



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
TAUROURSODEOXICÓLICO (TUDCA) E/OU COLINA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS**

Londrina - PR
2017

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
TAUROURSODEOIXICÓLICO (TUDCA) E/OU COLINA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina - PR
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lunardelli, Paula Alvares.

Efeito da suplementação com ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) e/ou colina na produção in vitro de embriões suínos / Paula Alvares Lunardelli. - Londrina, 2017. 84 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes
Seneda. Coorientador: Vilceu Bordignon.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia da Reprodução - Tese. 2. Produção In Vitro de Embriões Suínos - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Bordignon, Vilceu. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

IV. Título.

PAULA ALVARES LUNARDELLI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
TAUROURSODEOIXÍCOLICO (TUDCA) E/OU COLINA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza
Componente da Banca
Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul -
UEMS

Profa. Dra. Wanessa Blaschi
Componente da Banca
Universidade Estadual Norte do Paraná - UENP

Profa. Dra. Lívia Aires Lisboa
Componente da Banca
Centro Universitário Filadélfia – Unifil

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins
Componente da Banca
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Marcelo, não só por ter desempenhado excelentemente o papel de orientador, mas também por sua amizade e inquestionável fé no meu potencial, desde o começo dessa jornada..

Ao professor Vilceu por ter prontamente me acolhido e co-orientado, durante o período do meu doutorado no Canadá e o mais decisivo da minha vida, por seu apoio incondicional, sem medir esforços para me proporcionar sempre o melhor..

À minha mãe, irmã, avô e avó pelo imensurável apoio em um sonho meu de ir para longe, mesmo contra seus mais fortes desejos de que eu ficasse.. e à minha Tia Renata, por ser meu exemplo de realização e busca pelos próprios sonhos..

Aos personagens difíceis e não menos importantes da minha vida, cujas ações contribuíram para o meu crescimento e a construção da minha personalidade e caráter..

À Maria Lúcia, por ter sido meu termômetro de sanidade mental e guia, por todo esse tempo..

À Lizete, pela eterna amizade e sem cujos 12 anos de apoio eu teria me perdido no caminho..

Ao meus amigos, que sempre me acharam o máximo, só porque eu fazia doutorado.. você são demais!

À Luciana, minha parceira para todos os momentos durante a minha vida acadêmica sem exceção, vários que eu poderia e muitos outros que não poderia citar aqui.. Ao querido Bruno Sanches por sempre estar disposto a dar os conselhos de vida que ninguém mais poderia, independente de qualquer fuso horário.. Ao parceiro Fábio Moraes (Tanguá) por acreditar na minha capacidade profissional e me proporcionar os melhores momentos de praticar o que me faz feliz! À Lari e a Cami Bortoliero pela amizade e parceria incontestáveis, aos brasileiros Fábio Morotti, Cami Rosa, Cami Bizarro, Fabi, Isa, Andressa (pela amizade e ajuda imensurável na manipulação de imagens desse trabalho), João, Emanuel, Lahys, aos “canadenses” Naomi, Karina, Werner, Luke, Laura, Mariana, Rodrigo, Rosalba, Fernando, Milena, Audrey e Medo e a todos os melhores colegas que alguém poderia ter, muito obrigada pela convivência, risadas, dificuldades e realizações compartilhadas!

E a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu estivesse aqui hoje, finalizando mais uma etapa da minha formação, o meu mais sincero OBRIGADA!!

***“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos
para cambiar lo que somos”***

Eduardo
Galeano

***“I must be willing to give up on what I am in
order to become what I will be.”***

“You never fail until you stop trying.”

Albert Einstein

LUNARDELLI, Paula Alvares. **Efeito da suplementação com ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) e/ou colina na produção *in vitro* de embriões suínos**. 2017. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Com o intuito de otimizar a técnica da produção *in vitro* de embriões, diversas substâncias têm sido consideradas como potenciais aditivos aos meios de cultivo. Objetivou-se na presente pesquisa avaliar o efeito da adição de colina e do ácido Tauroursodeoxicólico (TUDCA) durante a maturação de oócitos e o cultivo de embriões produzidos *in vitro*. No primeiro estudo, oócitos foram puncionados a partir de ovários suínos coletados em abatedouro local. Alocou-se os oócitos selecionados em meio de maturação *in vitro* (MV) padrão e posteriormente, realizou-se a ativação partenogenética e 1030 prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em meio padrão ou com 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM de colina durante 7 dias. No segundo estudo, realizou-se MIV padrão e CIV de 872 prováveis zigotos por 0, D0-D3, D0-D5, D0-D7, D3-D7 e D5-D7 dias com suplementação de colina a 3,73mM. No terceiro estudo, selecionou-se 1141 oócitos que foram alocados em meio de maturação *in vitro* (MV) padrão ou suplementado com colina a 3,73mM, TUDCA a 50µM ou ambos. No quarto estudo, realizou-se MIV padrão e CIV de 1645 prováveis zigotos em meio padrão, ou suplementado com colina a 3,73mM, TUDCA a 50µM ou ambos. No quinto estudo, realizou-se MIV padrão e CIV de 1756 prováveis zigotos em meio padrão, ou suplementado com glicose a 7mM, glicose + TUDCA a 50µM, glicose + colina a 3,73mM e glicose + TUDCA + colina. No terceiro estudo avaliou-se a taxa de maturação e, em todos os estudos, as taxas de clivagem, blastocistos e eclosão. Nos estudos que avaliaram condições de cultivo, realizou-se imunofluorescência em blastocistos para avaliação do número total de células e proporção de células positivas para CC3 e Sox2. Realizou-se as análises estatísticas por ANOVA e a comparação de médias pelo teste Tukey-Kramer, adotando α de 0,05. Os resultados da presente pesquisa mostraram pela primeira vez, que a suplementação do meio de MIV e CIV com colina influencia negativamente o desenvolvimento e a qualidade de embriões pré-implantação, que a suplementação de 10mM de colina por 7 dias ou 3,73mM pelos primeiros 5 dias de cultivo proporcionam maiores danos à qualidade embrionária, prejudicando também o desenvolvimento de embriões induzidos ao estresse por glicose quando suplementada sozinha ou na presença de TUDCA. Ainda, apesar de parecer melhorar o desenvolvimento embrionário, TUDCA não foi capaz de minimizar o impacto da colina.

Palavras-chave: Blastocistos. Qualidade embrionária. Apoptose. CC3. Sox2.

