



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

Maria Helena Souza de Aguiar

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Curitibanos

2024

Maria Helena Souza de Aguiar

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção
do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Vitor Braga Rissi, Dr.

Coorientador: Prof. Marcos Henrique Barreta, Dr.

Curitiba

2024

Aguiar, Maria Helena Souza de
EFEITOS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO in vitro DE
EMBRIÕES BOVINOS / Maria Helena Souza de Aguiar ;
orientador, Vitor Braga Rissi, coorientador, Marcos
Herique Barreta, 2024.

70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária Convencional e Integrativa,
Curitibanos, 2024.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2.
embrião. 3. bovino. 4. Tunicamicina. 5. Ácido
Tauroursodesoxicólico. I. Rissi, Vitor Braga. II. Barreta,
Marcos Herique. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária Convencional e Integrativa. IV. Título.

Maria Helena Souza de Aguiar

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Werner Giehl Glanzner, Dr.
McGill University

André Lucio Fontana Goetten, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Vitor Braga Rissi, Dr.
Orientador(a)

Curitibanos, 2024

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Alcides Cardoso de Aguiar (*in memoriam*) e Suzana de Souza, pelo amor, apoio e incentivo a seguir minhas escolhas em busca de um futuro melhor. Agradeço por mostrarem que dignidade e compromisso são base para a formação de uma boa cidadã, e por ensinarem que a educação é um caminho capaz de mudar a realidade e proporcionar um bom futuro.

A minha filha Pietra por ser um anjo que ilumina meus dias e torna todo propósito maior.

Ao meu noivo Claudinei, pelo apoio, amizade e por se fazer presente em meus dias.

A minha irmã, Karina, pelo carinho, amizade e apoio durante essa e outras etapas importantes de minha vida.

Ao meu orientador, Vitor Braga Rissi, exemplo de pessoa e de profissional, agradeço por ter me acolhido no estágio curricular e mestrado, pelos conhecimentos transmitidos, confiança e amizade, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador, Marcos Henrique Barreta, exemplo de pessoa e de profissional, pelos conhecimentos transmitidos, confiança e amizade.

A todos os membros do LAFRA, que se tornaram uma família nesse período, agradeço pela amizade, apoio, risadas e companheirismo. As atividades durante os experimentos agregaram colegas, que se tornaram amigos que vou levar para toda a vida.

Em especial, agradeço ao Dr. André, que demonstra em seu trabalho diário uma forma incrível de ensinar, ser amigo e agregar nas diferentes áreas de formação de um profissional e ser humano.

A Dra. Andréa, minha amiga, conselheira, apoiadora e minha inspiração, agradeço por do incentivo, abraço amigo e palavras acolhedoras.

Aos colegas de profissão e amigos Dra. Vera e Dr. Edison Martins, que se tornaram incentivadores importantes desta etapa, agradeço pela amizade, apoio e partilhar de conhecimentos imprescindíveis para meu crescimento profissional e pessoal.

A CAPES pela bolsa de mestrado, ao CNPq que financiou a pesquisa e a UFSC que vem tornando possível a mudança de minha realidade de vida por meio da educação.

Aos colaboradores do LAFRA: Frigorífico Verdi e Fazenda Bom Jesus do Herval. Por tornarem possível a realização do presente trabalho.

A Deus, pela vida.

Por fim, a todos que tornaram este trabalho possível, de forma direta ou indireta.

“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

– Albert Einstein

RESUMO

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal encontram-se em plena expansão comercial; o Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, e utiliza em larga escala a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Apesar de bem estabelecida, esta biotecnologia apresenta desafios para aumentar a sua eficiência, minimizando fatores que tornam o ambiente *in vitro* subótimo. O objetivo deste trabalho foi determinar as consequências do estresse de Retículo Endoplasmático (RE) em diferentes fases do desenvolvimento embrionário *in vitro* na espécie bovina. Realizou-se inicialmente um experimento dose-resposta (25, 50 e 100 μM) de um agente inibidor de estresse de RE, Ácido Tauroursodesoxicólico/TUDCA (TD). Em um segundo experimento dose-resposta (0,1, 1 e 10 ng/ml) foi avaliado o efeito de um indutor de estresse de RE, Tunicamicina (TN) durante todo o período de cultivo embrionário *in vitro* (CIV). Posteriormente, com a finalidade de determinar em que momento do desenvolvimento embrionário o estresse de RE é mais deletério, os embriões receberam o tratamento na dose de 1 ng/ml de TN em diferentes momentos do CIV, correspondentes ao período anterior (D 1-3), durante (D 3-5) e pós (D 5-7) ativação do genoma embrionário (EGA). Em um quarto experimento, com a finalidade de comprovar que a indução de estresse gerada pela TN tem ação no RE, realizou-se a associação de TN+TD em diferentes momentos do CIV, seja durante todo o período do desenvolvimento embrionário (TN+TD 1-7), e durante a AGE (TN+TD 3-5), comparados a grupos tratados somente com TN de maneira isolada nos mesmos períodos. Os principais resultados obtidos demonstram que o uso de TD na dose de 100 μM foi capaz de melhorar a qualidade dos embriões produzidos comparados ao grupo controle. Ao contrário, observou-se que TN prejudicou o desenvolvimento e qualidade dos embriões de maneira dose dependente. Além disso o efeito negativo da TN foi mais evidente durante e após a AGE. A associação do TD foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da TN sobre o desenvolvimento. Foram ainda avaliados genes relacionados ao RE (GRP78, ATF6, PERK, IRE1, XBP1-s, XBP1-u) e fatores de pluripotência (OCT4, SOX2, NANOG) em embriões tratados com TN de maneira isolada ou em associação com o TD em diferentes momentos do CIV, mas, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes avaliados no estágio de Blastocisto. Em conjunto os dados obtidos permitem afirmar que o estresse de RE é um importante aspecto relacionado à viabilidade embrionária, além disso a atenuação proporcionada pela adição de TD de maneira isolada tem efeito benéfico sobre a qualidade dos embriões produzidos.

Palavras-chave: embrião, bovino, *Tunicamicina*, Ácido *Tauroursodesoxicólico*.

ABSTRACT

Animal reproductive biotechnologies are extensively used for commercial applications worldwide. In this context, Brazil is the country with the largest commercial cattle herd in the world, and extensively take advantage of biotechnologies such as *In vitro* embryo production (IVP). This biotechnology still has gaps that should be overcome towards improvement of its efficiency, minimizing factors that render the *in vitro* environment suboptimal. The aim of this study was to determine the detrimental consequences of Endoplasmic Reticulum (ER) stress at different stages of *in vitro* embryonic development in cattle. Initially, a dose-response experiment (25, 50, and 100 μ M) of tauroursodeoxycholic acid/TUDCA (TD), an ER stress inhibitor agent, was conducted. In a second dose-response experiment (0.1, 1, and 10 ng/ml), the effect of Tunicamycin (TN), an ER stress inducer, was evaluated throughout the *in vitro* embryo culture period (IVC). Subsequently, to determine at which stage of embryonic development ER stress is most deleterious, embryos were treated with 1 ng/ml TN at different time points of IVC, corresponding to pre- (D 1-3), during (D 3-5), and post- (D 5-7) Embryonic Genome Activation (EGA). In a fourth experiment, to confirm that TN-induced stress acts on the ER, TN+TD association was performed at different time points of IVC, either throughout the embryonic development period (TN+TD 1-7), or during embryonic genome activation (TN+TD 3-5), compared to groups treated only with TN alone in the same periods. The main results demonstrate that the use of TD at a dose of 100 μ M was able to improve the quality of the embryos produced compared to the control group. Conversely, in embryos treated with TN, impairment of embryo development and quality was observed in a dose-response way. Furthermore, the negative effect of TN was more evident during and after EGA. Nevertheless, TD association was able to attenuate the deleterious effects of TN on embryo development. Genes related to ER (GRP78, ATF6, PERK, IRE1, XBP1-s, XBP1-u) and pluripotency factors (OCT4, SOX2, NANOG) were also evaluated in embryos treated with TN alone or in combination with TD at different time points; no significant differences in gene expression levels were observed at the blastocyst stage. Overall, the data obtained herein allow us to conclude that ER stress has an important role on embryonic viability, and the addition of TD alone has shown a beneficial effect on the quality of the embryos produced.

Keywords: embryo, bovine, *Tunicamycin*, *Tauroursodeoxycholic acid*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classificação da qualidade os oócitos bovinos. Fonte: Adaptado de LEIBFRIED; FIRST, 1979. 21
- Figura 2.** Vias de resposta a proteína mal dobrada (UPR). Lin *et al*, 2019..... 32
- Figura 3.** Embriões bovinos tratados no período de CIV com TD nas doses de 25, 50 e 100 μ M. Os embriões foram corados em hoeschst 33342 e tiveram suas células contadas de forma individual. Imagens dos blastocistos em ETM no D7 do CIV e corados. TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: cultivo embrionário *in vitro*; ETM: estereomicroscópio. 42
- Figura 4.** Efeito da suplementação de TN em diferentes concentrações durante o período de CIV. Taxas de clivagem (A) e blastocistos (B) às 48h e 168h pós-fecundação, e número de células embrionárias (C). Imagens representativas dos blastocistos no D7 do CIV e co corados (D). TN: Tunicamicina; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: estereomicroscópio. Os dados são a média \pm EP de quatro réplicas, e letras diferentes denotam diferenças significativas ($P < 0,05$). 43
- Figura 5.** Efeito da indução de estresse de RE em diferentes momentos do CIV. Embriões tratados com TN na dose de 1,0 ng/ml, nos dias 1-3, 3-5 e 5-7 de CIV. Foram avaliadas taxas de clivagem (A), blastocistos (B) e número de células embrionárias (C). Imagens dos blastocistos em ETN no D7 do CIV e corados (D). TN: Tunicamicina; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: Estereomicroscópio. Os valores são a média \pm EP de quatro réplicas, e letras diferentes denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). 45
- Figura 6.** Avaliação da reversão do estresse de RE induzido pela TN durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Foram avaliadas taxas de clivagem (A) e blastocistos (B) às 48h e 168h pós-fecundação, respectivamente, e o número de células embrionárias (C). Imagens do blastocistos no D7 do CIV e corados (D). TN: Tunicamicina; TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: esteriomicroscópio. Os valores são a média \pm EP de quatro réplicas, e letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$). 47
- Figura 7.** Expressão genica relativa dos genes realcionados com ativação da UPR. 49
- Figura 8.** Expressão genica relativa dos genes de pluripotência embrionária. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers utilizados para análise de expressão gênica e descrição das sequências de primers usados para amplificar cada gene.37
- Tabela 2.** Efeito da suplementação com TD em diferentes concentrações durante o período de CIV. Taxas de clivagem e Blastocistos foram avaliadas às 48h e 168h pós-fecundação, respectivamente. TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: cultivo embrionário *in vitro*; n: número. Os dados são a média \pm EP de cinco réplicas. Valores com sobrescritos diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$).41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Ativação partenogenética
BL	Blastocisto
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CIV	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufóxido
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GRP	Proteínas reguladas por glicose
GSH	Glutathiona reduzida
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil-etanosulfônico
IETS	International Embryo Technology Society
LAFRA	Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Nº	Número
OPU	Ovum Pick-Up/Aspiração folicular
PBS	Tampão Fosfato Salino
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas
TD	Ácido tauroursodesoxicólico
TN	Tunicamicina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UPR	Resposta a proteína mal enovelada
°C	Graus Celsius
XBP1	X-box-binding protein-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	Revisão bibliográfica	17
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	17
2.1.1	Maturação <i>in vitro</i>	17
2.1.1.1	<i>Maturação nuclear</i>	18
2.1.1.2	<i>Maturação citoplasmática</i>	19
2.1.1.3	<i>Maturação molecular</i>	21
2.1.2	Fertilização <i>in vitro</i>	22
2.1.3	Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	24
2.1.3.1	<i>Clivagem</i>	25
2.1.3.2	<i>Ativação do genoma embrionário (AGE)</i>	26
2.2	ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	28
2.2.1	Retículo Edoplasmático (RE)	28
2.2.2	Resposta a proteína mal enovelada (UPR)	30
2.2.3	Tunicamicina	32
2.2.4	Ácido tauroursodesoxicólico (TD)	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	35
4.2	CONTAGEM DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS	36
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	36
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	38
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.1	Experimento 1: Avaliação dose-resposta do tratamento com ácido <i>tauroursodesoxicólico</i> (TD) sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	38

5.2	Experimento 2: Avaliação dose-resposta do tratamento com <i>tunicamicina</i> (TM) sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	39
5.3	Experimento 3: Efeito da indução de estresse de RE em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	39
5.4	Experimento 4: Avaliação da reversão do estresse de RE induzido pela TN durante o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	39
5.5	Experimento 5: Efeito do estresse de RE sobre a expressão gênica de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	40
6	RESULTADOS	41
6.1	AVALIAÇÃO DOSE-REPOSTA DO TRATAMENTO COM TUDCA (TD) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	41
6.2	AVALIAÇÃO DOSE-REPOSTA DO TRATAMENTO COM TUNICAMICINA (TN) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	42
6.3	EFEITO DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RE EM DIFERENTES MOMENTOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i>	44
6.4	AVALIAÇÃO DA REVERSÃO DO ESTRESSE DE RE INDUZIDO PELA TN DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i>	46
6.5	EFEITO DO ESTRESSE DE RE SOBRE A EXPRESSÃO GENICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDO <i>IN VITRO</i>	47
7	DICUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução animal encontram-se em plena expansão comercial. O Brasil é líder na transferência de embriões produzidos *in vitro*, e ocupa a segunda colocação na quantidade de embriões produzidos *in vitro* no mundo. Na América do Sul é o maior produtor de embriões bovinos, a partir de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU), respondendo por mais de 60% da produção *in vitro* do continente. Mesmo com as consequências sociais e econômicas da pandemia do Covid-19, a indústria de embriões segue com tendências positivas em todo o mundo (VIANA, 2022).

A produção *in vitro* (PIVE) de embriões bovinos tem como objetivo difundir o material genético de fêmeas, via aproveitamento da população de células germinativas que fisiologicamente entrariam em atresia. Através da punção e aspiração dos folículos para coleta do complexo *cumulus*-oócito (CCO), maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) é possível simular *in vitro* as condições que os gametas e zigotos encontram no ambiente reprodutor feminino (GONÇALVES, 2021).

Além de acelerar a produção de animais geneticamente superiores, a PIVE viabiliza outras biotécnicas, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonagem e transgenia; possibilita a criopreservação de material genético, com isso a formação de bancos de germoplasma, tornando possível a preservação de raças e linhagens animais e/ou celulares; viabiliza o aprofundamento de conhecimentos de processos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos, por meio de estudos da maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, minimizando o uso de animais de laboratório (GONÇALVES, 2021); auxilia em situações especiais da infertilidade humana, e na compreensão de embriopatias e doenças humanas (ERIKSSON; CEDERBERG; WENTZEL, 2003; MOLEY, 2001), tais como, a disfunção da homeostasia energética e nutricional, relacionadas com hiperglicemia (diabetes mellitus), obesidade (DICKS et al., 2021) e câncer (DICKS et al., 2015), doenças que impactam diretamente na qualidade de vida e sobre vida humana e animal.

Em bovinos, a utilização da PIVE permite que fêmeas com problemas reprodutivos adquiridos permaneçam na reprodução, viabiliza a reprodução de fêmeas pré-púberes e senis, facilita a determinação do sexo embrionário, otimiza o uso de sêmen de alto valor e torna

possível a produção de embriões a partir de ovários imediatamente após o abate de fêmeas (GONÇALVES, 2021).

A produção *in vitro* de embriões na espécie bovina ainda apresenta desafios a serem superados e melhorias que venham a elevar a eficiência da técnica. Além da inconsistência de seus resultados nas taxas de formação de blastocitos, possui outras limitações como custo inicial da construção da infraestrutura e tempo para produção dos embriões, que vai da punção dos folículos, até o momento de criopreservação ou transferência dos embriões para as receptoras. Existem evidências de que o ambiente de cultivo embrionário *in vitro* é capaz de alterar em nível molecular o funcionamento das células conferindo um ambiente subótimo em comparação ao ambiente *in vivo* (MARSICO et al., 2023). Tais condições contribuem para a perda de eficiência de algumas biotecnologias da reprodução, inclusive na PIVE (ALI et al., 2018; KIM et al., 2012; LIN et al., 2016; SHARMA et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

O estresse de retículo endoplasmático (RE) é um dos fatores que prejudica o sucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Devido ao ambiente subótimo, a síntese proteica pode ser prejudicada, gerando o acúmulo de proteínas desdobradas ou mal enoveladas no interior dessa organela, desencadeando a degradação proteossomal (*ER-associated protein degradation* – ERAD) e sob condições de estresse é a resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response* – UPR), uma defesa celular na busca da proteostase, ativada para garantir a sobrevivência celular (LIN et al., 2019).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as consequências do estresse de RE em diferentes fases do desenvolvimento embrionário *in vitro* na espécie bovina, utilizando um agente indutor de estresse de RE, a *Tunicamicina* (TN) e outro inibidor de estresse de RE, o *Ácido Tauroursodesoxicólico* (TD), no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A PIVE em bovinos é uma biotecnologia que possibilita a interação entre os gametas masculino e feminino fora do trato reprodutivo da fêmea, resultando em um novo indivíduo após sucessivas etapas, as quais envolvem a punção de folículos ovarianos para obtenção dos CCO's, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) (GONÇALVES, 2021).

