spricigo<sup>3</sup>; L.F.C. Aguiar Filho<sup>1</sup>; L.F.S.Gomes<sup>1</sup>; I. Pivato<sup>3</sup>; R.V. Souza<sup>1</sup>; M.A.N.Dode<sup>1,2</sup> and M. M. Franco<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília-DF, 70770-917, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio of Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade de Brasília, Escola de Medicina Veterinária de Agronomia, Brasília-DF, 70910-900, Brasil.

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil;

\*Endereço para correspondência: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Parque Estação Biológica, W5 Norte Final, Brasília 70770-917, DF, Brazil, Tel: + 55-61-3448-4959; Fax: + 55-61-3340-3658; E-mail: [mauricio.franco@embrapa.br](mailto:mauricio.franco@embrapa.br)

## RESUMO

A produção de embriões *in vitro* e principalmente de embriões clones, pode afetar mecanismos epigenéticos, podendo alterar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e à inativação do Cromossomo X (ICX). Nós avaliamos a expressão alelo-específica de um gene localizado no cromossomo X, monoamina oxidase tipo A (MAO-A), em embriões produzidos *in vivo* e por transferência nuclear (TN). A massa celular interna (MCI) e o trofoblasto (TF) foram separados e o RNA total das biópsias (*pools* para embriões *in vivo* e individualmente para embriões TN) foi isolado, e a técnica de RT-PCR-RFLP foi usada para avaliar a expressão do gene MAO-A. Nos embriões produzidos *in vivo* detectamos os dois alelos, ambos na massa celular interna (MCI) como no trofoblasto (TF). Da mesma forma nós encontramos expressão bialélica do gene MAO-A em embriões TN, mas houve uma prevalência da detecção do alelo A comparado ao G na MCI e no TF. Então, ICX em embriões *in vivo* pode ser aleatória, e em embriões TN nós sugerimos que neste estágio de desenvolvimento a ICX não é aleatória na MCI e TF, ou alguma alteração pode ter gerado uma marca epigenética anormal no cromossomo X, favorecendo a inativação de um alelo específico, no caso o alelo G.

*Palavras-chave: clonagem, embrioblasto, MAO-A, RFLP.*

## INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior produção de embriões bovinos produzidos *in vitro* do mundo (Viana, 2012). Atualmente, o uso da clonagem por transferência nuclear (TN) também tem sido promissora, com aplicações potenciais na pecuária e medicina regenerativa. Exige-se hoje uma busca contínua pelo aperfeiçoamento destas técnicas, tornando prioritária a prospecção de marcadores moleculares para qualidade de ovócitos e embriões. A clonagem e a PIVE ainda não possuem uma eficiência almejada, tendo como possível causa as etapas de reprogramação epigenética, principalmente no âmbito da clonagem. A maioria dos embriões clonados são eliminados na fase uterina e os poucos que se desenvolvem a termo mostram uma alta incidência de anormalidades epigenéticas como, por exemplo, alterações no processo de inativação do cromossomo X (ICX) (Xue et al., 2002; Nolen et al., 2005). Portanto, a ICX, torna-se candidato a marcador para avaliar a qualidade embrionária, considerando ser o maior evento epigenético que acontece durante o desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos.

A inativação de um cromossomo X em fêmeas equaliza a expressão gênica entre os sexos (Heard e Distèche, 2006), mecanismo conhecido como compensação de dose (Lyon, 1961).

Em marsupiais a ICX é *imprinting*, onde o Xp é escolhido para a inativação (Cooper et al., 1971). Em humanos, a inativação é aleatória e parece ocorrer nos tecidos embrionário e extra-embrionário (Mello et al., 2010). No entanto, em camundongos (espécie mais estudada), a ICX é inicialmente *imprinting* (Takagi e Sasaki, 1975), silenciando o Xp a partir do estágio de 4-8 células, seguido pela ICX aleatória na MCI (Okamoto et al., 2004; Navarro et al., 2008, 2010). Esta segunda onda, que inativa aleatoriamente, é acompanhada de eventos como inibição dos fatores de pluripotência,

como *Nanog*, *Oct4/Pou5f1* e *Sox2*; ativação de Xist por fatores de competência ligados ao X, sensível à inativação, como *Rnf12*; e regulação aleatória monoalélica de Xist, via seu transcrito antisense, *Tsix* (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011).

Em camundongos, a ICX ocorre de maneira mais precoce quando comparados a coelhos e humanos (Okamoto et al., 2011), e o Xist parece não ser responsável pelo imprinting. Este fato pode ser justificado pela necessidade de um rápido desenvolvimento pré-implantacional em camundongos (Okamoto et al., 2005).

A maior diferença entre estas três espécies é que, para coelhos e humanos a expressão de Xist é alta em ambos os cromossomos na maioria dos blastômeros, o que é raramente observada em camundongos *in vivo*. Em coelhos, esta expressão de Xist nos dois cromossomos possui consequências na expressão gênica, onde a ICX se inicia em ambos os cromossomos concomitantemente, e depois rapidamente esta situação se resolve para uma inativação aleatória. Em humanos, embora Xist seja expresso em ambos os cromossomos, a ICX somente começa depois do estágio de blastocisto (Okamoto et al., 2011). De La Fuente et al. (1999), trabalhando com embriões bovinos produzidos *in vitro*, sugerem que a inativação ocorra por volta do estágio de blastocisto.

Embora a região XIC (Centro de Inativação do X) afete a maioria do cromossomo X, vários genes ligados a este cromossomo são conhecidos por escaparem do processo de inativação. Genes que escapam à inativação do X estão ativamente expressos no contexto da cromatina silenciada (Boggs et al., 2002), tendo um importante papel na determinação das diferenças entre os sexos (Heard e Disteche, 2006).

Existem, também, genes que estão presentes nos dois cromossomos sexuais (X e Y), dentro das regiões homólogas (região pseudoautossômica-PAR). Estes genes não são inativados, e isto se dá devido ao fato de serem expressos nos dois alelos nos machos,

não podendo ser inativados em nenhum dos alelos da fêmea, equalizando assim, a expressão gênica entre os sexos (Chang et al., 2006).

O gene MAO-A está localizado no cromossomo X e é “desligado” no processo de inativação do cromossomo X (Benjamin et al., 2000; Xue et al., 2002; Stabellini et al., 2009). Xue et al. (2002) demonstraram uma expressão aleatória e monoalélica do gene MAO-A, o que indica que este gene está sujeito a ICX também em bovinos.

Em um experimento realizado previamente em nosso Laboratório (Ferreira et al., 2010), o padrão de expressão do gene MAO-A foi estabelecido com o objetivo de se compreender o processo de ICX em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Neste trabalho detectamos apenas a presença de mRNA. A de origem materna no estágio de mórula, e mRNA das duas origens parentais em blastocisto.

O objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão de expressão alelo-específica do gene MAO-A, um gene localizado no cromossomo X e sujeito ao processo de ICX, em embriões bovinos produzidos *in vivo* e por TN.

## **RESULTADOS**

### **Experimento 1**

Em um total de 40 coletas, recuperamos 445 estruturas (10,8/coleta), 103 (23,84%) foram embriões Graus I (61,16%), II (19,41%) e III (19,41%) sendo a média de embriões por animal de 2,57. Destes, 83 foram considerados embriões viáveis (graus I e II), onde 41 eram mórulas (49,39%), cinco blastocistos (6,02%), 28 blastocistos expandidos (33,73%), oito blastocistos iniciais (9,63%), e um blastocisto eclodido (1,20%). O número de estruturas degeneradas foi de 236 (54,62%), e não fecundadas 106 (24,53%). A sexagem foi realizada



em todos os embriões viáveis, exceto os blastocistos iniciais. Em 75 embriões, apenas quatro foram sexados como machos (5,3%), os quais foram excluídos das análises posteriores.

O mRNA MAO-A foi detectado em todos os *pools*, de todas as fases de desenvolvimento (Fig 1). A presença de mRNA MAO-A advinda de ambos os cromossomos X foi detectada em todas as fases de desenvolvimento (Tabela 1).



Figura 1- Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo, mostrando dados da fenotipagem para o gene MAO-A. Números 1-3 controles, sendo Número 1: AA (106 pb); Número 2: GG (83 pb); Número 3: AG (106 pb e 83 pb), a banda 23 pb não é visualizada no gel. Número 4: Mórula compacta pool 1 (Mc1) - AG; Número 5: Mórula compacta pool 2 (Mc2) - G; Número 6: Mórula compacta pool 3 (Mc3) - AG; Número 7: Mórula compacta pool 4 (Mc4) - G; Número 8: Blastocisto Expandido MCI pool 1 (BxM1) - A; Número 9: Blastocisto Expandido Trofoblasto pool 1 (BxT1) - AG; Número 10: Blastocisto Expandido MCI pool 2 (BxM2) - AG; Número 11: Blastocisto Expandido Trofoblasto pool 2 (BxT2) - AG; Número 12-controle negativo.

Os resultados do sequenciamento, mostrados abaixo, confirmam os resultados da RT-PCR-RFLP, com exceção das amostras Mc1 e Mc4 (Fig 2).

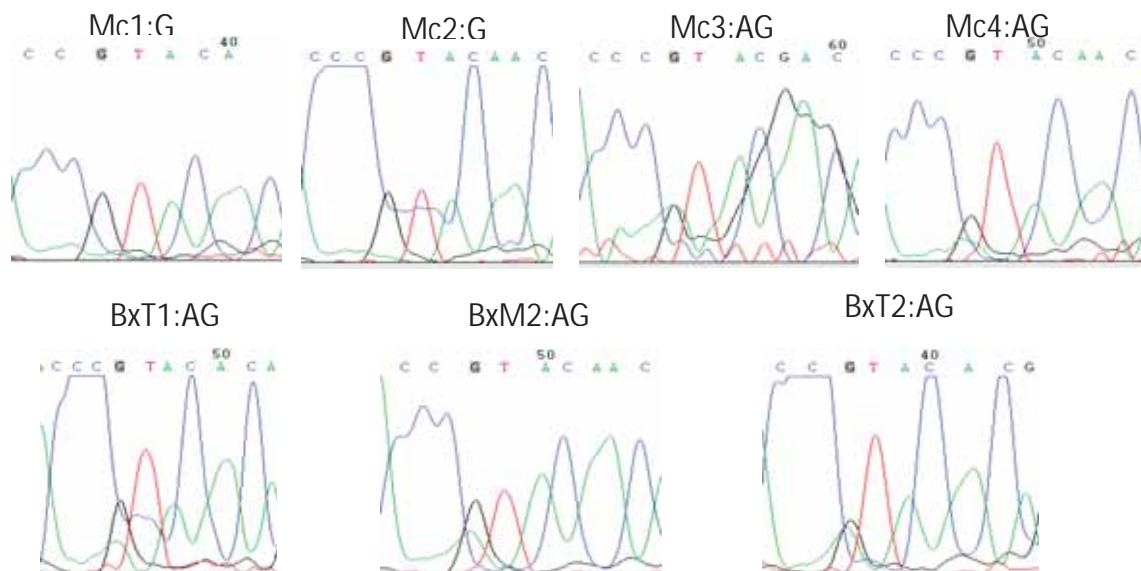


Figura 2- Cromatograma de parte da sequência do gene MAO-A em embriões no estágio de mórula (Mc) e em MCI (M) e TF (T) de blastocisto expandido (Bx).

A Tabela 1 mostra uma síntese dos resultados da RT-PCR-RFLP e sequenciamento em todas as amostras. Considerando todas as repetições, em apenas um pool de mórulas não foi encontrado mRNA dos dois alelos e apenas o paternal.

Tabela 1- Fenotipagem por RT-PCR-RFLP do gene MAO-A e sequenciamento. Resumo dos resultados obtidos nas replicatas da fenotipagem para o gene MAO-A. Realizados em embriões no estágio de morula e blastocisto expandido (Bx), biópsias de massa celular interna (M) e trofoblasto (T).

Estágio de Desenvolvimento	Pool	RT-PCR-RFLP				Sequenciamento	Resultado final
		Réplicas técnicas					
Mórula	1	G	A	AG	AG	G	AG
Mórula	2	G	G	G	G	G	G
Mórula	3	G	-	AG	AG	AG	AG
Mórula	4	G	-	G	AG	AG	AG
BxMCI	1	A	-	A	AG	-	AG
BxMCI	2	G	-	AG	-	AG	AG
BxTF	1	A	G	AG	G	AG	AG
BxTF	2	A	-	A	-	AG	AG

## Experimento 2

Com relação aos embriões produzidos por TN (n=25), apenas 56% deles (n=14) apresentou expressão bialélica em pelo menos um tecido (Tabela 3 e Fig 5).

Tabela 2 Frequência da expressão alélica-específica do gene MAO-A na massa celular interna e trofoblasto de biópsias de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear.

Tecido	Alelo transcrito		
	A	G	AG
Massa celular interna (n=25)	16 (64%)	01 (4%)	08 (32%)
Trofoblasto (n=25)	17 (68%)	-	08 (32%)

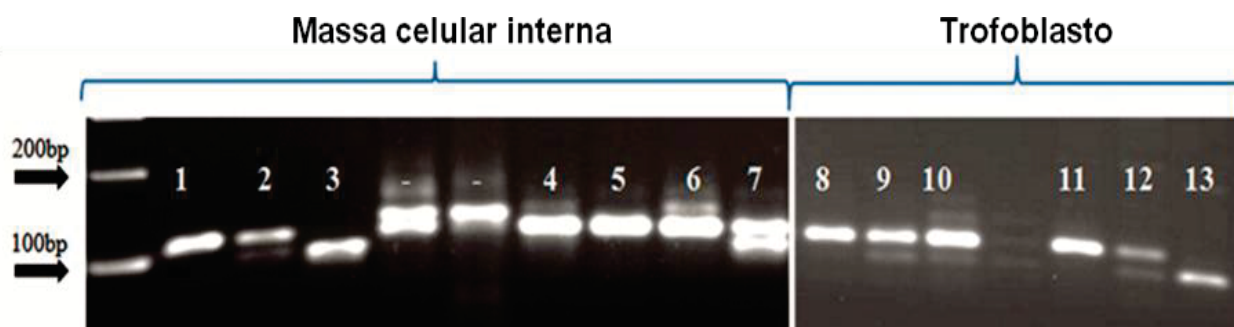


Figura 3- Gel de agarose 2,5% representativo mostrando os resultados da RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A na massa celular interna e trofoblasto de embriões produzidos por transferência nuclear. Controles (DNA Genômico): Linha 1 e 11-AA; Linha 2 e 12-AG; Linha 3 e 13-GG. Linhas 4, 5, 6 e 8 - A; Linhas 7, 9 e 10- AG.

Tabela 3- Expressão alelo-específica para o gene MAO-A na massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF) obtidos a partir de embriões bovinos produzidos por transferência nuclear.

	Alelo transcrito																								
Embriões	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
MCI	A	A	AG	A	AG	A	AG	A	A	A	A	A	AG	A	A	AG	A	A	AG	AG	G	AG	A	A	
TF	A	A	A	A	A	A	AG	A	A	AG	AG	AG	A	A	A	AG	A	AG	A	AG	A	A	A	A	AG

## DISCUSSÃO

Em um experimento realizado, previamente, em nosso Laboratório (Ferreira et al., 2010), o padrão de expressão do gene MAO-A, um gene localizado no cromossomo X e sujeito à inativação do cromossomo X (ICX) (Benjamin et al., 2000; Xue et al., 2002; Stabellini et al., 2009), foi estabelecido com o objetivo de se compreender o processo de ICX em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os resultados mostraram que no estágio de mórula o alelo paterno não foi detectado, sendo detectado imediatamente após, em

blastocisto (Ferreira et al., 2010). Como o estudo foi realizado com embriões produzidos *in vitro*, uma possível influência do sistema de cultivo *in vitro* sobre a inativação do cromossomo X tem que ser considerada. Por isso, caracterizar a inativação do cromossomo X em embriões bovinos *in vivo* é importante para determinar se realmente existe uma influência do sistema *in vitro* sobre este importante evento epigenético. Algumas questões ficaram por serem respondidas: 1) O quanto o sistema *in vitro* influencia a ICX?; 2) Há expressão monoalélica e preferencial de um dos cromossomos X nas células do trofoblasto, como em camundongos (Okamoto e Heard, 2009)?; 3) Qual o perfil de expressão do gene MAO-A em embriões produzidos por TN?

Portanto, neste estudo foram realizados dois experimentos para responder a essas questões. No experimento 1 foi realizado para determinar o padrão de expressão alelo-específico do gene MAO-A em embriões bovinos produzidos *in vivo* e o experimento 2 para determinar o padrão alelo-específico do gene MAO-A em embriões clones.

No experimento 1 a expressão bialélica (X<sub>m</sub> e X<sub>p</sub>) ou presença de mRNA MAO-A de ambos os cromossomos X foi detectada em todas as fases de desenvolvimento embrionário e tecidos (MCI e TF) utilizando RT-PCR-RFLP e sequenciamento de produto de RT-PCR (Tabela 1). No experimento 2, dos 25 embriões TN produzidos apenas 56% (n=14) apresentaram expressão bialélica em pelo menos um tecido, sendo que houve prevalência do alelo A comparado ao alelo G na MCI (96% vs 36%) e no TF (100 % vs 36 %) (Tabela 2).

O processo de ICX foi primeiramente descrito por Mary F. Lyon, em 1961 (Lyon, 1961). É um evento estabelecido durante o desenvolvimento embrionário inicial por fatores epigenéticos, como a hipermetilação associada à região promotora do gene XIST no cromossomo ativo, hipoacetilação de H3 e H4, e hipometilação da lisina 4 e

metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K4; H3K9) no X inativo (Plath et al., 2002). Se estes eventos não ocorrem de maneira correta, não há um desenvolvimento embrionário normal (Reik e Walter, 2001; Lucifero et al., 2004). A inativação de um cromossomo X em fêmeas de mamíferos equaliza a expressão gênica entre os sexos. Diferentes estratégias de compensação de dose são estabelecidas por diferentes espécies (Okamoto et al., 2011). Em mamíferos placentários, a ICX afeta o cromossomo X paterno ou materno de uma maneira aleatória durante o desenvolvimento embrionário, sendo que o estado inativo é herdado de forma estável, gerando adultos de dois tipos celulares (Heard e Disteche, 2006). Em camundongos esta inativação é imprinted no trofoblasto, inativando preferencialmente o alelo paterno (Okamoto et al., 2004), diferente do que ocorre em coelhos e humanos, que possui uma inativação aleatória (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011).

Este processo é controlado e regulado por uma região chamada Centro de Inativação do X (XIC) (Russel, 1963) no cromossomo X a ser inativado (Xi), e o silenciamento gênico no Xi é altamente estável nas células somáticas diferenciadas (Heard e Disteche, 2006). A reativação do Xi é observada em células da massa celular interna (MCI) de blastocistos na linhagem epiblastica (Huynh e Lee, 2003; Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004) e em células germinativas primordiais em migração (CGP) (De Napoles et al., 2007).