LUNARDELLI, Paula Alvares. **Effect of media supplementation with Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), Choline and both on porcine in vitro embryo production.** 2017. 84p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Aiming to improve the in vitro embryo production technique, many substances have been considered as potential in vitro media additives. Thus, the objective of the present research was to assess the effect of choline and Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) addition to *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) media of *in vitro* produced embryos. In the first study, oocytes were punctured from porcine ovaries collected from a local slaughterhouse. Selected oocytes were placed in standard IVM medium, were parthenogenetically activated and 1030 presumable zygotes were subjected to standard IVC or supplemented with 2.5mM, 5mM, 7.5mM or 10mM choline. In the second study, IVM was carried out in standard medium and 872 presumptive zygotes were subjected to IVC in standard medium or supplemented with 3.73mM choline during D0-D3, D0-D5, D0-D7, D3-D7 and D5-D7. In the third study, 1141 selected oocytes were subjected to standard IVM or supplemented with 3.73mM choline, 50µM TUDCA or both and IVC was carried out in standard. In the fourth study, IVM was carried out in standard medium and 1645 presumptive zygotes were subjected to IVC in standard medium or supplemented with 3.73mM choline, 50µM TUDCA or both. In the fifth study, IVM was carried out in standard medium and 1756 presumptive zygotes were subjected to IVC in standard medium or supplemented with 7mM glucose, glucose + 50µM TUDCA, glucose + 3.73mM choline or glucose + TUDCA + choline. In the third study maturation rates were recorded and in all studies cleavage, blastocysts and hatching rates were evaluated. In the studies that assessed culture conditions, immunofluorescence was carried out for evaluating total cell number and CC3 and Sox2 positive cells proportion. Statistical analysis was carried out through one way ANOVA and means comparison by Tukey-Kramer test, adopting α as 0.05. Results from the present research showed for the first time, that IVM and IVC media supplementation with choline impairs preimplantation development and embryo quality, that 10mM choline supplementation for 7 days or 3.73mM for the first 5 culture days promote more harm to embryo quality, impairing the development of embryos subjected to stress by glucose when supplemented alone or in the presence of TUDCA. Yet, besides TUDCA seeming to improve embryo development, it was not able to minimize choline's damage

Key words: Blastocysts. Embryo quality. Apoptosis. CC3 Sox2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do código genético de células eucarióticas.....	19
Figura 2 – Representação gráfica da dinâmica de metilação do DNA em gametas	22
Figura 3 – Representação gráfica da dinâmica do RNA em oócitos e embriões durante a transição materno-zigótica.....	23
Figura 4 – Esquema ilustrativo da expressão gênica em blastocistos	25

Artigo A

Experimental design – Experiment I	47
Experimental design – Experiment II	48
Figura 1 – Painel representativo do perfil de CC3 e Sox2 de blastocistos suínos produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de Colina em diferentes concentrações	51
Figura 2 – Painel representativo do perfil de CC3 e Sox2 de blastocistos suínos produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de Colina nos diferentes períodos de cultivo	54

Artigo B

Experimental design – Experiment I	64
Experimental design – Experiment II	64
Experimental design – Experiment III	65
Figura 1 – Painel representativo do perfil de CC3 e Sox2 de blastocistos suínos produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de Colina, ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) ou ambos	69
Figura 2 – Painel representativo do perfil de CC3 e Sox2 de blastocistos suínos induzidos ao estresse por glicose e suplementados com Colina, ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) ou ambos	72

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Tabela 1** – Efeito da suplementação de diferentes concentrações de colina ao meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos.....49
- Tabela 2** – Efeito da suplementação de diferentes concentrações de colina durante o cultivo *in vitro* na apoptose, número total de células e proporção de massa celular interna de embriões suínos50
- Tabela 3** – Efeito das diferentes durações de suplementação de colina ao meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos52
- Tabela 4** – Efeito das diferentes durações de suplementação de colina durante o cultivo *in vitro* na apoptose, número total de células e proporção de massa celular interna de embriões suínos53

Artigo B

- Tabela 1** – Efeito da adição de 50µM de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), 3,73mM de colina ou ambos durante a maturação de oócitos suínos na produção *in vitro* de embriões.....66
- Tabela 2** – Efeito da adição de 50µM de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), 3,73mM de colina ou ambos durante o cultivo *in vitro* de embriões suínos67
- Tabela 3** – Efeito da adição de 50µM de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), 3,73mM de colina ou ambos durante o cultivo *in vitro* na apoptose, número total de células e proporção de massa celular interna de embriões suínos68
- Tabela 4** – Efeito da adição de 50µM de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), 3,73mM de colina ou ambos durante o cultivo *in vitro* de embriões suínos submetidos ao estresse por glicose70
- Tabela 5** – Efeito da adição de 50µM de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), 3,73mM de colina ou ambos durante o cultivo *in vitro* na apoptose, número total de células e proporção de massa celular interna, de embriões suínos submetidos ao estresse por glicose.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina Monofosfato
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
MCI	Massa Celular Interna
PIV	Produzidos <i>In Vitro</i>
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
RE	Retículo Endoplasmático
SFB	Soro Fetal Bovino
TE	Trofectoderma
TUDCA	Ácido Tauroursodeoxicólico
CC3	Caspase 3 clivada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	BIOTECNOLOGIAS DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS	15
2.1.1	Maturação <i>In Vitro</i>	15
2.1.2	Ativação Partenogenética	16
2.1.3	Cultivo <i>In Vitro</i>	18
2.2	EPIGENÉTICA	19
2.2.1	Introdução À Epigenética	19
2.2.2	Epigenética No Desenvolvimento Embrionário	21
2.2.2.1	Transição materno-zigótica	22
2.2.2.2	Diferenciação celular no blastocisto	23
2.2.3	Nutrientes E A Epigenética	25
2.3	COLINA	26
2.3.1	Influência Da Colina Na Epigenética	27
2.4	ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	28
2.4.1	Estresse De Retículo Endoplasmático No Desenvolvimento Embrionário	31
2.4.2	Apoptose	32
2.5	ÁCIDO TAUROURSODEOIXICÓLICO (TUDCA)	33
	REFERÊNCIAS	35
3	HIPÓTESES	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	OBJETIVO GERAL	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5	ARTIGO A – CHOLINE: POTENTIAL SUPPLEMENT FOR <i>IN VITRO</i> CULTURE MEDIA?	44
6	ARTIGO B – CHOLINE ADDITION TO IVM AND IVC MEDIA IMPAIRS IMPLANTATION POTENTIAL AND EMBRYO QUALITY	

	REGARDLESS OF TUDCA SUPPLEMENTATION	58
7	CONCLUSÕES	78
	ANEXO	79
	Demais produções científicas	79

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento exponencial da população mundial, assim como o aumento significativo da expectativa de vida dessa população, as comunidades médica e científica têm enfrentado crescente demanda por tratamentos para doenças do século como cânceres e problemas reprodutivos. Para esse fim, pesquisas realizadas em animais detêm posição de destaque, permitindo um melhor entendimento das doenças e patologias associadas, além do desenvolvimento de drogas, soluções genéticas ou processos regenerativos (TANG e PRUEKSARITANONT, 2010; PELLEGGATTI, 2014).