Um dos marcos da FIV ocorreu em 1978 com o nascimento de Loise Brown, o primeiro bebê humano proveniente desta técnica. Na espécie bovina, os primeiros relatos de maturação e fecundação de oócitos *in vitro* foram em 1977 (GARCIA; AVELINO; VANTINI, 2004; GONÇALVES et al., 2021), contudo, o primeiro bezerro resultante de PIVE nasceu em 1982, no Estados Unidos, após inúmeros estudos com animais de laboratório (BRACKETT et al., 1982). Outros animais de produção como ovinos e caprinos tiveram os primeiros produtos dessa biotecnologia nascidos também da década de 80 (GONÇALVES et al., 2021).

No Brasil a PIVE teve início em 1990, em 1994 nasceram os primeiros bezerras, utilizando oócitos imaturos, sêmen descongelado e sistema de cultivo *in vitro*. Os avanços conquistados nesta técnica possibilitaram sua utilização em larga escala em laboratórios de pesquisa e de forma comercial (ALVES et al., 2003; ANDRADE et al., 2012; BUENO; BELTAN, 2008). Em 2014 o Brasil foi o maior produtor de embriões bovinos gerados por PIVE do mundo, sendo responsável por 70% da produção mundial, segundo a *International Embryo Technology Society* (IETS). Atualmente a produção brasileira só é menor que a dos EUA e, juntos, os dois países representam 77,2% de embriões PIVE registrados mundialmente. Ainda segundo o relatório de recuperação de dados de 2020 da IETS, o Brasil, lidera a coleta de embriões PIVE na espécie equina (IETS, 2020).

2.1.1 Maturação *in vitro*

No interior do folículo ovariano encontram-se os oócitos, envoltos por células da granulosa, compondo os CCO's. O gameta feminino deve passar por diversas modificações para que esteja apto a ser fecundado, esse processo pode ser denominado de maturação ou capacitação oocitária. Tais etapas envolvem a maturação nuclear, citoplasmática e molecular. A maturação nuclear corresponde à progressão meiótica, do estágio de Prófase I da primeira

divisão meiótica até a segregação dos cromossomos e extrusão dos corpúsculos polares, evento que será finalizado somente após a fecundação, sendo tal processo regulado por moléculas como a adenosina 3'-5' monofosfato cíclico (AMPC), a proteína quinase ativada por mitogêo (MAPK), o fator promotor da fase M (MPF), entre outras. A maturação citoplasmática corresponde a modificações citoesqueléticas, que consistem no rearranjo de organelas que ocorrem no oócito. A maturação molecular corresponde ao acúmulo de transcritos que são armazenados nos oócitos durante a oogenese e são posteriormente utilizados até que ocorra a AGE após a fecundação. Nos bovinos a retomada da meiose oocitária *in vivo* coincide com o pico de LH na fêmea em estro, *in vitro* a punção do folículo é responsável por desencadear o processo de maturação nuclear (GONÇALVES, 2021).

2.1.1.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear ou meiótica, tem como objetivo a produção de gametas haploides, ou seja, é a divisão reducional dos cromossomos, para torná-los aptos à fecundação (GONÇALVES, 2021). Oócitos de mamíferos em sua maioria, iniciam a meiose após várias mitoses, na vida intrauterina. Muitos fatores inibitórios sintetizados pela célula da granulosa e presentes no fluido folicular interrompem as divisões meióticas no estágio diplóteno da prófase I, morfológicamente denominada vesícula germinativa (VG) (MOTLIK et al., 1998; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), que assume diferentes conformações na progressão meiótica, partindo de uma cromatina descondensada (VG0) até maior grau de condensação (VG3). Esse estágio de primeiro bloqueio se mantém até a puberdade animal, então esses gametas passam a ser recrutados gradualmente, e retomam a divisão meiótica por estímulo gonadotrófico pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesse período o oócito passa por uma série de modificações que inclui síntese proteica, transcrição de RNA mensageiro (RNAm) e a reorganização de organelas, que tornam o oócito capaz de sustentar o desenvolvimento embrionário inicial subsequente (BERTAGNOLLI et al., 2004).

O processo que desencadeia a retomada da maturação nuclear é diferente quando comparado o ambiente *in vivo* com o *in vitro*. No ambiente *in vivo* a retomada da maturação meiótica é desencadeada pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), cuja ação tem necessidade de mediação por fatores parácrinos secretados pelas células somáticas LH-responsivas, essas células da granulosa também são responsáveis pelo transporte de substâncias

indutoras da meiose por meio das junções Gap comunicantes (GJCs) (GILULA; EPSTEIN; BEERS, 1978; RICHARD, 1996). No ambiente *in vitro* a retomada da meiose se dá com a remoção do CCO do ambiente folicular, por meio da OPU guiada por ultrassonografia transretal *in vivo*, ou, em ovários provenientes de abatedouro por meio de aspiração por agulha fina acoplada a uma seringa ou a uma bomba de vácuo (GONÇALVES, 2021). Independente da maturidade citoplasmática, folículos entre 3 e 8 mm são aspirados, culminando com redução nas taxas de desenvolvimento embrionário inicial (BLONDIN et al., 1997).

Com a retomada da divisão meiótica, ocorre a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina entre 7 e 12 horas após o início do cultivo *in vitro*, em seguida o oócito segue para metáfase (MI) que ocorre entre 12 a 15 horas, anáfase (AI) e a telófase (TI) ocorrem entre 15 a 18 horas, completando a primeira divisão meiótica por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar. A etapa de metáfase II (MII), que ocorre após 18 horas de cultivo, caracteriza-se pela presença da cromatina condensada e um corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Gradualmente durante a foliculogênese o gameta feminino adquire a habilidades para reiniciar e completar a meiose, nesse período armazena RNAm, desempenha papéis essenciais no processo de regulação do ciclo celular, diferenciação celular, sinalização intracelular e expressão gênica. Além disso, completa a prófase I da meiose. (GONÇALVES, 2021), mais de 95% dos oócitos apresentam bloqueio em MII entre 22 e 24 horas de cultivo (HYTTEL; GREVE; CALLESEN, 1989).

2.1.1.2 Maturação citoplasmática

Para uma correta capacitação oocitária, além da maturação nuclear, é necessário que ocorra a maturação citoplasmática, processo que envolve, a reorganização de organelas citoplasmáticas, a transcrição de RNAm, síntese de proteínas e outros fatores interligados com o processo de maturação fertilização e desenvolvimento embrionário (GONÇALVES, 2021).

A maturação citoplasmática é responsável pela capacidade do oócito bloquear a polispermia, descondensar o espermatozoide após a reação do acrossoma no interior do ooplasma, promover singamia entre pronúcleo feminino e masculino e sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; YAMADA; ISAJI, 2011). Durante a folículo-oogênese até próximo a retomada da maturação nuclear, de forma abrangente, ocorre: formação de GJCs entre oócito e células da granulosa, desenvolvimento e

deslocamento do complexo de Golgi para periferia oocitária, secreção de grânulos corticais (GC) e de proteínas da zona pelúcida pelo complexo de Golgi, desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e formação de gotas lipídicas, diferenciação e aumento da quantidade de mitocôndrias, formação e estoque de ribossomos, transcrição de RNAm e síntese de proteínas fundamentais à progressão da maturação e desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997).

Com a retomada da maturação nuclear as organelas, em sua maioria, migram para o centro do ooplasma. No oócito imaturo as mitocôndrias e o complexo de Golgi ficam na periferia celular, com a progressão meiótica, as mitocôndrias migram ao centro e se associam a gotículas lipídicas e o complexo de Golgi reduz seu tamanho significativamente (GONÇALVES, 2021). Quando oócito está em estágio de VG o retículo endoplasmático fica distribuído de forma uniforme, durante a maturação ele se desloca para a região cortical do ooplasma (FERREIRA et al., 2009).

O complexo de Golgi é responsável pela produção dos GCs, que assumem papel imprescindível durante a fertilização, os GCs são compostos por diversas proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos (FERREIRA et al., 2009). Ao final da maturação, quando o oócito se encontra em MII, os GCs ficam próximos à superfície interna da membrana plasmática, formando uma monocamada estratégica para o momento da penetração do espermatozoide (THIBAUT; SZÖLLÖSI; GÉRARD, 1987), que culmina com elevação da concentração intraoocitária de cálcio, responsável por induzir a fusão dos GCs à membrana plasmática e liberar seu conteúdo no espaço perivitelínico (CARNEIRO et al., 2002), processo esse denominado reação cortical, responsável por bloquear a polispermia, que teria como resultado a degeneração embrionária (FERREIRA et al., 2009).

Os oócitos puncionados podem ser selecionados morfológicamente pelas características das células do *cumulus* e aspecto do citoplasma do oócito, em uma escala de 1 a 4 (Figura 1) (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Tal classificação tende a apresentar boa correlação com o potencial de desenvolvimento dos CCO's sendo amplamente utilizada em oócitos destinados à PIV.

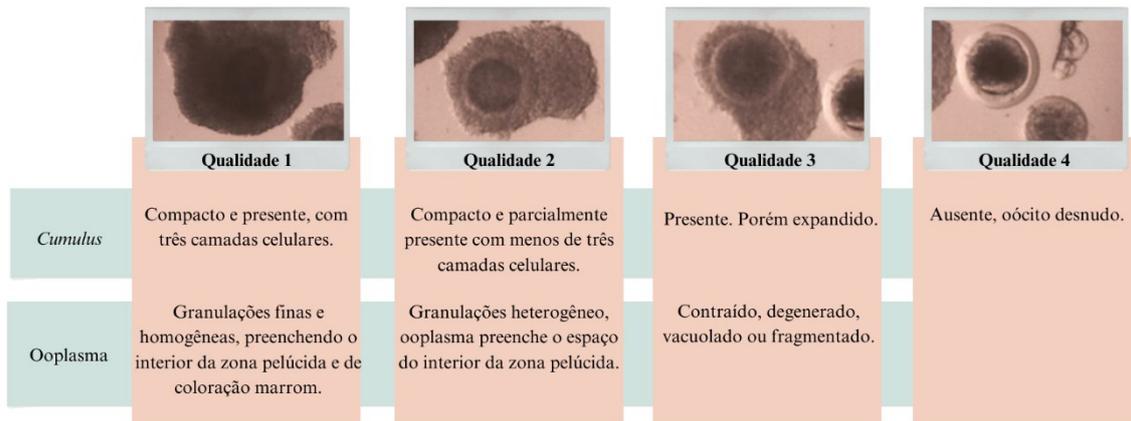


Figura 1. Classificação da qualidade os oócitos bovinos. Fonte: Adaptado de LEIBFRIED; FIRST, 1979.

2.1.1.3 Maturação molecular

A maturação molecular envolve a transcrição, estoque e processamento de RNAm que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos. O processo de maturação e eventos celulares subsequentes, como fertilização, formação dos pronúcleos e fase inicial da embriogênese, necessitam destas proteínas (GONÇALVES, 2021).

A competência do oócito para suportar os posteriores estádios do desenvolvimento embrionário, é determinada por sua eficiência no armazenamento e posterior utilização dos RNAm (GONÇALVES, 2021), regulados pelo processo de poliadenilação. No decorrer da foliculo-oogênese, enquanto o núcleo celular se encontra em quiescência meiótica, ocorre a transcrição e estoque de RNA. Contudo, a capacidade de tradução de RNAm e a síntese proteica se mantém ao longo de todo desenvolvimento oocitário e embrionário. A maior parte do RNAm se mantém no ooplasma em sua forma estável, inativa caracterizada pela presença da cauda poli-A curta (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, ocorre a poliadenilação, ou seja, a adição de adeninas à porção terminal 3' do RNAm, por ação da enzima poli-a polimerase, com consequente liberação de moléculas repressoras acopladas à porção 5', permitindo o início da tradução do RNAm e síntese proteica (REN-JANG, 2010; TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002).

Os oócitos utilizados na PIV são provenientes de folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm. Durante o desenvolvimento folicular o oócito em seu interior passa por uma série de

modificações, como visto anteriormente, que promovem sua maturação e acúmulo de RNAm para a síntese de proteínas necessárias até a AGE. Oócitos bovinos atingem o diâmetro final, de aproximadamente 120 μm , quando o folículo alcança 3 mm de diâmetro. Folículos maiores de 8 mm de diâmetro vão estar em atresia ou em processo de maturação (GONÇALVES, 2021). Oócitos provenientes de folículos entre 0,5 a 2 mm de diâmetro são considerados incompetentes para reiniciar a meiose já que, apresentam organelas dispersas no citoplasma e cromatina pouco condensada, em alta atividade transcricional (LODDE et al., 2008).

2.1.2 Fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* é uma biotecnologia da reprodução que possibilita a união entre os gametas feminino e masculino fora do aparelho reprodutor da fêmea. A FIV é a base para inúmeros estudos voltados a compreensão do desenvolvimento embrionário inicial, representa uma alternativa frente a certos problemas de infertilidade, permite a multiplicação de animais de alto valor, e torna possível o uso desta biotecnologia para geração de modelos animais, com a finalidade de estudar as interações celulares e moleculares sobre atuias síndromes, mal formações genéticas e doenças como câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e mal de Parkinson, entre outras.

O gameta masculino é uma célula móvel flagelada formada durante a espermatogênese, responsável pela reprodução sexuada animal. Essa célula passa pelo período de maturação no epidídimo, que envolve absorção de proteínas e glicoproteínas produzidas pelo epitélio epididimário pela membrana plasmática do espermatozoide, bem como pela remoção de algumas proteínas de membrana espermática (VERNON; MULLER; EDDY, 1987). A maturação espermática envolve importantes eventos como destruição da gota citoplasmática do espermatozoide, digestão de polissacarídeos adsorvidos, processamento e síntese de glicoproteínas pelo epidídimo, formação da matriz acrossomal, ação sobre a reação acrossômica e reconhecimento de sítios específicos sobre a superfície dos oócitos durante a fertilização (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003; HINTON et al., 1981; TULSIANI et al., 1993).

Estudos demosntram que o espermatozoide transmite microRNAs (miRNA) que estão envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial. Nas vacas e coelhas o miR-34c melhora a competência de desenvolvimento de embriões gerados por transferência nuclear de células somáticas, já em camundongos o microRNA-34c transmitido pelo esperma regula a degradação

do RNAm materno e o desenvolvimento embrionário pré-implantação (CUI et al., 2023). Outros estudos sugerem evidências de que o epigenoma do espermatozóide de mamíferos serve como modelo para o desenvolvimento embrionário (LISMER; KIMMINS, 2023).

Após a maturação espermática, os espermatozoides são liberados durante a ejaculação. O espermatozoide passa pelo processo de seleção no interior do aparelho reprodutor feminino onde a migração ativa dos espermatozoides, através dos fluidos genitais da fêmea, determina que ocorra um processo natural de seleção onde apenas os espermatozoides aptos, com boa motilidade e vigor, alcançam o oócito. Junto ao processo de seleção, por meio das interações químicas e moleculares, ocorre a capacitação do espermatozoide tornando possível a fecundação. No ambiente *in vitro* a etapa de seleção é feita com gradiente de densidade de baixa viscosidade (Percoll[®]), ou por outros métodos como de migração ascendente (*swin-up*) (GONÇALVES, 2021) e o mais atual método estudado, o sistema microfluídico (nMx) ou também chamado seleção microfluídica de espermatozoides (MFSS) (HARPER et al., 2017), que seleciona espermatozoides por biomimética da microanatomia do trato reprodutor feminino por meio de estratégias como quimiotaxia e reotaxia (VAUGHAN; SAKKAS, 2019), tais métodos tem como objetivo selecionar os espermatozoides com maior capacidade de fertilização.

