

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/02/2022.

ELISA MARIANO PIOLTINE

**USO DE TUDCA NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ETAPAS DA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Botucatu - SP
2020

ELISA MARIANO PIOLTINE

**USO DE TUDCA NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ETAPAS DA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Associado Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Botucatu - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pioltine, Elisa Mariano.

Uso de TUDCA na modulação do estresse do retículo endoplasmático em etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos / Elisa Mariano Pioltine. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Capes: 20700008

1. Embriões. 2. Técnicas *in vitro*. 3. Estresse do Retículo Endoplasmático. 4. Ácido Ursodesoxicólico. 5. Taurina.

Palavras-chave: Estresse do retículo endoplasmático;
Produção *in vitro* de embriões; TUDCA.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria do Carmo e José Renato, pela força, amizade e amor incondicional. Ao meu irmão, Eduardo, por ser meu exemplo de luta e coragem. Ao meu namorado, Marcelo, por cuidar de mim e dividir sonhos. Ao Prof. Marcelo, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos. Às minhas amigas e companheiras do laboratório, Camila, Carolzinha, Fernanda, Priscila, Sara e Thaisy, pela amizade companheirismo e ensinamentos durante esses anos. Aos colegas de laboratório FitoFarmaTec, por deixar os dias mais alegres. À Janete, por cuidar tão bem de nós e fazer os melhores chás. À Laís, pela positividade e por me ajudar nas análises. Às estagiárias que acompanharam e ajudaram na execução do experimento: Lara e Mariana. Ao meu quinteto amado da graduação, Yas, Xu, Yuka e Seu Ladir, pelo apoio mesmo com a distância. À minha irmã postiça que o laboratório me deu, Vitória, e toda sua família, por me receberem em Assis com tanto carinho. À minha amiga Jéssica, por estar sempre comigo, na alegria e na tristeza, em Botucatu. Ao meu amigo Eduardo, pela inspiração intelectual e parceria. Aos professores componentes da banca examinadora, pelos ensinamentos e contribuições na defesa. Ao Prof. Di Stasi, por estar sempre presente e acreditar em nós. À minha família de coração “Polizel Camilli”, por todo amor e incentivo. Em especial a Vó Cecília e Vô Toni, pelo exemplo de vida. À Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Farmacologia pela oportunidade de realizar o doutorado. A todos, que de alguma forma, contribuíram com incentivo, apoio e confiança para que esse trabalho se tornasse realidade e concluísse a realização de um sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Na vida, não vale tanto o que
temos, nem tanto importa o que
somos. Vale o que realizamos com
aquilo que possuímos e, acima de
tudo, importa o que fazemos de
nós.”*

Chico Xavier

RESUMO

Embora estágios iniciais de embriões de mamíferos tenham aparentemente uma grande plasticidade, eles, assim como o oócito em maturação, são bastante sensíveis a estresses exógenos. Responder a esses estresses é uma parte vital da fisiologia celular. Cada vez mais é aparente que um dos principais mecanismos, para iniciar a resposta celular a uma variedade de estressores exógenos, reside no retículo endoplasmático (RE). O RE é uma importante organela responsável pela síntese, processamento e transporte de proteínas e lipídeos. No entanto e *in vitro*, a perturbação do microambiente do RE pode causar alterações na estrutura das proteínas levando ao acúmulo de proteínas com o incorreto dobramento, uma condição denominada estresse do RE. Dependendo da intensidade do estresse, o RE pode desencadear a apoptose pela *Unfolded Protein Response*. Em várias espécies, estudos observaram uma melhoria da competência do oócito e no desenvolvimento do embrião quando foram adicionados inibidores do estresse do RE no meio de maturação e/ou meio de cultivo *in vitro* (CIV). Dentre os inibidores do estresse do RE, o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) se mostrou benéfico na produção *in vitro* de embriões. Entretanto, pouco é conhecido sobre o seu efeito na maturação oocitária e no desenvolvimento do embrião bovino *in vitro*. Portanto, os objetivos gerais desta Tese foram: Capítulo 1 - investigar o efeito da adição de TUDCA durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a competência do oócito e do embrião [maturação nuclear, atividade mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), formação de pro núcleo, formação de blastocisto e abundância de transcritos em oócitos e embriões] e Capítulo 2 - investigar o efeito da adição de TUDCA durante o CIV sobre a competência embrionária e a criotolerância do embrião (cinética de eclosão e abundância de transcritos de embriões antes e após a vitrificação). A adição de TUDCA na MIV não melhorou a competência oocitária. Entretanto, a adição de 200 μ M de TUDCA pareceu aliviar o estresse do RE reduzindo a produção de ERO no oócito e aumentando a abundância de transcritos relacionados positivamente com a defesa antioxidante do oócito e do embrião. Contrariamente, a adição de 1.000 μ M de TUDCA na MIV pareceu ser tóxica para o oócito e diminuiu a taxa de maturação nuclear bem como a atividade mitocondrial. Além disso, houve um aumento da abundância de transcritos pró-apoptóticos no oócito. Quando o TUDCA foi suplementado no CIV não houve melhora da competência embrionária. De forma semelhante que na MIV, a adição de 1.000 μ M de TUDCA no CIV pareceu ser tóxica para o embrião e diminuiu a taxas de blastocisto eclodido. De modo complementar, houve um aumento da abundância de transcritos relatados negativamente com o estresse do

RE, o estresse oxidativo, o metabolismo lipídico e a sobrevivência celular. Entretanto, a adição de 200 μ M de TUDCA no CIV pareceu aliviar o estresse do RE em embriões submetidos à vitrificação. Com isso, houve o aumento da taxa de embrião eclodido após o aquecimento. Além disso, nos blastocistos eclodidos pós-aquecimento foi observada uma redução da abundância de transcritos relacionados negativamente com o estresse do RE e um aumento daqueles relacionados positivamente com o mecanismo antioxidante e o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: TUDCA; Oócito; Blastocisto; Estresse do retículo endoplasmático; Vitrificação; Bovino.

ABSTRACT

Although early stages of mammalian embryos appear to retain great plasticity, they and maturing oocytes are quite sensitive to exogenous stresses. Responding to those stresses is a vital part of cellular physiology, and it is increasingly apparent that one of the main mechanisms for initiating that response is based on the endoplasmic reticulum (ER). ER is an important organelle responsible for the synthesis, processing, folding and transport of proteins and lipids. However, *in vitro*, the disturbance of the ER microenvironment can cause changes in the structure and folding of proteins leading to the accumulation of misfolding proteins, a condition called ER stress. Depending on the intensity of the stress, the ER can trigger apoptosis by Unfolded Protein Response. In several species, studies have reported an improvement in oocyte and embryo competence when ER stress inhibitors have been added to the *in vitro* maturation (IVM) medium and/or *in vitro* culture (IVC) medium. Among the ER stress inhibitors, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) has been shown to be beneficial in *in vitro* embryo production. However, little is known about TUDCA's effect on oocyte maturation and the development of bovine embryo *in vitro*. Therefore, the main objectives of this Thesis were: Chapter 1 - to investigate the effect of adding different TUDCA concentrations during IVM on the oocyte and embryo competence [nuclear maturation, mitochondrial activity, reactive oxygen species (ROS) production, pronuclei formation, blastocyst formation and transcripts abundance in oocytes and embryos]; and Chapter 2 – to investigate the effect of adding different TUDCA concentrations during IVC on embryo competence and embryo cryotolerance (hatching kinetics and transcripts abundance in embryo before and after the vitrification). The TUDCA addition to the IVM did not improve oocyte competence. However, the 200 μM of TUDCA appeared to relieve ER stress and reduced the ROS production in the oocyte. Concomitantly, there was an increasing of the transcripts abundance positively reported to the antioxidant defense in the oocyte and embryo. In contrast, the 1,000 μM of TUDCA appeared to be toxic to the oocyte by decreasing the nuclear maturation rate and mitochondrial activity in the oocyte. Moreover, there was an increasing of the pro-apoptotic transcripts' abundance in the oocyte. When TUDCA was supplemented in IVC there was no improvement in embryo competence. As in IVM, the 1,000 μM of TUDCA appeared to be toxic to the embryo - decreasing the hatched blastocyst rate and increasing the transcripts' abundance negatively reported in ER stress, oxidative stress, lipid metabolism and cell survival. However, the 200 μM of TUDCA addition in the CIV seemed to relieve ER stress in the embryos subjected to vitrification, increasing the

hatched embryo rate post-warming. In addition, in hatched blastocysts post-warming it was observed a reduction of the transcripts' abundance negatively reported to the ER stress and an increasing of those positively reported to the antioxidant mechanism and the embryo development.

Keywords: TUDCA; Oocyte; Blastocyst; Endoplasmic reticulum stress; Vitrification; Cattle.

SUMÁRIO

Preâmbulo

Introdução	12
Revisão da Literatura.....	14
O retículo endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular.....	14
O estresse do retículo endoplasmático na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	21
Ativação do estresse do retículo endoplasmático na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	23
O uso de ácido tauroursodesoxicólico para aliviar o estresse do retículo endoplasmático.....	24
Efeito da adição de ácido tauroursodesoxicólico na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	26
Vitrificação de embriões produzidos <i>in vitro</i> e seu efeito no metabolismo embrionário.....	28
Hipóteses.....	30
Objetivos.....	31

Capítulo 1 - Modulating the endoplasmic reticulum stress in *in vitro* maturation of bovine oocytes: Could tauroursodeoxycholic acid improve developmental competence?