Nosso laboratório descreveu pela primeira vez um padrão de expressão alelo-específica para um gene sujeito ao processo de ICX em bovinos em embriões produzidos *in vitro* de quatro células até blastocisto expandido, na tentativa de contribuir com um melhor entendimento do processo de ICX nessa espécie (Ferreira et al., 2010). Neste estudo, observamos que no estágio de mórula havia a presença apenas de mRNA MAO-A materno e que o paterno reaparecia no estágio de blastocisto expandido, um padrão

semelhante ao que acontece em camundongos (Okamoto e Heard, 2009). Como esse estudo foi realizado com embriões produzidos *in vitro* e não isolamos as células do trofoblasto para avaliar o que ocorre nestas células com relação à inativação do cromossomo X, realizamos o experimento 2 utilizando embriões produzidos *in vivo* e isolando as células trofoblásticas de blastocistos. Neste experimento, produzimos embriões *in vivo* heterozigotos para o gene MAO-A utilizando sêmen de um touro Holandês sexado para fêmea em vacas Nelore superovuladas. Avaliamos a expressão do gene MAO-A em mórulas, massa celular interna e trofoblasto de blastocistos expandidos. Pelo que é do nosso conhecimento, esta foi a primeira vez que este tipo de estudo foi realizado em bovinos.

Os resultados mostraram uma expressão bialélica (X<sub>m</sub> e X<sub>p</sub>) do gene MAO-A em mórulas e blastocistos expandidos, tanto na massa celular interna quanto no trofoblasto (Tabela 2). Como há possibilidade de se ter a presença de células do trofoblasto nas amostras de massa celular interna, a expressão bialélica só pode ser confirmada com certeza em mórulas e trofoblastos. Este resultado difere de camundongos, onde há apenas X<sub>m</sub> ativo no trofoblasto (Okamoto et al., 2004). Em humanos, existem relatos de inativação não aleatória em tecidos extra-embrionários (Okamoto et al., 2011; Looijienja et al., 1999), embora em um estudo mais recente foi encontrado na placenta uma inativação aleatória (Mello et al., 2010).

Em nosso primeiro estudo (Ferreira et al., 2010), onde estabelecemos a expressão alelo específica do gene MAO-A em embriões bovinos produzidos *in vitro*, observamos que a ICX no estágio de mórula foi preferencialmente paterna, o que não foi confirmado em nossos resultados *in vivo*, onde detectamos a presença dos dois alelos. Assim como em coelhos e humanos, a ICX em bovinos parece também ser um evento mais tardio do que em camundongos (De La Fuente et al., 1999; Ferreira et al., 2010), e possui uma

inativação aleatória, e não *imprinting* (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011). O cultivo *in vitro* pode ter afetado o processo de ICX em nosso primeiro estudo (Ferreira et al., 2010). Por não ter influência do sistema *in vitro*, é provável que o experimento *in vivo* represente o processo mais real da ICX, apesar de Jirtle e Skinner, (2007) comentarem a possibilidade de influência dos protocolos de superovulação sobre a reprogramação epigenética de ovócitos.

Se considerar o caso de um gene responsável por uma característica de expressão de padrão mendeliano, tratando-se dos embriões clones, e considerando que o animal doador das células é heterozigoto para o gene MAO-A, espera-se haver a detecção da expressão dos dois alelos igualmente em todos os embriões. No entanto, isso não é esperado para o gene MAO-A, que está sujeito à inativação do cromossomo X. Os resultados mostraram haver um desvio da segregação mendeliana nesses embriões (n=25), pois apenas 56% deles (n=14) apresentaram expressão bialélica em pelo menos um tecido (Tabela 2) e com detecção mais fraca do alelo G na grande maioria desses (Fig 3). Do contrário, teria que haver a detecção da expressão dos dois alelos em todos os embriões (100%). Pode-se considerar existir a possibilidade de que todos os embriões expressaram os dois alelos, como numa segregação mendeliana, mas houve um desvio favorecendo a detecção de apenas o alelo A em praticamente todos os embriões e tecidos. Consideramos que isso possa ser devido à menor quantidade do alelo G, pela menor expressão desse alelo em todas as células ou pela menor quantidade de células expressando este alelo. No mínimo podemos afirmar que a expressão do alelo G é menor no *pool* de células, favorecendo a detecção do alelo A pela característica de amplificação exponencial da PCR. Se esse fosse o caso, uma possível explicação para isso seria que a mutação no gene e que nós utilizamos para o desenvolvimento do processo de fenotipagem (Ferreira et al., 2010), esteja envolvida no controle da



expressão do gene e que o alelo G teria uma menor taxa de transcrição. Isso é possível, principalmente pela localização da mutação na região 3'UTR do gene, uma região bastante envolvida na regulação gênica de uma maneira geral (de Moor et al., 2005). Porém, isso não foi testado em nosso estudo.

A outra possibilidade é que realmente o alelo G esteja sendo expresso num menor número de células, tanto na MCI e TF. De toda forma, os resultados mostram claramente que alguma sinalização, favorecendo o alelo A esteja presente nas células desses embriões clones. Portanto, sugerimos que esteja havendo algum controle *imprinting*, independente do tecido, favorecendo a inativação do alelo G ou impedindo a inativação do alelo A. Como seria independente do tecido, pois está acontecendo tanto na MCI quanto no TF, esse controle seria estabelecido antes da diferenciação entre MCI e TF. Como o gene MAO-A está sujeito à inativação do cromossomo X (Benjamin et al., 2000; Xue et al., 2002; Stabellini et al., 2009), esse controle *imprinting* sugerido aqui, poderia estar relacionado ao padrão de inativação presente na célula doadora do núcleo (Yang et al., 2007), o que não foi testado nesse estudo.

Apesar dos resultados conflitantes acerca dos padrões de inativação *imprinting* ou não *imprinting* no processo de ICX em mamíferos (Bermejo-Alvarez et al., 2011; Ferreira et al., 2010; Xue et al., 2002; Zeng et al., 2003; Nolen et al., 2005; Senda et al., 2004; Smith et al., 2005), com exceção a camundongos que já está bem estabelecido, Eggan e Jaenish (2003) e Yang et al. (2007) citam que em embriões clones, há uma tendência de inativação preferencial, e neste sentido um padrão *imprinting*, de que as células do trofoblasto sigam o padrão de inativação da célula doadora do núcleo e que na MCI tenham um padrão aleatório de inativação. Seguindo este raciocínio, seriam detectados os dois alelos em todas as biópsias de MCI e o paterno ou materno, mas não os dois, dependendo de qual alelo estaria inativo na célula doadora do núcleo, em todas

as biópsias de trofoblasto. Nossos resultados diferem desse padrão mostrado por Yang et al., 2007, pois ambos os alelos estão ativos nas biópsias de TF, de todas as formas possíveis, com alguns embriões expressando apenas o alelo A, outros o G e outros os dois alelos. Seguindo o padrão proposto por Yang et al. (2007), um ponto importante que temos que considerar é que cada embrião foi gerado a partir de uma célula, e que o animal doador das células é heterozigoto para o gene MAO-A.

Se considerarmos que o processo de ICX não seja *imprinted* em bovinos, o que ainda não está bem estabelecido (Xue et al., 2002; Eggan e Jaenish, 2003), teríamos teoricamente 50% das células no cultivo com o cromossomo X carregando o alelo A inativo e a outra metade com o G inativo, considerando aqui não haver efeito do cultivo *in vitro* no processo de ICX.

Assim, por uma questão de probabilidade, teríamos utilizado a metade das células com o alelo A inativo e a outra metade com o G para produzir os embriões. Considerando ainda o modelo proposto por Yang et al. (2007), que o embrião clone segue o padrão de ICX da célula para o TF, teríamos a metade das biópsias de TF expressando o alelo A e a outra metade o G. Portanto, nosso resultado difere desse padrão, pois todas as biópsias de TF expressaram o alelo A, algumas os dois e nenhuma apenas o alelo G (Tabela 3). Portanto, mostramos aqui neste estudo que o padrão de ICX, baseado na expressão alelo-específica do gene MAO-A, segue um padrão diferente do que já foi mostrado na literatura, apresentando uma inativação preferencial a favor de um alelo, mas que não testamos neste estudo.

Normalmente, a ICX em embriões clones parece ser aleatória na MCI e apresenta falhas no padrão *imprinting* da placenta (Yang et al., 2007). Alguns trabalhos mostraram falhas na expressão de genes ligados à placenta localizados no cromossomo X, com uma inativação preferencial do X inativo da célula doadora, com já mencionado

anteriormente (Senda et al., 2004; Nolen et al., 2005; Yang et al., 2007), embora Smith et al., (2005), avaliando embriões no estágio de blastocisto, não encontraram nenhuma evidência de expressão anormal de genes ligados ao cromossomo X.

Há que se considerar então que os embriões avaliados aqui neste estudo são embriões clones produzidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS). A literatura mostra que o processo de ICX em embriões clones apresentam algumas aberrações (Xue et al., 2002; Nolen et al., 2005). Em embriões fecundados normalmente, mecanismos ativos (Mayer et al., 2000) e passivos (Rougier et al., 1998) apagam a maioria do padrão de metilação advinda dos gametas antes da implantação, de modo que as células de blastocistos são pouco metiladas e um novo padrão de metilação só é estabelecido depois da implantação. Em embriões bovinos produzidos por TNCS, a desmetilação passiva é pouco eficiente, e uma desmetilação ativa pode acontecer tardiamente, no desenvolvimento pré implantacional (Bourc'his et al., 2001). No estágio de mórula, os núcleos dos blastômeros encontram-se altamente metilados, semelhante aos das células somáticas doadoras, já diferenciadas (Bourc'his et al., 2001). Logo, acredita-se que a reprogramação epigenética acontece de forma incompleta e aberrante na maioria dos embriões clonados (Dean et al., 2001), resultando em uma expressão gênica aberrante e um desenvolvimento embrionário anormal (Morgan et al., 2005).

Experimentos realizados em desenvolvimento mais tardio encontraram expressão bialélica de genes ligados ao cromossomo X em placentas de clones mortos, em vez de expressão materna específica, o que seria esperado em uma ICX normal. Curiosamente, as placentas dos clones que sobreviveram, ao contrário dos mortos, tinha apenas um cromossomo X ativo, sugerindo que um padrão aberrante de ICX pode ter contribuído para a morte fetal (Xue et al., 2002). Apesar de nossos resultados não nos permitir afirmar que os dois cromossomos X estão expressos na mesma célula, o que seria fatal

para a célula, detectamos 32 % das biópsias de TF expressando os dois alelos (Tabela 3). Se considerarmos que há células nessas biópsias que poderiam estar expressando os dois X ao mesmo tempo, isso seria um forte indício de inviabilidade desses embriões, dando-nos uma perspectiva de prospecção de marcadores moleculares relacionados à qualidade embrionária a ser utilizada na clonagem.

Os resultados do experimento 1 nos permitiu mostrar pela primeira vez que a inativação do cromossomo X *in vivo* em bovinos parece ser aleatória no trofoblasto ou ainda não ocorreu nesta fase do desenvolvimento, e que o sistema de cultivo *in vitro* pode influenciar o estabelecimento deste processo. No experimento 2, avaliando os embriões clones, houve um evidente desvio da expressão alelo-específica a favor do alelo A. Isto pode já estar relacionado ao processo de ICX, com tendência a inativar o alelo G, sugerindo que a ICX não seja aleatória em bovinos ou por alguma alteração por ser em embriões TN. De acordo com nossos resultados, a expressão do gene MAO-A nos embriões clones foi bialélica em algumas biópsias, mas mono-alélica para o alelo A na maioria dos embriões (Tabela 2). Considerando que este gene está presente no cromossomo X e é sujeito à inativação, e baseando nos resultados encontrados na literatura (Dean et al., 2001; Bourc'his et al. 2001; Senda et al., 2004; Nolen et al., 2005; Morgan et al., 2005; Inoue et al., 2010; Matoba et al., 2011), podemos especular o fato de que possa estar ocorrendo uma expressão anormal ou algum desvio no processo aleatório de ICX, favorecendo a inativação de um alelo específico, no caso o alelo G.

Finalmente, os resultados encontrados para os embriões produzidos *in vivo* mostraram que os dois alelos estão presentes tanto nas biópsias de MCI quanto de TF (Tabela 1). Se considerarmos que utilizamos pools de biópsias para fazer o perfil de expressão do gene MAO-A nesses embriões, não podemos descartar a possibilidade de que biópsias individuais poderiam mostrar a presença tanto de apenas um alelo quanto dos dois ao

mesmo tempo, como encontramos para os embriões clones. Por isso, nossos resultados não nos permite comparar os resultados entre os dois tipos de embriões. Os resultados obtidos aqui neste estudo sugerem a necessidade de um estudo avaliando a expressão do gene MAO-A em embriões individuais produzidos *in vivo*, como foi feito para os embriões produzidos por TN. Nossos resultados mostraram uma boa perspectiva de desenvolvimento de um marcador molecular para a qualidade embrionária baseando-se no processo de ICX utilizando uma pequena biópsia de trofoblasto e ampliando o número de genes a serem avaliados. Para isso, há a necessidade da fenotipagem nas biópsias e a transferência dos embriões para a avaliação da taxa de prenhes. O estudo de mais genes localizados no cromossomo X e susceptíveis à inativação do cromossomo X e o seu uso como marcadores moleculares para qualidade embrionária torna-se relevante quando se entende a importância deste evento epigenético para o desenvolvimento embrionário inicial.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- protocolo nº 98/2010) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **Experimento 1 – Expressão alelo-específica para o gene MAO-A em embriões produzidos *in vivo***

#### *Extração de DNA e Genotipagem do gene MAO-A*

DNA genômico de sêmen de dois touros Holandeses (ABS Pecplan, Minas Gerais, Brasil) sexados para fêmea e de foi leucócitos de 26 novilhas Nelore doadoras de ovócitos foram isolados para genotipagem utilizando um protocolo baseado em *Salting Out* (Biase et al., 2002). Os animais doadores de sêmen e ovócitos foram

previamente escolhidos baseado na genotipagem para o gene MAO-A (Xue et al., 2002; Ferreira et al., 2010), sendo o touro doador do sêmen (*Bos taurus taurus*) de genótipo GG e as doadoras de ovócitos AA. A metodologia de genotipagem está descrita com detalhes em Ferreira et al. (2010).

#### Coleta de embriões

Para obtenção dos embriões, a emergência da onda foi sincronizada com 2,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, São Paulo, Brasil) e foi introduzido dispositivo intravaginal de progesterona (PRIMER<sup>®</sup>; 1 g de progesterona; Tecnopec, São Paulo, Brasil) em D0. Em D4, o tratamento superestimulatório (total de 133 mg de NIH-FSH-P1; Folltropin<sup>®</sup>; Tecnopec, São Paulo, Brasil) foi iniciado e os animais foram superestimulados duas vezes por dia em doses decrescentes, durante um período de 4 dias. Na época da quinta injeção de pFSH, 150 µg de PGF2α IM (Veteglan<sup>®</sup>, Hertape Calier Saude Animal, Minas Gerais, Brasil) foi administrada. O dispositivo de progesterona foi retirado no momento da aplicação do sétimo pFSH. A ovulação foi induzida com uma injeção IM de 12,5 mg de GnRH (Gestran<sup>®</sup>, Tecnopec, São Paulo, Brasil), 12 h depois. Todas as fêmeas foram inseminadas artificialmente com quatro doses de sêmen sexado-fêmea congelado/descongelado do mesmo touro de raça Holandesa (ABS Pecplan<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil) foram utilizadas duas doses após 12 horas da administração de GnRH e mais duas doses 12 horas após a primeira inseminação. Foi realizado um total de três coletas em 26 animais que foram divididos em dois grupos (n=15 e n=11, respectivamente). O primeiro grupo foi utilizado na terceira coleta, com exceção de um animal que apresentou problemas, totalizando 40 coletas. Os embriões foram recuperados por lavagem uterina em D15,5 para obtenção de mórulas e D16,5 para obtenção de blastocistos. Para a realização das coletas dos embriões as vacas foram contidas em tronco individual, procedendo-se a anestesia

peridural com cloridrato de lidocaína 2,0% (4,0 ml- Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). Os embriões foram classificados de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society – IETS (Stringfellow e Siedel, 1999). Embriões de graus 1 e 2 foram considerados viáveis. As estruturas encontradas foram lavadas, transferidas para outra placa com meio de manutenção de embriões estéril- TQC (TQC holding plus<sup>®</sup> - Nutricell), mantidas até o momento da micromanipulação.

#### Micromanipulação para biópsia embrionária

As biópsias foram realizadas utilizando um micromanipulador manual (M&M Micromanipulator<sup>®</sup>) e lâminas de aço inox com ângulos de 15 graus (Bio-Cut Blades<sup>®</sup> - Feather). Na mórula compacta (Mc) o fragmento consistiu de aproximadamente 10 a 20 células, e em blastocisto expandido (Bx) separou-se massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF), sendo que uma pequena parte do trofoblasto também foi retirada para realizar a sexagem. Os embriões foram micromanipulados em placa de petri de 100x20 mm em gota de solução contendo 200 µl de meio de manutenção-TQC<sup>®</sup>.

As biópsias para sexagem foram colocadas em solução de Lise Celular constituída por Tampão de PCR 10X (Tris, 100mM, KCl, 500 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 20 mM) e Proteinase K, (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (20 mg/ml) e mantidas a -20° C até a realização da sexagem. A MCI e trofoblastos, assim como as mórulas, foram colocadas em RNAlater<sup>®</sup> Solution (Ambion<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e mantidas a -20° C para posterior extração de RNA.

#### Sexagem embrionária

A identificação do sexo dos embriões foi determinada através do método de PCR como descrito em (Machado et al., 2012).

### Extração de RNA e Transcrição Reversa

Utilizou-se para extração de RNA apenas os embriões sexados fêmeas. Foi extraído RNA total de quatro *pools* de 10 mórulas, dois *pools* de MCI e dois *pools* de trofoblastos obtidos de 13 blastocistos expandidos, utilizando o kit RNeasy Plus Micro<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi submetido a uma reação de transcrição reversa assim como descrito no experimento 1.

### RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A

Para a fenotipagem do gene MAO-A foi utilizado tanto uma nested RT-PCR-RFLP convencional, quanto uma amplificação direta em PCR em tempo Real.

Para a qPCR foram utilizados 3 µl de cDNA de cada *pool*, 5 pmoles (colocar em µM) de *primers internos*, e o “kit” Máxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas<sup>®</sup> Waltham, MA, USA). As reações foram realizadas com um volume final de 15 µl, e as condições para a amplificação dos genes foram: 95° C por 10 min, 50 ciclos de: 95° C por 15 seg; 56° C por 30 segundos, seguido de uma temperatura de extensão de 72° C por um minuto, seguido de curva de dissociação.

Na nested PCR convencional utilizou-se na primeira amplificação 2-3 µl do cDNA de Mc e 5 µl do cDNA Bx. Para a segunda amplificação foi utilizado 2-3 µl da primeira amplificação para Mc e 5 µl para Bx. Para as reações foram utilizados: tampão 1X de PCR, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer inner/out*, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Life Technologies<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA), em um volume final de 20 µl. As reações foram corridas utilizando as seguintes condições: 94° C por 3 min, 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 51° C (*out*)/ 52° C (*inner*) por 30 seg e 72° C por 40 seg, seguido de uma extensão final de 72° C por 10 min.