A capacitação completa do espermatozoide ocorre no microambiente uterino, onde ocorrem uma série de eventos bioquímicos, que resultam em modificações celulares e moleculares do espermatozoide (RAHMAN; KWON; PANG, 2017). Reações químicas e moleculares resultam no movimento hiperativo propulsivo, que tem como objetivo biológico a liberação dos espermatozoides das células da região do istmo da tuba uterina, a travessia pelas células do *cumulus* até a zona pelúcida e, após a reação acrossomal, da zona pelúcida até o espaço perivitelino. O movimento vigoroso e assimétrico é dependente da entrada de Ca^{2+} através dos CatSper, presentes na peça intermediária do flagelo (BERNECIC et al., 2019; SINGH; RAJENDER, 2015). Para embriões bovinos no ambiente *in vitro*, com o objetivo de manter eficiente a função espermática se usa o meio Fert-TALP, que contém heparina para capacitação espermática (GONÇALVES, 2021).

Na reação do acrossoma ocorre a formação de poros de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. Essa reação é dependente de Ca^{2+} e inicia com a ligação entre o espermatozoide e a ZP3, uma glicoproteína espécie-específica constituinte da

zona pelúcida (GONÇALVES, 2021). Essa fusão é regulada pela formação de complexos solúveis de N-etilmaleimida sensível ao fator de ativação do receptor de proteína (SNARE), envolvendo fosfolipase C (PLC) e despolimerização da actina (BREITBART et al., 2010; MEJÍA-FLORES et al., 2017; SOSA et al., 2015). Em seguida à formação dos poros de fusão, as membranas começam a formar vesículas híbridas (membrana plasmática e membrana acrossomal externa) e liberam o conteúdo de enzimas líticas, contidas no acrossomo, que irão auxiliar na degradação da zona pelúcida (BREITBART et al., 2010). A perda da membrana acrossomal externa e uma grande região da membrana plasmática expõe a membrana acrossomal interna para o meio e permite a ocorrência de modificações na membrana plasmática na região equatorial, para tornar esta região da membrana apta para interagir e sofrer fusão com a membrana plasmática do oócito – ooplasma (TOSHIMORI, 2011).

Após a fusão entre as membranas plasmática espermática e do oócito, ocorre a entrada do espermatozoide dentro do citoplasma do oócito. Esta entrada, ativa o término da meiose II do oócito, ocorrendo a extrusão do segundo corpúsculo polar, e a formação do pronúcleo feminino. Enquanto isso, o núcleo do espermatozoide sofre descompactação formando o pronúcleo masculino. Ocorre então, a fusão dos pronúcleos masculino e feminino, denominada singamia, formando o zigoto (ALVES; CELEGHINI; BELLEANNÉE, 2020; TOSHIMORI, 2011; YANAGIMACHI et al., 1985).

2.1.3 Cultivo embrionário *in vitro*

Em mamíferos o período pré-implantação é compreendido entre a formação do zigoto até o estágio de blastocisto, pouco antes da implantação do embrião ao útero. E pode ser organizado em quatro etapas importantes após a fertilização: 1. Clivagem, 2. Ativação do genoma embrionário (AGE), 3. Compactação e formação da polarização do epitélio embrionário e 4. Diferenciação de mórula em blastocisto (SCHULTZ et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2005). O cultivo embrionário *in vitro* corresponde ao período pré-implantação *in vivo*, e compreende o período decorrido geralmente até o sétimo dia após a FIV de gametas bovinos.

2.1.3.1 Clivagem

Em geral o potencial de desenvolvimento embrionário está associado a características intrínsecas do oócito como: o folículo de origem, morfologia, estado de poliadenilação, cinética das primeiras clivagens (BREVINI et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; MEIRELLES et al., 2003) e das interações com sistema de cultivo (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004; WRENZYCKI et al., 2005). Os fatores extrínsecos, como íons inorgânicos, tampões, aminoácidos, pH, fatores de crescimento, luminosidade, vitaminas, macromoléculas, composição atmosférica gasosa (GONÇALVES, 2021) e tensão de oxigênio (MARSICO et al., 2023) também geram efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro*, que é reconhecidamente mais sensível que embriões produzidos *in vivo*.

Quanto mais precoce for a clivagem, maior o potencial de desenvolvimento embrionário, quando comparados aos embriões de clivagem tardia (DINNYÉS et al., 1999; LONERGAN et al., 1999). O tempo necessário para a primeira clivagem é um parâmetro importante para prever o potencial de desenvolvimento de embriões bovinos (BASTOS; GONÇALVES; BORDIGNON, 2008; LONERGAN et al., 1999). Na PIVE 90% dos oócitos são capazes de atingir a maturação nuclear (progressão de prófase I para metáfase II) (GORDON, 1994) e a maioria dos oócitos bovinos clivam 32 horas após a inseminação *in vitro* (hpi). Embriões de clivagem precoce (28 hpi) apresentam maior competência de desenvolvimento embrionário que embriões de clivagem intermediária (32 hpi) e tardia (36 hpi); a maioria dos embriões de clivagem tardia interrompe seu desenvolvimento no estágio de 2-8 células (BARRETA et al., 2012).

O embrião possui um mecanismo celular de controle de qualidade que regula o desenvolvimento de células anormais, desnecessárias e em excesso por meio de apoptose celular. Esse processo é observado em embriões da espécie bovina principalmente após o estágio de oito células que coincide com a AGE (BYRNE et al., 1999; MATWEE; BETTS; KING, 2000). Um aumento de apoptose pode ser observado em embriões submetidos a condições estressantes, como o cultivo *in vitro* (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Nessas condições o embrião tem a opção de remodelar sua reposta e se adaptar ao ambiente ou bloquear seu desenvolvimento.

Estudos realizados com camundongos descobriram um gene relacionado com o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (gene Ped), confirmando que a presença de seu alelo dominante (Ped rápido) gera embriões de clivagem precoce, com maior número de células no trofotoderma (TE) e na massa celular interna (ICM), favorecendo a implantação em locais com melhor vascularização, melhorando assim a placentação e desenvolvimento fetal. Embriões com o alelo Ped rápido têm uma chance maior de sobrevivência a termo, e os filhotes têm maior peso ao nascer e maior peso ao desmame em comparação com os filhotes decorrentes de embriões com o alelo Ped lento (WARNER; BRENNER, 2001). O homólogo do gene Ped, teve o padrão de expressão de RNAm caracterizado durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional em bovinos e se mostrou com maior abundância nos embriões de maior qualidade (cultivados *in vivo*) e maior potencial de desenvolvimento (clivagem precoce) (FAIR et al., 2004).

Apesar de as primeiras clivagens serem controladas pelo RNAm materno proveniente do oócito, após a AGE o próprio embrião assume gradativamente o controle da expressão gênica. Até o estágio de blastocisto, os embriões são considerados relativamente autônomos em seu desenvolvimento, ou seja, não possuem absoluta necessidade de contato direto com o trato reprodutivo materno para que a gestação possa ser continuada, tanto que seu cultivo pode ser mimetizado *in vitro* (GEISERT; BAZER, 2015).

2.1.3.2 Ativação do genoma embrionário (AGE)

Durante o CIV, ocorre a transição da síntese proteica a partir do RNAm materno para a transcrição proteica advinda do RNAm embrionário, denominada ativação do genoma embrionário ou transição materno-zigótica, essa etapa ocorre por volta do estágio de 8 a 16 células embrionárias (HYTTEL et al., 1996; PLANTE et al., 1994), que corresponde aos dias 3 a 5 do CIV. O citoplasma do oócito é o responsável pelo suprimento de RNAm e de proteínas necessárias para manutenção do embrião até a ativação principal do genoma, na qual o embrião passa a depender da transcrição de seu próprio RNAm para continuar a se desenvolver (FAVETTA et al., 2004).

A ativação do genoma é um evento essencial para o desenvolvimento embrionário. O momento da AGE é variável entre espécies, normalmente ocorre por volta do estágio de 2 células em camundongos, 4 em suínos e humanos, 8 células em bovinos e ovinos, e 16 células

em coelhos (DE SOUSA et al., 1998; SCHULTZ, 1993; TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990). Evidências sugerem que o mecanismo de remoção e reestabelecimento tanto nos níveis de metilação do DNA quanto de modificações de histonas são necessários para que ocorra a AGE (RISSI et al., 2019).

Especificamente no período que antecede a AGE, o potencial de desenvolvimento embrionário inicial está associado à presença de RNAm e proteínas, acumuladas pelo oócito durante a oogênese, cuja principal função é de manutenção dos primeiros ciclos celulares embrionários (DE SOUSA et al., 1998; SCHULTZ, 1993). Os fatores que controlam a cinética nessa fase do desenvolvimento não foram totalmente esclarecidos, no entanto, estudos associam a cinética do desenvolvimento pré-implantacional com a competência embrionária (DINNYÉS et al., 1999; GRISART; MASSIP; DESSY, 1994; HOLM et al., 1998; LONERGAN et al., 1999; MEIRELLES et al., 2003).

A compreensão dos eventos biológicos envolvidos na ativação do genoma embrionário, que venham responder de que forma os transcritos herdados maternalmente podem controlar o desenvolvimento embrionário, quais são os fatores transcritos responsáveis pela competência oocitária, e quais os primeiros genes a serem transcritos, seram fontes para melhorar de forma qualitativa e quantitativa a PIV de embriões bovinos (DE SOUSA et al., 1998).

Obtendo tais respostas, se torna possível modificações em meio de cultivo embrionário, através da adição de substâncias que melhorarem o desenvolvimento embrionário, ou por possibilitar incremento de manejos assertivos durante o período de CIV, otimizando as possibilidades de reconhecimento materno fetal, implantação, e desenvolvimento do embrião no trato reprodutivo da fêmea.

O bloqueio do desenvolvimento embrionário inicial ocorre no ciclo de maior duração no período pré-implantação, e coincide com o momento da AGE, até este momento a maioria do RNAm existente no embrião foi produzida durante a oogênese (PIKÓ, 1970; TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990). A incapacidade do embrião ultrapassar os primeiros estádios de seu desenvolvimento é vinculada ao ambiente de repressão gerado por fatores estruturais do genoma, como o grau de empacotamento do DNA, a acetilação, hiperacetilação e metilação (LAVOIR, 1997). A morte via apoptose e danos genotóxicos no embrião são causadas por danos no DNA e quebra de fita dupla (RICH; ALLEN; WYLLIE, 2000). O bloqueio da divisão

celular e desencadeamento da morte celular programada é gerado pela presença de apenas uma única quebra de fita dupla de DNA (DOHERTY; JACKSON, 2001). Os embriões bovinos são capazes de responder a DSBs, induzida por irradiação UV, após a AGE por vias de recombinação homóloga e de união terminal não homóloga reguladas durante o desenvolvimento embrionário (BARRETA et al., 2012).

Efeitos individuais de vacas e touros utilizados para PIVE podem influenciar negativamente o desenvolvimento embrionário (WATANABE et al., 1999). As taxas de insucesso de embriões produzido *in vitro* chegarem ao estágio de blastocisto podem ser atribuídas a problemas de fecundação e ao momento de AGE, levando ao bloqueio embrionário no estágio de 8 células (DE SOUSA et al., 1998). Com o progresso do desenvolvimento embrionário inicial, as divisões mitóticas têm início e o número de células no embrião aumenta em progressão geométrica do estágio de duas células até mórula e blastocisto. Os blastômeros resultantes das divisões mitóticas, passam pelo processo de compactação que gera circunstâncias que induzem a formação da MCI e do TE, as quais dão origem ao embrião e anexos embrionários como a placenta, respectivamente (GONÇALVES, 2021). No sétimo dia de desenvolvimento, o blastocisto deve apresentar uma proporção de células na massa celular interna (MCI) para aquelas no trofotoderma (TE) de aproximadamente 1:3. Já se determinou que o número total de células e o número de células da MCI apresenta forte correlação com a viabilidade do blastocisto e potencial estabelecimento de prenhez (GARDNER; LANE; WATSON, 2004).

O CIV pode se estender até o sétimo dia após a FIV ou ativação oocitária, quando é realizada a seleção e avaliação dos embriões para posterior transferência a fêmeas receptoras, criopreservação, análise molecular, entre outras avaliações. Com a intenção de avaliar-se a taxa de eclosão ou qualidade embrionária, o CIV pode se estender até os dias 8 e 9 (GARCIA; AVELINO; VANTINI, 2004).

2.2 ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

2.2.1 Retículo Edoplasmático (RE)

O reticulo endoplasmático foi observado pela primeira vez em 1897, é constituído por um sistema de membranas em forma de túbulos, vesículas e cisternas. É dividido em Retículo

Endoplasmático Liso (REL), quando não há associação a ribossomos, e rugoso (RER) quando apresenta associação com ribossomos. Os ribossomos são partículas não membranosas, compostas de proteínas e RNA ribossomal (LATORRACA, 2019).

O RE é responsável pela síntese proteica e homeostasia celular, tendo funções relevantes durante o desenvolvimento embrionário, iniciando no processo de maturação onde essa organela sofre uma reorganização estrutural com a finalidade de permitir a grande liberação de cálcio após a fecundação, a qual irá coordenar processos de ativação oocitária. Com o início do desenvolvimento, o RE em associação com as mitocôndrias e complexo de Golgi são responsáveis pelo acúmulo de energia, síntese de fosfolipídios e formação de proteínas de membrana durante as primeiras divisões celulares. Durante o desenvolvimento embrionário, a síntese proteica é um processo contínuo necessário para dar suporte às necessidades estágio específicas de cada fase do desenvolvimento. A capacidade de sobrevivência de um embrião e futuro estabelecimento de uma gestação está diretamente atrelada a sua habilidade para manter a homeostasia celular nas diferentes fases de seu desenvolvimento, conferindo ao RE um importante papel (LATORRACA, 2019).

Para que uma proteína seja estável e consiga exercer sua função a mesma deve passar pelo processo pós-traducional essencial, a glicosilação, responsável por adicionar açúcares às proteínas, resultando em glicoproteínas. A glicosilação tem influência sobre interações entre proteínas e sinalização celular. Há dois tipos de glicosilação: N-glicosilação, que envolve a ligação N-glicanos ao grupo amino de asparaginas, e O-glicosilação, que é a ligação de O-glicanos ao grupo hidroxila de treoninas ou serinas. N-glicosilação compreende uma etapa de montagem e uma etapa de processamento que se estende por três compartimento celulares: citoplasma, RE e complexo de Golgi (JAEKEN, 2010). O estresse de RE tem demonstrado prejudicar a produção embrionária *in vitro* de diferentes espécies (ALI et al., 2018; LIN et al., 2016, 2019; SHARMA et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2015), e está diretamente relacionado a danos na N-glicosilação, que por sua vez tem ganhado espaço em estudos voltados às doenças congênitas da glicosilação (CDG) em humanos (MAGALHÃES et al., 2020), que podem ter manifestações clínicas ainda na gestação, como a hidropisia fetal não imune, microcefalia, malformações congênitas e dismorfias faciais; em neonatos e na infância, podem ser encontrados hipoplasia cerebelar, mamilos invertidos, estrabismo, movimento ocular anormal, retardo de desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM), hipotonia, ataxia, hiporreflexia, convulsões, anorexia, vômitos, diarreia, defeitos do sistema imunológico,

hipogonadismo, lipodistrofia, hepatomegalia, cifose, escoliose e cardiomiopatia. Podem também ocorrer fenótipos mais leves, sem dismorfias e com RNDPM leve. Em qualquer caso de síndrome inexplicada, deve-se considerar a hipótese de CDG (MARKLOVÁ; ALBAHRI, 2007).

2.2.2 Resposta a proteína mal enovelada (UPR)

A morte embrionária nos estádios iniciais de desenvolvimento é um dos principais componentes da infertilidade. Em bovinos, muitos oócitos naturalmente fertilizados são incapazes de sobreviver até a implantação (DISKIN; PARR; MORRIS, 2012). É bem documentado que menos de 50% dos embriões produzidos por fertilização *in vitro* são capazes de estabelecer uma gestação tanto em humanos quanto em bovinos e outras espécies de produção (PARAMIO; IZQUIERDO, 2014; PONTES et al., 2009). Tais falhas no desenvolvimento são atribuídas a diversos fatores que incluem integridade genômica, defeitos genéticos e epigenéticos, fatores ambientais, desordens metabólicas e hormonais nos zigotos, embriões e/ou fêmeas receptoras (LEROY et al., 2015).

O RE regula a qualidade, o enovelamento e a secreção de proteínas recém-sintetizadas. Em condições normais, uma vez enoveladas adequadamente, as proteínas são transportadas para sua localização celular designada. Se a proteína não for enovelada adequadamente, esta fica retida no RE através de proteínas responsáveis pelo “*controle de qualidade*” até adquirir a conformação correta para ser secretada. No entanto, se ainda assim, o enovelamento adequado não for atingido, essas proteínas mal enoveladas são então direcionadas para degradação proteossomal (*ER-associated protein degradation* - ERAD), mecanismo que auxilia na degradação das proteínas mal dobradas. A indução severa de estresse de RE ou a persistência deste estresse, induz a ativação de vias de morte celular a fim de eliminar as células com comprometimento do RE. As principais vias apoptóticas ativadas em resposta ao estresse do RE são a indução transcricional do gene *GADD153/CHOP*, a ativação da quinase JNK e a ativação de Caspase 12 (FAITOVA et al., 2006).