Abstract.....	34
Introduction.....	34
Materials and Methods.....	36
Experimental Design.....	36
<i>In vitro</i> Maturation.....	39
<i>In vitro</i> Fertilization and Culture.....	39
Nuclear staining.....	40
Detection of reactive oxygen species and mitochondrial activity.....	41
Target-Transcripts Relative Quantitation: RT-qPCR.....	41
Statistical analysis.....	43
Results.....	44
The effect of TUDCA during IVM on oocyte nuclear maturation.....	44
The effect of TUDCA during IVM on oocyte ROS production.....	44
The effect of TUDCA during IVM on oocyte mitochondrial activity.....	44
The effect of TUDCA during IVM on the abundance of target-transcripts in oocytes.....	45
The effect of TUDCA during IVM on pronucleus formation in presumptive zygotes.....	45
The effect of TUDCA during IVM on developmental competence of embryos.....	45
The effect of TUDCA during IVM on transcript abundance of embryonic quality markers.....	46
Discussion and Conclusion.....	46
Acknowledgments.....	52
References.....	52

Capítulo 2 - Molecular and cellular effects of the inclusion of tauroursodeoxycholic acid in *in vitro* culture before to cryopreserve bovine blastocysts

Abstract.....	69
Introduction.....	69
Materials and Methods.....	72
<i>In vitro</i> Production.....	72
Chemical Treatment.....	73
Target-Transcripts Relative Quantitation: RT-qPCR.....	73
Vitrification of embryos.....	75
Warming and culture of cryopreserved embryos.....	76
Experimental Design.....	76
Statistical analysis.....	77
Results.....	78
The effects of TUDCA during IVC of bovine embryos.....	78
The effects of TUDCA during IVC on post-warmed vitrified blastocysts.....	79
Discussion and Conclusion.....	80
Acknowledgments.....	86
References.....	86

Considerações Finais

Conclusões Gerais.....	100
Resultados Suplementares.....	101
Referências Bibliográficas.....	102

PREÂMBULO

Esta Tese para o programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia se encontra dividida em quatro sessões principais. A primeira, denominada **“Introdução”**, descreve o contexto e a problemática relacionada com este trabalho de maneira mais profunda e detalhada. As duas partes subsequentes, Capítulo 1 - **“Modulating the endoplasmic reticulum stress in in vitro maturation of bovine oocytes: Could tauroursodeoxycholic acid improve developmental competence?”** e Capítulo 2 - **“Molecular and cellular effects of the inclusion of tauroursodeoxycholic acid in in vitro culture before to cryopreserve bovine blastocysts”**, correspondem a duas propostas de manuscritos a serem submetidos como artigos resultantes do trabalho efetuado. Finalizando, a sessão **“Considerações Finais”** compreende as conclusões gerais (descrevendo de forma sucinta os resultados obtidos) e os resultados suplementares não inseridos nos artigos.

Conforme normas do programa de Pós-graduação, o presente exemplar consiste na versão definitiva da tese a ser encaminhada à biblioteca e que comporá o conjunto de publicações do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP. Entretanto, os artigos científicos aqui apresentados estão no prelo, mas não comprometidos com a publicação em quaisquer periódicos, estando, portanto, passíveis de correções e modificações de amplo espectro, especialmente por parte da banca de defesa.

INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução em bovinos, especialmente as técnicas envolvendo a produção de embriões (*in vivo* e *in vitro*), constituem uma importante ferramenta para aumentar a eficiência da pecuária, proporcionando o aproveitamento racional de algumas áreas destinadas à bovinocultura e contribuindo para o melhoramento genético (Lopes *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2014).

Estudos na espécie bovina dos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), foram fundamentais para a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante a maturação oocitária, a capacitação espermática e a fertilização, além do início do desenvolvimento embrionário em estágios pré-implantacionais (Gonçalves *et al.*, 2008). Essa importância é demonstrada - nos registros da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) de 2017 - com o total de embriões produzidos *in vitro* (PIV) que ultrapassou aqueles derivados *in vivo* (992.289 vs. 406.287, respectivamente; Viana *et al.*, 2018).

Contudo, é de conhecimento que as condições *in vitro*, nas quais os oócitos e embriões são expostos, causam uma variedade de estresses celulares que contribuem para a perda da competência no desenvolvimento do embrião (Lane e Gardner *et al.*, 2005). Essas condições incluem tensão de cisalhamento durante o manuseio, temperatura, meio de cultura, pH alterado, alta tensão de O₂ e até incidência luminosa (Lane e Gardner, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2009). Como consequências, em gametas e embriões, ocorrem alterações na expressão de alguns genes, nos mecanismos epigenéticos, no metabolismo, na indução da apoptose e, finalmente, na redução do desenvolvimento e da viabilidade embrionária quando comparadas com os embriões derivados *in vivo* (Lane e Gardner, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Fong *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2009).

Responder ao estresse exógeno é uma parte vital da fisiologia celular. Está cada vez mais aparente que um dos principais mecanismos, para iniciar a resposta celular a uma variedade de estressores exógenos, reside no retículo endoplasmático (RE; Guzel *et al.*, 2017). O RE é uma importante organela responsável pela síntese, processamento e transporte de proteínas e lipídeos (Brodsky *et al.*, 2011). No entanto e *in vitro*, a perturbação do microambiente do RE pode causar alterações na estrutura das proteínas levando ao acúmulo de proteínas com o incorreto dobramento (Latham *et al.*, 2015), uma condição denominada estresse do RE (Tabas *et al.*, 2011). Para combater os efeitos deletérios do estresse do RE, as células desenvolveram várias estratégias, coletivamente conhecidas como resposta a proteínas malformadas ou UPR (*Unfolded Protein Response*). Inicialmente, a UPR restaura a homeostase do RE pelo aumento da produção de chaperonas moleculares envolvidas no dobramento de proteínas e pela degradação de proteínas malformadas (Hussain *et al.*, 2007). Entretanto, o acúmulo excessivo e prolongado de proteínas malformadas no lúmen do RE redireciona a UPR para ativar a sinalização apoptótica (Szegezdi *et al.*, 2006).

Para o correto desenvolvimento do oócito e do embrião, as proteínas devem ser dobradas adequadamente em sua formatação 3D. Assim, a regulação do estresse/homeostase do RE provavelmente é um mecanismo importante durante a PIVE (Zeng *et al.*, 2005; Lockwood *et al.*, 2017).

Em várias espécies, estudos observaram uma melhoria da competência do oócito e no desenvolvimento do embrião quando foram adicionados inibidores do estresse do RE no meio de maturação e/ou meio de cultivo *in vitro* (CIV), reforçando que o dobramento correto das proteínas é essencial para a atividade celular (Song *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Vários inibidores já foram utilizados para reduzir o estresse do RE,

tais como o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), o ácido fenilbutírico (PBA) e o salubrinal (Song *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Sutton-McDowall *et al.*, 2015).

Com função de chaperona química, o ácido biliar TUDCA tem se mostrado benéfico quando adicionado nos meios de PIVE em mamíferos (Zhang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014). Na espécie bovina, a adição de TUDCA no CIV aumentou a taxa de blastocisto de embriões clonados por transferência nuclear de célula somática (Song *et al.*, 2011). Além disso, o TUDCA foi eficaz na redução de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de transcritos marcadores do estresse do RE em embriões expostos à 20% de O₂ (Yoon *et al.*, 2014). Recentemente, a adição de 10 µM de TUDCA no CIV demonstrou ser benéfico para a crio tolerância de embriões bovinos (Khatun *et al.*, 2020).

Apesar de estudos relatarem o efeito benéfico de TUDCA na PIVE na espécie bovina, pouco é conhecido sobre os efeitos de TUDCA no alívio do estresse do RE em relação à crio tolerância de embriões produzidos *in vitro*. Além disso, até o momento, nenhum estudo investigou os efeitos da adição de TUDCA na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos.

Dessa forma, é importante uma investigação para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação desse inibidor do estresse do RE em etapas da PIVE, como forma de mitigar os estresses causados pelo ambiente *in vitro* e, potencialmente, aumentar a produção de embriões com maior tolerância à criopreservação.

REVISÃO DA LITERATURA

O retículo endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular

O RE é uma organela de células eucarióticas, formado a partir da invaginação da membrana plasmática, constituído por uma rede de túbulos e vesículas achatadas e

interconectadas, que se comunicam com a membrana nuclear. O RE pode ser classificado em dois tipos: retículo endoplasmático rugoso (RER), que possui formato achatado e a presença de ribossomos associados à sua membrana; retículo endoplasmático liso (REL) com uma estrutura mais tubular e sem ribossomos (Pagliassotti, 2012). O RE está envolvido em diversos processos dentro da célula como: síntese, enovelamento, glicosilação e transporte de proteínas; síntese e distribuição de fosfolipídios e esteróis; armazenamento e o controle da liberação de Ca^{2+} para o citoplasma (Walter *et al.*, 2011).

Cerca de um terço do proteoma total é sintetizado no RER, sendo esta organela o principal compartimento subcelular envolvido na dobragem e maturação de proteínas destinada às vias endo/exocíticas. Para tal, as proteínas secretoras e transmembrânicas sintetizadas nos ribossomos são translocadas do citoplasma para o lúmen do RE, onde sofrerão modificações pós-traducionais e a dobragem necessária para ser entregue em seu local de ação (Alberts *et al.*, 2002). Para desempenhar tais funções, o RE possui um ambiente altamente especializado e singular para o enovelamento, a formação de pontes dissulfeto e a glicosilação de proteínas. Este ambiente é mantido pelo alto nível de cálcio, um ambiente oxidativo e pela presença de chaperonas cálcio-dependentes, lectinas, foldases e glucosidases, as quais são responsáveis pelo dobramento e controle de qualidade das proteínas recém-sintetizadas (Walter *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2013).