Um volume de 13 µl do *amplicon* de amplificação de ambas as técnicas foi digerido usando 13 UI da enzima de restrição *RsaI* (Promega® Madison, Wisconsin, USA) *overnight* a 37° C. Os produtos da digestão foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %, corado com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografado sob luz ultra violeta. O alelo A é representado por um fragmento de 106 pb e o alelo G por dois fragmentos, 83 e 23 pb.

#### Sequenciamento do gene MAO-A

Para a confirmação dos resultados da fenotipagem, um produto de amplificação gerado por RT-PCR utilizando apenas os *primers externos* foi produzido de todos os tratamentos, purificado (Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System - Promega® Madison, WI, USA) e sequenciado pela metodologia de dideoxy em um sequenciador ABI 3130xl (Life Technologies® Carlsbad, CA, USA) usando o *primer* interno *foward*.

### **Experimento 2 - Expressão alelo-específica para o gene MAO-A em embriões produzidos por transferência nuclear**

#### Coleta de ovários, seleção de ovócitos e maturação *in vitro*

Utilizamos ovários oriundos de vacas cruzadas (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) obtidos em abatedouro local e transportados em solução salina (NaCl 0,9 %) suplementado com penicilina G (100 UI/ml) e sulfato de estreptomicina (100 ηg/ml) a 35° C. Complexos Cumulus Ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro. Somente os Complexos Cumulus Ovócitos (COCs) que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do cumulus foram utilizados (Caixeta e Dode, 2008). Os COCs selecionados (graus I e II) foram transferidos em número de 20-25 para uma gota de 200 µL de meio de maturação,

coberta com óleo de silicone e incubados por 22 h a 39° C e 5 % CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação consistiu de TCM – 199 sais de Earl (Invitrogen<sup>®</sup>, CA, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen<sup>®</sup>, CA, USA), 0,01 UI/ml de FSH (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA), 0,1mg/ml de Glutamina e antibiótico (Amicacina, 0,075 mg/ml).

#### Desnudação e seleção de ovócitos para TN

Após 16 h de MIV, os ovócitos eram desnudados utilizando hialuronidase (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA). Os ovócitos eram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar (CP) sob estereomicroscópio (ZEISS<sup>®</sup> - Stemi SV11) e apenas os que apresentavam foram utilizados para a TN.

#### Cultivo de células somáticas

Para células doadoras de núcleos foram usados, fibroblastos provenientes de biópsias de orelha de uma fêmea Nelore adulta, previamente genotipadas para o gene MAO-A apresentando genótipo AG, mantidos em cultivo por até sete passagens, em meio Dubelcco's Minimum Eagle Medium (DMEM-GIBCO<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 39° C e 5 % de CO<sub>2</sub> em ar.

Palhetas de 0,25 µl contendo fibroblastos provenientes de biópsia de orelha de uma fêmea Nelore adulta, previamente genotipada para o gene MAO-A apresentando genótipo AG, foram retiradas do nitrogênio líquido (-196° C) e descongeladas em um recipiente contendo água aquecida a 37 - 38° C. As células foram cultivadas em meio Dubelcco's Minimum Eagle Medium (DMEM-GIBCO<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 3,7 g/l de bicarbonato de sódio, 110 mg/l piruvato, 10 % SFB e antibióticos em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, a 39° C e 5 % de CO<sub>2</sub> em ar.

### Transferência nuclear

Após trinta minutos de incubação em solução SOFaaci (fluido sintético do oviduto com aminoácidos, citrato e mio-inositol) contendo 0,33 µg/ml de citocalasina D (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA) e 7,5 µg/ml hoechst 3342 (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA) os gametas foram separados em grupos de 16 a 20 ovócitos e submetidos a TN. Os ovócitos foram fixados individualmente à pipeta *holding* e posicionado de forma que o corpúsculo polar permaneça na posição de 4 h. O corpúsculo polar e uma porção do citoplasma adjacente a ele foram retirados por aspiração, sem que a membrana citoplasmática fosse rompida, etapa denominada “Enucleação”. Na sequência, através do mesmo orifício aberto na membrana pelúcida durante a Enucleação, uma célula somática foi depositada no espaço perivitelino, etapa denominada “Reconstrução”. Em seguida as estruturas foram submetidas ao processo de eletrofusão em fonte ECM 200 (BTX<sup>®</sup>), através da geração de dois pulsos elétricos com carga de 2,1kVA/cm, com 30 µs de duração, em solução de D-Manitol (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA) a 0,28 M contendo 0,1 mM de MgSO<sub>4</sub> (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA) em câmara de fusão por 30 min.

A seguir efetuou-se a ativação onde as estruturas fusionadas foram submetidas à incubação por 5 min em solução SOFaaci contendo Ionomicina 5 µM (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA) posteriormente a 4 horas em solução SOFaaci contendo 6DMAP 2 mM (Sigma<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA).

### Cultivo in vitro de embriões

Após esse período as estruturas foram co-cultivadas por 7 dias em meio SOFaaci, sob monocamada de células do cumulus, em estufa de cultivo, à temperatura de 39° C e atmosfera gasosa de 5 % de CO<sub>2</sub> em ar. Os embriões foram avaliados quanto

ao seu desenvolvimento com 48 h de cultivo (D2) para verificação da clivagem, e com 170 h (D7) e 193 h (D8) para verificação da formação de blastocistos.

#### Separação da Massa Celular Interna e Trofoblasto

Em D8 os embriões eram avaliados e os blastocistos expandidos eram levados ao micromanipulador para realização da biópsia embrionária, separando Massa Celular Interna (MCI) de Trofoblasto (TF), utilizando a mesma técnica do experimento 1.

#### Extração de RNA e Transcrição Reversa

O RNA total foi extraído das biópsias de trofoblasto e massa celular interna, individualmente, utilizando o Arcturus<sup>®</sup> Pico Pure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi submetido a uma reação de transcrição reversa assim como descrita nos outros experimentos.

#### RT-PCR-RFLP para o gene MAO-A

Para detectar e caracterizar a expressão alelo-específica para o gene MAO-A nos embriões clones foi utilizada *nested* PCR.

Foram realizadas 25 réplicas para MCI e 25 para TF, sendo que cada biópsia representava uma réplica, fazendo as amplificações para o PCR *out* utilizando 4 µl de cDNA. Para o PCR *inner* 1 µl de amplicon resultante do PCR *out*. Para as reações foram utilizados: tampão de PCR 1x, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de cada dNTP, 5 µM de cada *primer inner/out*, 1U de Taq DNA polimerase Platinum (Life Technologies<sup>®</sup> Carlsbad, CA, USA), em um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas utilizando as seguintes condições: 94° C por 3 min, 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 52° C (*out*)/ 56° C

(*inner*) por 30 seg e 72° C por 40 seg, seguido de uma extensão final de 72° C por 10 min. Esta amplificação final gerou um *amplicon* de 106 pb. A digestão para fenotipagem foi realizada da mesma forma do experimento 1.

## **ANÁLISE DOS DADOS**

Para a fenotipagem do gene MAO-A nos embriões, foi realizada uma análise descritiva dos dados, detectando se houve expressão bialélica ou monoalélica, identificando a origem parental do alelo. O resultado do sequenciamento do gene MAO-A foi avaliado utilizando o programa Chromas 2.01 (Copyright<sup>©</sup>, Technelysium Pty Ltd). Os dados para quantificação da expressão gênica foram comparados entre os tratamentos usando análise de variância (ANOVA) e teste t de Student, no programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à EMPRAPA, CNPq, pelo suporte financeiro. Agradecemos também à FAPESP (no. 2010/07971-3) pela bolsa de estudos concedida à primeira autora.

## **REFERÊNCIAS**

Augui S, Nora EP, Heard E. 2011. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet* 12:429-42.

Barnes FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29:117–123,

- Benjamin D, Van Bakel I, Craig IW. 2000. A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes. *Euro J Hum Genet* 8: 103–108.
- Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2011. Transcriptional sexual dimorphism in elongating bovine embryos: implications for XCI and sex determination genes. *Reproduction* 141:801-808.
- Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC. 2002. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genet Mol Biol* 25:313-315.
- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71:30-38.
- Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. 2002. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* 30:73-76.
- Braude P, Bolton V, Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332:459–461.
- Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. 2002. RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1218-22.
- Caixeta SE, Dode ANM. 2008. Dissecção folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária. *Documentos Empraba* 260.
- Camous S, Kopecný V, Fléchon JE. 1986. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58:195-200.

- Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ. 2006. Mechanisms of X-Chromosome Inactivation. *Front Bio* 11:852-866.
- Cooper DW, Vandeberg JL, Sharman GB, Poole WE. 1971. Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nat New Biol* 230:155-157.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fert* 82:769–775.
- D Bourc'his, D Le Bourhis, D Patin, A Niveleau, P Comizzoli, J.-P Renard, E Viegas-Péquignot. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Current Biology*, v. 11, p. 1542–1546, 2001.
- De La Fuente R, Hahnel A, Basrur PK, King WA. 1999. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod* 60:769-75.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. 2005. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Sem Cell Dev Biol* 16:49–58.
- De Napoles M, Nesterova T, Brockdorff N. 2007. Early loss of Xist RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. *PLoS ONE* 2, e860.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13734-13738.

- Dhara SK, Benvenisty N. 2004. Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 32:3995–4002.
- Eggan K, Jaenisch R. 2003. Micromanipulating dosage compensation: understanding X-chromosome inactivation through nuclear transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 14:349-58.
- Escamilla-Del-Arenal M, Rocha ST, Heard E. 2011. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Hum Genet* 130:307–327.
- Ferreira AR, Machado GM, Diesel TO, Carvalho JO, Rumpf R, Melo EO, Dode MAN, Franco MM. 2010. Allele-Specific Expression of the MAOA Gene and X Chromosome Inactivation in In Vitro Produced Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev* 77:615-621.
- Forlani S, Bonnerot C, Capgras S, Nicolas JF. Relief of a repressed gene expression state in the mouse 1-cell embryo requires DNA replication. *Development* 125:3153-66, 1998.
- Frei PG, Schultz GA, Church RB. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fert* 86:637–641.
- Fukuda A, Cao F, Morita S, Yamada K, Jincho Y, Tane S, Sotomaru Y, Kono T. 2010. Identification of inappropriately reprogrammed genes by large-scale transcriptome analysis of individual cloned mouse blastocysts. *PLoS ONE*, 5:e11274.



- Goto T, Wright E, Monk M. 1997. Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 3:77–80.
- Heard E, Disteche CM. 2006. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev* 20:1848-1867.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52:683-700.
- Huynh KD, Lee JT. 2003. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 426:857–862.
- Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T et al. 2010. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 3:496-499.
- Inoue-Choi M, Nelson HH, Robien K, Arning E, Bottiglieri T, Koh Woon-Puay, Yuan Jian-Min. 2012. One-carbon metabolism nutrient status and plasma S-adenosylmethionine concentrations in middle-aged and older Chinese in Singapore. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:160-173.
- Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8:253-62.
- Looijenja L, Gillis A, Verkerk A, Van Putten W, Oosttherhuis J. 1999. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentals. *Am J Hum Genet* 64:1445-1452.

- Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. 2004. Potential significance of genomic *imprinting* defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update*, 10:3-18.
- Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372-373.
- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71:1289-1297.
- Machado GM, Ferreira AR, Guardieiro MM, Bastos MR, Carvalho JO, Lucci CME, Diesel TO, Sartori R, Rumpf R, Franco MM, Dode MAN. 2012. Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 25 (4).
- Mak W, Nesterova TB, De Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N. 2004. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303:666–669.
- Manes C. 1971. Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryos II: Delayed synthesis of ribosomal RNA. *J Exp Zool* 176:87–96.
- Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F et al. 2011. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:20621-20626.

- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. 2000. Demethylation fibroblasts derived from skin biopsies performed at the ears of adult of the zygotic paternal genome. *Nature* 403:501-502.
- Mello JCM, Araújo ESS, Stabellini R, Fraga AM, Souza JES, Sumita DR, Camargo AA, Pereira LV. 2010. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PloS One* 5:1-8.
- Memili E, First NL. 1998. Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol Reprod Dev* 51:381-9.
- Memili E, First NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8:87-96.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. *Hum Mol Genet.* 2005. Epigenetic reprogramming in mammals 14:47-58.
- Navarro P, Chambers I, Karwacki-neisius V, Chureau C, Morey C, Rougeulle C, Avner P. 2008. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 321:1693–1695.
- Navarro P, Oldfield A, Legoupi J, Festuccia N, Dubois A, Attia M, Schoorlemmer J, Rougeulle C, Chambers I, Avner P. 2010. Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* 468:457–460.

- Nolen, L.D. Gao S, Han Z, Mann MR, Gie Chung Y, Otte AP, Bartolomei MS, Latham KE. 2005. X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Bio* 279: 525–540.
- Okamoto I, Arnaud D, Le BP, Otte AP, Disteche CM, Avner P, Heard E. 2005. Evidence for de novo *imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature* 438:369-373.
- Okamoto I, Heard E. 2009. Lessons from comparative analysis of X-chromosome inactivation in mammals. *Chromosome Res* 17:659–669.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. 2004. Epigenetic dynamics of *imprinted* X inactivation during early mouse development. *Science* 303:644-649.
- Okamoto I, Patrat C, The'Pot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabangouaya P, Wolf JP, Renard JP, Duranthon VR, Heard E. 2011. Eutherian mammals use different strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472:370–374.
- Peippo J, Farazmand A, Kurkilahti M, Markkula M, Basrur PK, King WA. *Mol Hum Reprod*. 2002. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos 8:923-929.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:45.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. 2002. XIST RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* 36:233-278.

- Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2:21-32.
- Rougier N, Bourc'his D, Molina Gomes D, Niveleau A, Plachot M, Pa' ldi A, Viegas-Pe' quignot E. 1998. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev*, 12:2108-2113.
- Russell LB. 1963. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. *Science* 140:976-978.
- Senda S, Yamazaki Y, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. 2004. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 321, 38–44.
- Shen Y, Matsuno Y, Fouse SD, Rao N, Root S, et al. 2008. X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4709–4714.
- Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT. 2008. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4820–4825.
- Smith, S.L. Everts RE, Tian XC, Li-Ying Sung FD, Rodriguez-Zas SL, Jeong Byeong-Seon, Renard Jean-Paul, Lewin HA, Yang X. 2005. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17582–17587

- Stabellini R, De Mello JC, Hernandez LM, Pereira LV. 2009. MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts. *Epigenetics* 4:388-93.
- Stringfellow DA, SEIDEL S. M. 1999. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed., 180.
- Takagi N, Sasaki M. 1975. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256:640-642.
- Stroud, B. 2011. IETS 2011 statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer on domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter* 29:14-23.
- Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. 2002. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 31:216-220.
- Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard Jean-Paul, Wakayama T. 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning *Nat Genet* 39:295-302.
- Zeng SM, Yankowitz J. 2003. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta* 24:270-5.

## CAPÍTULO 3

*Trabalho a ser enviado para a revista: The Journal of Nutrition (normas em anexo)*

**Efeitos de diferentes níveis de enxofre e cobalto da dieta sobre parâmetros bioquímicos do ciclo da metionina, expressão gênica e a viabilidade de ovócitos bovinos.**

A R Ferreira<sup>2</sup>, R Sartori<sup>2</sup>, R G Júnior<sup>3</sup>, D B Araújo<sup>4</sup>, I Pivato<sup>5</sup>, B D M Silva<sup>1</sup>, J FW Spricigo<sup>5</sup>, L O Leme<sup>5</sup>, E L Silveira<sup>1</sup>, N R Kussano<sup>6</sup>, V O Miranda<sup>5</sup>, M N Diógenes<sup>5</sup>, A M Santos<sup>6</sup>, G H V Brunello<sup>7</sup>, R L Kaqui<sup>7</sup>, M A N Dode<sup>1,5</sup>, and M M Franco <sup>\*1,6</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Brasília-DF, 70770-917, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio of Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Embrapa Cerrados, BR 020 Km 18, Planaltina, DF - Brasil - CEP 73310-970.

<sup>4</sup>Kemin do Brasil, LTDA. Rua Quatro 471 Distr.Ind.Nova Era, Indaiatuba, São Paulo, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade de Brasília, Escola de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-DF, 70910-900, Brasil.

<sup>6</sup>Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil;

<sup>7</sup>Universidade de Brasília, Departamento de Estatística, Brasília-DF, 70910-900, Brasil.

\*Endereço para correspondência: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal, Parque Estação Biológica, W5 Norte Final, Brasília 70770-917, DF, Brazil, Tel: + 55-61-3448-4959; Fax: + 55-61-3340-3658; E-mail: [mauricio.franco@embrapa.br](mailto:mauricio.franco@embrapa.br)



## RESUMO

Durante a ovogênese ocorre uma ampla reprogramação na metilação do DNA e esta depende do ciclo de um carbono como doador de grupamento metil. O nível nutricional, qualidade da nutrição da doadora de ovócitos e sistema de produção *in vitro* pode influenciar nesta reprogramação. Nós avaliamos a influência de diferentes níveis de enxofre (S) e cobalto (Co) na dieta nos níveis do plasma sanguíneo de homocisteína, ácido fólico, B12, IGF-I, glicose e insulina, expressão de genes codificadores de enzimas chaves no ciclo de um carbono e metilação do DNA em células do cumulus (MAT2B, mSHMT2, SAHH, DHFR, MTR e DNMT1), ovócitos e na produção *in vitro* de embriões. Trinta novilhas Nelores foram distribuídas em três grupos diferentes com dieta baseada em cana-de açúcar, ureia e mineral premix: controle; -S-Co (baixo nível de S e Co); e +Meth+Chol (adição de metionina e colina). Nenhuma diferença foi encontrada entre +Met+Col e o grupo controle. O grupo -S-Co foi diferente do controle para homocisteína (13,7 vs. 10,6;  $p < 0,001$ ), ácido fólico (29,6 vs. 26,0;  $p = 0,011$ ), B12 (143,8 vs. 165,6;  $p < 0,001$ ), IGF-I (375,3 vs. 410,2;  $p = 0,034$ ), and glicose (82,2 vs. 76,2;  $p = 0,003$ ). Os genes MAT2B e DNMT1 foram menos expressos no grupo -S-Co comparado ao controle quando normalizado pelos genes endógenos GAPDH (MAT2B  $p = 0,05$ ; DNMT1  $p = 0,03$ ) e  $\beta$ -Actina (MAT2B  $p = 0,06$ ; DNMT1  $p = 0,01$ ). As novilhas do grupo -S-Co produziu um menor número de ovócitos por animal comparado ao grupo controle (13,81 vs 17,79;  $p = 0,0438$ ), com nenhuma diferença na produção de embriões. Nossos resultados contribuem para um melhor entendimento da influência do ciclo de metabolisme de um carbon na foliculogênese e ovogênese em mamíferos. No contexto da reprodução assistida, estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de protocolos nutricionais específicos para animais doadores de ovócitos, melhorando a fertilidade dos animais no sistema de produção de embriões.