Atualmente, a espécie mamífera mais utilizada como modelo de pesquisa é o camundongo de laboratório. A contribuição de tal espécie para o conhecimento científico da biologia adquirido até então é inquestionável. No entanto, de acordo com inúmeros experimentos a respeito, a extrapolação do conhecimento obtido em camundongos para a prática da medicina humana pode ser inadequada. Diferenças significativas entre camundongos e humanos limitam a utilização desses primeiros como bons modelos de estudo (WHITELAW *et al.*, 2016). Como consequência, pesquisadores têm direcionado seu interesse a espécies maiores, como a suína, devido à maior semelhança de sua anatomia, fisiologia e genética quando comparados aos humanos, contemplando sua vasta aplicação (CAO *et al.*, 2014; GRUPEN, 2014).

Para a reprodução desses animais, tem sido adotada a utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE), que representa uma ferramenta de alto potencial multiplicador de descendentes, capaz de proporcionar a superação de obstáculos como deficiências de mobilidade espermática e infertilidade de causas extra ovarianas, entre outros (LUNARDELLI *et al.*, 2014). Contudo, devido a diferenças ainda existentes entre os embriões produzidos *in vivo* e os produzidos *in vitro*, se faz necessário o conhecimento mais aprofundado dos processos fisiológicos que regem a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial (LUNARDELLI *et al.*, 2016), visando não só a otimização da biotécnica reprodutiva em suínos, como também futuramente aplicar tal conhecimento à medicina da reprodução assistida.

A adição de alguns compostos aos meios de cultivo das diferentes espécies *in vitro* tem sido recente objeto de estudo de inúmeros grupos de pesquisadores em busca da obtenção de protocolos mais eficientes na redução do

stress de embriões PIV (WASIELAK *et al.*, 2016; HAJARIAN *et al.*, 2017; SOVERNIGO *et al.*, 2017). Vislumbra-se que nutrientes fisiologicamente disponíveis *in vivo* sejam potencialmente necessários ao bom funcionamento do organismo *in vitro*. No entanto, as diferenças no ambiente, na concentração e nos meios de disponibilização caracterizam desafios substanciais a tais pesquisas.

O ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) é um conjugado de ácido biliar endógeno. Sua utilização tem sido eficaz em tratamentos de doenças degenerativas e processos inflamatórios do sistema nervoso central (ROMERO-RAMIREZ *et al.*, 2017), devido ao seu papel na redução de erros na conformação estrutural de proteínas recém-formadas e seus aglomerados, aliviando stress de organelas como o retículo endoplasmático (RE) e conseqüentemente a apoptose celular (DICKHOUT e KREPINSKY, 2009). Seu efeito em embriões, contudo, ainda é controverso. Algumas pesquisas afirmam que o ácido biliar também melhora as taxas de desenvolvimento de embriões suínos em estágio de pré-implantação (ZHANG *et al.*, 2012a; LIN *et al.*, 2016), enquanto outras indicam efeito positivo no combate ao stress de RE mas nenhuma influência em desenvolvimento e qualidade embrionária em bubalinos (SHARMA *et al.*, 2015).

Outro potencial aditivo é a Colina, um nutriente considerado necessário à dieta humana pelo US Institute of Medicine's Food and Nutrition Board, desde 1998. Sabe-se que a colina é importante para a formação do aminoácido metionina, síntese de neurotransmissores, integridade estrutural e funções de sinalização de membranas assim como no metabolismo de grupos metil (LEERMAKERS *et al.*, 2015), o que poderia trazer grandes benefícios aos embriões cultivados. No entanto, não há registros de estudos avaliando sua influência no meio de maturação de oócitos ou cultivo de embriões no estágio pré-implantação, nem sua interação com TUDCA.

Visando uma possível contribuição à reprodução humana assistida no futuro, o objetivo da presente pesquisa foi, avaliar o efeito da suplementação dos meios de maturação e cultivo embrionário com ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), Colina e a suplementação de ambos simultaneamente no desenvolvimento e na qualidade de embriões suínos produzidos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOTECNOLOGIAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS

2.1.1 Maturação *In Vitro* (MIV)

A PIVE é uma biotécnica utilizada tanto para pesquisa quanto para a reprodução de animais geneticamente superiores das mais diversas espécies, permitindo um entendimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos na maturação e fecundação oocitárias, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário inicial. No início dos anos 90, devido à demanda da comunidade científica para sua utilização em pesquisas e na produção de animais transgênicos, a biotécnica atingiu um grau aceitável de desenvolvimento na espécie suína, com o primeiro nascimento de leitões vivos. No entanto, a eficiência da técnica é ainda muito baixa, comparada a outras espécies (GRUPEN, 2014).

Para que os produtores atinjam as especificações de demanda do mercado, suínos são abatidos antes da puberdade. Assim, ovários oriundos de abatedouros são geralmente coletados de fêmeas pré-púberes cujos oócitos ainda não foram submetidos a ciclos estrais regulares. Pesquisas apontam que a qualidade inerente aos oócitos, assim como a sobrevivência embrionária, aumentam à medida que a fêmea progride do primeiro ao terceiro ciclo estral. Estudos comprovam o fato de a qualidade de oócitos imaturos estar relacionada ao ambiente folicular do qual foram recuperados, diretamente proporcional ao aumento de tamanho do folículo ovariano (BAGG *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências de que a qualidade oocitária pode ser influenciada pela estação reprodutiva, sendo negativamente afetada durante o verão, que corresponde ao período de redução da fertilidade em suínos (BERTOLDO *et al.*, 2010).