Além de garantir a estrutura correta das proteínas, o RE contribui para o armazenamento e a regulação do cálcio, para a síntese e armazenamento de lipídios e para o metabolismo da glicose (Ghemrawi *et al.*, 2018). Dessa forma, o RE é sensível a perturbações na homeostase celular que são desencadeadas por diferentes tipos de estresse, podendo ser de origem endógena ou exógena e incluem, por exemplo, variações no nível de cálcio, inibição da glicosilação, estresse oxidativo, insuficiência

de nutrientes, mutações gênicas e exposição a agentes químicos (Walter *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Essas perturbações podem causar alterações do equilíbrio redox celular, distúrbios na homeostase de cálcio, falhas nas modificações pós-traducionais e um aumento geral na síntese de proteínas, levando ao acúmulo de proteínas malformadas no RE (Ron & Walter, 2007). Proteínas dobradas erroneamente são potencialmente prejudiciais para a função celular e, portanto, são rigidamente controladas. Contudo, quando esse acúmulo de proteínas é exacerbado ocorre a ativação do estresse do RE (Ghemrawi *et al.*, 2018). Essa condição é detectada por diferentes sensores localizados na membrana do RE, os quais desencadeiam uma via de transdução de sinal que induzem a expressão de chaperonas e foldases, componentes do sistema de degradação associado ao RE ou ERAD (*ER-associated Degradation*). Juntos, eles atuam para ajudar a célula a lidar com o estresse, atenuando a síntese proteica, degradando as proteínas malformadas e aumentando a capacidade do RE para dobrar proteínas. A ativação coordenada dos sensores constitui uma resposta específica ao estresse do RE, a qual foi denominada de resposta a proteínas malformadas ou UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*; Tabas *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2011; Kroeger *et al.*, 2018).

Vias de sinalização da UPR

A UPR é uma resposta ao estresse celular originada no RE. Nos mamíferos, ela é predominantemente controlada por três sensores principais: IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*protein kinase related endoplasmic reticulum kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*; Figura 1). Os domínios luminais dos três sensores de estresse do RE são normalmente ligados a principal e mais abundante chaperona do RE, BiP (*binding protein*), também conhecida como GRP78 (*glucose-regulated protein 78*)

ou HSPA5 (*heat shock 70 kDa protein 5*), mantendo-se em um estado inativo (Kusaczuk *et al.*, 2013; Chipurupalli *et al.*, 2019). Porém, durante o estresse de RE o acúmulo de proteínas malformadas promove a dissociação de BiP dos seus ligantes, para auxiliar no correto dobramento das proteínas e, conseqüentemente, ocorre a ativação de PERK, IRE1 e ATF6 (Kusaczuk *et al.*, 2013; Chipurupalli *et al.*, 2019; Figura 1).

A IRE1 é uma proteína bifuncional com ação tanto de cinase como de endonuclease. Uma vez ativada, a IRE1 sofre um processo de oligomerização e os domínios cinases, presentes na porção citoplasmática, são justapostos e autofosforilados, deflagrando assim a ativação de sua função endonucleásica no lúmen da cisterna reticular (Ron & Walter, 2007; Korennykh *et al.*, 2011). A ativação do domínio endonucleásico inicia o processamento pós-transcricional do mRNA de alguns genes, como o fator de transcrição XBP1 (*X-box binding protein 1*). O IRE1 ativado induz uma clivagem seletiva em uXBP1 (*unspliced XBP1*) e um íntron de 26 nucleotídeos é excisado. As extremidades 5' e 3' do mRNA são religadas, produzindo uma isoforma sXBP1 (*spliced XBP1*) que é competente para se ligar ao promotor de genes essenciais da UPR, incluindo a expressão de chaperonas, foldases e componentes da via ERAD, a fim de aliviar o estresse do RE e restaurar a homeostase (Lee *et al.*, 2003; Figura 1).

PERK também conhecida como eIF2AK3, compartilha com IRE1 várias características na sua estrutura e na sua ativação, no entanto, falta-lhe o domínio com atividade endorribonuclease. Semelhante a sinalização por IRE1, a dissociação de BiP ligada a PERK permite sua oligomerização e sua ativação por autofosforilação (Harding *et al.*, 2000). O dímero de PERK ativado é capaz de reconhecer e fosforilar a eIF2 α (α -subunit of the eukaryotic initiation factor 2) no resíduo de serina 51, inibindo a troca do

nucleotídeo GDP por GTP feita pelo complexo pentamérico eIF2B e, consequentemente, atenuando a tradução de novas proteínas (Lee *et al.*, 2010). O bloqueio da tradução durante o estresse do RE é importante para reduzir a carga de proteínas na maquinaria de dobragem do RE. Durante esse período, eIF2 α regula positivamente a transcrição de ATF4 (*activating transcription factor-4*). O ATF4 ativo irá induzir genes importantes para combater o estresse oxidativo, bem como à indução da expressão do fator de transcrição pró-apoptótico CHOP (*C/EBP-homologous protein*) e de GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) (Lee *et al.*, 2010; Figura 1).

O ATF6 é uma proteína transmembrânica tipo II no RE com um domínio amino-terminal que contém um motivo transcricional bZIP situado no citoplasma. Diferente da PERK e IRE1, o ATF6 possui na porção carboxi-terminal (localizada no lúmen do ER) sinais de localização do aparato de Golgi que são mascarados por BiP (Yoshida *et al.*, 2001). Em resposta ao estresse do RE, a liberação de BiP facilita a translocação do ATF6 para o Golgi onde é clivado pelas proteases S1P (*site-1 protease*) e S2P (*site-2 protease*) para produzir um domínio amino-terminal ativo de 50 kDa, o ATF6f. Este é translocado para o núcleo onde induz a síntese de chaperonas e enzimas modificadoras. Além disso, convergindo com as cascatas de sinalização IRE1 e PERK, o ATF6 também pode induzir a expressão de XBP1 e CHOP para aprimorar a sinalização UPR (Yoshida *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2004; Figura 1).

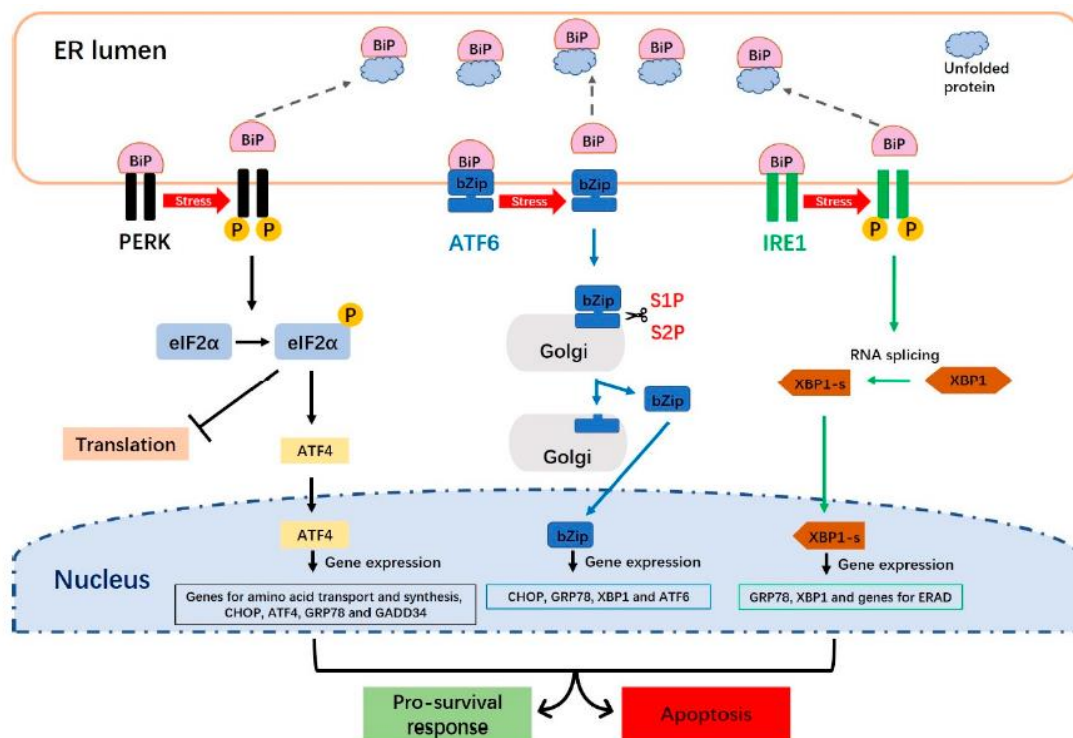


Figura 1. Diagrama esquemático das principais vias de sinalização da unfolded protein response (UPR). O acúmulo de proteínas malformadas no retículo endoplasmático (RE) induz UPR, com a ativação de três receptores: IRE1, PERK e ATF6 (Lin *et al.*, 2019).

Morte celular associada à UPR

A sinalização UPR é extremamente importante para a restauração da homeostase do RE e a manutenção da sua função normal. Quando proteínas malformadas se acumulam no lúmen do RE, a sinalização UPR é ativada como uma via adaptativa para mitigar essa fonte de estresse. No entanto, se o acúmulo de proteínas malformadas for persistente, o estresse não pode ser aliviado e a UPR desencadeia mecanismos de morte celular pela ativação das vias CHOP, JNK (*Jun-N-terminal kinase*) e caspase 12 (Huang *et al.*, 2017; Figura 2).