## INTRODUÇÃO

Na produção *in vitro* de embriões (PIV), vários fatores podem influenciar profundamente a eficiência da técnica. Dentre esses, a qualidade da nutrição e o estado corporal da doadora de ovócitos, a manipulação dos ovócitos e embriões e as condições ambientais *in vitro*, tem um papel determinante no sucesso da PIV, pois comprometem a qualidade do ovócito (Dode, 2006). As mudanças endócrinas e metabólicas são acompanhadas por alteração na composição do fluido folicular, que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (Leroy et al., 2008).

Para obter um ovócito de qualidade, capaz de ser fecundado e gerar um embrião saudável, se faz necessária uma correta reprogramação epigenética. Há dois períodos do desenvolvimento – nos embriões durante o período inicial de desenvolvimento e na formação das células germinativas – em que esses padrões são reprogramados, gerando células com amplos e distintos potenciais de desenvolvimento (Reik, 2007). Fatores ambientais como o *status* nutricional de doadoras de gametas e embriões e as condições de maturação de gametas e cultivo *in vitro* podem alterar o padrão de metilação do DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (Young et al., 2001; Mann et al., 2004).

Tanto as alterações pós-traducionais das histonas quanto o padrão de metilação do DNA são cruciais para a regulação da expressão gênica. No que se refere a metilação a S-adenosilmetionina (SAM), originada da conversão da metionina, é o precursor ou substrato essencial para o fornecimento de grupamentos metil para o estabelecimento da metilação *de novo* e do padrão de metilação de manutenção do DNA (Jaenish e Bird, 2003). A metionina pode ser derivada da dieta, assim como da remetilação da homocisteína, onde o grupamento metil é transferido a partir do 5-metil tetrahidrofolato

(THF) ou da betaína, um derivado da colina (Saw et al., 2001; Olthof et al., 2003). Além disso, as vitaminas do complexo B (vitamina B2, B6 e B12) são cofatores para a remetilação de homocisteína e outras reações (Saw et al., 2001).

Logo, a viabilidade de SAM como um doador de metil para a metilação de DNA, depende da disponibilidade destes nutrientes envolvidos no ciclo de um carbono. A maior função deste ciclo é assegurar que as células sempre tenham um fornecimento adequado de SAM, mesmo quando a ingestão de grupamentos metil como metionina, betaína ou colina é baixa (Inoue-Choi et al., 2012).

Recentemente foi reportado que ovócitos e embriões de mamíferos expressam inúmeras enzimas chaves do metabolismo de um carbono (Ikeda et al., 2010; Kwong et al., 2010). Isto sugere que ovócitos e embriões pré-implantação podem, independentemente, utilizar e metabolizar nutrientes no metabolismo de um carbono, como metionina, colina, betaína, folatos e vitaminas do complexo B.

Devido à grande importância da reprogramação epigenética para uma correta gametogênese, entender essa reprogramação e os eventos nela envolvidos, assim como os efeitos da nutrição sobre ela é essencial para dar suporte ao desenvolvimento e adaptação de novos protocolos de maturação de ovócitos e cultivo de embriões *in vitro*. Além disso, abre possibilidades de se estabelecer dietas nutricionais específicas para doadoras de ovócitos, objetivando a obtenção de gametas de melhor qualidade. Isso possibilita almejar melhores índices de sucesso na PIVE viabilizando a sua utilização em rebanhos comerciais.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de enxofre e cobalto na dieta de novilhas Nelore sobre a qualidade ovocitária e a produção de embriões *in vitro*, dosando componentes do ciclo de um carbono no sangue, a

expressão de genes codificadores de enzimas desse ciclo em células do cumulus e a produção embrionária *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- protocolo nº 98/2010) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **Animais**

Foram utilizadas 30 novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) púberes, do mesmo grupamento genético, com escore de condição corporal (ECC) e peso corporal (PC) semelhantes, entre 3 e 4 (escala de 1 a 5) e 398,5 kg de peso vivo médio, respectivamente. Os animais foram mantidos em piquetes com 10 animais por piquete, com área de cocho de 80 cm/animal.

### **Dieta**

Foi oferecida dieta completa aos animais duas vezes ao dia, calculada para manutenção mais um ganho de 100-200 g/animal/dia (NRC, 2000). As dietas foram quimicamente idênticas, exceto para as quantidades de metionina, colina, cobalto e enxofre, e foram divididas em três tratamentos: -S -Co, +Metionina +Colina e controle. A base da dieta foi composta de cana-de-açúcar com uréia e sal mineral GRAMA<sup>®</sup>.

Foram feitas análises do sal mineral em dois laboratórios diferentes, onde os níveis de garantia estão apresentados na Tabela 1, e as análises da cana-de-açúcar em um mesmo laboratório, em três períodos diferentes entre o início e o final da dieta (Tab 2). A dieta do grupo controle foi composta de cana-de-açúcar picada com uréia + enxofre ventilado (9:1) e sal mineral completo (Tab 1), com níveis normais de cobalto e

enxofre. A dieta do grupo -S -Co foi composta de cana-de-açúcar picada com uréia sem enxofre e sal mineral, sem nenhuma fonte de cobalto e enxofre (Tab 1). A dieta do grupo +Metionina+Colina foi à mesma fornecida para o grupo controle, recebendo ainda a adição de fontes encapsuladas de DL-metionina (20 g/animal/dia; MetiPEARL™, Kemin industries, Inc.) e hidrocloreto de colina (15 g/animal/dia; CholiPEARL™, Kemin Industries, Inc.). Ambas as moléculas comerciais oferecem 50 % de proteção ruminal (“*rumen by-pass*”) e apresentam 55 % e 25 % de concentração de cada nutriente, respectivamente. Em média, a suplementação garantiu que cada animal recebesse diariamente 5,5 g de metionina metabolizável, e 1,8 g/animal/dia de colina metabolizável. Tanto a fonte de metionina como de colina foram fornecidas juntamente ao sal, uma vez ao dia sobre o volumoso, individualmente (Fig 1). Antes do fornecimento das dietas, as sobras eram retiradas dos cochos e pesadas, para cálculo do consumo diário do grupo. Foram realizadas pesagens dos animais quinzenalmente, em jejum de 8 horas, para cálculo do ganho de peso médio diário (GPMD).



FIGURA 1 A figura mostra o fornecimento da dieta para os animais. A: Uréia + Enxofre sendo misturada na cana-de-açúcar; B: mineral premix sendo misturado na cana-de-açúcar; C: animais nos troncos.

Os animais foram confinados por um período total de 6 meses, o grupo +Metionina+Colina iniciou a ingestão das fontes encapsuladas de DL-metionina (20 g/animal/dia; MetiPEARL<sup>TM</sup>, Kemin industries, Inc.) e hidrocloreto de colina (15 g/animal/dia; CholiPEARL<sup>TM</sup>, Kemin Industries, Inc.) a partir do segundo mês de início do experimento. Como a base das dietas dos grupos controle e +Metionina+Colina são as mesmas, esta diferença de tempo não influenciou a análise da diferença entre elas. Esse período de fornecimento das dietas foi importante para assegurar que, se não completa, pelo menos abrangeria grande parte de um ciclo completo de foliculogênese, a partir da ativação de folículos primordiais.

**TABLE 1** Composição química da cana-de-açúcar e mineral premix.

Item	Composição	
<b>Cana-de-açúcar</b>		
Ca (%)	0,23	
Proteína Bruta (%)	5,2	
K (%)	0,74	
<b>Co (%)</b>	<b>0,01</b>	
Na (ppm)	0,02	
P (%)	0,19	
Fibra Bruta (%)	22,5	
NDT (%)	66,7	
Mg (%)	0,14	
Cu (ppm)	0,00	
Umidade (%)	77,7	
Extrato Etéreo (%)	2,1	
Matéria Seca (%)	22,2	
<b>S (%)</b>	<b>0,08</b>	
F (g/Kg)	0,001	
Zn (ppm)	0,00	
Mineral premix	completo <sup>1</sup>	-enxofre -carbonato de cobalto
Na	21,01	20,77
Ca	10,15	11,15
P	8,30	8,55
<b>S</b>	<b>1,76</b>	<b>0,28</b>
Zn	0,28	0,23
Mg	0,18	0,24
Cu	0,07	0,07
<b>Co</b>	<b>0,015</b>	<b>0,002</b>

<sup>1</sup> mineral premix (GRAMA<sup>®</sup>). Composição básica do mineral premix: Fosfato bicálcico, cloreto de sódio, iodato de cálcio, enxôfre ventilado, óxido de zinco, óxido de cobre, carbonato de cobalto, selenito de sódio.

#### Análises Bioquímicas

As concentrações das vitaminas B9 (ácido fólico) e B12, homocisteína, insulina basal, glicose e IGF-I foram dosadas no plasma sanguíneo de todos os animais, em intervalos de quinze dias (n=9-11). As análises foram realizadas pelo Instituto Sabin,

Brasília-DF, Brasil. Para mensurar glicose, foi utilizado equipamento Advia 2400, com metodologia de hexokinase (kit Siemens), ácido fólico (B9) e insulín basal o equipamento foi ADVIA Centaur com método de quimiluminescência (Kit Siemens), para Vitamin B12 o equipamento foi ADVIA Centaur e metodologia foi Centaur (Kit Siemens), para a somatomedina/Igf-1 e homocisteína o equipamento foi IMMULITE xpi 2000 com método de quimiluminescência (Kit Siemens).

#### Aspiração folicular e manipulação dos ovócitos

Os animais foram submetidos à aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) a partir do terceiro mês que estava sendo oferecida a dieta para o grupo +Metionina+Colina e quarto mês para o grupo controle e -S-Co, realizando um total de sete seções/animal/tratamento com intervalo de uma semana entre as seções. O equipamento utilizado foi um aparelho de ultrassom (Aloka SSD 500<sup>®</sup> Japão), acoplado a uma sonda com transdutor setorial micro-convexo de 7,5 MHz modelo UST 9125 - 7.5 (Aloka<sup>®</sup>, Japão) e um guia transvaginal WTA<sup>®</sup> (Brasil), uma bomba de vácuo Cook<sup>®</sup> VMAR5100 (Austrália), acoplada a um sistema com uma agulha 18 G (0,9 x 70) WTA<sup>®</sup> (Brasil).

Os animais submetidos ao procedimento de aspiração folicular foram contidos em tronco de contenção bovino, foi realizado anti-sepsia local e posterior anestesia epidural baixa com lidocaína 2 % (3 a 5 ml - Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). O guia foi posicionado transvaginal no fórnix, sendo direcionado para o mesmo lado do ovário a ser aspirado (direita /esquerda). Os ovócitos foram aspirados em meio PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com 5 % de Soro Fetal Bovino (Sigma- Aldrich<sup>®</sup> St. Louis, MO) e adicionado de 1 µl/ml de heparina sódica (Liquemine<sup>®</sup> i.v. Roche, Suíça) à temperatura constante de 39° C. A pressão de aspiração aplicada foi de 13-15 ml/min e



os ovócitos recuperados foram encaminhados ao Laboratório para serem selecionados como já descrito na literatura (Caixeta et al., 2009). Parte dos ovócitos foi desnudada, e as células do cumulus e os ovócitos armazenados em RNAlater<sup>®</sup> Solution (Ambion<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a -80° C para posterior extração de RNA. Outra parte foi submetida à maturação *in vitro* (MIV) e produção de embriões para avaliar a taxa de produção de blastocistos. Os ovócitos destinados à PIVE foram provenientes a partir da quinta aspiração, perfazendo um total de três réplicas. Uma semana de aspiração de todos os animais, dos três grupos, foi considerada uma réplica.

#### Produção *in vitro* de embriões

Todos os meios utilizados (MIV/FIV/CIV) foram fornecidos pela GENEAL, Genética e Biotecnologia Animal S/A, Uberaba-MG, Brasil.

#### Maturação *in vitro* de ovócitos (MIV)

Os COCs selecionados (graus I, II e III) foram transferidos em número de 15-30 para uma gota de 150 µL de meio de maturação, sendo uma gota para cada tratamento e duas gotas para controle da PIVE, utilizando sêmen com qualidade previamente conhecida e ovócitos provenientes de ovários de abatedouro local. Foram cobertas com óleo de silicone e incubados por 22 h a 39° C e 5 % CO<sub>2</sub> em ar.

#### Fecundação *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 150 µl de meio de fecundação (FEC). O sêmen de um touro, com fertilidade *in vitro* conhecida, e rotineiramente usado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foi utilizado para a FIV. O sêmen foi descongelado a 37° C por 30 segundos em banho-maria e as células espermáticas

selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* 45 e 90 %, utilizando o protocolo já descrito na literatura (Machado et al., 2009). Espermatozóides e ovócitos foram co-incubados por 18 horas a 39° C em 5 % de CO<sub>2</sub> em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o dia zero (D0).

#### Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)

Após a co-incubação, os possíveis zigotos oriundos de ovócitos fecundados, foram lavados e transferidos para gotas de 150 µL do meio de cultivo. Foram cultivados a 39° C em 5 % de CO<sub>2</sub> em ar. Foram avaliados quanto a clivagem no D2, no D7 para verificação da taxa de blastocisto e no D8 para a taxa de eclosão. Em D8 os embriões foram retirados do sistema de cultivo e congelados a -80° C em RNAlater<sup>®</sup> Solution (Ambion<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para uma análise futura do padrão de metilação do genoma.

#### Extração do RNA Total e Transcrição Reversa

O RNA total de quatro *pools* de células do cumulus provenientes de 50 ovócitos foi extraído utilizando o kit RNeasy Plus Micro<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com 0,5 U de DNase (1 U/µL; Invitrogen<sup>®</sup>, CA, USA) e submetido à uma reação de transcrição reversa utilizando 200 U de SuperScript III (200 U/µL; Invitrogen<sup>®</sup>, CA, USA), 0,5 µg de Oligo-DT<sub>12-18</sub> *primer* (0,5 µg/µL; Invitrogen<sup>®</sup> CA, USA), dNTPs (2.0 mM de cada), 0.1 mM DTT (0.1 mM/µL), 40 U de RNaseOUT (Invitrogen<sup>®</sup> CA, USA) e tampão da enzima 1 X. As reações foram realizadas utilizando 65° C por 5 min, 50° C por 60 min e 70° C por 15 min. O volume final de cDNA foi de 28 µL.

#### Expressão gênica por PCR em Tempo Real

As análises de expressão gênica para os genes relacionados ao ciclo de um carbono (MAT2B, SAHH, MTR, mSHMT2, DHRF), metilação do DNA (DNMT1) e os constitutivos ( $\beta$ -ACTINA e GAPDH) foram investigadas por ensaio de PCR em tempo real utilizando o sistema Fast SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA) no ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA ).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram delineados a partir de sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* (Tab 2). A identidade dos produtos de PCR foi confirmada pela avaliação de seu tamanho por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5 %. As reações foram realizadas com um volume final de 25  $\mu$ L, utilizando 12,5  $\mu$ L de SYBR, 1  $\mu$ L de cDNA e 7,5 pmoles de cada primer.

As condições para a amplificação dos genes foram: 95° C por 10 min, 50 ciclos de: 95° C por 15 seg; 60° C por 1 minuto, seguido de curva de dissociação padrão. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em triplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi avaliada pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

TABELA 2 Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb).

Gene (Acesso ao Genbank)	Sequence	Amplicon (pb)
DHFR (BC114162.1)	F: 5' TGGTTTGGATAGTGGGAGGCAGTT 3' R: 5' TGGACATCCAAAGGAACACCTGGA 3'	178
mSHMT2 (BC103242.1)	F: 5' ATTGACTACGCCCGCATGAGAGAA 3' R: 5' TCTTGTGAGTGGTCGTGGTGACAA 3'	148
MTR (NM_001030298.1)	F: 5' ACTCAGGGCAAAGGAGGGAAGAAA 3' R: 5' ATGCCCTTCACAAGAGCGTACTCA 3'	95
MAT2B (NM_001046526.1)	F: 5' AACAAGTCCGCAAACATGGACCAC 3' R: 5' ATCTGTTCGTTGCCAGACCAGTGA 3'	146
SAHH (BT030537.1)	F: 5' TCAGCAACTGCTCACTCAGTCCTT 3' R: 5' ACAGTTCCCTCACACCCTTTGACA 3'	192
$\beta$ -ACTINA (NM_173979.3)	F: 5' GGCACCCAGCACAATGAAGATCAA 3' R: 5' ATCGTACTCCTGCTTGCTGATCCA 3'	130
GAPDH (NM_001034034.2)	F: 5' GGCGTGAACCACGACAAGTATAA 3' R: 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT 3'	119

#### Forma de análise dos resultados

O experimento foi delineado em um esquema fatorial, considerando que Tempo e Dieta poderiam exercer alguma influência nas variáveis avaliadas.

Atribuiu-se distribuição Normal para as variáveis respostas avaliadas (Homocisteína, Ácido Fólico, B12, IGF-I, Insulina e Glicose), de modo que se aplicou um modelo de

Análise de Covariância, usando o Peso como uma covariante para avaliar os efeitos do Tempo e Dieta nas respostas, assim como o efeito da interação entre os dois fatores.

Atribui-se inicialmente distribuição Poisson para as variáveis respostas avaliadas (Número de folículos aspirados, Número de ovócitos totais e Número de ovócitos viáveis). Neste caso, para corrigir a superdispersão presente nos dados foi utilizado o método da Quase-verossimilhança na estimação do fator de heterogeneidade.

Para avaliar os resultados obtidos na PIVE, utilizou-se a distribuição Binomial. O ajuste utilizando a distribuição Binomial não conseguiu adequar toda a variabilidade dos dados, devido à superdispersão apresentada pelo conjunto. Então, a correção da heterogeneidade presente nos dados foi tratada através do método de Quase-verossimilhança (Quase-Binomial).

Para os experimentos onde os efeitos de Tempo ou de Dieta foram significativos, foram aplicados testes de comparações múltiplas, por meio de contrastes ortogonais, para avaliar entre quais tempos ou entre quais dietas houve essa diferença. No caso das comparações múltiplas entre as dietas, aplicou-se o teste de Dunnett.

Todas as análises foram realizadas no Programa R “Development Core Team”.

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão dos genes endógenos GAPDH e  $\beta$ -ACTINA. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método  $\Delta\Delta$ Ct com correção da eficiência (Pfaffl, 2000). Foi considerado um gene diferencialmente expresso somente quando obtida diferença estatística para os dois genes constitutivos.

## RESULTADOS

### Peso corporal e consumo diário de alimentos

O Ganho de peso médio diário (GPMD) e o consumo médio diário de alimento não foram significativamente diferentes entre os tratamentos e os resultados são mostrados na Figura 2 e Tabela 3.

TABELA 3 Composição e consumo das dietas experimentais.