A resposta a proteína mal enovelada (UPR - *unfolded protein response*) é ativada por três proteínas transmembrana (Figura 2) presentes no RE (*PERK*, *ATF6* e *IRE1*) e pela proteína chaperona BiP (*conhecida como proteína 78 regulada por glicose ou GRP78*) (LATHAM, 2016; MICHALAK; GYE, 2015). Em condições fisiológicas (sem estresse) GRP78/BiP tem

interação direta com PERK, ATF6 e IRE1. Do contrário, esta chaperona se desliga das proteínas transmembrana e ativa as vias de sinalização da UPR. A sinalização PERK reduz a translocação de novas proteínas para o lúmen do RE, prevenindo sobrecarga de proteínas, enquanto as vias ATF6 e IRE1 regulam a ativação transcricional de vários genes, incluindo aqueles responsáveis por aumentar a translocação, dobramento de proteínas, exportação, degradação e outras funções do RE (SHEN; ZHANG; KAUFMAN, 2004).

Após a ativação da UPR, *PERK* sofre dimerização e autofosforilação e, em seguida, fosforila *eIF-2* para impedir o início da tradução e bloquear a produção de novas proteínas no citoplasma. O *eIF-2* fosforilado por *PERK* também ativa o ATF4, que se transloca para o núcleo e desencadeia a transcrição de genes como *CHOP*, *ATF4* e *GRP78* que são necessários para restaurar a homeostase do RE. Quando o *BiP* é separado do *ATF6*, o último fator se move para o aparelho de Golgi, onde é clivado em sua forma ativa por *S1P* e *S2P*. A clivagem de *ATF6* produz um fator de transcrição *bZip*. O *ATF6* ativo (*bZip*) se move para o núcleo e induz a transcrição dos genes como *XBPI* e *ATF6*, resultantes do estresse do RE via *ERSE-1* e *-2*. A endoribonuclease *IRE1* é ativada por dimerização e transfosforilação. Isso leva à remoção de um íntron de 26 nucleotídeos da forma do gene *XBPI* (*XBPI-u*) sem *splicing* alternativo para produzir a forma *XBPI spliced* (*XBPI-s*). *XBPI-s* move-se para o núcleo e induz genes responsivos a UPR (*GRP78* e *XBPI*) (LIN et al., 2019).

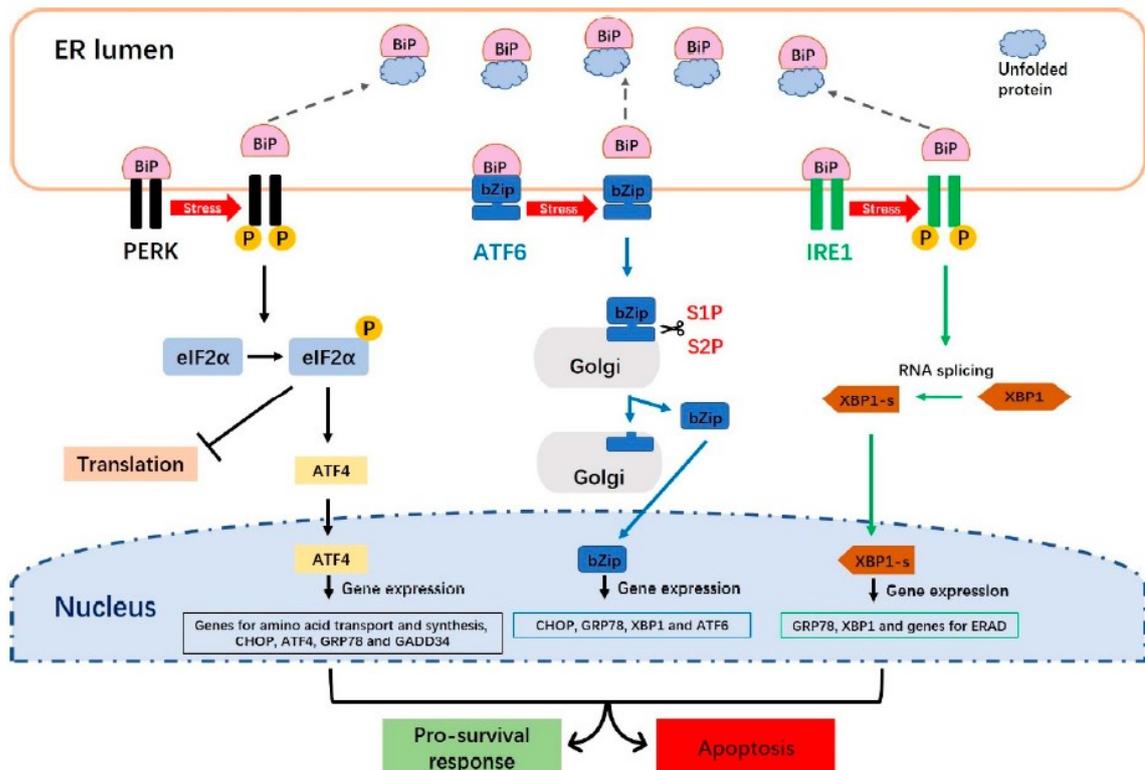


Figura 2. Vias de resposta a proteína mal dobrada (UPR). Lin *et al*, 2019.

O estresse de RE está presente em todas as fases da PIVE (ZHANG *et al.*, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que o ácido natural da bile ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), um promotor de proteases efetivamente reduz o estresse de RE e tem um efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário em diversas espécies (DICKS *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2016, 2019; SONG *et al.*, 2011). Diante destas evidências, agentes como a TUDCA e/ou outros sais que tenham potencial de interferir nas rotas de homeostase do RE podem ser utilizados com a finalidade de modular o estresse de RE durante a PIVE, melhorando a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Apesar de tais evidências, pouco ainda se sabe sobre as consequências moleculares do estresse de RE em períodos críticos do desenvolvimento embrionário inicial.

2.2.3 Tunicamicina

A *Tunicamicina* (TN) é um agente químico capaz de inibir a N-glicosilação, essencial para dobramento de proteínas, sendo geralmente utilizada para induzir estresse de RE em células no ambiente *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2011). A TN afeta negativamente a maturação do oócito e o desenvolvimento do embrião, promovendo o enovelamento incorreto da proteína no

RE e induz apoptose em camundongos, suínos, bovinos e búfalos (ALI et al., 2018; LIN et al., 2016; SHARMA et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

O estresse de RE induzido por TN geralmente tem uma influência negativa sobre o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, ao fazer uso de 5 µg/ml de TN no cultivo *in vitro* de embriões de camundongos, houve bloqueio completo no estágio de 2 células (ZHANG et al., 2012). Em embriões bovinos e suínos derivados de ativação partenogenética (AP) ou FIV quando expostos a 5 µg/ml de TN durante o cultivo *in vitro*, houve uma redução na taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (KIM et al., 2012; SHARMA et al., 2015; ZHANG et al., 2012). Em embriões suínos clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT), por outro lado, apenas 1 µg/ml TN foi suficiente para bloquear a capacidade dos embriões de se desenvolver até o estágio de blastocisto, sugerindo que embriões derivados de SCNT, que foram expostos a eletrofusão são mais sensíveis à TN e tem uma resposta aumentada ao estresse de RE quando comparados a embriões derivados da FIV (LIN et al., 2016).

2.2.4 Ácido tauroursodesoxicólico (TD)

O ácido tauroursodesoxicólico (TD) é resultado da conjugação da taurina com o ácido ursodesoxicólico (UDCA), um ácido biliar secundário endógeno, considerado uma chaperona química com atuação no RE, que tem se mostrado efetiva na expressão de transcritos relacionados ao estresse de RE e apoptose (KHATUN et al., 2020). Por ser secundário, em humanos, o UDCA é produzido exclusivamente pela microbiota intestinal, direcionado ao fígado pela circulação entero-hepática e então conjugado com a taurina, formando o TD (KUSACZUK, 2019). O TD faz parte de um grupo de pequenas moléculas comumente chamadas de “chaperonas químicas” que foram identificadas como atenuantes do estresse celular e atuam melhorando o processamento de proteínas (VEGA; AGELLON; MICHALAK, 2016).

É conhecido que o TD está envolvido no processo de modulação apoptótica, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, sobrevivência e proliferação celular. Isso é possível devido a maior afinidade do TD pelos receptores de membrana TGR5, S1PR2 e $\alpha 5\beta 1$. A ativação desses receptores gera uma cascata complexa de reações com ativação e/ou inibição de vias moleculares, como as ERKs (quinases reguladas por sinais extracelulares) e AKT (proteína quinase B) (ZANGEROLAMO et al., 2021). Seu uso na PIVE já está relatado na espécie suína (DICKS et al., 2021) em embriões provenientes de transferência nuclear de

células somáticas (SCNT) (LIN et al., 2016), no CIV de embriões bubalinos (SHARMA et al., 2015), embriões bovinos (YOON et al., 2014) seja para avaliação da criotolerância (KHATUN et al., 2020) ou para modular a via de sinalização do estresse oxidativo (PIOLTINE et al., 2021), em embriões de camundongos (ZHANG et al., 2012) levando a compreensão de como o estresse de RE pode prejudicar a gestação em mulheres (CAPATINA et al., 2021), e como a TD pode aliviar o estresse de RE e reduzir apoptose, ao suprimir parcialmente a UPR gerando benefícios ao desenvolvimento embrionário inicial (LIN et al., 2019).

O TD reduz a UPR tanto *in vitro* como *in vivo* (HETZ; CHEVET; HARDING, 2013), e restaura a homeostase da glicose num modelo de diabetes tipo 2 (ÖZCAN et al., 2006), protege contra lesão e inflamação hepática (BEN MOSBAH et al., 2010), e é capaz de prevenir a fibrose cardíaca. A identificação generalizada do TD como “chaperona química” parece inadequada, considerando que ambas as substâncias não têm atividade de chaperonas diretamente em proteínas mal dobradas. Os mecanismos de ação destes compostos são provavelmente indiretos em termos de atividade de acompanhamento. Em vez disso, há um crescente corpo de evidências indicando que o TD modula a sinalização dos componentes da resposta de enfrentamento da UPR, promovendo o dobramento de proteínas e a proteostase, ativando programas transcricionais que levam ao aumento da expressão de genes, ou regulando a homeostase de Ca^{2+} do RE, que pode aumentar a atividade de moléculas ou enzimas de dobramento no RE, aumentando assim a capacidade de dobramento do RE (VEGA; AGELLON; MICHALAK, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos do estresse de reticulo endoplasmático em diferentes fases do desenvolvimento embrionário *in vitro* na espécie bovina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um modelo de indução de estresse de Reticulo Endoplasmático em embriões bovinos produzidos *in vitro*;
- Avaliar os efeitos do estresse de RE sobre a taxa de desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões produzidos;

- Determinar em qual período do desenvolvimento a indução do estresse de RE é mais prejudicial ao embrião;
- Avaliar os efeitos do estresse de RE sobre a expressão gênica em fases críticas do desenvolvimento embrionário inicial;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Todos os produtos químicos utilizados foram adquiridos da Empresa Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, salvo indicação em contrário no texto. Ovários bovinos obtidos em frigorífico foram transportados ao laboratório em solução de NaCl a 0,9 % em temperatura ambiente. Os oócitos foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro, por meio de bomba de vácuo com pressão de aspiração regulada para aspirar de 6 a 7 ml de água em 30 segundos, acoplada a tubos plásticos de 15 ml com agulhas de 40 x 1,20 mm. Após a recuperação e seleção, os oócitos foram transferidos para placas com 4 poços contendo 400µl de meio de maturação, constituído de TCM199 suplementado com 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 5,0 mg/ml de LH, 0,5 mg/ml de FSH, 10% soro fetal bovino (SFB), 100 UI de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina. O cultivo foi realizado em estufa a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada durante 24 horas.

Após o período de maturação *in vitro*, os oócitos foram inseminados com sêmen congelado previamente testado para FIV, os espermatozoides com motilidade foram separados por gradiente de Percoll[®] (Cytiva), diluídos em uma concentração final de 1x10⁶ espermatozoides por ml em meio FERT-TALP contendo 10µg/ml de heparina, 30µg/ml de penicilamina, 15µM de hipotaurina e 1µg/ml de epinefrina (PARRISH *et al.*, 1988). A FIV foi realizada pelo co-cultivo de oócitos e espermatozoides por um período de 18 horas em placas de 4 poços nas mesmas condições atmosféricas e de temperatura descritas na MIV.

Após o período de FIV, os oócitos tiveram as células do *cumulus* removidas através do vórtex e, posteriormente, foram cultivados em meio semelhante ao oviduto (SOF) em atmosfera controlada (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂). Taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas às 48 h e 168 h após fecundação, respectivamente.

4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

Os embriões provenientes das rotinas de PIVE foram fixados por 15 min em paraformol 4% e transferidos para solução de PBS com 3,0% BSA. Após, foram realizadas 3 lavagens com PBS e os embriões foram transferidos para uma lâmina de vidro contendo uma gota de Mowiol com Hoechst 33342 (10µg/ml), tendo como excitação de fluorescência de 350 a 390 nm e emissão de fluorescência entre 440 a 460 nm. A lâmina foi montada e analisada em microscópio de epifluorescência BX53F (OLYMPUS, Tokyo, Japan). Todas as imagens foram analisadas utilizando o software Image J 1.33u (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA).

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

O RNA total foi extraído de “pools” de 7 a 10 embriões utilizando o Kit PicoPure Isolation Kit (Life Technologies) de acordo com as indicações do fabricante. O RNA extraído foi tratado com Dnase I (Qiagen) a 42°C por 30 minutos e, foi realizada a transcrição reversa utilizando a enzima SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante em termociclador Veriti (Applied Biosystems, California, USA) com parâmetros de ciclagem térmica de 10 minuto a 25°C, 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. A quantificação de transcritos específicos foi realizada por RT-qPCR usando SYBR GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA), e as reações foram realizadas utilizando o termociclador Stratagene MX3005P (San Diego, USA). Foi utilizado um protocolo padrão de amplificação no termociclador (1 ciclo de 10’ a 95°C, 40 ciclos de 30’’ a 95°C, 1’ a 60°C, 1’ a 72°C, 1 ciclo de 1’ a 95°C, 30’’ a 60°C, 30’’ a 95°C). Os iniciadores (*primers*) foram desenhados utilizando o programa Primer-Blast e a especificidade foi confirmada pelo BLAST (NCBI). Os genes alvo selecionados para avaliação do estresse de RE foram Glucose Regulated Protein 78 (GRP78), Activating Transcription Factor 6 (ATF6), Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1), X-box Binding Protein 1 – spliced (XBP1-s) e unspliced (XBP1-u), genes relacionados a pluripotência foram Octamer-binding Transcription Factor 4 (OCT4), SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2 (SOX2) e Homeobox Protein (NANOG), sendo usado como genes de referência Histone H2A.Z (H2AFZ), Ciclofilina A e Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Os primers (Tabela 1) foram previamente descritos para bovinos. Os dados de amplificação foram extraídos do aparelho Stratagene MX3005P, e cada amostra foi analisada através do software LinReg

PCR (UNTERGASSER et al., 2021) para correção da linha de base e determinação da eficiência do qPCR. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e foram expressas em relação à média geométrica dos genes de referência selecionados H2AFZ, Ciclofilina e GAPDH. Os dados foram normalizados para uma amostra de calibrador e valores relativos calculados com um método $\Delta\Delta C_t$ modificado que incorpora correção para amplificação de eficiência (PFAFFL, 2001).

Tabela 1. Primers utilizados para análise de expressão gênica e descrição das sequências de primers usados para amplificar cada gene.