O CHOP, também conhecido como GADD153 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 153*), foi originalmente identificado em resposta a danos no

DNA. No entanto, a indução de CHOP é provavelmente mais sensível às condições de estresse do RE (Szegezdi *et al.*, 2006). Durante o estresse do RE, todos os três sensores da UPR induzem a transcrição de CHOP. Entretanto, para regular positivamente a síntese da proteína CHOP, a via PERK-eIF2 α -ATF4 da UPR é essencial. A dissociação de BiP do receptor PERK ativa a transcrição ATF4 que regula positivamente a expressão de CHOP (Bravo *et al.*, 2013). Foi descrito que CHOP induz a apoptose principalmente mediante a regulação negativa da expressão do gene anti-apoptótico BCL2 ou por depleção de glutatona, resultando em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO; Szegezdi *et al.*, 2006; Figura 2).

Diferentemente da via CHOP, a via JNK é ativada apenas pelo sensor IRE1 da UPR. O domínio cinase da IRE1 pode se ligar à proteína adaptadora TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*) o qual estimula a cascata das cinases ASK1 (apoptotic signaling kinase-1)/JNK, e a liberação de Ca²⁺ pelo RE regulada por Bax/Bcl-2 (*Bcl-2 associated X protein/B-cell leukemia/lymphoma 2*) (Van der Kallen *et al.*, 2009). A cinase JNK fosforila alguns membros da família de proteínas supressoras de apoptose, Bcl-2, e induzem a apoptose dependente de Bax (Van der Kallen *et al.*, 2009; Figura 2).

As vias que ligam o estresse do RE à ativação da caspase 12 ainda precisam ser melhor investigadas, porém foi proposto que níveis elevados de cálcio citoplasmático ativam uma protease não caspase (calpaína) que processa proteoliticamente a procaspase 12 (Nakagawa e Yuan, 2000). Ainda, foi sugerido que a caspase 12 possa ser clivada e ativada pela caspase 7 (Rao *et al.*, 2001). Após a sua liberação da membrana do RE, a caspase 12 se associa à caspase 9, o que pode levar à ativação da caspase 3 e, subsequentemente, da apoptose (Shen *et al.*, 2004; Figura 2).

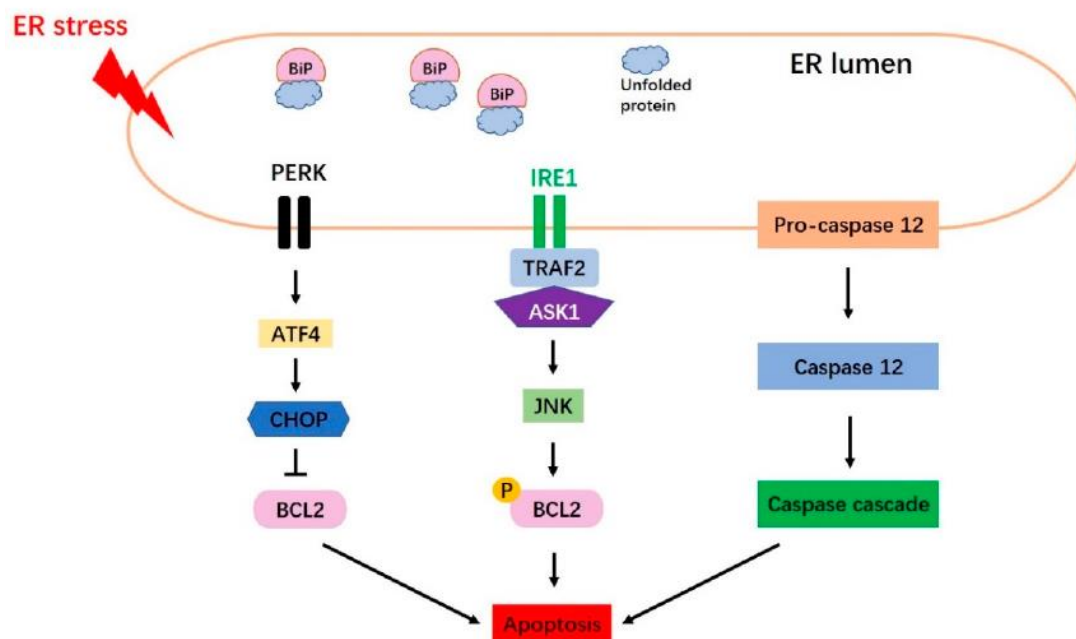


Figura 2. Diagrama esquemático das vias de apoptose induzidas pelo estresse do retículo endoplasmático (RE). Em casos de estresses do RE severos e prolongados a UPR desencadeia mecanismos de morte celular pela ativação das vias CHOP, JNK (*Jun-N-terminal kinase*) e caspase 12 (Lin *et al.*, 2019).

O estresse do retículo endoplasmático na produção *in vitro* de embriões

O oócito (em sua fase de maturação) e os embriões de mamíferos são notáveis por suas fisiologias celulares únicas e mecanismos singulares de regulação do desenvolvimento. Oócitos e embriões em estágios iniciais carecem de muitos dos mecanismos para desempenhar funções metabólicas e homeostáticas básicas, como sequestradores de radicais livres, transportadores de íons e mecanismos osmorreguladores (Latham *et al.*, 2016). Oócitos e embriões também sofrem eventos celulares únicos, não vistos nas células somáticas (Latham *et al.*, 2016). Essas singularidades de oócitos em maturação e de estágios iniciais embrionários criam,

igualmente, desafios particulares. De fato, esses desafios podem estar subjacentes à relativa sensibilidade dessas células a insultos exógenos. Embora estágios iniciais de embriões de mamíferos tenham, aparente, uma grande plasticidade – o que permite que eles compensem perturbações dramáticas como a redução celular - o oócito em maturação e o embrião são bastante sensíveis a estresses exógenos (Paczkowski *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2012; Sakatani *et al.*, 2004; Paula-Lopes e Hansen, 2002).

Durante a maturação oocitária e o desenvolvimento do embrião pré-implantação, o RE atua como um importante local para a biossíntese de proteínas, lipídios e proteínas secretoras e, portanto, desempenha um papel fundamental à crescente demanda do oócito por novas proteínas (Guzel *et al.*, 2017). Essas proteínas devem ser dobradas adequadamente no RE para manter a maturação e o correto desenvolvimento do embrião. Assim, a regulação do estresse/homeostase do RE provavelmente é um mecanismo importante durante esses processos (Latham *et al.*, 2015; Guzel *et al.*, 2017). O desenvolvimento de gametas e de embriões pode encontrar vários tipos de estresse exógeno no sistema de cultivo *in vitro* (Paula-Lopes e Hansen, 2002; Sakatani *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2012; Paczkowski *et al.*, 2014; Latham *et al.*, 2016). É cada vez mais evidente que alguns desses fatores adversos podem impactar negativamente as funções do RE e a síntese proteica, resultando na ativação do estresse do RE e nas vias de sinalização da UPR (Latham *et al.*, 2016). De fato, o estresse do RE e a sinalização UPR parecem desempenhar papéis críticos durante a retomada meiótica oocitária e o desenvolvimento embrionário pré-implantação (Song *et al.*, 2014; Sutton-McDowall *et al.*, 2015; Latham *et al.*, 2016).

Ativação do estresse do retículo endoplasmático na produção *in vitro* de embriões

Oócitos e embriões em estágios iniciais são muito sensíveis à variação de diversos fatores exógenos, incluindo a temperatura, o estresse osmótico, o estresse de cisalhamento, o estresse oxidativo, a exposição química etc. Esses fatores induzem o estresse do RE (Latham *et al.*, 2016) e reduzem o potencial desenvolvimento embrionário por meio de alterações na expressão gênica, em mecanismos epigenéticos e no metabolismo (Lane *et al.*, 2005).

Durante a maturação dos oócitos e o desenvolvimento inicial do embrião, várias enzimas e vias metabólicas produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) endógenas. A fosforilação oxidativa nas mitocôndrias gera ERO. O próprio estresse do RE pode gerar ERO (Landau *et al.*, 2013). Existe uma conexão íntima entre o estresse do RE e o estresse oxidativo (Yoon *et al.*, 2014). O estresse oxidativo impede o correto dobramento e transporte de proteínas e a homeostase do cálcio, podendo desencadear o estresse do RE (Malhotra e Kaufman, 2007). A cultura embrionária com elevada tensão de oxigênio (ar atmosférico), glicose elevada e outros fatores que alteram a fosforilação oxidativa e a função mitocondrial, podem induzir o estresse oxidativo e, consequentemente, o estresse do RE (Chu *et al.*, 2013).

Os meios de cultura que apresentam uma osmolaridade apropriada demonstraram melhorar a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário (Lin *et al.*, 2015). No entanto, a hiperosmolaridade dos meios de cultura diminuiu a capacidade de desenvolvimento embrionário, induzindo o estresse do RE e a apoptose (Zhang *et al.*, 2012).

Da mesma forma, o estresse térmico está associado ao estresse do RE, aumentando os níveis de ERO e a apoptose em oócitos e embriões (Paula-Lopes e Hansen, 2002; Tseng *et al.*, 2006). O estresse por baixas temperaturas associado à

criopreservação, também pode afetar o desenvolvimento embrionário e a regulação dos genes (Saenz-de-Juano *et al.*, 2012). De modo semelhante, a exposição prolongada à temperatura ambiente pode gerar ERO, efeitos negativos nas estruturas intracelulares e levar ao estresse do RE (Hegele-Hartung *et al.*, 1991).