	Dietas		
	Controle	-S-Co	+Met+Col
Consumo de Matéria Seca/cana-de-açúcar (kg/d)	4,59	4,38	4,26
Ingredientes Kg/d (%)			
Cana-de-açúcar	20,674 (98,54)	19,735 (98,53)	19,190 (98,36)
Uréia	0,188 (0,90)	0,199 (0,99)	0,174 (0,89)
Enxofre Ventilado	0,021 (0,10)	-	0,019 (0,10)
Mineral premix	0,097 (0,46)	0,095 (0,48)*	0,093 (0,48)
Metionina <sup>1</sup>	-	-	0,019 (0,09)
Colina <sup>2</sup>	-	-	0,014 (0,07)

\*mineral premix sem nenhuma fonte de cobalto e enxofre; <sup>1</sup>DL-metionina (MetiPEARLTM); <sup>2</sup>hidrocloreto de colina (CholiPEARLTM) - Kemin Industries, Inc.

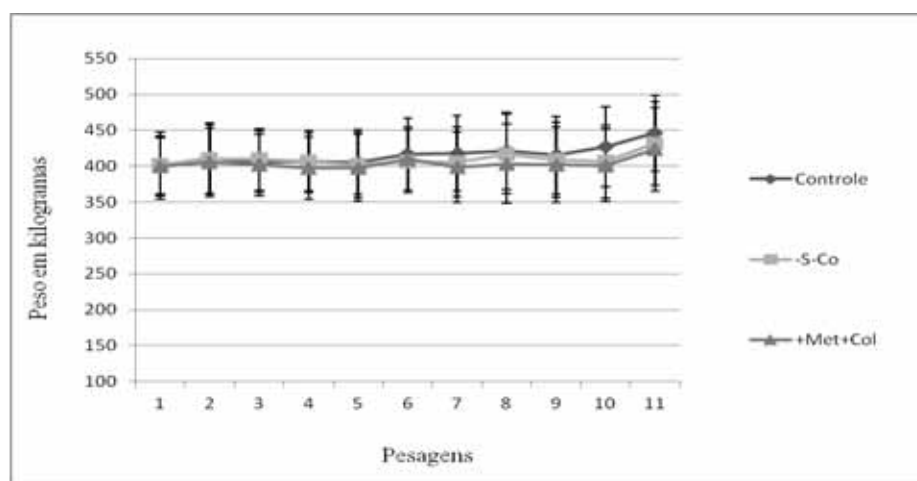


Figura 2- Gráfico mostrando o peso ( $\pm$  DP) de animais ( $n=10$  por grupo) durante todo o período que a dieta foi fornecida. Foram realizadas pesagens a cada quinze dias ( $n=11$ ). Não houve diferença estatística entre o grupo controle comparado ao grupo +Met+Col ( $p=0.0809$ ), e-S-Co ( $p=0.1308$ ).

### Perfil metabólito no plasma

Não houve uma interação significativa da Dieta e do Tempo para todos os metabólitos plasmáticos avaliados entre os tratamentos, como homocisteína ( $p = 0,126$ ), ácido fólico ( $p = 0,99$ ), B12 ( $p = 0,541$ ), IGF-I ( $p = 0,95$ ), insulina ( $p = 1,00$ ) e de glicose ( $p = 0,256$ ). O grupo -S-CO foi significativamente diferente do grupo de controle para os seguintes metabólitos: homocisteína ( $p < 0,001$ ), ácido fólico ( $p = 0,011$ ), B12 ( $p < 0,001$ ), de IGF-I ( $p = 0,034$ ), e glicose ( $p = 0,003$ ). Homocisteína, ácido fólico e glicose foram mais altas, enquanto que B12 e de IGF-I foram inferiores no grupo -S-Co do que no grupo controle (Tabela 4). O grupo +Met+Col não diferiu do grupo controle para todos os metabólitos (Tabela 5). O Tempo afetou significativamente as concentrações do ácido fólico ( $p < 0,001$ ), B12 ( $p < 0,001$ ), IGF-I ( $p < 0,001$ ), insulina ( $p < 0,001$ ), e glicose ( $p < 0,001$ ). O ácido fólico e IGF-I foram agrupados em dois grupos de tempo, a vitamina B12 e a insulina em três grupos de tempo, e a glicose foram agrupadas em quatro grupos de tempo (Tabela 6).

**TABELA 4** Efeito da dieta -S-Co nos níveis dos metabólitos do ciclo de um carbono, IGF-I, Insulina e Glicose na circulação periférica.

	Dieta				<i>p</i> -valor
	-S-Co		Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
Homocisteína (micromol/L)	13,70 <sup>b</sup>	3,52	10,64 <sup>a</sup>	3,19	< 0,001
Ácido Fólico (ng/mL)	29,58 <sup>b</sup>	10,47	25,98 <sup>a</sup>	10,52	0,011
B12 (pg/mL)	143,84 <sup>b</sup>	46,48	165,59 <sup>a</sup>	48,73	< 0,001
IGF-I (ng/mL)	375,30 <sup>b</sup>	99,17	410,24 <sup>a</sup>	121,00	0,034
Insulina (μUI/mL)	4,53 <sup>a</sup>	6,12	3,33 <sup>a</sup>	3,23	1,00
Glicose (mg/dL)	82,16 <sup>b</sup>	18,47	76,18 <sup>a</sup>	13,88	0,003

\*Letras diferentes indicam médias diferentes, ao nível de 5% de significância.

**TABELA 5** Efeito da dieta +Met+Col nos níveis dos metabolitos do ciclo de um carbono, IGF-I, Insulina e Glicose na circulação periférica.

	Dieta				<i>p</i> -valor
	+Met+Col		Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
Homocisteína (micromol/L)	11,35 <sup>a</sup>	5,81	10,64 <sup>a</sup>	3,19	0,874
Ácido Fólico (ng/mL)	25,63 <sup>a</sup>	12,22	25,98 <sup>a</sup>	10,52	0,948
B12 (pg/mL)	162,87 <sup>a</sup>	30,07	165,59 <sup>a</sup>	48,73	0,682
IGF-I (ng/mL)	394,17 <sup>a</sup>	95,65	410,24 <sup>a</sup>	121	0,306
Insulina (μUI/mL)	3,58 <sup>a</sup>	4,11	3,33 <sup>a</sup>	3,23	1,00
Glicose (mg/dL)	75,21 <sup>a</sup>	13,71	76,18 <sup>a</sup>	13,88	0,759

\* Letras diferentes indicam médias diferentes, ao nível de 5% de significância.



**TABELA 6** Comparações múltiplas para o nível sanguíneo de Ácido Fólico, B12, IGF-I, Insulina e Glicose nos diferentes tempos.

Tempo (coleta)	Ácido Fólico (ng/mL)		B12 (pg/mL)		IGF-I (ng/mL)		Insulina ( $\mu$ UI/mL)		Glicose (mg/dL)	
	Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos	Média $\pm$ DP
1	A	25,72 <sup>a</sup> 8,54	B	165,85 <sup>b</sup> 48,07	A	305,9 <sup>a</sup> 90,75	A	3,43 <sup>a</sup> 3,49	D	94,25 <sup>d</sup> 18,29
2	A	24,68 <sup>a</sup> 15,34	B	155,95 <sup>a</sup> 34,92	A	375,45 <sup>a</sup> 79,40	B	4,19 <sup>b</sup> 4,1	D	92,80 <sup>d</sup> 17,21
3	B	32,16 <sup>b</sup> 8,37	B	161,5 <sup>b</sup> 30,56	A	357,03 <sup>a</sup> 82,69	B	3,99 <sup>b</sup> 4,26	B	80,43 <sup>b</sup> 12,97
4	B	30,91 <sup>b</sup> 10,89	A	128,76 <sup>a</sup> 26,19	B	401,5 <sup>b</sup> 105,47	B	4,34 <sup>b</sup> 5,32	C	84,86 <sup>c</sup> 10,01
5	B	34,65 <sup>b</sup> 12,61	B	168,86 <sup>b</sup> 42,37	B	416,56 <sup>b</sup> 98,92	A	3,37 <sup>a</sup> 3,81	A	64,56 <sup>a</sup> 13,14
6	B	30,79 <sup>b</sup> 10,62	B	153,53 <sup>b</sup> 30,18	B	411,56 <sup>b</sup> 113,18	B	4,34 <sup>b</sup> 5,39	B	75,83 <sup>b</sup> 13,25
7	A	26,70 <sup>a</sup> 11,43	C	188,63 <sup>c</sup> 72,74	A	355,3 <sup>a</sup> 82,89	A	3,2 <sup>a</sup> 3,20	C	82,66 <sup>c</sup> 24,36
8	A	24,58 <sup>a</sup> 9,15	B	151,83 <sup>b</sup> 45,01	B	414,73 <sup>b</sup> 103,27	A	0,5 <sup>a</sup> 0	B	77,96 <sup>b</sup> 10,96
9	A	23,33 <sup>a</sup> 9,61	B	153,06 <sup>b</sup> 29,02	B	408,03 <sup>b</sup> 108,38	A	2,0 <sup>a</sup> 0	B	72,76 <sup>b</sup> 8,89
10	A	22,93 <sup>a</sup> 11,39	B	159,66 <sup>b</sup> 42,89	A	376,13 <sup>a</sup> 114,57	C	6,66 <sup>c</sup> 7,68	B	74,66 <sup>a</sup> 6,32
11	A	20,96 <sup>a</sup> 7,26	B	142,83 <sup>b</sup> 31,82	B	467,73 <sup>b</sup> 115,67	B	6,13 <sup>b</sup> 5,23	A	67,76 <sup>a</sup> 8,64

\* Letras diferentes indicam médias diferentes, ao nível de 5% de significância.

Dados da aspiração, qualidade de ovócitos e produção de embriões.

Não houve uma interação significativa do Tempo e da Dieta para o número total de ovócitos ( $p = 0,629$ ), número de folículos aspirados ( $p = 0,824$ ), número de ovócitos viáveis ( $p = 0,761$ ), taxa de blastocistos em D7 ( $p = 0,662$ ), taxa de blastocistos em D8 ( $p = 0,574$ ), ou número de blastocistos eclodidos D8 / taxa de blastocistos em D7 ( $p = 0,984$ ). Ambos, Dieta ( $p = 0,0438$ ) (Tabela 7) e Tempo ( $p = 0,007$ ) (Tabela 8) influenciaram o número total de ovócitos. O grupo -S-Co produziu um menor número de ovócitos do que o grupo controle ( $p = 0,0438$ ) (Tabela 7). O Tempo influenciou no número de folículos aspirados ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8). Não houve influência das dietas sobre os parâmetros de produção de embriões (Tabela 9).

**TABELA 7** Efeito das dietas no número total de ovócitos por animal, recuperados por ovum pick-up.

Dieta	Média	± DP	<i>p</i> -valor
Controle	17.79 <sup>a</sup>	11.63	
+Met+Col	15.95 <sup>a</sup>	10.15	0.2794
-S-Co	13.81 <sup>b</sup>	6.60	0.0438

\* Letras diferentes indicam médias diferentes, ao nível de 5% de significância.

**TABELA 8** Comparações múltiplas para o número de folículos aspirados e número de ovócitos totais nos diferentes tempos de OPU.

Tempo (OPU)	Número de folículos			Número de ovócitos		
	Gruposs	Média	± DP	Grupos	Média	± DP
1	A	15,70 <sup>a</sup>	7,72	A	10,46 <sup>a</sup>	6,94
2	A	21,96 <sup>a</sup>	8,67	A	17,26 <sup>a</sup>	8,19
3	A	19,63 <sup>a</sup>	9,50	A	16,60 <sup>a</sup>	10,66
4	A	21,63 <sup>a</sup>	10,08	B	18,83 <sup>b</sup>	11,50
5	B	28,26 <sup>b</sup>	13,12	A	16,03 <sup>a</sup>	8,47
6	B	26,40 <sup>b</sup>	12,04	A	13,48 <sup>a</sup>	8,72
7	B	28,31 <sup>b</sup>	13,5	A	17,80 <sup>a</sup>	11,21

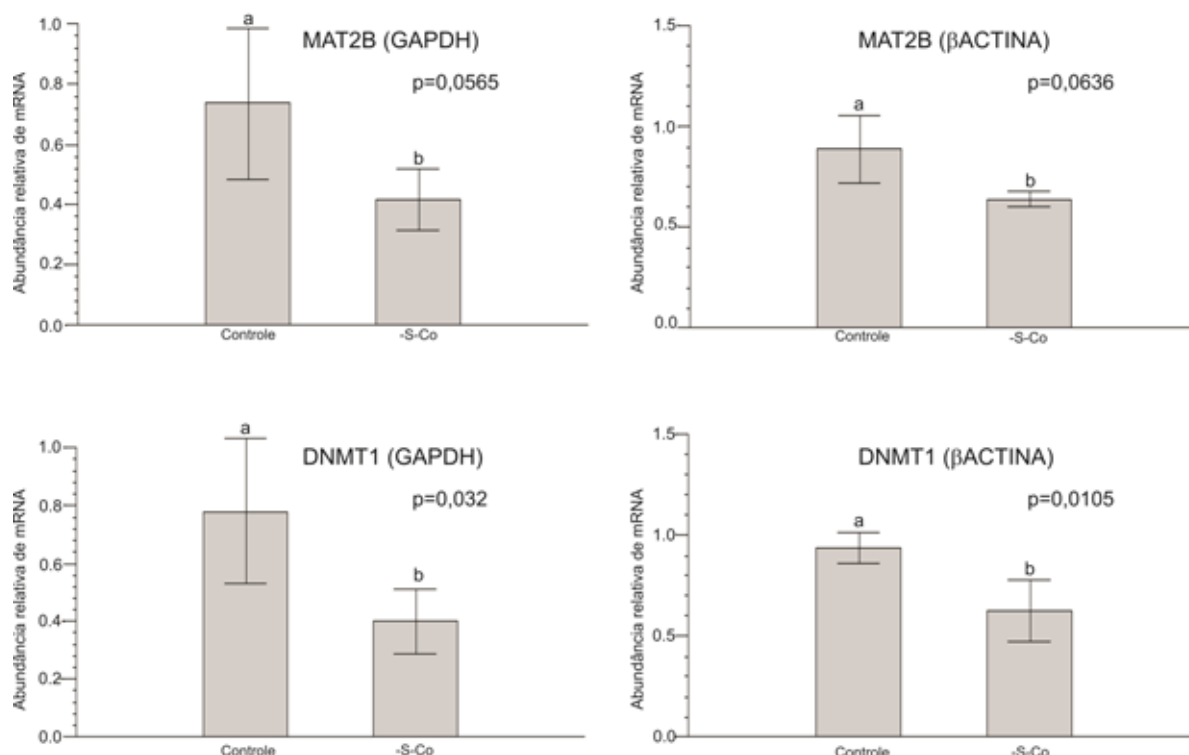
\* Letras diferentes indicam médias diferentes, ao nível de 5% de significância.

**TABELA 9** Percentagem de embriões produzidos *in vitro*, no dia 7 e 8 de desenvolvimento com relação ao número de ovócitos totais, número de blastocistos totais e blastocistos eclodidos.

Dieta	Ovócitos N	Blastocisto D7		D8			
		N	(%)	Blastocisto		Blastocisto Eclodido	
		N	(%)	N	(%)	n	(%)
Controle	229	146	63,76	156	68,12	73	46,79
-S-Co	129	73	56,59	78	60,47	36	46,15
+Met+Col	190	116	61,05	123	64,74	56	45,53

## Quantificação da expressão gênica

Entre os genes quantificados nas células do cumulus (Tabela 3), MAT2B ( $\beta$ -actina:  $p = 0,06$ ; GAPDH:  $p = 0,05$ ) e DNMT1 ( $\beta$ -actina:  $p = 0,01$ ; GAPDH:  $p = 0,03$ ) demonstraram uma expressão menor no grupo -S-Co em comparação com o grupo controle (Figura 3).



**FIGURA 3** Abundância relativa de mRNA dos genes MAT2B e DNMT1 determinado pelo método de RT-PCR e normalizado utilizando os genes GAPDH e  $\beta$ -actina em células do cumulus de ovócitos aspirados de animais dos grupos controle e -S-Co. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$ DP.

## DISCUSSÃO

Buscamos primeiramente, avaliar se quando alterados os níveis de enxofre e cobalto da dieta haveria uma resposta a nível bioquímico dos metabólitos que fazem parte como cofatores e/ou substratos no ciclo de um carbono. Para isso, oferecemos uma dieta

baseada em cana-de-açúcar, uréia (com ou sem enxofre - 9:1) e sal mineral. A cana-de-açúcar foi escolhida como volumoso por ter baixa disponibilidade de enxofre, cobalto e proteína (Tab 1).

Os ruminantes normalmente não têm nenhuma fonte de vitamina B12 através da dieta e dependem inteiramente da microbiota ruminal para síntese dessa vitamina, que é dependente de contínua suplementação de cobalto na dieta. A falta de metionina pode contribuir parcialmente para um comprometimento da retenção de nitrogênio no rúmen, impedindo a produção de proteína bacteriana (Kirchgeßner et al., 1998). Além disso, o nível de energia ingerida, assim como a viabilidade de cobalto são fatores importantes para a atividade das bactérias no rúmen (Poston e Standtman, 1975).

A metionina é um aminoácido sulfurado essencial que, muitas vezes limita o crescimento do ruminante (Richardson e Hatfield, 1978). Ela pode ser derivada da dieta, assim como da remetilação da homocisteína, onde o grupamento metil é transferido a partir do 5-metil tetrahidrofolato (THF) ou da betaína, um derivado da colina (Saw et al., 2001; Oltho et al., 2003). O metabolismo da metionina pode ser através da reação de trans- e remetilação do seu ciclo, e eles estão interligados com o ciclo do metabolismo do folato e a via da transulfuração a partir da homocisteína (Main et al., 2010). A combinação desta rede de metabólitos é chamada de ciclo de um carbono (Fox e Stover, 2008; Laanpere et al., 2010).

Quando disponibilizamos na dieta metionina e colina protegidas, elas supostamente resultariam em um aumento da fonte de doadores metil, aumentando a síntese de SAM, metilação de DNA, e conseqüentemente formação de S-adenosil-homocisteína (SAH), o subproduto de SAM. Em ruminantes, a metionina exógena não é diretamente derivada da proteína da dieta, mas sim das proteínas microbianas presentes no rúmen. Ao contrário da metionina, todas as partes da molécula de colina também podem ser

sintetizadas nas células dos mamíferos, e o fator limitante para a síntese de colina é provavelmente ter fonte de metil viável (Xue e Snoswell, 1985).

A foliculogênese em mamíferos é um processo constante e contínuo nos ovários e pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia durante a vida fetal, com a formação do folículo primordial e culmina com a ovulação (Van Der Hurk e Zhao, 2005). Portanto os folículos presentes nos ovários se encontram em diferentes estágios de crescimento ou regressão. No entanto, a precisão do tempo em que ocorre a ovogênese e foliculogênese ainda é bastante discutida na literatura (Webb et al., 2004; Russe, 1983; Lussier et al., 1987). A dieta foi oferecida para os animais durante três meses, após este período iniciamos a aspiração folicular, continuando a dieta por mais dois meses até o término das aspirações. Este tempo foi importante para assegurar, que se não completa, pelo menos abrangeria uma grande parte do período em que a reprogramação epigenética e síntese de transcritos estariam acontecendo no ovócito, desde a fase pré-antral até os estágios finais de maturação.