Semelhante ao que acontece *in vivo*, a maturação nuclear e citoplasmática do oócito é necessária à ativação ou fecundação e futuro desenvolvimento embrionário *in vitro*. Morfologicamente, a expansão de células do cumulus, grânulos homogêneos preenchendo o citoplasma e extrusão do primeiro corpúsculo polar são considerados bons indicativos de maturação oocitária. Em espécies mamíferas, a maturação nuclear, que corresponde a condensação de cromatina, quebra da vesícula germinativa levando à até a metáfase II e posterior

bloqueio, pode ser provocada quando os oócitos são retirados dos folículos antrais e cultivados *in vitro* (KHARCHE e JHA, 2016).

No entanto, na espécie suína observava-se uma incapacidade de oócitos maturados *in vitro* de formarem os pronúcleos feminino e masculino após fecundação, apresentando baixos índices de descondensação de cabeça do espermatozoide e formação de pronúcleo masculino, devido à ausência de fatores citoplasmáticos oocitários necessários a esse processo, indicando uma deficiência na maturação *in vitro* (MATTIOLI *et al.*, 1988). Outro obstáculo enfrentado ainda na atualidade é a polispermia, possivelmente devido a falha na reação cortical oocitária e reduzida espessura da zona pelúcida, entre outros fatores oocitários (GRUPEN, 2014).

Diferentemente de outras espécies, a maturação *in vitro* (MIV) para oócitos suínos dura um período relativamente longo, de aproximadamente 40 horas. Tal característica facilita a temporária adequação dos meios de maturação de acordo com as necessidades do oócito em constante mudança. Inicialmente, os meios de MIV, consistiam em sua maioria, de TCM-199 suplementado com soro fetal bovino (SFB), hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), além de diversos fatores de crescimento. Contudo, o tempo que cada oócito levava para atingir o estágio de metáfase II variava substancialmente entre eles. Assim, com o objetivo de melhorar o protocolo de maturação por meio da mimetização do ambiente *in vivo*, o AMP cíclico e o fluido folicular suíno passaram a ser adicionados às fórmulas de meio para MIV, somente durante as primeiras 20 horas de MIV, inibindo reversivelmente a progressão meiótica, proporcionando a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática e melhor desenvolvimento embrionário subsequente (GRUPEN, 2014; KHARCHE e JHA, 2016)

2.1.2 Ativação Partenogenética

A partenogênese tem sido amplamente utilizada na produção *in vitro* de embriões como modelo de estudo. Por reduzir a variável do espermatozoide, possibilita uma melhor avaliação das condições e do estresse causado pelo ambiente *in vitro* e melhor compreensão da regulação dos ciclos celulares e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que são produzidos em

condições experimentais relativamente mais simples e que é submetida a menos restrições éticas que embriões fecundados (LEE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2012b).

Mesmo que a partenogênese não seja um processo ao qual o oócito é submetido naturalmente em mamíferos, ela pode ser induzida por diferentes meios. Os primeiros estudos mostrando a ativação partenogenética foram realizados em coelhos ao redor dos anos 30, com o nascimento de uma coelha viva em 1940 (PINCUS e SHAPIRO, 1940). Desde então, inúmeras pesquisas têm confirmado a possibilidade e sucesso da ativação partenogenética até o estágio pré-implantação em diversas espécies, mas nenhuma confirmando a possibilidade de sobrevivência além desse período, somente por meio da ativação. Isso deve-se ao fato de que mamíferos possuem vários genes *imprinted*. Assim, um mamífero criado por partenogênese possuiria o dobro de genes maternos *imprinted* e não possuiria os genes paternos *imprinted*, levando a anomalias de desenvolvimento (KHARCHE e JHA, 2016).

A ativação propriamente dita, corresponde à libertação do oócito do bloqueio meiótico em que se encontra (metáfase II), permitindo sua progressão da meiose. O procedimento é semelhante ao desenvolvimento de embriões produzidos por FIV, substituindo o passo da fecundação por ativação. Durante décadas, pesquisas têm sido realizadas utilizando estímulos químicos, choques de temperatura, estímulos elétricos, etc. Atualmente, estímulos elétricos são os mais utilizados para ativação de clones (o que promove o influxo de cálcio extracelular, mesmo mecanismo promovido pela exposição ao etanol). Já para o tratamento de oócitos maturados, protocolos com ionomicina e estrôncio (que liberam cálcio citoplasmático), cicloheximide ou puromicina (inibidores de síntese proteica) e Citocalasina B (um inibidor de polimerização de microtúbulos, que impede a liberação do segundo corpúsculo polar e leva ao desenvolvimento diplóide) proporcionam melhores taxas de blastocisto *in vitro* (LEE *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2005; KHARCHE e JHA, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Além da ativação partenogenética, a fecundação *in vitro* (FIV) é outra possibilidade na PIVE. Contudo, em suínos, observa-se a alta incidência de polispermia. Um obstáculo à solução de tal desafio é o fato de embriões polispérmicos apresentando três ou quatro pronúcleos ainda serem capazes de se desenvolverem com as mesmas taxas de blastocistos (HAN *et al.*, 1999).

A clonagem também representa uma possibilidade de produção de animais geneticamente superiores. A técnica consiste em enucleação oocitária seguida pela transferência do núcleo da célula somática de escolha ou da célula em sua totalidade, ao citoplasma receptor como ilustrado na Figura 1. Posteriormente, o embrião reconstruído é ativado artificialmente de maneira semelhante à partenogênese (GRUPEN, 2014). Entretanto, a eficiência da técnica ainda é de menos de 5%, devido ao que se acredita estar relacionado a deficiências nucleares da reprogramação genética e epigenética (DICKS *et al.*, 2015).

2.1.3 Cultivo *In Vitro* (CIV)

Sabe-se que no trato reprodutivo de fêmeas suínas, embriões são deslocados do oviduto para os cornos uterinos no estágio de quatro a oito células, o que corresponde ao período de dois dias após a fecundação. Com o objetivo de compreender e posteriormente mimetizar *in vitro* o ambiente uterino *in vivo*, avaliações têm sido realizadas com respeito às concentrações de substratos energéticos e proteicos. Estudos demonstram, por exemplo, crescente concentração e utilização de glicose pelo embrião à medida que ele progride de zigoto para blastocisto. Assim, a mudança da concentração de glicose no meio *in vitro* após 48 horas parece fazer sentido. Todavia, a alta eficiência de um meio de CIV atualmente utilizado durante quase todo o período de sete dias de cultivo (porcine zygote médium - PZM), desafia a lógica, mantendo o desenvolvimento nos primeiros 5 dias, em embriões produzidos *in vivo*, por FIV, clonagem e partenogênese (GRUPEN, 2014).