A manipulação de oócitos e de embriões mediante a pipetagem produz tensão de cisalhamento, a qual pode danificar o oócito e afetar negativamente o desenvolvimento embrionário. O estresse de cisalhamento transitório pode não influenciar negativamente os embriões, entretanto, o manuseio prolongado ou repetido pode induzir o estresse do RE (Xie *et al.*, 2007).

Reagentes químicos como a tunicamicina (TM) - que age inibindo a N-glicosilação (importante para o dobramento correto da proteína) - são geralmente usados para induzir o estresse do RE na PIVE. A TM foi negativamente relacionada com a maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário, promovendo o incorreto dobramento proteico no RE e ativando as vias de apoptose (Zhang *et al.*, 2011).

Em geral, os estudos descritos acima evidenciam os principais estressores encontrados no ambiente *in vitro* de produção embrionária. Eles ativam o estresse do RE e as vias de sinalização UPR em oócitos e embriões de mamíferos.

O uso de ácido tauroursodesoxicólico para aliviar o estresse do retículo endoplasmático

Os ácidos biliares são produtos naturais e componentes fundamentais da bile (Wang *et al.*, 2014). O ácido ursodesoxicólico (UDCA) e seu conjugado de taurina, o TUDCA, são ácidos biliares hidrofílicos endógenos aprovados pelo FDA (US Food and Drug Administration) para tratamentos clínicos de certas doenças hepáticas colestáticas (Vang *et al.*, 2014). Existem fortes evidências que os efeitos citoprotetores dessa

molécula resultam, em parte, por sua capacidade de reduzir o limiar apoptótico em vários tipos de células através da modulação das vias mitocondriais clássicas (Rodrigues *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000). Além disso, foi observado um efeito positivo do uso do UDCA/TUDCA como um agente para tratar doenças não-hepáticas associadas ao aumento dos níveis de apoptose, como distúrbios neurodegenerativos (McMillin *et al.*, 2016).

O TUDCA foi definido funcionalmente como uma chaperona química, molécula que mimetiza as funções das chaperonas moleculares (Arakawa *et al.*, 2006). Além de induzir um efeito benéfico sobre o estresse mitocondrial, modulando a perturbação da membrana mitocondrial, a formação dos poros, a translocação de BAX, a liberação do citocromo c, a ativação da via caspase e, subsequentemente, a clivagem do substrato (Rodrigues *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000), recentemente o TUDCA se mostrou eficaz em regular a via mediada pelo estresse do RE (Lee *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento, o mecanismo de ação do TUDCA sobre o estresse do RE não foi totalmente esclarecido.

Um estudo, em tipos celulares diferentes, demonstrou os efeitos de TUDCA modulando as vias da UPR e minimizando o estresse do RE. Os principais efeitos de TUDCA foram observados na redução do efluxo de cálcio e da ativação da caspase 12 (Xie *et al.*, 2002). Além disso, o TUDCA inibiu a fosforilação do eIF2a (Lee *et al.*, 2010) e regulou negativamente a via de sinalização IRE1/XBP1 (Luo *et al.*, 2019).

Embora os detalhes mecanicistas da ação do TUDCA sobre a via de estresse do RE não estejam totalmente elucidados, é sabido até o momento que essa chaperona química apresenta um efeito citoprotetor e com grande potencial terapêutico para tratamentos de doenças relacionadas com o estresse do RE, como a diabetes, a obesidade, as doenças cardiovasculares e o câncer.

Efeito da adição de ácido tauroursodesoxicólico na produção *in vitro* de embriões

Em várias espécies, o uso de inibidores de estresse do RE durante a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial de embriões mostrou ser benéfico, diminuindo a apoptose mediada por esse estresse. Por sua função de chaperona, o TUDCA tem sido utilizado para aliviar o estresse do RE durante a maturação oocitária e/ou o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Foi sugerido que o estresse do RE e a sinalização UPR são intrínsecos em oócitos de mamíferos e que sua função adequada pode ser essencial para uma adequada maturação e qualidade dos oócitos (Zhang *et al.*, 2012). Em suínos, o uso de TUDCA na MIV não só aumentou a taxa de oócitos em metáfase II em 44 h, como diminuiu a produção de ERO no mesmo período. Além disso, o TUDCA mostrou um efeito reparador da maturação nuclear em oócitos suínos após as primeiras 22 horas de maturação sujeitas ao efeito de *knockdown* mediado pelo siRNA (*small interfering RNA*) #693 de BiP/GRP78 ou tunicamicina (Park *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018). Após a indução do estresse com tunicamicina, foi observada uma menor abundância de transcritos para ATF4 e CHOP, genes altamente expressos no estresse do RE e na apoptose. Da mesma forma, em camundongos, a adição de TUDCA demonstrou melhorar a viabilidade e o subsequente potencial de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados, reduzindo o estresse do RE induzido pela criopreservação (Zhao *et al.*, 2015).

Contudo, até o momento, na espécie bovina não há relatos sobre os efeitos da suplementação de TUDCA na maturação *in vitro* oocitária, com ou sem a adição de estressores químicos. Entretanto, a suplementação de TUDCA durante o CIV mostrou ser benéfico para o desenvolvimento do embrião bovino. Além de aliviar o estresse do RE em embriões clonados por transferência nuclear de célula somática, aumentando a

taxa de blastocistos produzidos (Song *et al.*, 2011), também reduziu os níveis de ERO e a abundância de mRNA de marcadores de estresse do RE em sistema de cultivo com 20% de O₂ (Yoon *et al.*, 2014). Ainda em bovinos, um recente estudo relatou uma melhora na crio tolerância dos embriões com a suplementação de TUDCA no cultivo, o que aumentou a taxa de eclosão e reduziu o número de células apoptóticas no embrião após serem submetidos ao estresse de vitrificação (Khatun *et al.*, 2020).

De forma semelhante, em suínos e camundongos, a adição de TUDCA no CIV foi benéfica para o alívio do estresse do RE em embriões. Em suínos, o número total de células aumentou e a taxa de apoptose reduziu em embriões cultivados com TUDCA (Kim *et al.*, 2015). Além disso, foi relatado um aumento da expressão do gene anti-apoptótico BCL2 e uma diminuição da expressão dos genes pro-apoptóticos, BCL2L1 (Bcl-xl) e TP53 em embriões tratados com TUDCA (Kim *et al.*, 2015). Embriões suínos clonados por transferência nuclear de célula somática e tratados com TUDCA apresentaram uma redução do estresse oxidativo pela regulação positiva do antioxidante GSH e uma redução na abundância de transcritos para sXBP1 (Lin *et al.*, 2016), ressaltando a ação do TUDCA em mitigar o estresse do RE.

Em camundongos, foi observado uma melhora significativa no desenvolvimento embrionário e na taxa de produção de filhotes após embriões derivados de oócitos livres de células do cumulus serem tratados com TUDCA (Mochizuki *et al.*, 2018).

Coletivamente, esses estudos sugerem que o estresse do RE é um evento comum na MIV de oócitos e/ou CIV de embriões de mamíferos. Além disso, o alívio do estresse do RE pelo tratamento com TUDCA pode melhorar o potencial de desenvolvimento dos oócitos e embriões.

Vitrificação de embriões produzidos *in vitro* e seu efeito no metabolismo embrionário

A criopreservação de embriões é extremamente importante para a conservação de material genético de valor e para aumentar a eficiência da produção de embriões produzidos *in vitro* em sistemas comerciais de aprimoramento genético na criação de gado (A-Na *et al.*, 2014). A vitrificação, uma das técnicas de criopreservação, pode ser alcançada utilizando altas temperaturas de resfriamento e alta concentração de soluções crioprotetoras (Sudano *et al.*, 2016a).

O primeiro relato sobre a criopreservação foi na utilização em embriões de camundongos, por Whittingham *et al.* (1971). Posteriormente, outros estudos surgiram e em diversas espécies (Arav *et al.*, 1987; Vajta *et al.*, 1998; Kuwayama *et al.*, 2005), sendo uma delas especialmente estudada, a bovina. Devido ao impacto econômico da criação de bovinos, a produção de embriões *in vitro* tem crescido a cada ano. Os embriões obtidos pela produção *in vitro* (PIV) possuem baixa resistência à criopreservação (isto é, baixa crio tolerância) a qual, aparentemente, está associada com os lipídios (sua composição na membrana celular, conteúdo e o tamanho das gotículas citoplasmáticas), bem como a composição e a morfologia das organelas presentes nas células embrionárias (Leibo *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 2002; Camargo *et al.*, 2011; Paschoal *et al.*, 2017; López-Damián *et al.*, 2012; 2018).

Apesar de os lipídios serem um obstáculo na PIV de embriões, eles possuem extrema importância nos processos metabólicos e auxiliam a coordenar eventos fundamentais durante o desenvolvimento embrionário inicial (Sudano *et al.*, 2016b). Uma das possíveis explicações para esse elevado depósito lipídico está relacionada com a suplementação de soro fetal bovino nos meios de cultivo *in vitro* (Paschoal *et al.*, 2017).