Esta fase de foliculogênese e ovogênese está altamente susceptível a alterações do meio. Fatores ambientais como o *status* nutricional de doadoras de gametas e embriões e as condições de maturação de gametas e cultivo *in vitro* podem alterar o padrão de metilação do DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (Young et al., 2001; Mann et al., 2004).

Vimos em nossos resultados, que não houve alteração dos metabólitos sanguíneos, nem na quantificação de mRNA das enzimas do ciclo de um carbono quando comparamos o grupo controle com o grupo +Met+Col. A homocisteína é um ponto de ramificação crítico no metabolismo da metionina, podendo ser tanto transsulfurada para formar a cisteína ou remetilada para conservar metionina (Finkelstein, 2007). Embora não se tenha medido cisteína aqui, acreditamos que, para evitar a acumulação de homocisteína,

a cisteína pode ter sido produzida através da reação de transsulfuração, porque quando o SAM se encontra no seu estado "elevado" ativa a enzima CBS e, conseqüentemente, inibe a enzima MTHFR e MTR (Martinov et al., 2010) (Fig 4).

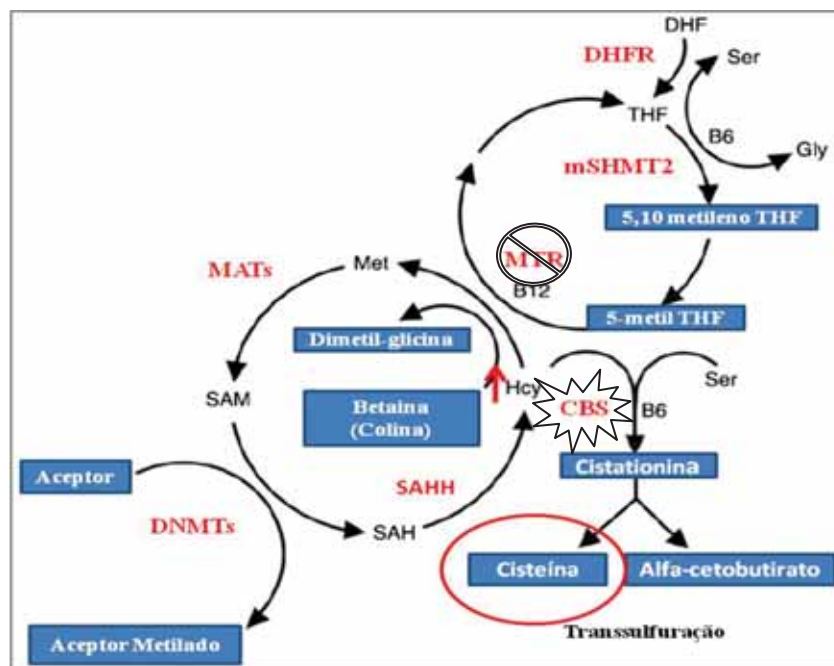
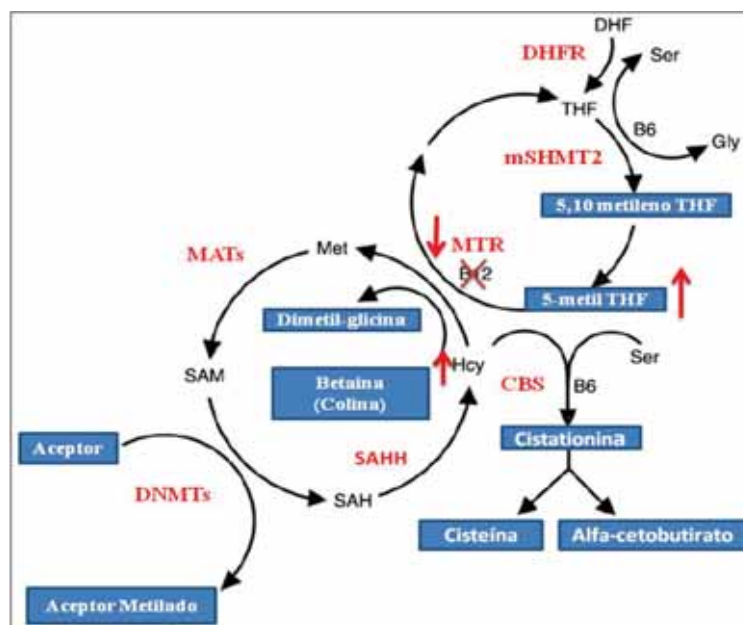


FIGURA 4 Ciclo de um carbono esquematizando acúmulo de homocisteína. A homocisteína por ser tóxica para o organismo ocorre uma catabolização pela via de transsulfuração em uma reação irreversível, produzindo cisteína e  $\alpha$ -cetobutirato.

Nosso objetivo na dieta do grupo com menor nível de enxofre e cobalto foi diminuir a síntese de aminoácidos sulfurados e vitaminas do complexo B pela microbiota ruminal. Isso também foi possível devido a maior parte do nitrogênio fornecido na dieta ser de origem não proteica (NNP).

Pudemos constatar que a dieta com menor nível de enxofre e cobalto conseguiu diminuir os níveis de B12, aumentando os níveis de homocisteína e ácido fólico (B9) (Tab 4), o que está de acordo com os dados da literatura, que mostram que com a deficiência de vitamina B12 a atividade de síntese da metionina pela MTR diminui,

causando hiperhomocisteinemia (Scott, 1999; Stongl et al., 2000), e o acúmulo de folato como 5-metil-THF, sendo esta a forma mais encontrada no plasma de bovinos (Fig 5). Desta forma, o grupo metil não encontra-se disponível para metilar homocisteína, o que conduz a níveis elevados de homocisteína no plasma e a diminuição da síntese da metionina pela remetilação, e em seguida de SAM, e de outros metabólitos do ciclo de metilação (Baik e Russel, 1999; Stabler, 2001).



**FIGURA 5** Ciclo de um carbono esquematizando a deficiência de B12. Quando há uma diminuição da quantidade de B12, vitamina utilizada como cofator para a enzima MTR (Metionina Sintetase) diminui a sua atividade, acarretando em um acúmulo folato, como 5-metil THF, e de homocisteína.

Como foi encontrada uma maior concentração de glicose, e que o IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina) é um fator mitogênico (Levine et al., 2006) e promove a regulação da glicose através da homeostase, o aumento da glicose no grupo carência pode ter causado uma diminuição na secreção de IGF-I, para não aumentar ainda mais a glicose, fazendo com que ocorra uma queda ainda maior dos níveis de IGF-I plasmático. Em estudos com camundongos (Wang et al., 2013), observaram que o



aumento de homocisteína promove a gliconeogênese para aumentar a produção de glicose, contribuindo para a ocorrência de resistência à insulina. Outro grupo (Sinclair et al., 2007), obteve o mesmo resultado de resistência à insulina, mas foi em progêneses resultantes de ovelhas doadoras de ovócitos que foram submetidas a uma dieta deficiente em B12 e folato.

Existem inúmeras evidências na literatura de que há associação entre a nutrição e a função ovariana, e de que o sistema glicose-insulina-IGF seja um dos principais mecanismos que elucidam esta afirmação (Armstrong et al., 2001; Scaramuzzi et al., 2006; Martins et al., 2008). No presente experimento as dietas foram calculadas de forma isoenergética, para manutenção do peso dos animais. Os resultados encontrados referentes aos metabólitos do plasma sanguíneo foram uma queda na concentração de IGF-I, um aumento na concentração de glicose no grupo carência quando comparados ao grupo controle. A maior parte do IGF-I circulante é derivada a partir da sua síntese no fígado, regulado pelo hormônio de crescimento (GH), pela insulina, e ingestão nutricional (Yakar et al., 2004).

Os IGFs são de grande importância para os estágios iniciais da foliculogênese, podendo causar um comprometimento severo do desenvolvimento folicular pré-antral e antral (Buratini, 2006; Webb et al., 2004). O que reforça este fato, é a diferença encontrada no número de ovócitos totais no grupo -S -Co quando comparado ao controle (Tab 7). Como nosso objetivo era que a dieta do grupo -S -Co, com baixos níveis de Co e S, causasse uma queda na produção de aminoácidos sulfurados e conseqüentemente de proteínas, esta deficiência a nível nutricional pode ter interferido na produção de IGF-I, por ser uma molécula proteica.

As mudanças endócrinas e metabólicas são acompanhadas por alteração na composição do fluido folicular, que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos

ovócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (Leroy et al., 2008). Há uma intensa comunicação bioquímica entre o ovócito e as células do cumulus (Eppig, 1991). Recentemente, ovócitos e embriões de mamíferos foram reportados expressarem inúmeras enzimas chaves do metabolismo de um carbono (Ikeda et al., 2010; Kwong et al., 2010), sugerindo que ovócitos de mamíferos e embriões pré-implantação podem independentemente utilizar e metabolizar nutrientes no metabolismo de um carbono, como metionina, colina, betaina, folatos e vitaminas do complexo B.

A análise do transcriptoma das células cumulus/granulosa, está sendo proposto como um instrumento não invasivo para avaliar a qualidade e viabilidade do ovócito (Uyar et al., 2013; Cordeiro, 2011). Tomando todas estas informações, utilizamos as células do cumulus para avaliar os níveis de expressão dos genes que codificam algumas enzimas que participam do ciclo de um carbono e do processo de metilação do DNA.

Os padrões de metilação do DNA são mantidos pela DNA metiltransferase de manutenção (DNMT1) durante a mitose (Ross E Poirier, 2002). A velocidade de deslocamento desta reação é diretamente proporcional às concentrações de SAM e a atividade da DNMT1 é inversamente proporcional à concentração de SAH. Estudos observaram diminuição da expressão de DNMT1 quando houve aumento da homocisteína plasmática (Yepeng et al., 2010). Da mesma forma nós observamos em nosso estudo. A expressão da DNMT1 no grupo -S -Co estava diminuída quando comparada ao grupo controle. Da mesma forma, houve uma diminuição da expressão do gene MAT2B, responsável pela catalisação da metionina pelo ATP para formar SAM (Fig 3).

Estes resultados reforçam nossos achados da bioquímica sanguínea. Acreditamos na hipótese de que o aumento de homocisteína plasmática nos animais do grupo carência

ocorreu devido à deficiência de vitamina B12, estimulada pela carência de Co e S na dieta. A enzima metionina sintase (MT) tem como cofator esta vitamina, e tem a função de remetilar a homocisteína transformando em metionina (Scott, 1999; Stangl et al., 2000). Além da diminuição da disponibilidade de metionina provocada pela queda desta reciclagem da homocisteína, a diminuição da síntese de aminoácidos sulfurados neste grupo agravou ainda mais a queda na produção de SAM, diminuindo então a expressão destes genes (MAT2B e DNMT1) pela falta de substrato (Baik e Russel, 1999; Stabler, 2001).

A alteração de componentes específicos da dieta pôde afetar os níveis sanguíneos dos metabólitos mensurados, número de ovócitos totais e o padrão de expressão de genes relacionados à metilação do DNA e ciclo da metionina. Resta avaliar se houve um comprometimento da reprogramação epigenética nos ovócitos, afetando a viabilidade dos embriões, sem ter alterado a taxa de produção embrionária. Para tal, avaliaremos o padrão de metilação global do DNA dos embriões e ovócitos (Metiloma) que foram congelados e a progênie desses animais até a puberdade. Caso haja confirmação de alguma alteração do padrão epigenético no genoma dos embriões e/ou progênie, constata-se haver alterações epigenéticas transgeracionais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Instituto Sabin através do Núcleo de Apoio à Pesquisa, pela realização das dosagens sanguíneas, a GENEAL Genética e Biotecnologia Animal S/A, a Kemin industries, Inc. fornecimento de DL- metionina (MetiPEARL™) e hidrocloreto de colina (CholiPEARL™), à FAPESP (no. 2010/07971-3) pela bolsa de estudos concedida a primeira autora, à EMBRAPA, ao CNPq e a FAP-DF.

## DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSES

Não houve conflitos de interesse entre os autores.

## LITERATURA CITADA

Armstrong DG, McEvoy TG Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R, Sinclair KD. 2001. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System 1. *Biol Reprod* 64:1624–1632.

Baik HW, Russell RM. 1999. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 19:357-377.

Buratini JR, J. Foliculogênese em bovinos. 2006. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina.*

Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Buratini Junior J, Dode MAN. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, 21:655-664.

Dode MAN. 2006. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XXI ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Anais... Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões 34:115-129.

Eppig JJ. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*13:569–74.

Finkestein J.D. 2007. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Med* 45:1694-1699.

Fox JT, Stover PJ. 2008. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm.*79:1-44.

- Ikedo S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S. 2010. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 313:129-36.
- Inoue-Choi M, Nelson HH, Robien K, Arning E, Bottiglieri T, Koh Woon-Puay, Yuan Jian-Min. 2012. One-carbon metabolism nutrient status and plasma S-adenosylmethionine concentrations in middle-aged and older Chinese in Singapore. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:160-173.
- Jaenisch R, Bird A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245-254.
- Kanakkaparambil R, Singh R, Li DF, Webb R, Sinclair KD. 2009. B-vitamin and homocysteine status determines ovarian response to gonadotropin treatment in sheep. *Biol Reprod* 80:743–752.
- Kirchgessner M, Schwarz FJ, Stangl GI. 1998. Growth performance of beef cattle fed corn silage-based rations without Cu, Zn, Mn, Co and Se supplementation. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr* 78: 141-153.
- Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R, Sinclair KD. 2010. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction* 139:705-15.
- Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. 2010. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev* 68:99-113.
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts, IGF, Bols PEJ. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reprod Domest Anim* 43:612-622.

- Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. 2006. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev* 20:267-75.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil*, 81:301-307.
- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71:1289-1297.
- Main PA, Angley MT, Thomas P, O'doherty CE, Fenech M. 2010. Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 91:1598-620.
- Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS. 2004. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 131:3727-3735.
- Martins AC, Mollo MR, Bastos MR, Guardieiro MM, Sartori R. 2008. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. Serum hormone concentrations of zebu cows under low and high feed intake. *Pesq. agropec. bras.* 43:2.
- National Research Council. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7 rev. ed., update 2000. Washington: National Academy Press, 232p.
- Olthof MR, Van Vliet T, Boelsma E, Verhoef P. 2003. Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 133:4135-4138.
- Pfaffl MW. 2000. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 1, 29:45.

- Poston JM, Stadtman TC. 1975. Cobamides as cofactors. Methylcobamides and the synthesis of methionine, methane and acetate. In: Babior, B.M. (ed), Cobalamin Biochemistry and Pathophysiology, John Wiley, London, 111-140.
- Reik W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 24:425-432.
- Richardson, C. R., and E. E. Hatfield. 1978. The limiting amino acids in growing cattle. *J. Anim. Sci* 46:740–745.
- Ross SA, Poirier L. 2002. Proceedings of the Trans-HHS Workshop: diet, DNA methylation processes and health. *J Nutr* 132:2329S–2332S.
- Ross SA. 2003. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 983:197–207, 2003.
- Russe I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, 24:77-92.
- Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, Yu, MC. 2001. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr* 73:232-239.
- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M, Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46:339-54.
- Scott JM. 1999. Folate and vitamin B12. *Proc Nutr Soc* 58: 441–448.
- Sinclair KD, Allegrucci C, Sinh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A, Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, et al. 2007. DNA methylation, insulin

- resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *PNAS* 104:19351–19356.
- Stabler SP. 2001. Vitamin B-12. In: Bowman BA & Russell RM (Eds), *Present Knowledge in Nutrition*, 8th edition, 230-240. ILSE Press, Washington DC. USA.
- . I. 2000. Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B<sub>12</sub>, folate, homocysteine and methylmalonic acid. *Br J Nutr* 84:645-53.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 99:979–97.
- Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63:1717-1751.
- Wang YN, Yang LJ, Wang WL, Feng WY, Gui L, Wang F, Li SD. 2013. *NanFangYi Ke Da Xue Xue Bao*. 33:507-510. Effect of homocysteine on gluconeogenesis in mice.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Asrmstrong DG. 2004. Control of follicular interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*, 82:63-74.
- Xue G, Snoswell AM. 1985. Comparative studies on the methionine synthesis in sheep and rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol* 80:489–494.
- Xue G, Snoswell AM. 1986. Developmental changes in the activities of enzymes related to methyl group metabolism in sheep tissues. *Comp Biochem Physiol* 83:115–120.
- Yakar S, Setser J, Zhao H, Stannard B, Haluzik M, Glatt V, Bouxsein ML, Kopchick JJ, LeRoith D. 2004. Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice. *J Clin Invest* 113:96–105.



- YePeng Lia, Ying Liua, Faith M. Stricklanda, and Bruce Richardson. 2010. Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes. *Exp Gerontol* 45: 312–322.
- Young LE, Fernandes K, Mcevoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153-154.
- Young LE, Rees WD, Sinclair KD. 2004. Nutritional programming of DNA methylation in the preimplantation embryo. *Frontiers in Nutritional Sciences: Fetal Nutrition and Adult Disease*, CABI International, 333–351.

## DISCUSSÃO GERAL

Em 1942, Conrad Waddington usou o termo "epigenética" para descrever a ideia de que a forma de vida de um organismo pode fazer com que seus genes se comportem (ou "se expressem") de forma diferente. A epigenética refere-se aos processos que regulam a atividade gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (REIK, 2007; WHITELAW e WHITELAW, 2008).

Há dois períodos do desenvolvimento – nos embriões durante o período inicial de desenvolvimento e na formação das células germinativas – em que ocorre uma reprogramação epigenética (REIK, 2007). Devido a estas duas reprogramações, o epigenoma, ao contrário do genoma, torna-se mais susceptível a interações com o ambiente durante a vida de um indivíduo (DOMINGUEZ-SALAS et al., 2012).

A metilação do DNA é uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas, sendo a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (MIGICOVSKY e KOVALCHUK, 2011). Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário, tendo importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina (NG e BIRD, 1999; SIMONSSON e GURDON, 2004).

Portanto, a foliculogênese, ovogênese e embriogênese tornam-se altamente susceptíveis as alterações do meio. Fatores ambientais como o *status* nutricional de doadoras de gametas e embriões e as condições de maturação de gametas e cultivo *in vitro* podem alterar o padrão de metilação do

DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (YOUNG et al., 2001; MANN et al., 2004).

No primeiro experimento buscamos responder como se comportaria a Inativação do Cromossomo X (ICX), um evento epigenético que consideramos candidato como marcador molecular para a qualidade embrionária, em embriões produzidos *in vivo* e por Transferência Nuclear (TN), diante do fato de que já havíamos realizado avaliações em embriões produzidos *in vitro* (Ferreira et al., 2010). Mostramos pela primeira vez que a inativação do cromossomo X *in vivo* em bovinos parece ser aleatória no trofoblasto ou ainda não ocorreu nesta fase do desenvolvimento, diferente do que ocorre *in vitro*. Avaliando os embriões clones, houve um evidente desvio da expressão alelo-específica a favor de um alelo. Isto pode já estar relacionado ao processo de ICX, com tendência a inativar o outro alelo, sugerindo que a ICX não seja aleatória em bovinos ou por alguma alteração por ser em embriões produzidos por TN (XUE et al., 2002; YANG et al., 2007).