Gene	Sequência (5' – 3')	Nº de referência
<i>Genes de estresse de ER</i>		
ATF6	F:AATGTGGGTTCTGATATTGCTGT R:TCTTCTTGCGGGACTGACAA	XM_024989876.1
GRP78	F:CGTGCGTTTGAGAGCTCAGT R:TAGGGCTTCGCAGGAAAACC	NM_001075148.1
PERK	F:CTCAGCTCTCCTAGTCCCGT R:ACATTTCCGTGGTCCATCCC	NM_001098086.1
IRE1	F:TTTTCTCTGCCGAAAGCCCT R:CAGGACCGAACTGCAGTGAT	XM_024980954.1
XBP1u	F:ACTCAGACTACGTGCACC R:TCCAAGTTGAACAGAATGCCC	NM_001034727.3
XBP1s	F:CTGAGTCCGCAGCAGGTG R:GGTCCTTCTGGGTCCACTTC	NM_001271738.1
<i>Genes de pluripotência</i>		
OCT4	F:GCAAATTAGCCACATCGCCC R:CGCCAGAGGAAAGGATACGG	NM_174580.3
SOX2	F:CTACAGCATGATGCAGGACCA R:CTGCGAGCTGGTCATAGAGT	NM_001105463.2
NANOG	F:GCAGAAAAACAACACTGGCCGA R:GTTACCAAACACCCCTGGT	NM_001025344.1
<i>Genes referência</i>		
H2AFZ	F:GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG R:TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	XM_002686087.4
GAPDH	F:GATTGTCAGCAATGCCTCCT	NM_001034034.2

	R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	
PPIB	F:GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	NM_174152.2
	R:TCCTTGATCACACGATGGAA	

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram coletados de réplicas contendo entre 35 a 45 oócitos, por grupo experimental. As análises de produção embrionária foram feitas por ANOVA seguida por teste Tukey para comparação múltipla entre médias de grupos. Para checar a normalidade dos dados foi empregado teste Shapiro-Wilk e normalizados quando necessário. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico RStudio versão 4.1.1 (RStudio Team, 2021). Foi utilizada a transformação de Box-Cox quando os dados de expressão gênica não atenderam as suposições de normalidade, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e/ou da homogeneidade da variância, testada pelo teste de Bartlett. As diferenças na expressão gênica entre os tratamentos dentro dos tempos foram avaliadas em um esquema duplo-fatorial com o pacote “ExpDes.pt” versão 1.2.1 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014). Em caso de efeitos significativos no modelo ($p < 0,05$), as comparações entre as médias foram realizadas usando o método das médias dos mínimos quadrados com teste Tukey-Kramer HSD para ajuste de comparações múltiplas através do pacote “emmeans” versão 1.8.4-1 (LENTH et al., 2023). Todos os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (S.E.M.) de repetições independentes.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 EXPERIMENTO 1: Avaliação dose-resposta do tratamento com ácido *tauroursodesoxicólico* (TD) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* foram tratados com TD nas doses de 25, 50, e 100 μ M durante o CIV e comparados com grupo controle com objetivo de determinar os efeitos da inibição do estresse de RE sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A partir desse experimento foi determinada a dose posteriormente utilizada no experimento 4. Foram avaliadas taxas de clivagem 48 horas pós-inseminação (*hpi*), e blastocistos foi às 168 *hpi*. Os

embriões no dia 7 de desenvolvimento foram fixados e corados para realização de contagem de células.

5.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação dose-resposta do tratamento com *tunicamicina* (TM) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* foram tratados com TM nas doses de 0,1, 1 e 10 ng/ml durante o CIV e comparados com grupo controle com objetivo de determinar os efeitos da indução do estresse de RE sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A partir desse experimento foi determinada a dose utilizada nos experimentos subsequentes. Foram avaliadas taxas de clivagem 48 horas pós-inseminação (*hpi*), e blastocistos às 168 *hpi*. Os embriões no dia 7 de desenvolvimento foram fixados e corados para realização de contagem de células.

5.3 EXPERIMENTO 3: Efeito da indução de estresse de RE em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* foram tratados com 1 ng/ml de TM, dose determinada no experimento 2, durante o CIV, os tratamentos foram realizados de acordo com os seguintes grupos:

- Controle: sem tratamento;
- TM D 1-3: embriões tratados com TM entre os dias 1 ao 3 do CIV;
- TM D 3-5: embriões tratados com TM entre os dias 3 ao 5 do CIV;
- TM D 5-7: embriões tratados com TM entre os dias 5 ao 7 do CIV;

Foram avaliadas taxas de clivagem 48 horas pós-inseminação (*hpi*), e blastocistos às 168 *hpi*. Os embriões no dia 7 de desenvolvimento foram fixados e corados para realização de contagem de células.

5.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da reversão do estresse de RE induzido pela TN durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* foram tratados com 1 ng/ml de TN, dose determinada no experimento 2, e TD (100µM) de acordo com os seguintes grupos experimentais:

- Controle: sem tratamento;
- TM 1-7: embriões tratados com 1 ng/ml de TM, do dia 1 ao 7 do CIV;
- TM + TD 1-7: embriões tratados com a associação de 1 ng/ml de TM e 100 μ M de TD do dia 1 ao dia 7;
- TM 3-5: embriões tratados com 1 ng/ml de TM, do dia 3 ao dia 5 do CIV, período determinado no experimento 3;
- TM + TD 3-5: embriões tratados com a associação de 1 ng/ml de TM e 100 μ M de TD, do dia 3 ao dia 5 do CIV, período determinado no experimento 3;

Foram avaliadas taxas de clivagem às 48 *hpi*, e blastocistos às 168 *hpi*. Os embriões avaliados no dia 7 de desenvolvimento foram fixados e corados para contagem de células embrionárias.

5.5 EXPERIMENTO 5: Efeito do estresse de RE sobre a expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Neste experimento foram utilizados os mesmos grupos experimentais descritos no experimento 4. Embriões produzidos *in vitro* foram coletados no dia 7 do CIV para a análises de expressão gênica. Foram avaliados genes relacionados ao estresse de RE (GRP78, ATF6, PERK, IRE1, XBP1-u, XBP1-s) e genes de pluripotência (OCT4, SOX2, NANOG).

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DOSE-REPOSTA DO TRATAMENTO COM TUDCA (TD) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Inicialmente os zigotos foram cultivados em meio CIV suplementado com TD, um agente inibidor de estresse de RE nas doses de 25, 50 e 100 μM . A produção embrionária *in vitro* foi determinada através da taxa de clivagem e de blastocistos, além da contagem de células dos embriões, com objetivo de avaliar qualidade embrionária. A maior taxa de clivagem foi observada no grupo tratado com TD na dose 100 μM (Tabela 2), contudo não diferiu estatisticamente do grupo controle, TD na dose 25 μM e TD na dose 50 μM . A taxa de blastocistos com o tratamento de TD na dose 100 μM , mas não foi significativamente maior que o grupo controle e os tratamentos com TD na dose 25 μM e TD na dose 50 μM . O número médio de células dos embriões tratados com TD na dose de 50 μM não diferiu estatisticamente da média do grupo tratado com 100 μM , contudo, a média do número de células dos embriões de ambos os grupos foi maior que a dos embriões do grupo controle e do grupo tratado com 25 μM ($P < 0,05$, Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Efeito da suplementação com TD em diferentes concentrações durante o período de CIV. Taxas de clivagem e Blastocistos foram avaliadas às 48h e 168h pós-fecundação, respectivamente. TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: cultivo embrionário *in vitro*; n: número. Os dados são a média \pm EP de cinco réplicas. Valores com sobrescritos diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

TD (μM)	Embriões cultivados (n)	Embriões clivados n (%)	Blastocistos n (%)	Células por blastocisto (n)
0 (Controle)	119	108 (90.7 \pm 3.0)	61 (51.0 \pm 3.6)	99.3 \pm 6.1 ^b
25	124	107 (86.5 \pm 4.9)	56 (45.3 \pm 4.2)	96.3 \pm 5.9 ^b
50	116	102 (87.9 \pm 1.0)	50 (42.9 \pm 5.7)	129.8 \pm 9.1 ^a
100	121	112 (91.9 \pm 1.6)	63 (51.9 \pm 3.7)	119.5 \pm 5.1 ^a

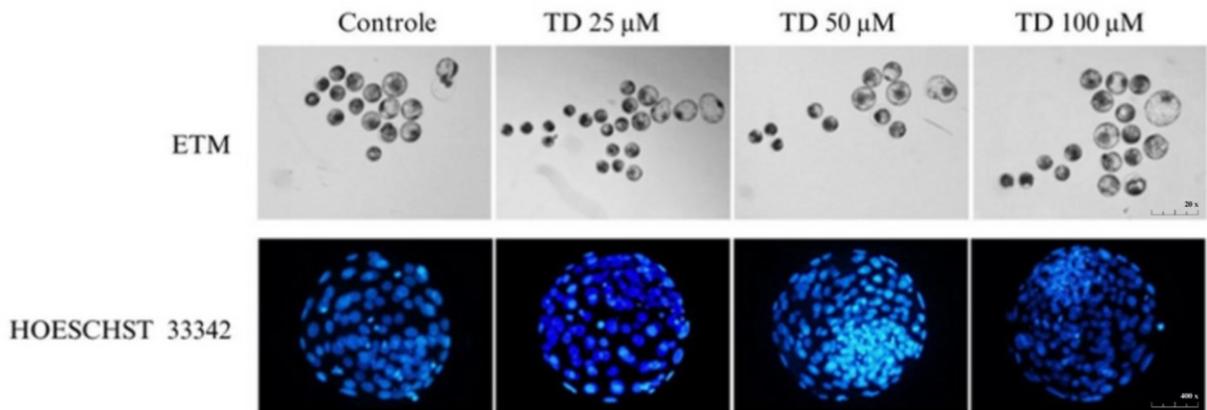


Figura 3. Embriões bovinos tratados no período de CIV com TD nas doses de 25, 50 e 100 μM . Os embriões foram corados em hoeschst 33342 e tiveram suas células contadas de forma individual. Imagens dos blastocistos em ETM no D7 do CIV e corados. TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: cultivo embrionário *in vitro*; ETM: estereomicroscópio.

6.2 AVALIAÇÃO DOSE-REPOSTA DO TRATAMENTO COM TUNICAMICINA (TN) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

No presente experimento foi avaliado o efeito dose resposta do tratamento com TN, agente químico indutor de estresse de RE nas doses de 0,1, 1 e 10 ng/ml. Não houve diferença na taxa de clivagem entre os grupos tratados com TN nas doses de 0,1 ng/ml ($86,7 \pm 3,3\%$; Figura 4A), 1 ng/ml ($83,9 \pm 1,3\%$) e 10 ng/ml ($80,2 \pm 4,1\%$) e grupo controle ($83,4 \pm 3,8\%$). O tratamento com TN nas doses de 1 ng/ml e 10,0 ng/ml reduziu de forma significativa ($P < 0,05$) o número de blastocistos ($27,8 \pm 3,8\%$; $12,6 \pm 1,6\%$), quando comparado com grupo controle ($39,7 \pm 3,9\%$), já o grupo tratado com TN na dose de 0,1 ng/ml ($32,3 \pm 3,9\%$) não diferiu do grupo controle e do grupo tratado com TN na dose de 1 ng/ml (Figura 4B). Os embriões tratados com TN nas doses 1,0 ng/ml ($77,8 \pm 6,9$; $P < 0,05$) e 10,0 ng/ml ($64,5 \pm 4,5$) apresentaram menor média de células nos blastocistos produzidos, quando comparados ao grupo controle ($116,2 \pm 5,9$), que por sua vez não diferiu estatisticamente do grupo tratado com TN na dose 0,1 ng/ml ($94,5 \pm 5,8$) (Figura 4C e D).

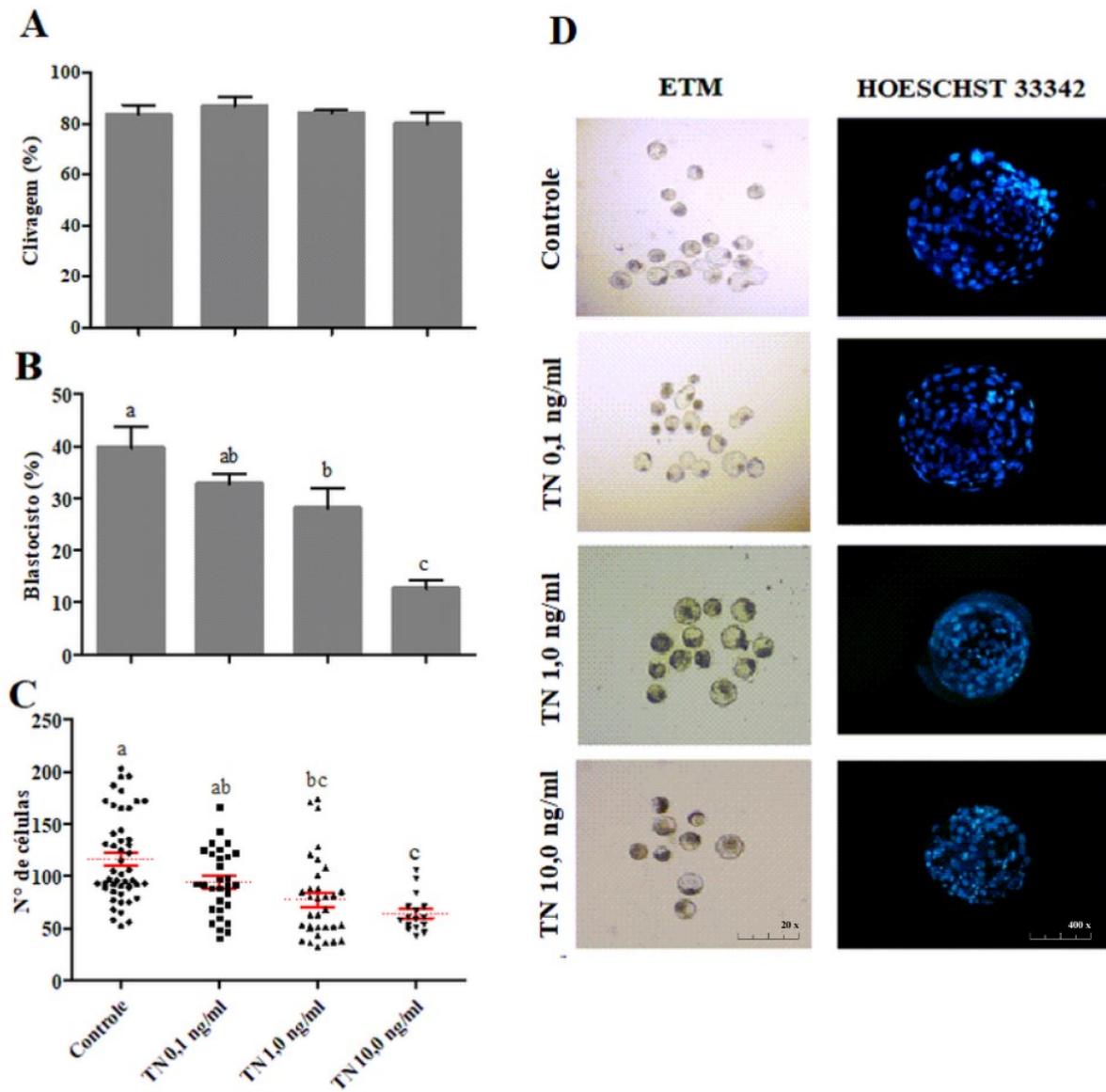


Figura 4. Efeito da suplementação de TN em diferentes concentrações durante o período de CIV. Taxas de clivagem (A) e blastocistos (B) às 48h e 168h pós-fecundação, e número de células embrionárias (C). Imagens representativas dos blastocistos no D7 do CIV e co corados (D). TN: Tunicamicina; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: estereomicroscópio. Os dados são a média \pm EP de cinco réplicas, e letras diferentes denotam diferenças significativas ($P < 0,05$).

6.3 EFEITO DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RE EM DIFERENTES MOMENTOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

O presente experimento teve por objetivo avaliar o efeito da indução do estresse de RE em diferentes momentos do cultivo embrionário, correspondendo aos períodos anterior (dias 1 ao 3), durante (dias 3 ao 5) e posterior (dias 5 ao 7) à ativação do genoma embrionário na espécie bovina. De maneira que os embriões ficaram sob estresse induzido pela TN durante um mesmo intervalo de tempo (48h). A dose utilizada de TN foi determinada com base no experimento anterior, onde se observou que a dose de 1 ng/ml foi capaz de induzir estresse de RE nos embriões reduzindo a taxa de blastocitos e o número de células, a um nível que possibilitou as avaliações seguintes.

Não houve diferença estatística nas taxas de clivagem (Figura 5A) entre os grupos controle ($73,7\% \pm 4,1$), TN D 1-3 ($78,2\% \pm 5,6$), TN D 3-5 ($75,1\% \pm 3,5$) e TN D 5-7 ($71,2\% \pm 2,6$). As taxas de blastocitos dos grupos D 3-5 e D 5-7 ($24,2\% \pm 1,4$, $26,2\% \pm 3,2$) foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) que as do grupo controle ($34,2\% \pm 3,4$), já o grupo D 1-3 ($28,4\% \pm 3,4$) foi igual estatisticamente aos grupos controle e aos grupos D 3-5 e D 5-7 (Figura 5. B). Quanto ao número de células, não houve diferença estatística entre os grupos controle ($10,2 \pm 0,3$), D 1-3 ($9,88 \pm 0,4$), D 3-5 ($9,4 \pm 0,1$) e D 5-7 ($10,1 \pm 0,3$; Figura 5. C e D).