No entanto, resultados obtidos com embriões suínos PIV ainda demonstram uma variedade de estresses celulares e danos ao desenvolvimento embrionário (LIN *et al.*, 2016), incluindo modificações na expressão gênica via metilação de DNA, provavelmente devido às condições subótimas de cultivo (DESHMUKH *et al.*, 2011). Assim, apesar dos avanços na PIVE de suínos, o melhor desenvolvimento das condições de cultivo será essencial para o progresso das biotécnicas da reprodução assistida.

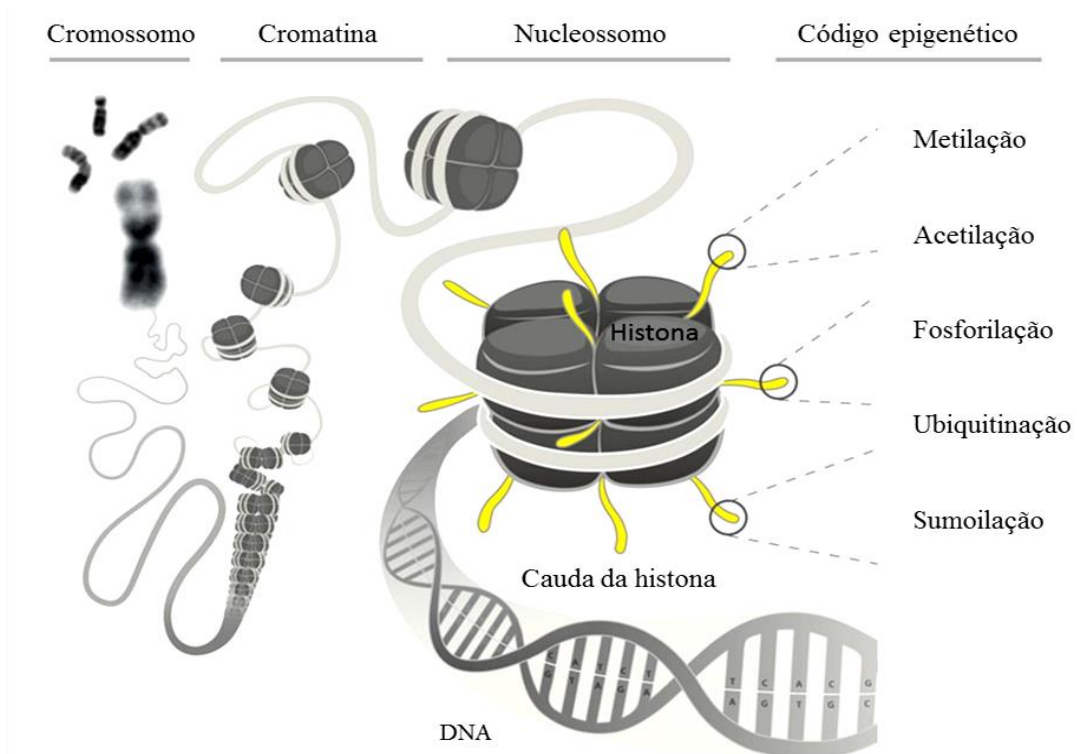
2.2 EPIGENÉTICA

2.2.1 Introdução À Epigenética

Os mecanismos epigenéticos são sistemas de modificações da cromatina pelas quais a expressão gênica de uma célula é alterada, sem que haja alteração da sequência de DNA, que incluem modificações reversíveis de histonas, RNAs não-codificantes e Metilação de DNA (FRISO *et al.*, 2017).

Em núcleos de células eucarióticas, a informação genética está contida em cromossomos, estruturas formadas por filamentos de DNA dupla-fita, ou seja, de cromatina, enrolada de maneira altamente eficaz em torno de nucleossomos (Figura 1). Os nucleossomos, por sua vez, são as unidades funcionais da cromatina compostos por 4 pares de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e uma histona estrutural (H1), responsáveis pelo dinamismo e acessibilidade de aproximadamente 146 pares de base enrolados à sua volta, à replicação e transcrição (LI *et al.*, 2013).

Figura 1. Representação esquemática da extensa estrutura do código genético armazenado em células eucarióticas.



Fonte: Figura adaptada de Keating *et al.*, (2016)

Modificações pós-traducionais em caudas terminais de histonas são fundamentais à regulação da expressão gênica, remodelando a estrutura e modificando a função da porção de cromatina envolvida. Dentre as modificações de histonas estão metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. A acetilação e metilação das histonas são mantidas pelo equilíbrio entre acetiltransferases e deacetilases, metiltransferases e demetilases, respectivamente (HE e COLE, 2015; FRISO *et al.*, 2017).

A cromatina pode ser encontrada em dois estados diferentes: eucromatina, quando se encontra acessível à transcrição; e heterocromatina, quando está inacessível. A acetilação é geralmente responsável por favorecer uma estrutura permissiva da cromatina aos fatores de transcrição, como H3K9ac, H4K12ac e H3K4me3. Já as metilações são consideradas marcas repressivas como H3K27me3, H3K9me2 e H4K12me. Cada aminoácido comporta um certo número de radicais metil, por exemplo, cada lisina aceita de um a três grupos metil (mono-, di- e trimetilação), enquanto a arginina aceita apenas mono- ou dimetilação (RIVERA e ROSS, 2013).

No entanto, as modificações de histonas podem não ser previsíveis o suficiente para que seus padrões sejam considerados um “código”. Ao contrário, o contexto genômico e fisiológico parecem exercer importante papel na determinação do efeito que modificações individuais produzirão na função da cromatina. Assim, algumas metilações em lisinas podem também estimular a transcrição, como em H3K4me, H3K36me e H3K79me (PRATHER *et al.*, 2009).