Lipídios como os triglicerídeos (TAG), a principal classe lipídica encontrada no citoplasma das células de mamíferos, são armazenados como gotículas lipídicas (Sudano *et al.*, 2016b) e, nos processos de criopreservação, a sua presença é um fator possivelmente comprometedor devido às injúrias celulares que causa. Em estudo recente foi demonstrado que embriões das duas subespécies (*Bos taurus* e *Bos indicus*) produzidos *in vivo* sofreram maior peroxidação lipídica, número de células apoptóticas e ROS, comparados a embriões que não passaram pela criopreservação (López-Damián *et al.*, 2019). Uma das consequências da peroxidação lipídica é aumento do conteúdo lipídico intracitoplasmático, impactando diretamente na sobrevivência após aquecimento. Assim, após a criopreservação, os embriões de PIV ficam mais vulneráveis aos danos oxidativos, por motivo de sua estrutura ser delicada e não carecer de mecanismos de defesa desenvolvidos (Nedambale *et al.*, 2006).

Em situações de alta demanda energética, pode ocorrer a hidrólise dos TAG no organismo, gerando ácidos graxos e glicerol em um processo denominado lipólise (Ravnskjaer *et al.*, 2015; Razza *et al.*, 2018). Sendo assim, todos os efeitos gerados pela técnica e manipulação dos oócitos e embriões podem interferir no metabolismo celular.

Dessa forma, a utilização de antioxidantes no meio de cultivo e nos meios pós-aquecimento pode viabilizar o potencial de desenvolvimento dos embriões (Nedambale *et al.*, 2006).

A inclusão de inibidores do estresse do RE, como o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ácido fenilbutírico (PBA) e salubrinal (Song *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Sutton-McDowall *et al.*, 2015) nos meios de produção *in vitro* de embriões, foi benéfica e melhoraram a competência e o desenvolvimento embrionário podendo, eventualmente, inclusive impactar na sobrevivência pós-implantação subsequentes ao processo de criopreservação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões Gerais

A partir dos resultados apresentados nos Capítulos 1 e 2, todas as hipóteses propostas nesta Tese foram rejeitadas. Os principais resultados observados com este trabalho foram:

- A adição de TUDCA (50, 200 e 1.000 μ M) durante a maturação *in vitro* (MIV) não melhorou a competência oocitária e o desenvolvimento do embrião.
- A adição de 200 μ M de TUDCA, durante a MIV, pareceu modular o estresse do RE e o estresse oxidativo, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio no oócito e aumentando a abundância de transcritos relacionados com a defesa antioxidante no oócito e no embrião.
- A adição de 1.000 μ M de TUDCA, durante a MIV, se mostrou tóxica para o oócito e diminuiu as taxa de maturação nuclear e a atividade mitocondrial. Além disso, foi observado um aumento na abundância de transcritos pró-apoptóticos no oócito.
- A adição de TUDCA (50, 200 ou 1.000 μ M) durante o cultivo *in vitro* (CIV) não melhorou a competência do desenvolvimento embrionário.
- A adição de 1.000 μ M de TUDCA, durante a CIV, se mostrou tóxica para o embrião e diminuiu a taxa de eclosão. Além disso, houve um aumento da abundância de transcritos relacionados negativamente com o estresse do RE, o estresse oxidativo, o metabolismo lipídico e a sobrevivência celular.
- A adição de 200 μ M de TUDCA, durante a CIV, pareceu modular o estresse do RE e o estresse oxidativo em embriões após a vitrificação. Além de aumentar a taxa de eclosão após o aquecimento, houve uma diminuição na abundância de transcritos relacionados negativamente com o estresse do RE e metabolismo lipídico, concomitante com o aumento na abundância de transcritos relacionados positivamente com a defesa antioxidante.

Referências Bibliográficas

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.
- AJDUK, A.; MALAGOCKI A.; MALESZEWSKI, M. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: Development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. **Reprod Biol**. v.8, p. 3–22, 2008.
- AKSU, D.A.; AGCA, C.; AKSU, S; BAGIS H.; AKKOC, T.; CAPUTCU AT, et al. Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. **Mol Reprod Dev**. v.79, p. 613–625, 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 4th edition. 2002.
- ARAKAWA, T.; EJIMA, D.; KITA, Y.; TSUMOTO, K. Small molecule pharmacological chaperones: and cell survival during the unfolded protein response. **Mol. Cell**. v. 5, p. 897–904, 2000.
- BELL, C.E.; LARIVIERE, N.M.; WATSON, P.H.; WATSON, A.J. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways mediate embryonic responses to culture medium osmolarity by regulating Aquaporin 3 and 9 expression and localization as well as embryonic apoptosis. **Hum Reprod**. v. 24, p.1373–1386, 2009.
- BENTOV, Y.; YAVORSKA T.; ESFANDIARI N. et al. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. **J Assist Reprod Genet**. v. 28, p.773–783, 2011.
- BERRIDGE, M.J.; The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium**. v. 32, p. 235–249, 2002.
- BOTIGELLI, R.C.; RAZZA E.M.; PIOLTINE, E.M.; FONTES, P.K.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL C.L.V.; NOGUEIRA M.F.G. Supplementing *in vitro* embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. **Reprod. Biol**. v. 18(1), p. 66-75, 2018.
- BRAVO, R.; PARRA V.; GATICA, D.; RODRIGUEZ, A.E.; TORREALBA, N.; PAREDES, F. Endoplasmic 517 reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **Cell Mol Biol**. v. 301, p.215-290, 2013.
- BRODSKY J.L.; SKACH W.R. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. **Curr Opin Cell Biol**. v. 23, p. 464-475 2011.
- BUNEL, A.; JORSSSEN, E.P.; MERCKX, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E.; SIRARD, M.A. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**. v.83, 228–237, 2015.
- CAMARGO L.; MUNK, M.; SALES, J.N.; WOHLRES-VIANA, S.; QUINTÃO, C.; VIANA, J. Differential gene expression between *in vivo* and *in vitro* maturation: a comparative study with bovine oocytes derived from the same donor pool. **JBRA assisted reproduction**. V. 23(1), p. 7–14, 2019.
- CAMPANELLA, C.; PACE, A.; CARUSO BAVISOTTO, C.; MARZULLO, P.; MARINO, GAMMAZZA, A.; BUSCEMI, S. Heat shock proteins in Alzheimer's disease: role and targeting. **Int. J. Mol. Sci**. v. 19, p.2603, 2018.
- CHA, B.H.; KIM, J.S.; AHN, J.C.; KIM H.C.; KIM, B.S.; HAN, D.K.; PARK, S.G.; LEE, S.H. The role of tauroursodeoxycholic acid on adipogenesis of human adipose-derived stem cells by modulation of ER stress. **Biomaterials**. v. 35, p.2851–2858, 2014.
- CHIPURUPALLI, S.; KANNAN, E.; TERGAONKAR, V.; D'ANDREA, R.; ROBINSON, N. Hypoxia Induced ER Stress Response as an Adaptive Mechanism in Cancer. **Int. J. Mol. Sci**. v. 20, p. 749, 2009.

- CHU, D.P.; TIAN, S.; SUN, D.G.; HAO, C.J.; XIA, H.F.; MA, X. Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 25, p.1174–1184, 2013.
- COMBELLES, C.M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the invitro maturation of oocytes? **Reprod Biomed Online.** v.18, p.864e80, 2009.
- DAIGNEAULT, B.W.; RAJPUT, S.; SMITH, G.W.; ROSS, P.J. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Scientific reports.** v. 8(1), p.7753, 2018.
- COLLADO, D.E.L.; SILVEIRA, M.; OLIVEIRA, J.C.; ALVES, M.L.F.; SIMAS, R.C.; GODOY A.T. *In vitro* maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction.** v. 154, p.881–93, 2017.
- DI EMIDIO, G.; FALONE, S.; VITTI, M.; D'ALESSANDRO, A.M.; VENTO, M.; DI PIETRO, C., et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. **Hum Reprod.** v. 29, p.17, 2006.
- DUCIBELLA, T.; FISSORE, R. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. **Dev Biol.** v. 315, p.257–279, 2008.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology.** v. 71, p.836-48, 2009.
- FLEMING, T.P.; WILKINS, A.; MEARS, A.; MILLER, D.J.; THOMAS, F.; GHASSEMIFAR, M.R.; FESENKO, I.; SHETH, B.; KWONG, W.Y.; ECKERT, J.J. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2003. The making of an embryo: short-term goals and long-term implications. **Reprod Fertil Dev.** v. 16, p.325–337, 2004.
- GAD, A.; HAMED, S.A.; KHALIFA, M.; AMIN, A.; EL-SAYED, A.; SWIEFY, S.A.; EL-ASSAL, S. Retinoic acid improves maturation rate and upregulates the expression of antioxidant-related genes in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Int. J. Vet. Sci. Med.** v. 6, p.279–285, 2018.
- GHAFFARI, N.M.; NORUZINIA, M.; ALLAHVEISI, A.; SAREMI, A.; FADAEI, F.F.; MASTERY, F.R. Comparison of mitochondrial-related transcriptional levels of TFAM, NRF1 and MT-CO1 genes in single human oocytes at various stages of the oocyte maturation. **Iran Biomed J.** v. 19(1), p. 23-28, 2015.
- GHEMRAWI, R.; BATTAGLIA-HSU, S.F.; ARNOLD, C. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. **Cells.** v. 7, p. 35, 2018.
- GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development.** v.23, p.23-31, 2011.
- GROENENDYK, J.; MICHALAK, M.; Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochim Pol.** v.52, p.381–395, 2005.
- GUZEL, E.; ARLIER, S.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; TABAK, M.S.; EKIZ, T.; SEMERCI, N.; LARSEN, K.; SCHATZ, F.; LOCKWOOD, C.J.; KAYISLI, U.A. Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology. **Int. J. Mol. Sci.** v. 18, p. 792, 2017.
- KAMMOUN, H.L.; CHABANON, H.; HAINAULT, I. “GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice,” **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 119, no. 5, p. 1201–1215, 2009.
- HAN, J.; KAUFMAN, R.J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. **J Lipid Res.** V.57, p.1329–38, 2016.
- HARDING, H.P.; ZHANG, Y.H.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.Q.; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol. Cell.** v. 5, p. 897–904, 2000.