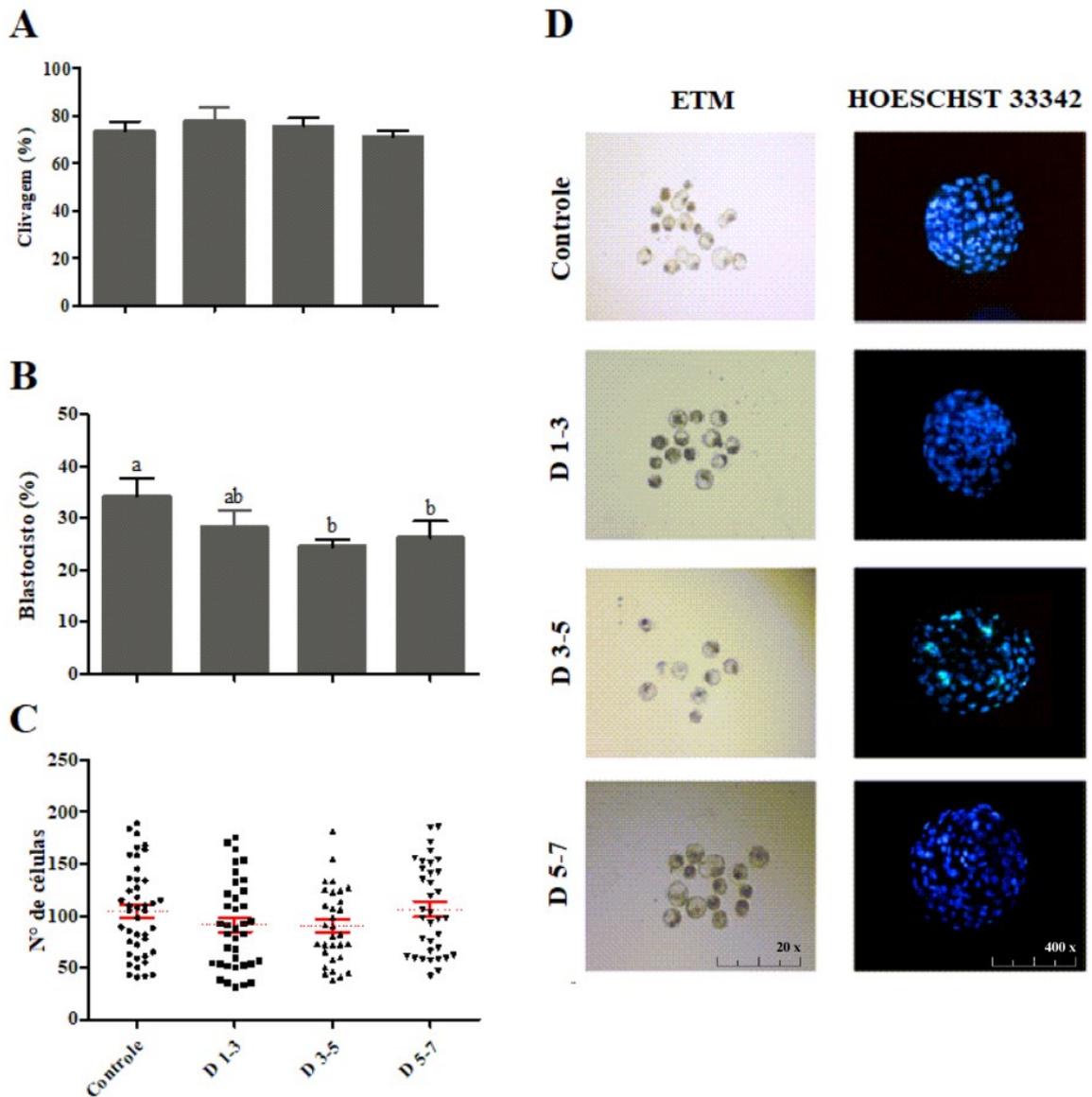


Figura 5. Efeito da indução de estresse de RE em diferentes momentos do CIV. Embriões tratados com TN na dose de 1,0 ng/ml, nos dias 1-3, 3-5 e 5-7 de CIV. Foram avaliadas taxas de clivagem (A), blastocistos (B) e número de células embrionárias (C). Imagens dos blastocistos em ETN no D7 do CIV e corados (D). TN: Tunicamicina; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: Estereomicroscópio. Os valores são a média \pm EP de quatro réplicas, e letras diferentes denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

6.4 AVALIAÇÃO DA REVERSÃO DO ESTRESSE DE RE INDUZIDO PELA TN DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*.

Com a finalidade de comprovar a especificidade do efeito observado nos tratamentos com TN, foi realizada a reversão do efeito com associação de TD na dose de 100 μ M conforme determinado no primeiro experimento. Foram realizados tratamentos com TN de forma isolada ou em associação com a TD durante todo o CIV (TN e TN+TD 1-7) e durante o período correspondente à ativação do genoma (TN e TN+TD 3-5) comparados entre si, juntamente como grupo controle sem tratamento.

As taxas de clivagem não foram significativamente diferentes entre os grupos controle (83,7% \pm 2,9), TN 1-7 (74,7% \pm 3,7), TN + TD 1-7 (77,2% \pm 3,7), TN 3-5 (77,6% \pm 2,3) e TN + TD 3-5 (76,1% \pm 3,7; Figura 6A). A taxa de blastocistos diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) nos grupos tratados TN 1-7 (22,2% \pm 4,5) comparado ao grupo controle (32,6% \pm 2,4), o grupo TN + TD 3-5 (32,8% \pm 2,7) foi igual ao grupo controle, no entanto os grupos TN + TD 1-7 (30,2% \pm 4,3) e TN 3-5 (27,8% \pm 3,0) se apresentaram iguais ao grupo controle e grupo TN 1-7. O número de células embrionárias foi estatisticamente diferente entre o grupo TN 3-5 (80,1 \pm 4,7) quando comparado ao controle (119,0 \pm 6,5), o grupo TN 1-7 (88,6 \pm 8,4) se mostrou igual ao grupo TN + TD 1-7 (112,0 \pm 4,3) e grupo TN 3-5, já o grupo TN +TD 3-5 (80,1 \pm 4,7) é igual estatisticamente aos grupos controle, e o grupo TN + TD 1-7 além de ser igual ao TN 1-7 é igual ao grupo controle.

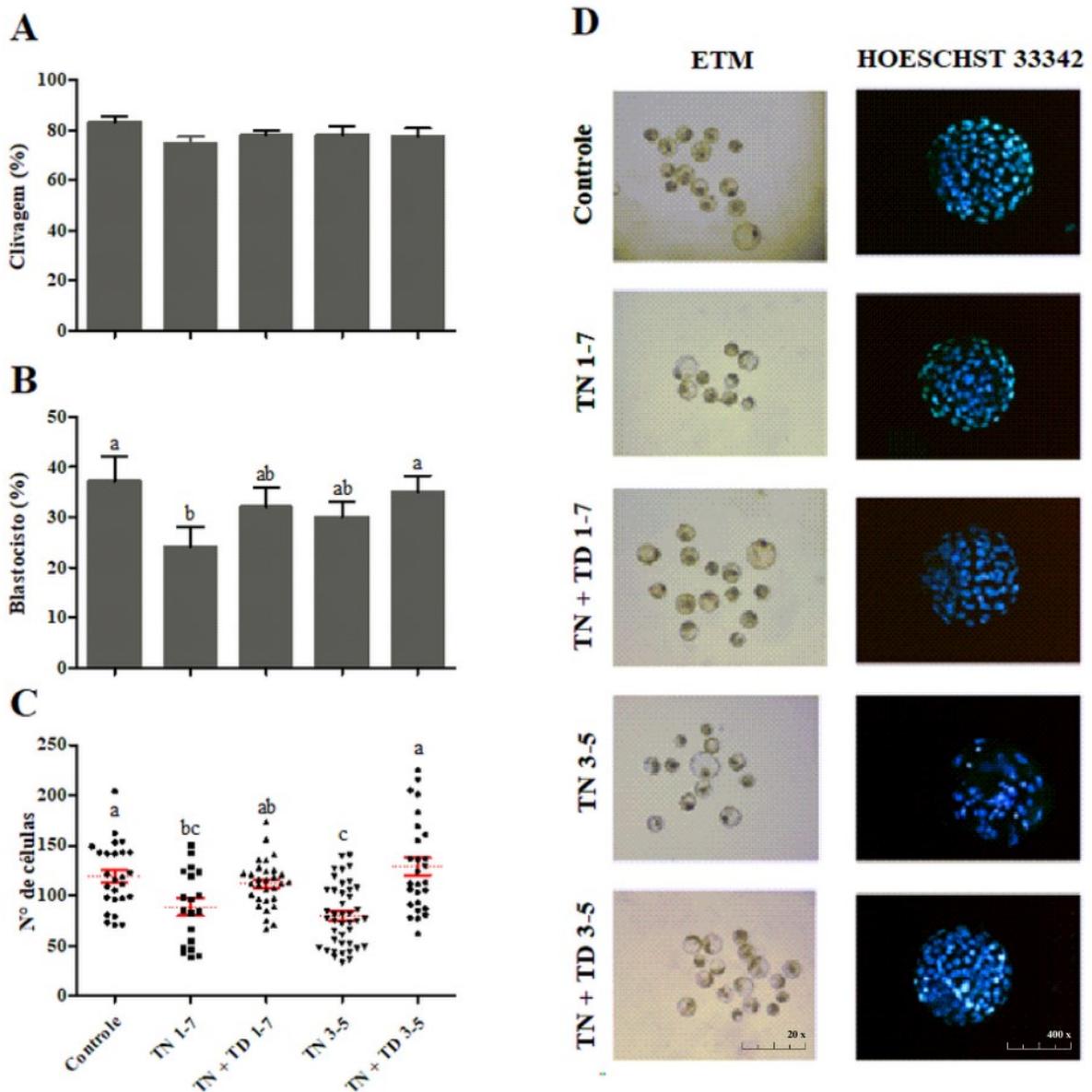


Figura 6. Avaliação da reversão do estresse de RE induzido pela TN durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Foram avaliadas taxas de clivagem (A) e blastocistos (B) às 48h e 168h pós-fecundação, respectivamente, e o número de células embrionárias (C). Imagens do blastocistos no D7 do CIV e corados (D). TN: Tunicamicina; TD: ácido tauroursodesoxicólico; CIV: Cultivo embrionário *in vitro*; EP: Erro padrão; ETM: esteriomicroscópio. Os valores são a média \pm EP de seis réplicas, e letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

6.5 EFEITO DO ESTRESSE DE RE SOBRE A EXPRESSÃO GENICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDO *IN VITRO*

Com objetivo de avaliar o efeito do estresse de RE sob a expressão gênica, de embriões bovinos durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, os embriões foram coletados no dia 7

do CIV dos grupos experimentais descrito no experimento 4. Os genes alvo para estresse de RE avaliados no presente experimento foram GRP78, ATF6, PERK, IRE1, XBP1-u, XBP1-s, os resultados obtidos demonstram que houve expressão destes genes, no entanto, pela avaliação estatística, comparando os grupos tratados com o grupo controle não houve diferença significativa (Figura 7). Buscando compreender os efeitos do estresse de RE sob a pluripotência de embriões bovinos, foi avaliada a expressão dos genes OCT4, SOX2, NANOG, por meio deste estudo se comprova a expressão de tais genes, no entanto, os resultados observados não foram diferentes estatisticamente (Figura 8).

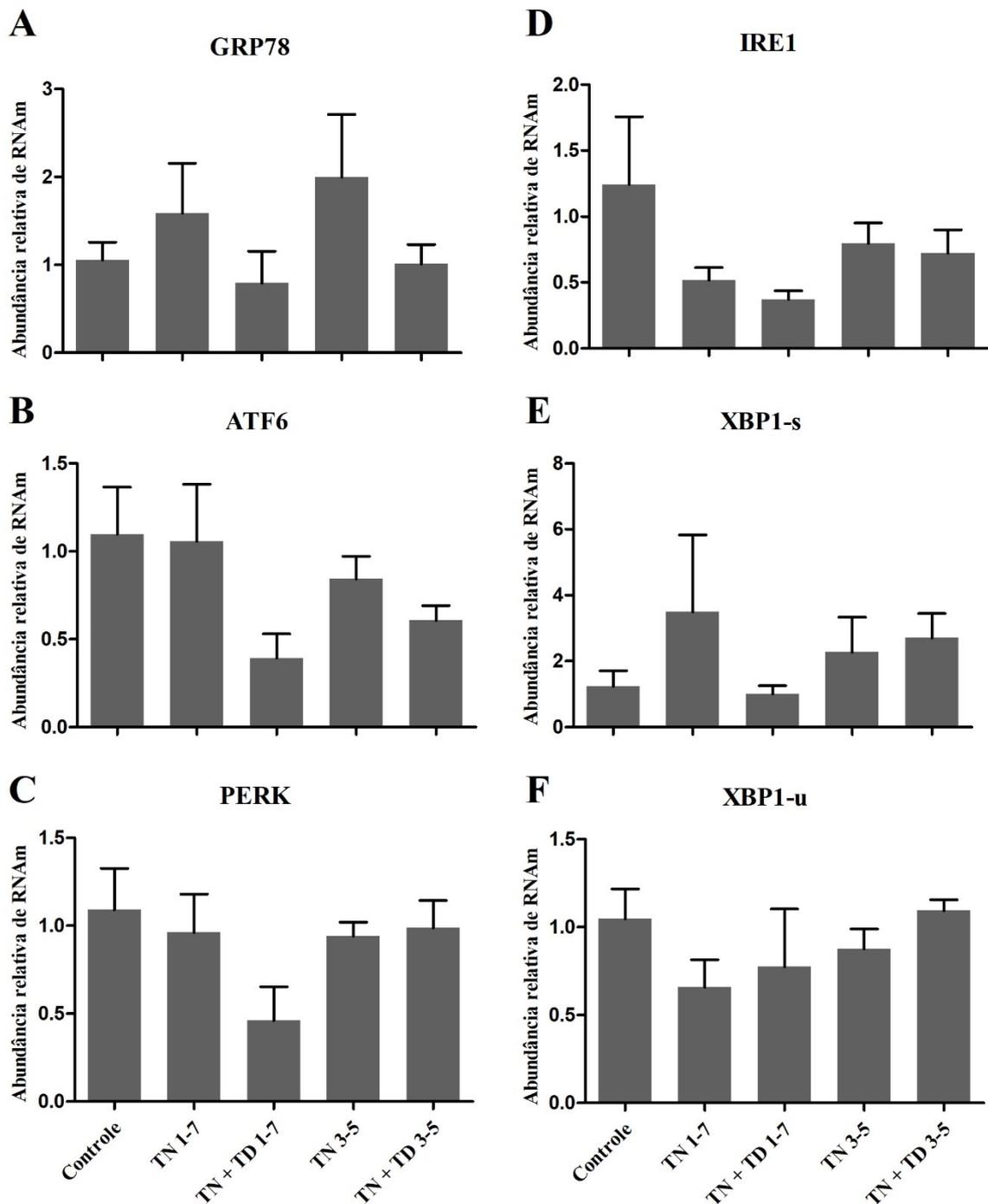


Figura 7. Expressão genica relativa dos genes relacionados com ativação da UPR: Glucose Regulated Protein 78 (GRP78) (A), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (B), Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) (C), Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) (D), X-box Binding Protein 1 – spliced (XBP1-s) (E) e unspliced (XBP1-u) (F). Resultados obtidos através de cinco réplicas independentes.

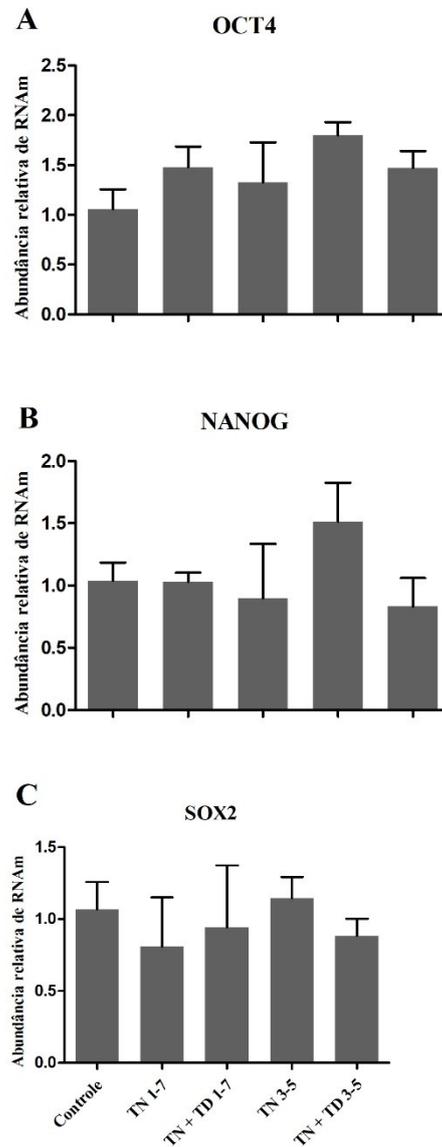


Figura 8. Expressão genica relativa dos genes de pluripotência embrionária: Octamer-binding Transcription Factor 4 (OCT4) (A), Homeobox Protein (NANOG) (B) e SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2 (SOX2) (C). Resultados obtidos através de cinco réplicas independentes.