MicroRNAs, são RNAs não-codificantes de aproximadamente 18-25 pares de bases capazes de modular a expressão gênica, agindo como repressores pós-transcricionais da transcrição de genes, silenciando seus RNAs mensageiros. Durante a embriogênese, sua função está estrategicamente relacionada ao destino das células e é necessário à diferenciação de linhagens celulares (PRATHER *et al.*, 2009; FRISO *et al.*, 2017). Já a metilação de DNA é uma modificação epigenética estabelecida e mantida pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), envolvida na compactação da cromatina e formação da heterocromatina alterando a expressão gênica de maneira repressiva (RIVERA e ROSS, 2013).

Uma vez que modificações epigenéticas podem ser alteradas por fatores ambientais, a epigenética tem sido considerada um mecanismo de extrema importância na regulação de inúmeras doenças de etiologias desconhecidas, nas quais a exposição ambiental a fatores nutricionais, por exemplo, exerce papel crucial.

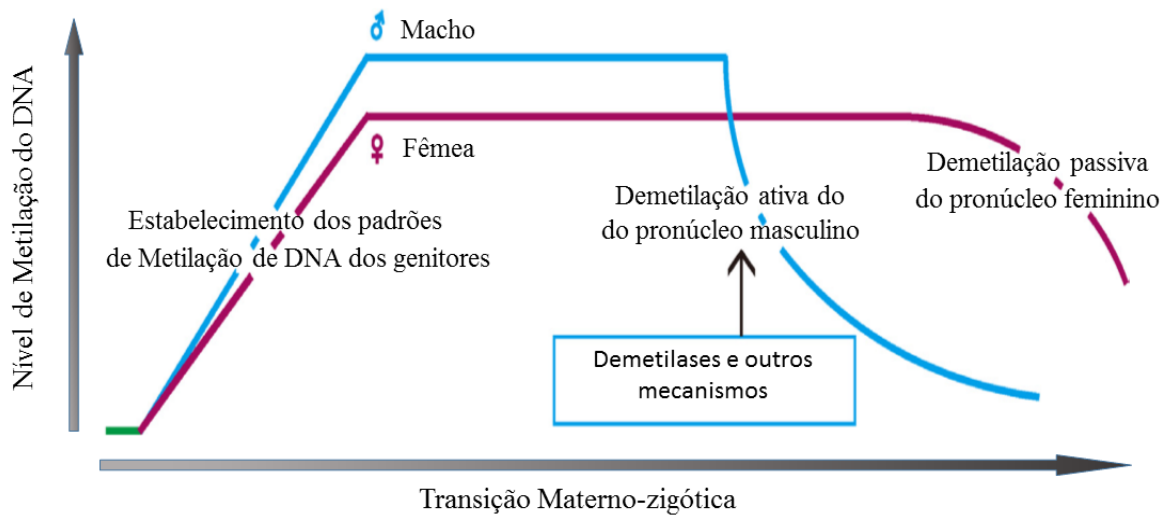
Assim, a epigenética é uma área de estudo em destaque atualmente nas pesquisas de desenvolvimento embrionário, envelhecimento, cânceres, doenças inflamatórias crônicas, obesidade, diabetes, doenças imunes e cardiovasculares (FRISO *et al.*, 2017).

2.2.2 Epigenética No Desenvolvimento Embrionário

Modificações de histonas são extremamente dinâmicas durante a oogênese. Por exemplo, sabe-se que a expressão de acetiltransferases e acetilações de histonas aumentam durante o crescimento oocitário. Outras modificações, como a trimetilação de H3K4 (marcação permissiva) e H3K9 (marcação repressiva), também aumentam à medida em que o oócito cresce (BURTON e TORRES-PADILLA, 2010). Para assegurar que um embrião seja competente e capaz de atingir certos estágios de desenvolvimento, uma regulação dinâmica do genoma, proteoma e transcriptoma oocitário é necessária, tanto antes quanto depois da fecundação. Durante o desenvolvimento do oócito, a quebra da vesícula germinativa indica seu comprometimento com a maturação e está associada à uma redução substancial da atividade transcricional. Pesquisas evidenciam o dinamismo e a presença assimétrica das marcações de histonas entre os pronúcleos materno e paterno. Histonas hiperacetiladas, por exemplo, são incorporadas ao genoma paterno e devem ser responsáveis por sua alta atividade transcricional em comparação ao pronúcleo materno (LI *et al.*, 2013).

A metilação de DNA é crucial para o desenvolvimento e reprogramação do embrião, expressão gênica, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e regulação do processamento de íntrons (*splicing*) do RNA mensageiro. Em mamíferos, ocorrem duas ondas de demetilação global do DNA. A primeira, é observada durante a migração das células germinativas primordiais do saco vitelino para a crista genital e a segunda ocorre logo após a fecundação (HAJKOVA *et al.*, 2010). O DNA paterno é demetilado de forma ativa, enquanto o genoma materno perde suas marcações passivamente a cada divisão celular (Figura 2), encontrando-se completamente demetilado ao estágio de blastocisto. Tais ondas de demetilação são imprescindíveis para a transição epigenética materno-zigótica promovendo o estabelecimento de uma nova programação epigenética do genoma (RIVERA E ROSS, 2013).

Figura 2. Dinâmica dos processos de metilação e demetilação do DNA, de gametas a zigoto.

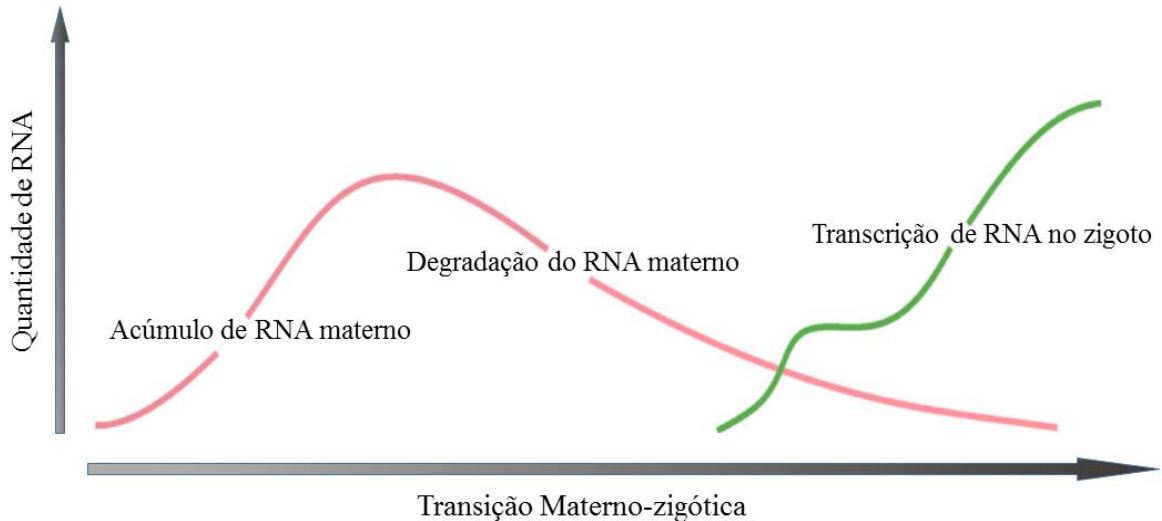


Fonte: Figura adaptada de Li *et al.*, 2013.