- HARRIS, D.; HUANG, B.; OBACK, B. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors 1. **Biol Reprod.** v.88, p.74, 2013.
- HAUSBURG, M.A.; DEKREY, G.K.; SALMEN, J.J.; PALIC, M.R.; GARDINER, C.S. Effects of paraquat on development of preimplantation embryos in vivo and in vitro. **Reprod. Toxicol.** v. 20, p.239–246, 2005.
- HEGELE-HARTUNG, C.; SCHUMACHER, A.; FISCHER, B. Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: a time course study. **Anat Embryol.** v. 183, p.559–571, 1991.
- HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v.13, p. 89–102, 2012.
- HOSOI, T.; OGAWA, K.; OZAWA, K. Homocysteine induces X-box-binding protein 1 splicing in the mice brain. **Neurochem Int.** v. 56, p.216–220, 2010.
- HUA, Y.; KANDADI, M.R.; ZHU, M.; REN, J.; SREEJAYAN, N. Tauroursodeoxycholic acid attenuates lipid accumulation in endoplasmic reticulum-stressed macrophages. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 55(1), p. 49-55, 2010.
- HUANG, N.; YU, Y.; QIAO, J. Dual role for the unfolded protein response in the ovary: Adaption and apoptosis. **Protein Cell.** v. 8, p. 14–24, 2017.
- HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. **Current Science.** v. 93, p. 1684-1696, 2007.
- ISPADA, J.; RODRIGUES, T.A.; RISOLIA, P.H.B. et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 30, p. 1169–1179, 2018
- IWAWAKI, T.; AKAI, R.; KOHNO, K.; MIURA, M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. **Nat Med** v.10, p.98–102, 2004.
- ZHANG, K.; WANG, S.; MALHOTRA, J. et al. “The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis,” **The EMBO Journal**, v. 30, p. 1357–1375, 2011.
- KHATUN, H.; IHARA, Y.; TAKAKURA, K.; EGASHIRA K. Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos. **Theriogenology.** v. 142, p.131 – 137, 2020.
- KIM, J.S.; SONG, B.S.; LEE, K.S.; KIM, D.H.; KIM, S.U.; CHOO, Y.K.; CHANG, K.T.; KOO, D.B. Tauroursodeoxycholic acid enhances the preimplantation embryo development by reducing apoptosis in pigs. **Reprod Dom Anim.** v.47(5), p.791-8, 2012
- KORENNYKH, A. V; EGEA, P.F; KOROSTELEV, A. A; FINER-MOORE, J; STROUD, R. M; ZHANG, C; SHOKAT, K. M; WALTER, P. Cofactor-mediated conformational control in the bifunctional kinase/RNase Ire1. **BMC Biol.** v. 9(48), 2011.
- KUSACZUK, M.; CECHOWSKA-PASKO, M. Molecular chaperone ORP150 in ER stress-related diseases. **Curr. Pharm. Des.** v.19, p. 2807–2818, 2012.
- LANDAU, G.; KODALI, V.K.; MALHOTRA, J.D.; KAUFMAN, R.J. Detection of oxidative damage in response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. **Methods Enzymol.** v. 526, p.231–250, 2013.
- LANE, M.; GARDNER, D.K. Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. **Semin Reprod Med,** v.8, p. 195–204, 2000.
- LANE, M.; GARDNER, D.K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. **Reprod Fertil Dev.** v. 17, p.371–378, 2005.

- LATHAM, K. E. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: A basis for intervention and improvement of outcomes. **Cell Tissue Res.** v. 363, p.159–167, 2016.
- LATHAM, K.E. Endoplasmic reticulum stress signaling in mammalian oocytes and embryos: Life in balance. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* v. 316, p. 227–265, 2015.
- LAURESSERGUES, E.; BERT, E.; DURIEZ, D. et. al. Does endoplasmic reticulum stress participate in APD-induced hepatic metabolic dysregulation? **Neuropharmacology.** v. 62, p. 784–796, 2012.
- LEE, K.; TIRASOPHON, W.; SHEN, X.; MICHALAK, M.; PRYWES, R. IRE-1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merges to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. **Genes Dev.** v.16, p.452–466, 2002.
- LEE, A.H.; IWAKOSHI, N.N.; GLIMCHER, L.H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident
- LEE, D. Y.; LEE, K.; LEE, H. J.; KIM, D. H.; NOH, Y. H.; YU, K.; JUNG, H.; LEE, S. A.; LEE, J. Y.; YOUN, Y. C.; JEONG, Y.; KIM, D. A.; LEE, W. B.; KIM, S. S. Activation of PERK Signaling Attenuates Ab-Mediated ER Stress. **PLoS ONE.** v. 5, p. 5, 2010.
- LEE, Y.Y.; HONG, S.H.; LEE, Y.J.; CHUNG, S.S.; JUNG, H.S.; PARK, S.G.; PARK, K.S. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 397, p. 735–739, 2010.
- LIN, T.; LEE, J. E.; KANG, J. W.; SHIN, H.Y.; LEE, J. B.; JIN, D. I. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 20(2), p. 409, 2019.
- LIN, T.; LEE, J.E.; OQANI, R.K.; KIM, S.Y.; CHO, E.S.; JEONG, Y.D.; BAEK, J.J.; JIN, D.I. Tauroursodeoxycholic acid improves pre-implantation development of porcine SCNT embryo by endoplasmic reticulum stress inhibition. **Reprod. Biol.** v. 16, 269–278, 2016.
- LIN, T.; ZHANG, J.Y.; DIAO, Y.F.; KANG, J.W.; JIN, D.I. Effects of sorbitol on porcine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Zygote.** v. 23, p. 297–306, 2015.
- LÓPEZ-DAMIÁ, E.P.; JIMÉNEZ-MEDINA, J.A.; ALARCÓN, M.A.; LAMMOGLIA, M.A.; HERNÁNDEZ, A.; GALINA, C.S.; FIORDELISIO, T. Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. **Theriogenology.** v. 143, p.74-81, 2020.
- MALHOTRA, J.D., KAUFMAN, R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxid. Redox Signal.** v. 9, p. 2277–2293, 2007.
- MENEZO, Y.J.; SILVESTRIS, E.; DALE, B. et al. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reprod Biomed Online.** v.33(6), p. 668–683, 2016.
- MICHALAK, M.; GYE, M.C. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. *Clin. Exp. Reprod. Med.* v. 42, p. 1–7, 2015.
- MILLER, S.D.; GREENE, C.M.; MCLEAN, C.; LAWLESS, M.W.; TAGGART, C.C.; O'NEILL, S.J.; MCELVANEY, N.G. Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of **Bad**. **Hepatology.** v. 46, p. 496–503, 2007.
- MOCHIZUKI, M.; MIYAGI, K.; KISHIGAMI, S. Optimizing treatment of tauroursodeoxycholic acid to improve embryonic development after *in vitro* maturation of cumulus-free oocytes in mice. **PLOS ONE.** v.13, 2007
- MOREIRA, S.; FONSECA, I.; NUNES, M. J. et al. Nrf2 activation by tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease. **Experimental Neurology.** v.295 p.77–87, 2017
- NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. 887–894, 2000.

NIE, J.; YAN, K.; SUI, L.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; YANG, X. et al. Mogroside V improves porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development. **Theriogenology**; v. 141, p. 35–40, 2019.

O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biol Reprod**. v. 56, p.229-37, 1997.

OLZMANN, J.A.; KOPITO, R.R.; CHRISTIANSON, J.C. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v.5, p. 013185, 2013.

OMURA, T. et al. Sodium tauroursodeoxycholate prevents paraquat-induced cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress responses in human lung epithelial A549 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 432, p. 689–694. 2013

PACZKOWSKI, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; KRISHER, R.L. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. **Reproduction**. v.148, p. 429–439, 2014.

PAGLIASSOTTI, M.J. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. **Annu 454 Rev Nutr**. v. 32, p. 17-33, 2012.

PANG, Y.; ZHAO, S.; SUN, Y.; JIANG, X.; HAO H.; DU, W.; ZHU, H. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Anim. Sci. J**. v. 89, p. :648–660, 2018.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-8, 2000.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. **Proc Natl Acad Sci**. v. 87, p. 4756-60, 1990.

PARK , H.J. et al. Regulation of the Endoplasmic Reticulum Stress by BIP/GRP78 is involved in Meiotic Maturation of Porcine Oocytes *In Vitro*. **Dev. Reprod**. v. 21, p. 407–415, 2017.

PARK H.J. et al. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during *in vitro* maturation. **J. Pineal Re**. v. 64, 2018.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v.295, p. 37–42, 2002.

PEREIRA, B.A.; ZANGERONIMO, M.G.; CASTILLO-MARTÍN, M. Supplementing Maturation Medium With Insulin Growth Factor I and Vitrification-Warming Solutions With Reduced Glutathione Enhances Survival Rates and Development Ability of *in vitro* Matured Vitrified-Warmed Pig Oocytes. **Front Physiol**. V. 9, p. 1894, . 2019.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol. Cell Endocrinol**. v.145, p. 27-37, 1998.

PLAISANCE, V. et al. Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic-cell function caused by human oxidized ldl. **PLoS One**. v. 11, e0163046, 2016.