7 DICUSSÃO

Diversos estudos demonstram a relevância de mecanismos homeostáticos desde a formação dos gametas, que se inicia na vida fetal, até a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. Tais fases do desenvolvimento são de especial importância pois são alvos de técnicas da reprodução, por essa razão estudos acerca de mecanismos celulares são essenciais para o entendimento da fisiologia reprodutiva proporcionando constante evolução das biotecnologias aplicadas à reprodução animal.

No presente estudo objetivou-se determinar os efeitos do estresse de RE em diferentes fases do desenvolvimento embrionário *in vitro* na espécie bovina. O estresse de RE é causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas e desdobradas devido a alteração na função do RE provocada na produção *in vitro* por fatores estressantes (KAUFMAN, 1999), como as espécies reativas a oxigênio (ROS) decorrentes de estresse oxidativo. Há evidências de que o estresse de RE leva à disfunção mitocondrial, comprometendo o desenvolvimento embrionário (KHATUN et al., 2020). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a TD funciona como uma chaperona química, visto que o estresse de RE é atenuado, prevenindo a disfunção da resposta à proteínas mal enoveladas e estabilizando as mitocôndrias (CHEN et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2007; VANG et al., 2014).

Khatun et al. (2020) descreve que o tratamento com 100 μ M de TD durante a maturação aumenta a taxa de clivagem e o desenvolvimento dos embriões. A adição de TD aumenta a taxa de blastocistos ao atenuar o estresse de RE durante o cultivo, promovendo uma melhora no desenvolvimento embrionário. YOON et al. (2014) descreve que a suplementação com TD no período de cultivo sob condições de 20% de O₂ promove o aumento do número total de células dos embriões. Ainda assim, a concentração de TD utilizada é decisiva para o aumento ou diminuição da competência de zigotos cultivados *in vitro* (PIOLTINE et al., 2021). Em nosso experimento dose-resposta, determinamos que as doses de 50 e 100 μ M de TD durante o período de CIV foi capaz de melhorar a qualidade dos embriões, determinada pelo aumento significativo no número de células embrionárias. Os resultados obtidos corroboram com trabalhos já publicados utilizando a TD ou outros sais que tenham potencial de interferir nas rotas de homeostase do RE.

A indução de estresse no cultivo *in vitro* de embriões vem sendo estudada a fim de compreender eventos relacionados a competência de desenvolvimento embrionário, vias de

ativação, e bloqueio do desenvolvimento embrionário (LIN et al., 2019), a nível molecular e epigenético (LEROY et al., 2015), embriopatias humanas (ERIKSSON; CEDERBERG; WENTZEL, 2003; MOLEY, 2001), disfunção da homeostasia energética e nutricional, relacionadas com hiperglicemia (*diabetes mellitus*), obesidade (DICKS et al., 2021) e câncer (DICKS et al., 2015). Doenças que impactam diretamente na qualidade de vida e sobre vida humana e animal.

A TN é um agente químico capaz de inibir a N-glicosilação de proteínas e potencialmente desencadear desvios de homeostase do RE, por esse motivo tem sido utilizada experimentalmente como um agente indutor de estresse de RE. Os efeitos da TN têm sido demonstrados em várias espécies, incluindo suínos, ratos e bubalinos. As doses de TN utilizadas para suínos variam de 0,1 a 5 µg/ml (KIM et al., 2012; LIN et al., 2016; PARK et al., 2018; ZHANG et al., 2012a), em ratos de 0,5 a 10 µg/ml (ALI et al., 2018; BASAR et al., 2014; ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2015) e em bubalinos, animais da mesma família dos bovinos, de 1 a 2 µg/ml suplementada no meio de cultivo embrionário *in vitro* (SHARMA, 2015). Em bovinos a indução de estresse de RE foi documentada na dose de 1 ng/ml (KATUN, 2019). Com base nos estudos citados foram utilizadas as doses de 0,1 ng/ml, 1 ng/ml e 10 ng/ml de TN durante o CIV.

Os dados obtidos permitem inferir que a TN não interfere na taxa de clivagem de embriões bovinos, mas prejudica a taxa de formação de blastocistos e qualidade embrionária (Figura 4 – A, B e C), a partir da dose de 1 ng/ml. Em conjunto, os dados do experimento 2 permitem afirmar que os tratamentos com TN não levam a alterações no padrão de clivagem, no entanto a dose de 10 ng/ml reduz de forma significativa a taxa de blastocitos e o número de células embrionárias, tornando essa dose não desejada em nossos estudos devido à baixa produção de embriões para avaliações subsequentes. Por outro lado, sugere-se que a dose de 1 ng/ml de TN pode ser capaz de induzir estresse de RE nos embriões reduzindo a taxa de blastocitos e o número de células, sendo escolhida para os experimentos subsequentes.

A ativação do genoma embrionário é um evento essencial para o desenvolvimento, e ocorre em diferentes momentos, quando avaliado em espécies distintas (DE SOUSA et al., 1998; SCHULTZ, 1993; TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990). Em bovinos tem início no 4º ciclo celular (LONERGAN et al., 2003), quando o embrião passa a ter 8 células, e pode se

considerar ativa até o estágio de 16 células (HYTTEL et al., 1996; PLANTE et al., 1994), quando ocorre a transição completa de síntese proteica a partir do RNAm materno para a transcrição proteica advinda do RNAm embrionário. O tempo para atingir o 4º ciclo celular observado *in vitro* em embriões bovinos é variado, e está relacionado com a taxa de insucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro* (DE SOUSA et al., 1998). Estudos recentes têm demonstrado que embriões bovinos de clivagem tardia interrompem seu desenvolvimento, em sua maioria, no estágio de 2 a 4 células (BARRETA et al., 2012).

Os fatores que controlam a cinética nessa fase inicial do desenvolvimento não foram totalmente esclarecidos, no entanto, estudos associam a cinética do desenvolvimento pré-implantacional com a competência embrionária (DINNYÉS et al., 1999; GRISART; MASSIP; DESSY, 1994; HOLM et al., 1998; LONERGAN et al., 1999; MEIRELLES et al., 2003). Os primeiros ciclos de divisão celular embrionária são possíveis porque há acúmulo de RNAm materno (DE SOUSA et al., 1998; SCHULTZ, 1993).

Os resultados do experimento 3 permitem inferir que a indução de estresse de RE tende a ter efeito negativo mais evidente durante e após a ativação do genoma embrionário. Durante a AGE, a maioria dos RNAs maternos são degradados e o embrião começa a transcrever seus próprios RNAs (BETTEGOWDA et al., 2006). A AGE engloba complexos eventos, que tem como exigência básica a síntese proteica. Ao iniciar a transcrição ativa de seus próprios genes, o embrião assume o controle da expressão gênica e inicia os processos necessários para seu desenvolvimento. A AGE está associada a ativação de vias específicas que governam a formação de diferentes tecidos e órgãos. Isso inclui, a expressão de genes envolvidos na formação de camadas germinativas, desenvolvimento neural, e outros processos cruciais. Além disso, a AGE está intimamente ligada ao estabelecimento da pluripotência, onde as células embrionárias adquirem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular do corpo (ECKERSLEY-MASLIN; ALDA-CATALINAS; REIK, 2018; NIAKAN et al., 2012; ZENG; SCHULTZ, 2005). Tais eventos ocorrendo de forma simultânea, tendem a explicar o efeito do estresse de RE observado ser mais pronunciado neste período.

Os dados do experimento 4 permitem afirmar que houve reversão parcial do estresse de RE quando realizada a associação de TN + TD durante todo período de cultivo, já no momento da ativação do genoma embrionário (D 3-5) a associação de TN + TD foi capaz de reverter o estresse de RE totalmente. Além disso, a TN é capaz de induzir o estresse de RE, e

prejudicar a qualidade embrionária de forma acentuada durante a AGE (Figura 6 C), com base na redução significativa do número de células no grupo TN 3-5. Ademais, os embriões são capazes de responder ao estresse de RE induzido durante todo o período de cultivo celular, já que houve redução na taxa de blastocistos, no grupo tratado com TN durante todo período de cultivo, no entanto o mesmo grupo não demonstra número de células inferior ao grupo teve associação de TN + TD no mesmo período (Figura 6. B e C).

Ao fazer uso da TD proporcionamos aos embriões possibilidade de modular o processo apoptótico, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, sobrevivência e proliferação celular, porque este ácido biliar conjugado tem maior afinidade pelos receptores de membrana TGR5, S1PR2 e $\alpha 5\beta 1$, que ao serem ativados geram uma cascata complexa de reações com ativação e/ou inibição de vias moleculares, como as ERKs e AKT (ZANGEROLAMO et al., 2021). Estudos com cultivo embrionário *in vitro* de camundongos (ZHANG et al., 2012) tem demonstrado como o estresse de RE pode prejudicar a gestação em mulheres (CAPATINA et al., 2021), e como a TD pode aliviar o estresse de RE e reduzir apoptose, ao suprimir a UPR gerando benefícios ao desenvolvimento embrionário inicial (LIN et al., 2019).

Com a finalidade de ampliar o entendimento acerca das consequências moleculares e mecanismos envolvidos na indução do estresse de RE pela TN, foi traçado um perfil de expressão de genes relacionados à UPR bem como fatores de pluripotência expressos predominantemente no estágio de blastocisto. Os genes avaliados (PERK, ATF6 e IRE1) são três proteínas transmembrana que sinalizam a ativação da UPR, juntamente com a proteína chaperona BiP (GRP78/BiP) (LATHAM, 2016; MICHALAK; GYE, 2015). Sob condições de estresse a endoribonuclease *IRE1* é ativada por dimerização e transfosforilação. Levando à remoção de um íntron de 26 nucleotídeos da forma do gene *XBPI* (*XBPI-u*) sem *splicing* alternativo para produzir a forma *XBPI spliced* (*XBPI-s*). *XBPI-s* move-se para o núcleo e induz genes responsivos a UPR (*GRP78 e XBPI*) (LIN et al., 2019). A ativação destas vias tem como objetivo a adaptação celular ao estresse de RE, restaura a homeostasia para consequente sobrevivência celular. No entanto, caso o estresse não seja aliviado a UPR ativa vias que promovem a morte celular por apoptose (FAITOVA et al., 2006; OLIVARES; HENKEL, 2015).

A XBP1 é considerada um mediador-chave da UPR, no controle da resposta adaptativa ao estresse de RE. Com o objetivo de determinar o papel da XBP1 hepática, foi realizado um estudo com camundongos, sendo feita a comparação da resposta ao estresse de RE em camundongos com exclusão hepática específica da XBP1 (*Xbp1^{LKO}*) com camundongos controle (*Xbp1^{f/f}*), os animais receberam injeções via intraperitoneal de TN nas doses de 0,5 ou 1,0 mg/kg, e foram sacrificados às 6, 24, 72 ou 168 horas pós-injeção. Após 24 horas, os camundongos *Xbp1^{f/f}* mostraram resposta completa da ativação da UPR e nenhum dano ao fígado, indicando adaptação bem-sucedida ao estresse. Ao contrário, os camundongos *Xbp1^{LKO}* mostraram ativação contínua da UPR associada a lesões progressivas no fígado, apoptose e, eventualmente, fibrose até o sétimo dia após a indução do estresse de RE. Tais dados indicam que o XBP1 hepático controla a resposta adaptativa da UPR e é crucial para restaurar a homeostase no fígado em resposta ao estresse no RE (OLIVARES; HENKEL, 2015).

Células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs), como as células-tronco embrionárias (ESCs) e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), possuem um programa bem orquestrado para diferenciação e auto renovação. No entanto, as características estruturais dos mecanismos únicos de manutenção da proteostase em hPSCs e suas características, distintas daquelas das células diferenciadas, em resposta ao estresse celular ainda não estão claras. Estudos recentes revelaram que, como as PSCs têm uma estrutura subdesenvolvida e expressam menos proteínas chaperonas BiP do que as células somáticas, elas são mais susceptíveis à apoptose induzida por estresse no RE (HA et al., 2020). Os fatores de transcrição de pluripotência OCT4, NANOG E SOX2 atuam de uma forma combinada e complexa, orquestrando a pluripotência de células tronco embrionárias e diferenciação celular (KASHYAP et al., 2009).

Diferentes doses de TN (1ng/ml e 5 ng/ml) foram adicionadas ao meio de cultivo embrionário de camundongos, e a dose de 5 ng/ml foi responsável por aumentar a fragmentação do DNA embrionário, este mesmo estudo comprovou que o XBP1 está presente no núcleo da célula embrionária, em condições normais de cultivo *in vitro*, e ao induzir estresse de RE, seja com TN ou sorbitol, há aumento de expressão de sua forma ativa (XBP1-s), após o estágio de uma célula embrionária. Além disso, a utilização de TD foi capaz de inibir o estresse de RE e apoptose nestes embriões de camundongos *in vitro* (ZHANG et al., 2012).

Em suínos foi descrito mecanismo da UPR e a função do XBP1, indicando que XBP1 desempenha papel importante durante o estresse de RE, como em outros sistemas animais, abrindo uma nova oportunidade para pesquisar a via UPR no sistema de modelo suíno (ZHANG et al., 2012). Nesta espécie, também foram abordados estudos voltados ao estresse de RE, com embriões SCNT, onde foi utilizado TN como indutor e TD como inibidor de estresse de RE, de forma separada por períodos distintos, e depois feita associação destas substâncias por 24h (2 µg/ml de TN e 200 µM de TD) durante o cultivo embrionário, constando a melhora no desenvolvimento de embriões SCNT ao inibir o estresse de RE (LIN et al., 2016). Durante a MIV, também foi observado que TN aumentou os marcadores para UPR (GRP78/BiP, ATF4, ATF6, XBP1-s, CHOP) e a melatonina melhorou a maturação dos oócitos, ao reduzir o estresse de RE *in vitro* (PARK et al., 2018). Em bubalinos, a TD na dose de 100 µM não foi capaz de melhorar taxa de desenvolvimento embrionário, mas atenuou os efeitos de estresse de RE, reduzindo a expressão de apoptose e de genes de estresse de RE (GRP78, GRP94) (SHARMA, 2015).

Embriões derivados na fertilização *in vitro* de humanos, bovinos e outras espécies de produção, tem menos de 50% de chances de estabelecer uma gestação (PARAMIO; IZQUIERDO, 2014; PONTES et al., 2009). As falhas no desenvolvimento são atribuídas a diversos fatores que incluem integridade genômica, defeitos genéticos e epigenéticos, fatores ambientais, desordens metabólicas e hormonais nos zigotos, embriões e/ou receptora (LEROY et al., 2015). O RE regula a qualidade, o enovelamento e a secreção de proteínas recém-sintetizadas. Em condições normais, as proteínas são transportadas para sua localização celular designada. Proteínas mal enoveladas ficam retidas no RE através de proteínas responsáveis pelo “controle de qualidade” até adquirir a conformação correta para ser secretada, caso contrário são direcionadas à ERAD. A indução severa de estresse de RE ou a persistência deste estresse, induz a ativação de vias de morte celular. As principais vias apoptóticas ativadas em resposta ao estresse do RE são a indução transcricional do gene *GADD153/CHOP*, a ativação da quinase JNK e a ativação de Caspase 12 (FAITOVA et al., 2006). O conjunto dessas informações reforça que a indução de estresse de RE no momento da AGE tende a ser mais prejudicial ao desenvolvimento embrionário, já que é nesse período que o embrião assume a transcrição de proteínas, fator fundamental para seu correto desenvolvimento.