2.2.2.1 Transição materno-zigótica

À fecundação, gametas haploides e altamente diferenciados se fundem para a formação de um zigoto totipotente, no qual ambos genomas sofrem intensas e dinâmicas modificações. O sucesso do desenvolvimento embrionário requer um extenso bloqueio transcricional e degradação de RNA materno, promovendo a remoção de modificações epigenéticas específicas de gametas para que o zigoto possa assumir o controle e a transcrição de seu próprio genoma (Figura 3). Durante tal período de quiescência transcricional, mudanças no transcriptoma e proteoma do zigoto podem ocorrer pela interação e transporte molecular intracelular com células do cumulus circundantes, ou pela regulação gênica pós-transcricional exercida pelos micro RNAs e RNAs mensageiros. A capacidade de transcrição gênica do embrião apenas é readquirida quando ocorre a ativação do genoma embrionário, também chamada transição materno-zigótica, no período de 4-8 células, tanto em humanos quanto em suínos (DESHMUKH *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; RIVERA e ROSS, 2013). Por sua extrema complexidade e envolvimento de inúmeros processos epigenéticos, tal período do desenvolvimento representa um gargalo nos índices de produção embrionária *in vitro*, o qual boa parcela dos embriões não consegue transpor.

Figura 3. Durante a oogênese, o oócito acumula grande quantidade de RNA materno. Após a fecundação, o RNA materno é degradado gradualmente nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário. A transcrição do genoma embrionário propriamente dita é ativada no advento da transição materno-zigótica, no estágio de 4-8 células.



Fonte: Figura adaptada de Li *et al*, 2013.

2.2.2.2 Diferenciação celular no blastocisto

Como se sabe, duas células gaméticas diferenciadas são submetidas a diversas modificações durante a fecundação permitindo que o resultado de sua fusão se torne um organismo unicelular. O zigoto é uma célula totipotente, uma vez que é capaz de dar origem a um organismo completo formado por diversos tipos de tecidos e órgãos de linhagem embrionária e extraembrionária (WU e SCHÖLER, 2016).

Durante o desenvolvimento pré-implantação, o zigoto sofre clivagem de sua única célula, dando origem a um número exponencialmente crescente de células. No estágio de mórula, o embrião então compacta-se e polariza-se com a aparição das junções comunicantes entre as células. À medida em que se dividem, as células perdem sua totipotência e se tornam pluripotentes, quando constituindo os grupos de células mais internas e células mais externas do blastocisto, dão origem às duas primeiras linhagens celulares: massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TE). O primeiro grupo futuramente dará origem ao epiblasto e endoderma primitivo,

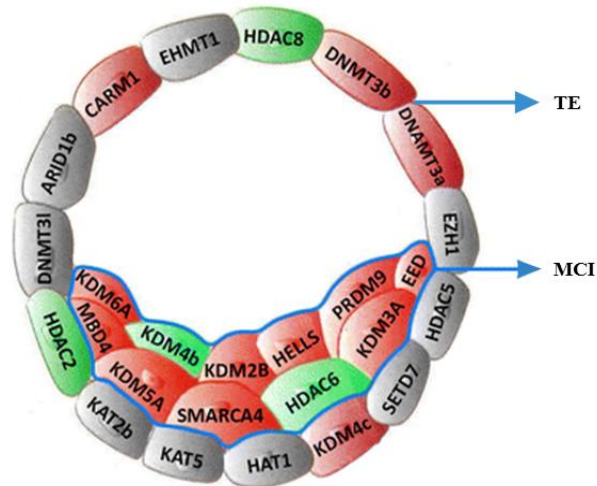
enquanto o último grupo dará origem à placenta (TOYOOKA *et al.*, 2016; WU e SCHÖLER, 2016).

Entre diversos modelos propostos, por volta dos anos 60 hipotetizou-se que a segregação das linhagens fosse conduzida pela posição em que a célula se encontrava: células na porção mais exterior dariam origem ao trofotoderma e as da porção mais interior, à massa celular interna. De acordo com esse modelo, a localização da célula determina sua exposição a diferentes ambientes e intensidade de contato celular, resultando em diferentes destinos. Os principais reguladores transcricionais das duas linhagens, identificados em mamíferos, incluem os genes Oct4, Nanog e Sox2 para a massa celular interna e Cdx2, Eomes, Gata3 e Tead4 para o trofotoderma (WU e SCHÖLER, 2016).

De acordo com diversas pesquisas, o Oct4 materno é considerado como um dos genes mais importantes à iniciação e estabelecimento da totipotência no zigoto e pluripotência no blastocisto. Juntamente com o Cdx2, exercem função-chave no direcionamento da MCI e no TE. Em blastocistos de mamíferos, como camundongos, humanos, bovinos e suínos, o Cdx2 é expresso especificamente no TE, enquanto o Oct4 é expresso em ambos MCI e TE por um período curto ou longo, espécie-específico, e posteriormente restringido à MCI. Estudos em embriões suínos demonstram que o Cdx2 promove a repressão do Oct4 pós-tradução, principalmente via aumento de sua exportação para fora do núcleo e subsequente degradação por proteossomos no citoplasma (BOU *et al.*, 2016).

Considerando a epigenética como principal fator regulador da pluripotência e diferenciação das células, um estudo analisou o perfil de expressão de 129 reguladores epigenéticos envolvidos nos dois processos, dos quais 13 estavam hiper-regulados e quatro hiporregulados (Figura 4). Os genes hiper-regulados na MCI incluíam genes responsáveis por ativação transcricional (KDM3A, SMARCA4, PRDM9 e KDM6A) e repressão transcricional (HELLS, EED, KDM2B, MBD4 e KDM5A), ao mesmo tempo em que os genes hiper-regulados no TE também codificavam repressão (DNMT3A, DNMT3B e CARM1) ou ativação transcricional (KDM4C), evidenciando a presença simultânea de ativação e repressão transcricional tanto em MCI quanto em TE e uma possível mudança transcricional entre MCI e TE posteriormente (HOSSEINI *et al.*, 2015).