PURCELL, S.H.; MOLEY, K.H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Trends Endocrinol Metab** 20, p. 483-489, 2009.

RAO, R.V. et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. **J. Biol. Chem**. v. 276, p. 33869–33874, 2001.

REMIÃO, et al. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reprod. Toxicol**. v. 63, p. 70–81, 2016.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev**. v. 61: p. 234–248, 2002.

RODRIGUES, T.A. et al. Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on *in vitro* matured bovine oocyte exposed to heat shock. **Theriogenology**. v. 86, p. 2028–2039, 2016.

RODRIGUES, C.M. et al. Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: Evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 2368–2379, 2000.

RON, D; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.7, J p.519-29, 2007.

SAENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMENEZ, F.; PENARANDA, D.S.; JOLY, T.; VICENTE, J.S. Effects of slow freezing procedure on late blastocyst gene expression and survival rate in rabbit. **Biol. Reprod.** v. 87, p. 91, 2012.

SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. **Mol. Reprod. Dev.** v. 67, p.77–82, 2004.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annu. Rev. Biochem.** v. 74, p. 739–789, 2005.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; DE OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**. v.67, p.37-43, 2001.

SEYHUN, E.; MALO, A.; SCHAFER, C.; MOSKALUK, C.A.; HOFFMANN, R.T.; GOKE, B. KUBISCH, C.H. Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, acinar cell damage, and systemic inflammation in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* v. 301, p. 773–782, 2011.

SHARMA, A.; AGRAWAL, H.; MULLANI, N.; SANDHU, A.; SINGH, M.K.; CHAUHAN, M.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P.; MANIK, R.S. Supplementation of tauroursodeoxycholic acid during IVC did not enhance *in vitro* development and quality of buffalo IVF embryos but combated endoplasmic reticulum stress. **Theriogenology**, 84, 200–207, 2015.

SHEN, X.H.; ZHANG, K.Z.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response—A stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 28, p. 79–92, 2004.

SINGH, M.; CHAUDHRY, P.; ASSELIN, E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. **J Endocrinol.** v.210, p.5-14, 2011.

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(6), p. 826-36, 2011.

Song, B.S.; Kim, J.S.; Yoon, S.B.; Lee, K.S.; Koo, D.B.; Lee, D.S.; Choo, Y.K.; Huh, J.W.; Lee, S.R.; Kim, S.U.; et al. Inactivated Sendai-virus-mediated fusion improves early development of cloned bovine embryos by avoiding endoplasmic-reticulum-stress-associated apoptosis. **Reprod. Fertil. Dev.**, 23, 826–836, 2011.

Song, B.S.; Yoon, S.B.; Sim, B.W.; Kim, Y.H.; Cha, J.J.; Choi, S.A.; Jeong, K.J.; Kim, J.S.; Huh, J.W.; Lee, S.R.; et al. Valproic acid enhances early development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos by alleviating endoplasmic reticulum stress. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 26, p. 432–440, 2014.

STADTMAN, E.R.; MOSKOVITZ, J.; BERLETT, B.S.; LEVINE, R.L. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell*.

SUDANO, M.J.; CAIXETA, E.S.; PASCHOAL, D.M.; MARTINS, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 26(8), p. 129–41, 2014.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; CROCOMO, L. F.; MAGALHAES, L. C.; JUNIOR, A. M.; MACHADO, R.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-31, 2014.

SZEGEZDI, E.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis—The story so far. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1010, p.186–194, 2003.

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat. Cell Biol.** v. 13, p. 184–190, 2011.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **J. Reprod. Dev.** v. 58, p.1–9, 2012.

Takahashi, M.; Keicho, K.; Takahashi, H.; Ogawa, H.; Schultz, R.M.; Okano, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, p. 137–145, 2000.

TANAKA, Y.; ALEKSUNES, L.M.; YEAGER, R.L.; GYAMFI, M.A.; ESTERLY, N.; GUO GL.; KLAASSEN, C.D. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 325, p.655–664, 2008.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reprod. Dom. Anim.** v.41, p.5-11, 2006.

TATONE, C.; CARBONE, M.C.; GALLO, R.; DELLE MONACHE, S.; DI COLA, M.; ALESSE, E. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. **Biol Reprod.** v. 74, p. 395–402, 2006.

THOMPSON, J.G.; KIND, K.L.; ROBERTS, C.T.; ROBERTSON, S.A.; ROBINSON, J.S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: shortand long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? **Hum Reprod.** v.17, p. 2783–2786, 2002.

TSENG, J.K.; TANG, P.C.; JU, J.C. In vitro thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. **Theriogenology**. v. 66, p.1073–1082, 2006.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. et al. The Submarine Incubation System, a new tool for in vitro embryo culture. A technique report. **Theriogenology**. v. 48, p.1379–1385, 1997.

VAN DER KALLEN, C.J.; VAN GREEVENBROEK, M.M.; STEHOUWER, C.D.; SCHALKWIJK, C.G. ENDOPLASMIC. Reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: Is there a role for adipose tissue and liver? **Apoptosis**. v.14, p.1424–1434, 2009.

VAN DER VLIES, D.; MAKKINJE, M.; JANSSENS, A.; BRAAKMAN, I.; VERKLEIJ, A.J.;WIRTZ, K.W.; POST, J.A. Oxidation of er resident proteins upon oxidative stress: Effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. **Antioxid. Redox Signal.** v.5, p. 381–387, 2003.

VAN SCHADEWIJK, A.; VAN'T WOUT, E.F.; STOLK J, HIEMSTRA, P.S. A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress. **Cell Stress Chaperones**; v. 17, p. 275–279, 2011.

VANG, S.; LONGLEY, K.; STEER, C.J.; LOW, W.C. The Unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. **Global Adv. Health Med.**, v.3, p. 58–69, 2014.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; GONÇALVES, R.L.R.; SIQUEIRA, L.G.B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Anim Reprod**, v.15, p. 963-97, 2018

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, p. 1081–1086, 2011.

WANG, J.; LEE, J.; LIEM, D.; PING P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. **Gene**. v. 618, p. 14–23, 2017.

WANG, D.Q.; CAREY, M.C. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review. *World J. Gastroenterol.* v. 20, p. 9952–9975, 2014.

WHITAKER, M. Calcium at Fertilization and in Early Development. **Physiol Rev.**; 86:25–8, 2006.

WILD, A.C.; MOINOVA, H.R.; MULCAHY, R.T. Regulation of gamma-glutamyl- cysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. **J Biol Chem**. v. 274, p. 33627–33636, 1999.

WU, G.; SCHÖLER, H.R. Role of Oct4 in the early embryo development. **Cell Regen (Lond)**. v. 29 p. 3 - 7. 2014

WU, L.L.; RUSSELL, D.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential (DeltaPsi m), and embryo development. **Mol Endocrinol**. v. 26(4), p. 562-73, 2012.

WU, Y.H.; LEE, Y.H.; SHIH, H.Y.; CHEN, S.H.; CHENG, Y.C.; TSUN-YEE, C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is indispensable in embryonic development by modulation of epithelial-mesenchymal transition via the NOX/Smad3/miR-200b axis. **Cell Death Dis**. v. 9(1), p.10, 2018.

XIE , Q. et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. **Hepatology**. v. 36, p. 592 – 601, 2002.

XIE, Y.;WANG, F.; PUSCHECK, E.E.; RAPPOLEE, D.A. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 1287–1294, 2007.

YANG, H. C. et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency enhances germ cell apoptosis and causes defective embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **Cell death & disease**. v. 4, p. 616, 2013.

YOON, S.B.; CHOI, S.A.; SIM, B.W.; KIM, J.S., MUN, S.E.; JEONG, P.S.; YANG, H.J.; LEE, Y.; PARK, Y.H.; SONG, B.S.; KIM, Y.H.; JEONG, K.J.; HUH, J.W.; LEE, S.R.; KIM, S.U.;CHANG, K.T. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biol. Reprod**. v. 90(5), p. 104, 1–10, 2014.

YOSHIDA, H. ET AL.. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. **Mol. Cell. Biol**. v. 21, p. 1239–1248, 2001.

ZENG, F.; SCHULTZ, R.M. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. **Dev. Biol.**, 283, 40–57, 2005.

ZHANG, J. Y.; DIAO, Y. F.; OQANI, R. K.; HAN, R. X., JIN, D. I. 2012. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. **Biol. Reprod**. v.27, p. 86(4) – 128 2012.

ZHANG, J.Y.; DIAO, Y.F.; KIM, H.R.; JIN, D.I. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. **PLoS ONE**. v. 7, p.40433, 2012.

ZHANG, J.Y.; LEE, K.S.; KIM, J.S.; SONG, B.S.; JIN, D.I.; KOO, D.B.; YU, K. Functional characterization of the ER stress induced X-box-binding protein-1 (Xbp-1) in the porcine system. **BMC Mol. Biol.**, v. 12, p. 25, 2005.

ZHANG, L; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Front Plant Sci**. v. 3, p. 293, 2012.

ZHAO, N.; LIU, X.J.; LI, J.T.; ZHANG, L.; FU, Y.; ZHANG, X.J.; CHEN, R.X.; WEI, X.Q.; WANG, R.; WANG, Y.; ZHANG, J.M. Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes. **Cryobiology**. v. 70, p. 48–52, 2015.

ZHAO, X.M. et al. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **J. Pineal Res.** 64, p. 12445, 2018.

ZHAO, N. et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes. **Cryobiology**, v. 70, p. 48–52, 2015.