Quando avaliamos o efeito da nutrição na ovogênese/foliculogênese, no segundo experimento, através da alteração de componentes específicos da dieta, constatamos que os níveis sanguíneos dos metabólitos mensurados, o padrão de expressão de genes codificadores de enzimas relacionados ao ciclo de um carbono, e a quantidade de ovócitos totais aspirados foram alterados, embora não tenha alterado a taxa de produção embrionária.

Baseando nos resultados relacionados à ICX nos experimentos anteriores realizados pelo nosso laboratório (Ferreira et al., 2010), e avaliando os achados do segundo experimento, podemos mostrar que os fatores ambientais (cultivo *in vitro* e nutrição) podem interferir no estabelecimento de

um evento epigenético, podendo estar influenciando na qualidade do ovócito e do embrião (YOUNG et al., 2001; MANN et al., 2004).

O estudo de mais genes susceptíveis à inativação do cromossomo X e o seu uso como marcadores moleculares para qualidade embrionária torna-se relevante quando se entende a importância deste evento epigenético para o desenvolvimento embrionário inicial (DEAN et al., 2001; REIK e WALTER, 2001; LUCIFERO et al., 2004). Referente ao experimento com a nutrição, ainda realizaremos mais análises para avaliar a nível molecular (metiloma) os ovócitos e embriões, e inseminamos os animais para avaliar a progênie destes até a puberdade. Em se confirmando alguma alteração do padrão epigenético no genoma dos embriões e/ou progênies, constatam-se alterações epigenéticas transgeracionais (SINCLAIR et al., 2007).

## CONCLUSÕES GERAIS

- A ICX em embriões *in vivo* ocorre de forma aleatória, diferente do que foi visto *in vitro*, em experimentos realizados pelo nosso grupo, e o processo *in vitro* de produção de embriões por transferência nuclear pode ter interferido no estabelecimento do padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos.
- A nutrição com baixos níveis de Co e S causou um aumento nos níveis de homocisteína e ácido fólico e diminuição dos níveis de B12, interferindo no padrão de expressão dos genes envolvidos no ciclo de um carbono e metilação de DNA, além de causar uma queda no número de ovócitos totais aspirados.
- Os resultados obtidos até o momento no experimento 2 apontam para a importância de se avaliar a possibilidade de herança epigenética transgeracional, por isso os embriões e a progênie dos animais serão avaliados.

## REFERÊNCIAS

AAPOLA, U.; KAWASAKI, K.; SCOTT, H.S.; OLLILA, J.; VIHINEN, M.; HEINO, M.; SHINTANI, A.; KAWASAKI, K et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*. v.65, p.293-298, 2000

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim*, v.45, p.171-179, 2008.

ALLARD, P.; YANG, Q.; MARZLUFF, W. F.; CLARKE H. J. The stem-loop binding protein regulates translation of histone RNAm during mammalian oogenesis. *Dev Biol*, v. 286, p.195 – 206, 2005.

ARMSTRONG, D.G.; McEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System 1. *Biol Reprod* v. 64, p.1624–1632, 2001.

ASHWORTH, C.J.; TOMA, L.M.; MORAG, G.H. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Phil. Trans. R. Soc* v. 364, p. 3351–3361. 2009.

BALAGHI, M.; HORNE, D.W.; WAGNER, C. Hepatic one-carbon metabolism in early folate deficiency in rats. *Biochem J*. v. 291 p. 145-149. 1993

BENJAMIN, D.; VAN BAKEL, I.; CRAIG, I.W. A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes. *Euro J Hum Genet*, v. 8, p. 103–108, 2000.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, v.9, p.2395-2402, 2000.

BOURC'HIS, D.; XU, GUO-LIANG.; LIN, CHYUAN-SHENG.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T.H. Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*. v 294 p. 2536-2539, 2001.

BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr*, v. 136(6 Suppl), p.1636S-1640S, 2006.

BURATINI, JR.J. Foliculogênese em bovinos. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. Londrina, 2006.

CHUANG, L.S.; IAN, H.I.; KOH, T.W.; NG, H.H.; XU, G.; LI, B.F. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*. 277:1996-2000, 1997.

COMBES, A.; WHITELAW, E. Epigenetic reprogramming: enforcer or enabler of developmental fate? *Dev Growth Differ*, v.52, p.483-491, 2010.

COONEY, C.A.; DAVE, A.A.; WOLFF, G.L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*, v.132, p.2393S–2400S, 2002.

COOPER, D.W.; VANDEBERG, J.L.; SHARMAN, G.B.; POOLE, W.E.; Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nat New Biol*, v.230, p.155-157, 1971.

DAVISON, J.M.; MELLOTT, T.J.; KOVACHEVA, V.P.; BLUSZTAJN, J.K.; Gestational choline supply regulates methylation of histone H3, expression of histone methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA methylation of their genes in rat fetal liver and brain. *J Biol Chem*. v.284, p.1982-1989, 2009.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Developmental Biology*, v.229, p.224–236, 2001.

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod*, v.60, p.769-75, 1999.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, p.13734-13738, 2001.

DEBRAND, E.; CHUREAU, C.; ARNAUD, D.; AVNER, P.; HEARD, E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of XIST expression. *Mol Cell Biol*, v.19, p.8513-8525, 1999.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XXI ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Anais... Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, v. 34, p.115-129, 2006.

DOMINGUEZ-SALAS, P.; COX, S.E.; PRENTICE, A.M. (2012). Maternal nutritional status, C1 metabolism and offspring DNA methylation: a review of current evidence in human subjects. *Proc Nutr Soc*, v.71, p.154-165, 2012.

DRIANCOURT, M.A.; Thuel, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod. Nutr. Dev.* v. 38, p. 345–362, 1998.

EBISCH, I.M.; PETERS, W.H.; THOMAS, C.M.; WETZELS, A.M.; PEER, P.G, STEEGERS THEUNISSEN, R.P. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub) fertile couple. *Hum Reprod* v. 21, p. 1725–33, 2006.

ELORANTA, T.O.; MARTIKAINEN, V.; SMITH, T.K. Adaptation of adenosylmethionine metabolism and methionine recycling to variations in dietary methionine in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.194, p. 364–71, 1990.



ESCAMILLA-DEL-ARENAL, M.; ROCHA, S.T.; HEARD, E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Hum Genet*, v.130, p.307–327, 2011.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.

FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O.; CARVALHO, J.O.; RUMPF, R.; MELO, E.O.; DODE, MAN.; FRANCO, M.M. Allele-Specific Expression of the MAOA Gene and X Chromosome Inactivation in In Vitro Produced Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.615-621, 2010.

FINKELSTEIN, J.D. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem*, v.1, p. 228–237, 1990.

FOX, J.T.; STOVER, P.J. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm*. v.79, p.1-44, 2008.

FRANCO, M.M.; MELO, E.O. Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. *Documentos Embrapa*, v. 188, 2006.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PEREZ-CRESPO, M.; FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; RAMIREZ, M.A.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; LONERGAN, P.; RIZOS D. Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim*. v. 41, p. 54-62, 2006.

HATA, K.; OKANO, M.; LEI, H.; LI, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. v. 129 p. 1983-93, 2002.

HEARD, E.; DISTECHE, C.M. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev*, v.20, p.1848-1867, 2006.

HEARD, E.; ROUGEULLE, C.; ARNAUD, D.; AVNER, P.; ALLIS, C.D.; SPECTOR, D.L. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X-inactivation. *Cell*, v.107, p.727-738, 2001.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi

IKEDA, S.; NAMEKAWA, T.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* v.313(3), p.129-36, 2010.

INOUE, K.; KOHDA, T.; SUGIMOTO, M.; SADO, T.; Ogonuki, N.; MATOBA, S.; SHIURA, H.; IKEDA, R.; MOCHIDA, K.; FUJII, T et al.: Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* v. 3, p. 496-499, 2010.

INOUE-CHOI, M.; NELSON, H.H.; ROBIEN, K.; ARNING, E.; BOTTIGLIERI T.; KOH, WOON-PUAY.; YUAN, JIAN-MIN. One-carbon metabolism nutrient status and plasma S-adenosylmethionine concentrations in middle-aged and older Chinese in Singapore. *Int J Mol Epidemiol Genet*, v. 3, p.160-173, 2012.

JAENISCH R, BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, v.33, p.245-254, 2003.

KAGEYAMA, S.; LIU, H.; KANEKO, N.; OOGA, M.; NAGATA, M.; AOKI, F. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85–94, 2007.

KATARI, S.; TURAN, N.; BIBIKOVA, M.; ERINLE, O.; CHALIAN, R.; FOSTER, M.; GAUGHAN, J.P.; COUTIFARIS, C.; SAPIENZA, C. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet*, v.18, p.3769-3778, 2009.

KWONG, W.Y.; ADAMIAK, S.J.; GWYNN, A.; SINGH, R.; SINCLAIR, K.D. Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction.* v.139(4), p.705-15, 2010.

LAANPERE, M.; ALTMÄE, S.; STAVREUS-EVERS, A.; NILSSON, T.K.; YNGVE, A.; SALUMETS, A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev.* v.68(2), p.99-113, 2010.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reprod Domest Anim* v. 43, p.612-622, 2008.

LI, E.; BESTOR, T.H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. v. 69, p. 915-26. 1992.

LONG JIAN-ER ; Li-Qiang He; Xia Cai; Zhao-Rui Ren; Shu-Zhen Huang; Yi-Tao Zeng. Construction and characteristics of 3-end enriched cDNA library from individual embryos of cattle. *Animal Reproduction Science* v 46; p 104-115, 2006.

LUCIFERO, D.; MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte *imprinting*. *Human Molecular Genetics*, v. 13, p. 839–849, 2004.

LUIKENHUIS, S.; WUTZ, A.; JAENISCH, R. Antisense transcription through the XIST locus mediates TSIX function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, v.21, p.8512-8520, 2001.

LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, v. 190, p. 372-373, 1961.

MAALOUF, W.E.; ALBERIO, R.; CAMPBELL, K.H. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics*, v.3, p.199-209, 2008.

MAIN, P.A.; ANGLELY, M.T.; THOMAS, P.; O'DOHERTY, C.E.; FENECH, M. Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. v. 91(6), p.1598-620, 2010.

MANN, M.R.; CHUNG, Y.G.; NOLEN, L.D.; VERONA, R.I.; LATHAM, K.E.; BARTOLOMEI, M.S. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, v.69, p.902-914, 2003.

MANN, M.R.; LEE, S.S.; DOHERTY, A.S.; VERONA, R.I.; NOLEN, L.D.; SCHULTZ, R.M.; BARTOLOMEI, M.S. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*, v.131, p.3727-3735, 2004.

MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggles of the clones. *Genome Biology*, v.3, p.2, 2002.

MATOBA, S.; INOUE, K.; KOHDA, T.; SUGIMOTO, M.; MIZUTANI, E.; OGONUKI, N.; NAKAMURA, T.; ABE, K.; NAKANO, T.; ISHINO, F et al.: RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, p. 20621-20626, 2011.

McEWEN, K.R.; LEITCH, H.G.; AMOUROUX, R.; HAJKOVA, P. *Biochem Soc Trans.* v. 41p. 711-9. 2013.

MELLO, J.C.M.; ARAÚJO, E.S.S.; STABELLINI, R.; FRAGA, A.M.; SOUZA, J.E.S.; SUMITA, D.R.; CAMARGO, A.A.; PEREIRA, L.V. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PloS One*, v.5, p.1-8, 2010.

MENEZO, Y.; KHATCHADOURIAN, C.; GHARIB, A.; HAMIDI, J.; GREENLAND, T.; SARDA, N. Regulation of S-adenosylmethionine synthesis in the mouse embryo. *Lif Sci*; v.44, p.1601–1609, 1989.

MÉTAYER, S.; SEILIEZ, I.; COLLIN, A.; DUCHÊNE, S.; MERCIER, Y.; GERAERT, P.A.; TESSERAUD, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem.* v.19, p.207-15, 2008.

MIGICOVSKY, Z.; KOVALCHUK, I. Epigenetic memory in mammals. *Front Genet*, v.2, 28, 2011.

MILLER, J.W.; NADEAU, M.R.; SMITH, J.; SMITH, D.; SELHUB, J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of

Sadenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J*, v.298, p. 415-419, 1994.

MOLLOY, A.M.; MILLS, H.L.; COX, C.; DALY, S.F.; CONLEY, M.; BRODY, L.C.; KIRKE, P.N.; SCOTT, J.M.; UELAND, P.M. Choline and homocysteine interrelations in umbilical cord and maternal plasma at delivery. *Am J Clin Nutr*, v. 82, p.836-842, 2005.

MUDD, S.H.; EBERT, M.H.; SCRIVER, C.R. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism* v. 29, p. 707–720, 1980.

MUDD, S.H.; POOLE, J.R. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* v. 24, p. 721–35, 1975.

NAVARRO, P.; CHAMBERS, I.; KARWACKI-NEISIUS, V.; CHUREAU, C.; MOREY, C.; ROUGEULLE, C.; AVNER, P. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* v.321, p.1693–1695, 2008.

NAVARRO, P.; OLDFIELD, A.; LEGOUPI, J.; FESTUCCIA, N.; DUBOIS, A.; ATTIA, M.; SCHOORLEMMER, J.; ROUGEULLE, C.; CHAMBERS, I.; AVNER, P. Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* v.468, p.457–460, 2010.

NG, H.H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, v.9, p.158-163, 1999.

NOLEN, L.D.; GAO, S.; HAN, Z.; MANN, M.R.; GIE, CHUNG, Y.; OTTE, A.P.; BARTOLOMEI, M.S.; LATHAM, K.E. X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev. Biol* v. 279, p. 525–540, 2005.

OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LE, B.P.; OTTE, A.P.; DISTECHE, C.M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for de novo *imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature*, v.438, p.369-373, 2005.

OKAMOTO, I.; OTTE, A.P.; ALLIS, C.D.; REINBERG, D.; HEARD, E. Epigenetic dynamics of *imprinted* X inactivation during early mouse development. *Science*, v.303, p.644-649, 2004.

OKAMOTO, I.; PATRAT, C.; THE´POT, D.; PEYNOT, N.; FAUQUE, P.; DANIEL, N.; DIABANGOUAYA, P.; WOLF, J.P.; RENARD, J.P.; DURANTHON, V.R.; HEARD, E. Eutherian mammals use different strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* v. 472, p.370–374, 2011.

OKANO M, XIE S, LI E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* v. 26 p.2536-40, 1998.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* v. 99 p. 247-57, 1999

OLTHOF, M.R.; VAN VLIET, T.; BOELSMA, E.; VERHOEF, P. Low dose betaine supplementation leads to immediate and long term lowering of plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* , v.133, p.4135-4138, 2003.

PARK, J.S.; JEONG, Y.S.; SHIN, S.T.; LEE, K.K.; KANG, Y.K. Dynamic DNAmethylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Developmental Dynamics*, v.236, p.2523–33, 2007

PENNY, G.D.; KAY, G.F.; SHEARDOWN, S.A.; RASTAN, S.; BROCKDORFF, N. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. *Nature*, v.379, p.131-137, 1996.

PRASOLOVA, L.A.; TRUT, L.N.; OSKINA, I.N.; GULEVICH, R.G.; PLYUSNINA, I.Z.; VSEVOLODOV, E.B.; LATIPOV, I.F. The effect of methyl supplements during pregnancy on the phenotypic modification of offspring agouti coat color in rats. *Russ J Genet*, v. 42, p.67–71, 2006.

REIK W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, v.24, p.425-432, 2007.

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

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, v.2, p.21-32, 2001.

ROSS, S.A. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 983, p. 197–207, 2003.

RUSSELL LB. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. *Science*, v.140, p.976-978, 1963.

SADEU, J.C.; CORTVRIND, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v.85, p.1130-1141, 2006.

SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, v.241, p.172-182, 2002.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, v.13, p.1116-2111, 2003.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ- cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, v.9, p.129-140, 2008.

SAW, S.M.; YUAN, J.M.; ONG, C.N.; ARAKAWA, K.; LEE, H.P.; COETZEE, G. A.; YU, M.C. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr*, v. 73, p. 232-239, 2001.

SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUNOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*. v. 46 p. 339-54, 2006

SCHAEFER, C.B.; OOI, S.K.; BESTOR, T.H.; BOURC'HIS, D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* v. 316, p. 398–9, 2007.

SENDA, S.W.T.; YAMAZAKI, Y.; OHGANE, J.; HATTORI, N.; TANAKA, S.; YANAGIMACHI, R.; SHIOTA, K. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 38–44 (2004).

SIMONSSON, S.; GURDON J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, v.6, p.984-990, 2004.

SINCLAIR, K.D.; ALLEGRUCCI, C.; SINH, R.; GARDNER, D.S.; SEBASTIAN, S.; BISPHAM, J.; THURSTON, A.; HUNTLEY, J.F.; REES, W.D.; MALONEY, C.A et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *PNAS*, v.104, p.19351–19356, 2007.

STABELLINI, R.; DE MELLO, J.C.; HERNANDES, L.M.; PEREIRA, L.V. MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts. *Epigenetics*, v.4, p.388-93, 2009.

STAVROPOULOS, N.; LU, N.; LEE, J.T. A functional role for TSIX transcription in blocking XIST RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proc Nat Acad Sci*, v.98, p.10232-10237, 2001.

STEWART, M.D.; LI J.; WONG, J. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Molecular and Cellular Biology*, v.25, p.2525–2538, 2005.

TAKAGI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, v.256, p.640-642, 1975.

VAN DEN VEYVER, I.B. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr*, v. 22, p. 255–282, 2002.

VIANA, J.H.M. ; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S. de A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian



embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, p. 661-674, 2010.

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

WANG, N.; FANG, L.; ZHAN, Q.; LI, L.; DONG, M.; DING, G.; XU, C.M.; JIANG, S.W.; HUANG, H.F.; JIN, F. Effects of In Vitro Maturation on Histone Acetylation in Metaphase II Oocytes and early Cleavage Embryos. *Obstetrics and Gynecology International*, v. 10, p. 1-9, 2010.

WANG, Y.N.; YANG, L.J.; WANG, W.L.; FENG, W.Y.; GUI, L.; WANG, F.; LI, S.D. Effect of homocysteine on gluconeogenesis in mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* v. 33, p. 507-510, 2013

WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*, v. 20, p. 63-68, 2004.

WEBB, R.; ENGLAND, B.G. Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J Reprod Fertil* v. 66, p. 169-80, 1982.

WHITELAW, N.C.; WHITELAW, E. Transgene rational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Dev*, v.18, p.273-279, 2008.

WOLFF, G.L.; KODELL, R.L.; MOORE, S.R.; COONEY, C.A. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J*, v.12, p.949–957, 1998.

XUE, F.; TIAN, X.C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L.V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, v.31, p.216-220, 2002.

YAKAR, S.; LIU, J.L.; FERNANDEZ, A.M.; WU, Y.; SCHALLY, A.V.; FRYSTYK, J.; Et al. Liver-specific IGF-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* v. 50, p. 1110–18. 2001

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, A.H.; RENARD, JEAN-PAUL; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* v 39, p. 295-302, 2007.

YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*, v.27, p.153-154, 2001.