O embrião deve ser classificado com base em características quantitativas (número de blastômeros e de células no TE e MCI) e qualitativas (tamanho dos blastômeros, se regulares ou irregulares; presença de fragmentação resultante da divisão celular anormal), principalmente no ambiente comercial onde se tem como objetivo a transferência ou criopreservação embrionária (BALABAN et al., 2011). Em nosso estudo utilizamos de taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número de células para caracterizar a produção embrionária *in vitro*, pois a competência de desenvolvimento embrionário inicial é totalmente atrelada a clivagem precoce, maior número de células no trofotoderma (TE) e na massa celular interna (ICM), isso favorece a implantação em locais melhor vascularizados, melhor placentação e melhor desenvolvimento fetal (WARNER; BRENNER, 2001), aumentando as chances de sobrevivência a termo, filhotes com maior peso ao nascer e maior peso ao desmame (FAIR et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo não demonstraram diferença significativa na expressão dos genes avaliados entre os grupos experimentais. Podemos inferir que no momento avaliado, no estágio de blastocisto, as estruturas que foram coletadas demonstraram um padrão de expressão gênica semelhante, apesar de ter havido diferença na taxa de desenvolvimento entre os grupos. Podemos especular que os próprios embriões (antes e após a AGE) tem capacidade de responder a fatores estressantes e aqueles que chegam ao estágio de blastocisto apresentam um padrão de expressão mRNA semelhante ao grupo controle. Além disso, a dose de 1ng/ml pode não ter sido suficiente para desencadear uma resposta observável em nível RNAm no dia 7 do desenvolvimento.

8 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, conclui-se que a indução de estresse de retículo endoplasmático (RE) durante o cultivo embrionário *in vitro* exerce impactos significativos no desenvolvimento inicial de embriões bovinos produzidos *in vitro*, por meio da redução notável na taxa de formação de blastocistos, assim como uma diminuição na qualidade dos embriões, evidenciada pela redução no número de células embrionárias. Também, constatou-se que o período crítico para a vulnerabilidade do embrião ao estresse de RE, induzido pela TN na dose de 1 ng/ml, ocorre tanto antes quanto após a ativação do genoma embrionário, sugerindo que a sensibilidade do embrião a fatores estressores do RE persiste ao longo de diferentes estádios de seu desenvolvimento. Reforçam ainda a importância de compreender os efeitos do estresse de RE durante o cultivo *in vitro* de embriões, visando otimizar as condições para um desenvolvimento embrionário saudável e, conseqüentemente, melhorar as técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

- 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals.** . [s.l: s.n.].
- ALI, I. et al. Reduced glutathione alleviates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in mouse preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 1, p. 15–24, 2018a.
- ALI, I. et al. Reduced glutathione alleviates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in mouse preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 1, p. 15–24, 2018b.
- ALVES, D. F. et al. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, 2003.
- ALVES, M. B. R.; CELEGHINI, E. C. C.; BELLEANNÉE, C. From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 21 ago. 2020.
- ANDRADE, G. A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 36, n. 1, p. 66–69, 2012.
- BALABAN, B. et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Human Reproduction**, v. 26, n. 6, p. 1270–1283, 1 jun. 2011.
- BASAR, M. et al. Unfolded protein response prevents blastocyst formation during preimplantation embryo development in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1777–1784, dez. 2014.
- BASTOS, G. M.; GONÇALVES, P. B. D.; BORDIGNON, V. Immunolocalization of the High-Mobility Group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 2, p. 282–290, 26 fev. 2008.
- BEN MOSBAH, I. et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 7, 2010.
- BERNECIC, N. C. et al. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. **Theriogenology**, v. 137, p. 56–66, out. 2019.

- BERTAGNOLLI, A. C. et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 488–496, ago. 2004.
- BETTEGOWDA, A. et al. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 267–278, mar. 2006.
- BLONDIN, P. et al. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1061–1075, abr. 1997.
- BRACKETT, B. G. et al. Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147–158, 1 ago. 1982.
- BREITBART, H. et al. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 2, p. 234–238, jan. 2010.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, abr. 2001.
- BREVINI, T. A. L. et al. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 510–517, 30 dez. 2002.
- BUENO, A. P.; BELTAN, M. P. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1–7, 2008.
- BYRNE, A. T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 97–105, 1 set. 1999.
- CAPATINA, N. et al. Excessive endoplasmic reticulum stress drives aberrant mouse trophoblast differentiation and placental development leading to pregnancy loss. **The Journal of Physiology**, v. 599, p. 4153–4181, 2021.
- CARNEIRO, G. F. et al. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 451–458, 29 dez. 2002.

- CHEN, Y. et al. Effect of Taurine-Conjugated Ursodeoxycholic Acid on Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Induced by Advanced Glycation End Products in Cultured Mouse Podocytes. **American Journal of Nephrology**, v. 28, n. 6, p. 1014–1022, 2008.
- CUI, L. et al. Sperm-borne microRNA-34c regulates maternal mRNA degradation and preimplantation embryonic development in mice. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 21, n. 1, p. 40, 26 abr. 2023.
- DACHEUX, J.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7–17, 27 maio 2003.
- DE ALMEIDA, S. F. et al. Chemical Chaperones Reduce Endoplasmic Reticulum Stress and Prevent Mutant HFE Aggregate Formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27905–27912, set. 2007.
- DE SOUSA, P. A. et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 115–128, jan. 1998.
- DICKS, N. et al. Endoplasmic Reticulum Stress, Genome Damage, and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 3 fev. 2015.
- DICKS, N. et al. Relief of endoplasmic reticulum stress enhances DNA damage repair and improves development of pre-implantation embryos. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187717, 3 nov. 2017.
- DICKS, N. et al. Tauroursodeoxycholic acid/TGR5 signaling promotes survival and early development of glucose-stressed porcine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 105, n. 1, p. 76–86, 1 jul. 2021.
- DINNYÉS, A. et al. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 3, p. 318–24, jul. 1999.
- DISKIN, M. G.; PARR, M. H.; MORRIS, D. G. **Embryo death in cattle: An update. Reproduction, Fertility and Development**, 2012.
- DOHERTY, A. J.; JACKSON, S. P. DNA repair: How Ku makes ends meet. **Current Biology**, v. 11, n. 22, p. R920–R924, nov. 2001.
- ECKERSLEY-MASLIN, M. A.; ALDA-CATALINAS, C.; REIK, W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 7, p. 436–450, 23 jul. 2018.

- ERIKSSON, U. J.; CEDERBERG, J.; WENTZEL, P. Congenital Malformations in Offspring of Diabetic Mothers—Animal and Human Studies. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 4, p. 79–93, 2003.
- FAIR, T. et al. Search for the Bovine Homolog of the Murine Ped Gene and Characterization of Its Messenger RNA Expression During Bovine Preimplantation Development1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 488–494, 1 fev. 2004.
- FAITOVA, J. et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 4, 2006.
- FAVETTA, L. A. et al. p66shc, but not p53, is involved in early arrest of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 6, p. 383–392, 2004.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, v. 05, n. 19, p. 2952–2958, 2014.
- FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, mar. 2009.
- GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. ESTADO DA ARTE DA FERTILIZAÇÃO IN VITRO EM BOVINOS. p. 223–230, 2004.
- GARDNER, D. K.; LANE, M.; WATSON, A. J. **Laboratory Guide to the Mammalian Embryo**. **Molecules**. [s.l.] Oxford University Press, 2004.
- GEISERT, R. D.; BAZER, F. W. In *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Em: **Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals**. [s.l.: s.n.]. p. 105–136.
- GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **The Journal of cell biology**, v. 78, n. 1, p. 58–75, 1 jul. 1978.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1. ed. Cambridge: University Press, 1994.
- GRISART, B.; MASSIP, A.; DESSY, F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **Reproduction**, v. 101, n. 2, p. 257–264, 1 jul. 1994.

- GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 441–448, 25 ago. 2004.
- HARPER, J. et al. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for ‘add-on’ interventions? **Human Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 485–491, mar. 2017.
- HA, T. W. et al. Characterization of Endoplasmic Reticulum (ER) in Human Pluripotent Stem Cells Revealed Increased Susceptibility to Cell Death upon ER Stress. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1078, 26 abr. 2020.
- HENRIQUE BARRETA, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 16, p. 2049–2058, out. 2012.
- HETZ, C.; CHEVET, E.; HARDING, H. P. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 9, p. 703–719, 30 set. 2013.
- HINTON, B. T. et al. Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. **Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 59–64, 1 jan. 1981.
- HOLM, P. et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285–1299, dez. 1998.
- HYTTEL, P. et al. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. **Reproduction**, v. 108, n. 2, p. 263–270, 1 nov. 1996.
- HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23–32, jan. 1997.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 38, p. 35–47, 1989.
- JAEKEN, J. Congenital disorders of glycosylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1214, n. 1, p. 190–198, 2010.
- KASHYAP, V. et al. Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 Pluripotency Transcription Factors With Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 7, p. 1093–1108, 1 set. 2009.

- KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes & Development**, v. 13, n. 10, p. 1211–1233, 15 maio 1999.
- KHATUN, H. et al. Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 142, p. 131–137, 15 jan. 2020.
- KIM, J.-S. et al. Tauroursodeoxycholic Acid Enhances the Pre-Implantation Embryo Development by Reducing Apoptosis in Pigs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 791–798, out. 2012.
- KUSACZUK, M. Tauroursodeoxycholate—bile acid with chaperoning activity: Molecular and cellular effects and therapeutic perspectives. **Cells**, v. 8, n. 12, 1 dez. 2019.
- LATHAM, K. E. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: a basis for intervention and improvement of outcomes. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 159–167, 7 jan. 2016.
- LATORRACA, L. B. **Respostas oocitárias ao estresse térmico**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2019.
- LAVOIR, M. C. Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 1, p. 204–213, 1 jul. 1997.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76–86, 1 jan. 1979.
- LENTH, R. V. et al. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. p. 1–101, 30 nov. 2023.
- LEROY, J. L. M. R. et al. Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical views on what we learned from the dairy cow model. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 4, p. 693, 2015.
- LIN, T. et al. Tauroursodeoxycholic acid improves pre-implantation development of porcine SCNT embryo by endoplasmic reticulum stress inhibition. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 4, p. 269–278, dez. 2016.
- LIN, T. et al. Endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR) in mammalian oocyte maturation and preimplantation embryo development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2 jan. 2019a.
- LIN, T. et al. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 409, 18 jan. 2019b.

- LISMER, A.; KIMMINS, S. Emerging evidence that the mammalian sperm epigenome serves as a template for embryo development. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 2142, 14 abr. 2023.
- LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 915–924, 18 maio 2008.
- LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1 set. 1999.
- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 6, p. 657–663, jan. 2003.
- MAGALHÃES, A. P. P. S. DE et al. Transferrin isoelectric focusing for the investigation of congenital disorders of glycosylation: analysis of a ten-year experience in a Brazilian center. **Jornal de Pediatria**, v. 96, n. 6, p. 710–716, 1 nov. 2020.
- MARKLOVÁ, E.; ALBAHRI, Z. **Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation**. **Clinica Chimica Acta**, out. 2007.
- MARSICO, T. V. et al. **Unraveling the Consequences of Oxygen Imbalance on Early Embryo Development: Exploring Mitigation Strategies**. **Animals** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2023.
- MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 57–68, 1 fev. 2000.
- MEIRELLES, F. V. et al. Genética e epigenética citoplasmática no desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 51–56, 2003.
- MEJÍA-FLORES, I. et al. During capacitation in bull spermatozoa, actin and PLC- ζ undergo dynamic interactions. **Zygote**, v. 25, n. 5, p. 558–566, 20 out. 2017.
- MICHALAK, M.; GYE, M. C. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 1, p. 1, 2015.
- MOLEY, K. H. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 78–82, mar. 2001.
- MOTLIK, J. et al. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 461–469, jan. 1998.

- NIAKAN, K. K. et al. Human pre-implantation embryo development. **Development**, v. 139, n. 5, p. 829–841, 1 mar. 2012.
- OLIVARES, S.; HENKEL, A. S. Hepatic Xbp1 Gene Deletion Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-induced Liver Injury and Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 50, p. 30142–30151, dez. 2015.
- ÖZCAN, U. et al. Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1137–1140, 25 ago. 2006.
- PARAMIO, M.; IZQUIERDO, D. Current Status of In Vitro Embryo Production in Sheep and Goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 37–48, 3 out. 2014.
- PARK, H. et al. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during in vitro maturation. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 2, 4 mar. 2018.
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169–1177, 1 abr. 2002.
- PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES; JOSÉ RICARDO DE FIGUEIREDO; BERNARDO GARZIERA GASPERIN. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal e Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–445, 1 maio 2001.
- PIKÓ, L. Synthesis of macromolecules in early mouse embryos cultured in vitro: RNA, DNA, and a polysaccharide component. **Developmental Biology**, v. 21, n. 1–2, p. 257–279, jan. 1970.
- PIOLTINE, E. M. et al. Treatment of in vitro-Matured Bovine Oocytes With Tauroursodeoxycholic Acid Modulates the Oxidative Stress Signaling Pathway. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 19 fev. 2021.
- PLANTE, L. et al. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, n. 4, p. 375–383, 4 dez. 1994.
- PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, mar. 2009.

- RAHMAN, M. S.; KWON, W.; PANG, M. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 749–759, 8 set. 2017.
- REN-JANG, L. **Maternal mRNA and the PolyA Tail in Oocytes**. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/maternal-mrna-and-the-polya-tail-in-14165611/>>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- RICHARD, F. J. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 22–28, 1 jan. 1996.
- RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 777–783, out. 2000.
- RISSI, V. B. et al. The histone lysine demethylase KDM7A is required for normal development and first cell lineage specification in porcine embryos. **Epigenetics**, v. 14, n. 11, p. 1088–1101, 2 nov. 2019.
- RStudio Team. (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC. <https://www.rstudio.com/>
- SCHULTZ, R. M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **BioEssays**, v. 15, n. 8, p. 531–538, 5 ago. 1993.
- SCHULTZ, R. M. et al. Reprogramming of Gene Expression During Preimplantation Development. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY (MOL DEV EVOL)**, v. 285, p. 276–282, 1999.
- SHARMA, A. et al. Supplementation of tauroursodeoxycholic acid during IVC did not enhance in vitro development and quality of buffalo IVF embryos but combated endoplasmic reticulum stress. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 200–207, jul. 2015.
- SHEN, X.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, n. 1–2, p. 79–92, set. 2004.
- SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 28–38, jan. 2015.
- SONG, B.-S. et al. Inactivated Sendai-virus-mediated fusion improves early development of cloned bovine embryos by avoiding endoplasmic-reticulum-stress-associated apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 6, p. 826, 2011.

- SOSA, C. M. et al. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 21, n. 3, p. 244–254, mar. 2015.
- TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, n. 1, p. 90–100, 4 maio 1990.
- THIBAULT, C.; SZÖLLÖSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 27, n. 5, p. 865–896, 1987.
- TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative Analysis of Protein Synthesis, Transcription and Cytoplasmic Polyadenylation of mRNA during Maturation of Bovine Oocytes in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 86–91, 29 abr. 2002.
- TOSHIMORI, K. Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. **Microscopy**, v. 60, n. suppl 1, p. S31–S42, 1 ago. 2011.
- TULSIANI, D. R. P. et al. Glycosylation of Rat Sperm Plasma Membrane during Epididymal Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 417–428, 1 fev. 1993.
- UNTERGASSER, A. et al. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 1 abr. 2005.
- VANG, S. et al. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 58–69, 1 maio 2014.
- VAUGHAN, D. A.; SAKKAS, D. Sperm selection methods in the 21st century. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 6, p. 1076–1082, 24 dez. 2019.
- VEGA, H.; AGELLON, L. B.; MICHALAK, M. The rise of proteostasis promoters. **IUBMB Life**, v. 68, n. 12, p. 943–954, dez. 2016.
- VERNON, R. B.; MULLER, C. H.; EDDY, E. M. Further Characterization of a Secreted Epididymal Glycoprotein in Mice that Binds to Sperm Tails. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 3, p. 123–128, 6 maio 1987.
- VIANA, J. H. M. **2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**. [s.l: s.n.].

- WARNER, C. M.; BRENNER, C. A. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 151–192.
- WATANABE, M. R. et al. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in nellore cows per session and in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 438, jan. 1999.
- WRENZYCKI, C. et al. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, n. 2, p. 23, 2005.
- YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 10, n. 2, p. 69–79, 17 jun. 2011.
- YANAGIMACHI, R. et al. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. **American Journal of Anatomy**, v. 172, n. 4, p. 317–330, 3 abr. 1985.
- YOON, S. BIN et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, 2014.
- ZANGEROLAMO, L. et al. **The bile acid TUDCA and neurodegenerative disorders: An overview**. **Life Sciences** Elsevier Inc., , 1 maio 2021.
- ZENG, F.; SCHULTZ, R. M. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. **Developmental Biology**, v. 283, n. 1, p. 40–57, jul. 2005.
- ZHANG, J. Y. et al. Functional characterization of the ER stress induced X-box-binding protein-1 (Xbp-1) in the porcine system. **BMC Molecular Biology**, v. 12, 24 maio 2011.
- ZHANG, J. Y. et al. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, 1 abr. 2012a.
- ZHANG, J. Y. et al. Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress Improves Mouse Embryo Development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40433, 13 jul. 2012b.
- ZHANG, J. Y. et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 13 jul. 2012c.
- ZHAO, N. et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 48–52, fev. 2015a.
- ZHAO, N. et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 48–52, fev. 2015b.