YOUNG, L.E.; REES, W.D.; SINCLAIR, K.D. Nutritional programming of DNA methylation in the preimplantation embryo. *Frontiers in Nutritional Sciences: Fetal Nutrition and Adult Disease*, CABI International, p. 333–351, 2004.

YOUNG, L.E.; SCHNIEKE, A.E.; MCCREATH, K.J.; WIECKOWSKI, S.; KONFORTOVA, G.; FERNANDES, K.; PTAK, G.; KIND, A.J.; WILMUT, I.; PASQUALINO, L.; FEIL, R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2r imprinting in the sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev*, v.120, p.1433-1442, 2003.

ZEISEL SH, BLUSZTAJN JK. Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr*. v.14, p. 269-96, 1994.

ZEISEL, S.H. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr*. v.26, p. 229-250, 2006.

**ANEXOS**

## Normas da revista: **Molecular Reproduction and Development**

### Manuscript Organization

1. **Title page.** The manuscript should have an informative title that defines the major findings described within the work. The title page must include the names and affiliations of all authors, the institution at which the work was performed, the name and address for all correspondence, telephone, telex, or fax number must be present. Include a short title of not more than 40 characters to be used as a Running Head, and three-to-six Keywords (not used in the title), which will appear below the abstract. Abbreviations used in the manuscript must be listed, and grants that support the work in the manuscript should be clearly acknowledged here.

2. **Abstract.** This section should be a factual condensation of the entire work and should include statements of the problem, methods of study, results, and conclusions as appropriate. All quantitative data in the abstract must also appear in the manuscript text or tables. The abstract may not exceed 250 words.

3. **Text.** Text of Research Articles should follow the format: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Acknowledgments, References, and Figure Legends. If the work includes data derived from human subjects, a statement that informed, written consent was obtained is mandatory. Use subheadings and paragraph titles whenever possible. Authors should ensure that clear and idiomatic English is used prior to submission. All uncommon abbreviations must be defined. We recommend that authors go to <http://www.informatics.jax.org/> for gene/protein nomenclature guidelines.

Abbreviate measurements (cm, ml) according to Style Manual for Biological journals, American Institute for Biological Sciences, 3900 Wisconsin Avenue, N.W., Washington, D.C. Place acknowledgments as the last element of the text, before references. Submit your text in DOC, DOCX, or RTF format. Do not embed figures or tables in this document; submit figures and tables as separate files. Also, see “Additional information and data handling” for studies involving vertebrates and/or humans.

Revisions, when requested, should not contain tracking within the main document(s). If tracking is requested by the handling Editor, a separate version containing tracking should be uploaded as a supplemental file for review.

4. **References.** References should be cited in the text by the name and date system (when there are more than two authors, use only the first name and (et al.)). In the final list, they should be in alphabetical order, and chronological for more than one reference with the same authorship. Use a letter suffix if more than one author reference is for the same year. Begin each reference with the names of all authors and the year of publication. For references to journals, give all author names, the titles of articles in full, abbreviate journal names according to the system used by *Index Medicus*, and provide inclusive pagination. For references to books, include all authors' names, chapter title (if any), editor (if any), book title, city of publication, publisher's name, and year of publication. In the following examples, note the punctuation; do not use all capitals, do not underline:

**Journal articles**

Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35:302-315.

**Books**

Wagner RP, Maguire MP, Stallings RL. 1993. *Chromosomes: A Synthesis*. New York: Wiley-Liss. p 1-182.

**Chapters in books**

Erickson RP. 1993. Molecular genetics of mammalian spermatogenesis. In: Gwatkin RBL, editor. *Genes in Mammalian Reproduction*. New York: Wiley-Liss. p 21-26.

5. **Legends.** A descriptive legend completes an illustration and permits it to be useful without reference to the text. A legend must accompany each illustration and must define any abbreviations used therein. Legends must be typed double spaced on a separate list at the end of the manuscript.

6. **Tables.** Each table must have a self-explanatory title, be numbered in order of appearance with Arabic numerals, and be keyed into the text (e.g., in MS Word table format). Tables must be submitted as separate MS Word files with the titles and legends included.

7. **Figures.** All figures must be numbered in order of appearance in the text with Arabic numerals, and text should be in a legible size. Preferable fonts for the labeling sub-panels include Arial or Helvetica. Figures should be submitted as close to final print size as possible. The maximum width for single-column

figures is 8.0 cm (3.1 in.) and for double-column figures is 17.5 cm (6.9 in), and the maximum length is 19.5 cm (7.7 in). For proper conversion into PDF form for review, figures cannot exceed 40 megapixels (length x width, in pixels) and individual files must be less than 200 MB in size. The total submission cannot exceed 350 MB in size. We recommend saving TIFF files with LZW compression to reduce the file sizes prior to submission. Figure resolution information is as follows:

**Illustrations.** To ensure the highest quality print production, upload figures as separate image files using TIFF or EPS formats only. Images should follow the minimum resolutions: 1200 dpi for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.); 600 dpi for combination halftones (black and white images that also contain labeling or thin lines). Figures created in Adobe Illustrator should be submitted in EPS format. **Color Illustrations** . Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. Color figures must be submitted in a CMYK colorspace, and in at least 600 dpi. *Do not submit color figures as RGB.* All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. If the authors wish to have color figures in the print article, the first page of color per article is free and subsequent color pages within an article cost \$500 each. It might be possible to publish several color images on one page, depending on their size.

**Cover Illustrations.** Authors of manuscripts submitted to MRD are encouraged to submit figures and corresponding descriptions for consideration for cover art of an issue. Every effort is made to use cover art related to an article within an issue, and thus authors are encouraged to submit images with the final manuscript submission. Follow the submission guidelines for “VISIONS: The Art of Science” submissions, above, for all cover art suggestions. These suggestions are evaluated by the Editorial Board for their visual impact and scientific content.

**Normas da Revista: The Journal of Nutrition**

## Submission Instructions

***Manuscript word count, table and figure counts***

Manuscripts longer than 7500 words will be returned without review. Word count includes all text exclusive of tables (includes title page, abstract, text, figure legends, acknowledgments and references). The Journal is limited in the number of pages that can be published each year and article length is a consideration in the editorial process.

During the online submission process you will be asked to provide information on the word count for the entire manuscript. Word count includes all text exclusive of tables (includes title page, abstract, text, figure legends, acknowledgments and references). You will also be asked to provide the numbers of figures and tables.

***Image Resolution***

If a figure is very small in the manuscript submission system-generated PDF file, the resolution of the figure file was not high enough. A higher resolution figure should be uploaded before the PDF is approved. Files must conform to the following minimum resolution specifications:

Line art: 1000 dpi

Combination Halftones: 600 dpi (grayscale or color images and type)

Halftones: 300 dpi (grayscale or color with no type or lettering)

***Fonts***

It is recommended to use standard fonts in order to avoid potential problems with font substitution or embedding problems. Acceptable fonts include Arial, Helvetica, Times Roman, Symbol, Mathematical PI, and European PI. All other fonts, if not embedded, may be replaced, resulting in data loss or realignment.

***Color Space***

All digital art, including black and white figures, submitted must be bitmap (Monochrome), grayscale, RGB or CMYK. Color files should be supplied in RGB color whenever edited before publication, so please be sure that *The Journal of Nutrition* format is used and that the PDF files are accurate. See

[http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora\\_7-online-info.xhtml](http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora_7-online-info.xhtml) for details on formatting OSM content. See screen shots for help embedding material in Microsoft Word.

When creating print quality files in MS Office applications, follow these general guidelines:

1. Do not use pattern or textured fills in graphics. Instead, use solid fills or percentage screens that will be effectively converted to vector images during file conversion.
2. When inserting pictures/images into files, be sure to select "insert" and not "insert link," which will not properly embed the hi-res image into the MS Office file.
3. Do not reduce or enlarge the images after placement within the MS Office file or image quality will be affected.
4. A separate file should be submitted for each figure. Make sure that any multi-panel figures are assembled onto one page. Rather than sending 4 files or a PDF file with multiple pages (Fig1A, Fig1B, Fig1C, Fig1D), the four parts should be assembled into one piece and supplied as a single image.

**Your Manuscript should include:**

**1. Title page: The title page must include:**

- a. A title that is composed as a single declarative statement. It should be focused on the results presented in the manuscript. Please do not use a colon or semicolon in the title. Keep the title as generally applicable as possible. It usually is not necessary to include the exact study location or a specific study name in the title, as this information can be included in the abstract.
- b. The names of all authors (first name, middle initial, last name) including their departmental and institutional addresses. Indicate which authors are associated



with which institutions by numbered footnotes. Identify a corresponding author and provide a mailing address, telephone number, fax number, and email address.

c. A list of all authors' last names exactly as they should appear for PubMed indexing. ASN will not replace files to correct author names once published.

d. The word count for the entire manuscript (title through references). See word limit at [http://jn.nutrition.org/site/misc/word\\_count.pdf](http://jn.nutrition.org/site/misc/word_count.pdf) for more information.

e. The number of figures (to print, not OSM).

f. The number of tables (to print, not OSM).

g. Whether supplemental online material has been submitted.

h. A running title of 48 or fewer characters and spaces.

i. Footnotes to the title disclosing: (a) all sources of financial support; (b) all potential conflicts of interest; (c) the existence of online supporting material, if appropriate (see section on Online Supporting Material).

*Conflict of Interest and Funding Disclosure:*

Any existing financial arrangements between an author and a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or between the author and any company or organization sponsoring the research reported in the submitted manuscript should be brought to the attention of the Editor at manuscript submission. In addition, all authors must declare all sources of funding for research reported in their manuscript and report all potential conflicts of interest in separate footnotes on the manuscript title page. If an author has no conflicts of interest, the footnote should list the author's name, followed by "no conflicts of interest". For detailed guidelines on possible conflicts of interest, see the ASN Journals Conflict of Interest Guidelines.

Individuals who are asked to review a manuscript should decline the solicitation if they have a conflict of interest. Detailed guidelines on conflicts of interest for reviewers can be found at ASN Journals Conflict of Interest Guidelines.

## **2. Abstract page**

The abstract must be a single unstructured paragraph of no more than 250 words summarizing the relevant problem addressed by the study and the theory or hypothesis that guided the research. The abstract should include the study design/methodology and clear statements of the results, conclusions, and importance of the findings.

## **3. Introduction**

Background to the research conducted and specific objectives should be clearly indicated. This should not be a comprehensive review of the literature, however.

## **4. Materials and Methods**

Documentation of methods and materials used should be sufficient to permit replication of the research. State the source of specialized materials, diets, chemicals, and instruments and other equipment, with model or catalog numbers, where appropriate. Specify kits, analyzers, and commercial laboratories used. Cite references for methods whenever possible and briefly explain any modifications made. Do not use *level* when referring to concentration.

*Human and Animal Research* Reports of human studies must include a statement that the protocol was approved by the appropriate institutional committee or that it complied with the Helsinki Declaration as revised in 1983. When preparing reports of randomized, clinical trials, authors should refer to the checklist published in the CONSORT Statement and should include a trial profile summarizing participant flow (2). Include in Methods the sizes (*n*) of initial (recruited, enrolled) and final groups. Research on animals should include a statement that the protocol was approved by the appropriate committee or complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (3). Describe how animals were killed. Describe control and experimental animals or participants, giving age, weight, sex, race, and for animals, breed or strain. Include the supplier of experimental animals.

*Diets* Composition of control and experimental diets must be presented. When a diet composition is published for the first time in *The Journal of Nutrition*, utilize a table or a footnote to provide complete information on all components. If previously described in *The Journal of Nutrition* or *The American Journal of Clinical Nutrition*, a literature citation may be used. State specifically any modifications made to the published diet compositions. The proximate composition of closed formula diets should be given as amounts of protein, energy, fat, and fiber. Components should be expressed as g/kg diet. Vitamin and mineral mixture compositions should be included using *Journal of Nutrition* units and nomenclature. For a discussion of the formulation of purified animal diets, refer to Baker (4) and to a series of ASN publications (5-8).

*Statistical Method:* Describe all statistical tests utilized and indicate the probability level (*P*) at which differences were considered significant. If data are presented in the text, state what they represent (e.g. means  $\pm$  SEM). Indicate whether data were transformed before analysis. Specify any statistical computer programs used.

Present the results of the statistical analysis of data in the body of each table and on figures per se. Use letters or symbols to indicate significant differences; define these in a table footnote or the figure legend. Provide the appropriate statistics of variability. An estimate of the error variance (SD or SEM) of group means should be displayed. Standard ANOVA methodology assumes a homogeneous variance. If error variance is tested and found to be heterogeneous, data should be transformed before ANOVA, or nonparametric tests should be used. For a discussion of variability calculations and curve-fitting procedures, see Baker (4).

The number of significant digits presented for a variable should be correct and consistent. Use no more than 3 significant digits (fewer, if appropriate) or justify the need for greater precision. (e.g. For diets, 17.8% or 18% fat, not 17.77% fat; for blood metabolite, 10.3 mmol/L not 10.257 mmol/L) Base the number on the precision of the analytical method and round accordingly.

If non-significant *P* values are reported, use only 2 digits past the decimal (e.g. *P*=0.15). Present significant *P* values to a maximum of 4 decimal places (e.g.

$P < 0.0001$ ); using fewer is acceptable. Present coefficients to a maximum of 2 decimal places (e.g.  $r = 0.87$ ,  $R^2 = 0.16$ , etc.).

## **5. Results and Discussion**

Report the results of the study in the RESULTS section; do not repeat methodology or the experimental design and do not include material that is more appropriate for the **Introduction** or **Discussion**. In the **Discussion**, explain the importance of the findings, put this into the context of the existing literature, and clearly state the overall conclusions. Do not repeat or present results in this section.

## **6. Literature Cited**

*The Journal of Nutrition* reference format is consistent with the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) recommended format for bibliographic citations with the following exception: references should include the names of all authors, unless there are more than ten, in which case list the first nine plus "et al." The ICMJE states, "as an option, if a journal carries continuous pagination throughout a volume (as many medical journals do) the month and issue number may be omitted." *The Journal of Nutrition* follows this optional style. If you are using software such as EndNote or Reference Manager that inserts this additional material, it will be automatically deleted during production of accepted manuscripts. Abbreviate journal names according to the National Library of Medicine (NLM) journal abbreviations list.

References, including web citations, should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. References cited for the first time in tables or figure legends should be numbered in order, based on the placement of the table or figure in text. Identify references in text, tables, and legends for illustrations by Arabic numbers in parentheses. See current print issues of *The Journal of Nutrition* for style.

Authors may add a doi for papers that have a doi number ("digital object identifier" number unique to the publication) to references. It should be included immediately after the citation in Literature Cited.

An example is:

Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr.* 2009;139:1157-61. doi:10.3945/jn.108.103168

Only published papers and accepted papers that are "in press" may be included in the Literature Cited section. "In press" papers must be submitted as supplemental files in PDF format at the time of manuscript submission. *Conflict of Interest and Funding Disclosure:*

Any existing financial arrangements between an author and a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or between the author and any company or organization sponsoring the research reported in the submitted manuscript should be brought to the attention of the Editor at manuscript submission. In addition, all authors must declare all sources of funding for research reported in their manuscript and report all potential conflicts of interest in separate footnotes on the manuscript title page. If an author has no conflicts of interest, the footnote should list the author's name, followed by "no conflicts of interest". For detailed guidelines on possible conflicts of interest, see the ASN Journals Conflict of Interest Guidelines.

Individuals who are asked to review a manuscript should decline the solicitation if they have a conflict of interest. Detailed guidelines on conflicts of interest for reviewers can be found at ASN Journals Conflict of Interest Guidelines.

### **G) Acknowledgments**

Technical assistance and advice may be acknowledged in a section at the end of the text. Only named individuals should be included in this section. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone providing a personal communication or acknowledged by name in the manuscript and for providing to the Editor a copy of the permission, if requested.

### **H) Statement of Authors' Contributions to Manuscript**

Authors must indicate their contribution(s) to the manuscript in the Acknowledgments section. Use the descriptors listed below unless the author

performed a function that clearly is not covered by one of these. While not all manuscripts will necessarily include all descriptors, all manuscripts, including reviews, must indicate who is responsible for design, writing, and final content.

1. designed research (project conception, development of overall research plan, and study oversight).
2. conducted research (hands-on conduct of the experiments and data collection).
3. provided essential reagents, or provided essential materials (applies to authors who contributed by providing animals, constructs, databases, etc., necessary for the research).
4. analyzed data, or, performed statistical analysis.
5. wrote paper (only authors who made a major contribution).
6. had primary responsibility for final content.
7. other (use only if categories above are not applicable; describe briefly).
8. All authors have read and approved the final manuscript. For single-authored research papers and reviews, please state: The sole author had responsibility for all parts of the manuscript.

Please do not include "obtained funding" (the initials of authors who received grants may be included in the footnote on the title page regarding Support).

An example is:

A. X., R. F. G., and P. G. Y. designed research; R.F. G. and Q. C. conducted research; P. T. analyzed data; A. X., P. G. Y. and Q. C. wrote the paper. P. G. Y. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

## **TABLES AND FIGURES**

See current print or electronic *Journal of Nutrition* papers for examples of table and figure styles. For original submissions, figures and tables should be in the

uploaded PDF file; for revisions, tables and figure titles and legends must be included in the manuscript's .doc file and each figure must be in a separate image file. Additional information on how to format electronic figure files is provided in the section on Manuscript Digital Files .

Tables or figures adapted or reproduced from another source must acknowledge that source in a table footnote or the figure legend and be accompanied by written proof that the copyright bearer has granted permission to reproduce or adapt the table or figure. To obtain permission, authors may need to reference the information found at the page, Permission to Re-Publish Copyrighted Content in *The Journal of Nutrition*. **Authors of supplement and symposium manuscripts** should include one of three statements in all figure and table captions:

1. Reproduced with permission from (reference X),
2. Adapted with permission from (reference X), or
3. Original to this manuscript.

*Tables:* Tables must be included in the text file. Each table (one per page) should have a title that clearly but concisely describes the treatments and experimental animals or participants. Information concerning methods or explanatory material should be in footnotes to the table rather than in the title. Repetition of methodology should be minimized. Units of measure should be clearly indicated after the variable in rows, above the first value in each column, or centered over all columns to which the unit applies. Statistics of variability (e.g., SD, pooled SEM) and the significance of differences among the data should be shown. Tables should be sequentially cited in the text, and the first reference to each table should be in bold face. References cited in tables should be included in the Literature Cited section.

For an illustrated table quality checklist, visit:

<http://pubs.nutrition.org/site/misc/ASNTTableChecklist.pdf>.

*Figures:* Figure titles and legends should be compiled on one or more pages in the manuscript's .doc file and should not be on the figure itself. Axes should be

clearly labeled with variables and where appropriate, units of measure. Significant differences should be shown using symbols or letters. Titles should clearly and concisely describe the treatments and experimental animals or participants. Repetition of methodology should be minimized but specific assay conditions can be given. Each legend should contain enough detail, including an explanation of the results of statistical tests shown to ensure that the figure is interpretable without reference to the text. Figures should be sequentially cited in the text and the first reference to each figure should be in bold face.