Figura 4. Figura esquemática dos genes envolvidos na estimulação (em MCI) e repressão (em TE) da pluripotência. Genes em vermelho encontram-se hiper-regulados e genes em verde encontram-se hiporregulados.



Fonte: Figura adaptada de Hosseini et al., 2015.

Comparando embriões bovinos e murinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, pesquisadores observaram uma redução nas diferentes especificações transcricionais expressas entre MCI e TE. Outra possibilidade seria de os embriões produzidos *in vitro* apresentarem certo atraso em seu desenvolvimento, o que implicaria na ausência de diferenças entre as duas linhagens quando coletados com o mesmo tempo de desenvolvimento de embriões *in vivo*. Assim, os genes que apresentaram disparidade em sua expressão quando *in vitro*, correspondiam a genes envolvidos na manutenção da pluripotência e diferenciação celular, dentre eles o DNMT1, GADD45, CARM1, ELF5 HDAC8, CCNB1, KDM6A, PRDM9, CDX2, ARID3A, IL6, GADD45A, FGFR2, PPP2R2B e SMARCA2, destacando a vasta influência do ambiente *in vitro* na expressão gênica e no desenvolvimento embrionário (GIRITHARAN *et al.*, 2012; HOSSEINI *et al.*, 2015).

2.2.3 Nutrientes E A Epigenética

Devido à grande influência do ambiente nos mecanismos epigenéticos, existe um crescente interesse da comunidade científica de compreender mais profundamente a regulação epigenética da expressão gênica determinada por

diferentes exposições a fatores ambientais como por exemplo os nutrientes (TAMMEN *et al.*, 2013).

Como se sabe, a metilação de DNA é uma das modificações epigenéticas mais estudadas que consiste na transferência de um grupamento metil (-CH₃) à citosina do dinucleotídeo do DNA, catalisada por diversas metiltransferases alterando a conformação da cromatina. Nutrientes e componentes bioativos da alimentação podem alterar as metilações de DNA global e gene-específicas tanto por afetarem a função das DNMTs quanto pelo fornecimento de grupos metil. Estudos têm demonstrado, portanto, que os nutrientes modulam a expressão gênica via modificações na estrutura dos cromossomos, influenciando as condições de higidez durante o desenvolvimento embrionário inicial, diferenciação celular e subsequentes crescimento e envelhecimento (FRISO *et al.*, 2017).

O metabolismo de um carbono regula o recebimento e a doação de radicais metil advindos de vitaminas e nutrientes que servem como co-fatores, dos quais o folato, vitaminas b6 e 12, metionina e colina exercem papel de grande importância (ACOSTA *et al.*, 2016). Doadores e receptores de grupo metil ocupam posição de grande importância não só na regulação de mecanismos como metilação de DNA e histonas, como também na atuação dos micro RNAs não codificantes, englobando, portanto os maiores fenômenos epigenéticos no genoma mamífero. Assim, vislumbra-se grande enriquecimento de pesquisas com cultivo de células e embriões, modelos animais e estudos em humanos a partir do melhor entendimento do *link* entre nutrientes e a epigenética, colaborando possivelmente para intervenções nutricionais visando manipular condições a nível molecular e eventualmente tratamentos e prevenções de doença (FRISO *et al.*, 2017).

2.3 COLINA

A colina é um dos nutrientes essenciais para a células animais, necessária à síntese dos principais fosfolípidios de membrana, a fosfatidilcolina e a esfingomielina. Grande quantidade de colina precisa ser absorvida e fosfatidilcolina sintetizada para que novas membranas sejam formadas. Além disso, como precursora da esfingomielina, é necessária durante o desenvolvimento na mielinização de axônios, divisão celular, expansão tecidual e transporte lipídico. Como precursora da acetilcolina, é essencial à adequada organização e função do cérebro em

desenvolvimento por meio de seus efeitos na neurogênese, desenvolvimento do hipocampo, memória durante a vida pós-fetal e formações sinápticas. Já a betaina, metabólito oxidado da colina, é fonte de grupamentos metil para a produção de metionina, que serve de substrato para metiltransferases de DNA e de histonas, sendo, portanto, necessária ao estabelecimento e manutenção do epigenoma fetal (YARA *et al.*, 2015).

A colina é um nutriente solúvel em água adquirido por meio da dieta e a ingestão insuficiente pode causar deficiência de colina, especialmente sob condições de maior requerimento, como durante a gestação e o aleitamento. A deficiência de colina no período perinatal de suínos afeta a composição do leite materno, sendo potencialmente responsável por alterações de neurodesenvolvimento (MUDD *et al.*, 2016).

Em camundongos *knock-out* para colina quinase, enzima responsável pela catalisação da fosforilação da colina durante a formação de fosfatidilcolina, estudos demonstraram a ocorrência de perda embrionária na prenhez a partir do período de blastocistos no desenvolvimento embrionário inicial (WU *et al.*, 2008). Em pesquisa realizada em bovinos, observou-se que modificando o meio de criopreservação de embriões por meio da substituição de cloreto de sódio por cloreto de colina aumentou a sobrevivência embrionária pós-descongelamento até o nascimento (LIM *et al.*, 2008).

2.3.1 Influência Da Colina Na Epigenética

Assim como os outros nutrientes envolvidos no metabolismo de um carbono, a colina afeta sensivelmente modificações de histona e de DNA e sua disponibilidade é diretamente influenciada pela dieta. A deficiência de colina na dieta altera metilação global do DNA assim como em genes específicos no hipocampo fetal, afetando o desenvolvimento neuronal de fetos murinos; hiper-regulando marcações repressivas como H3K9me2 e H3K27me3 e hiporregulando marcações permissivas como H3K4me2 no fígado, provocando o silenciamento de diversos supressores de tumores contribuindo para o desenvolvimento de câncer hepático e sendo inclusive modelo de estudos por indução de hepatocarcinogênese; favorecendo quebras na fita de DNA e supressão dos genes de reparo; alterando a regulação do ciclo celular; resultando em anomalias de desenvolvimento embrionário pré-implantação e morte

embrionária (POWELL *et al.*, 2005; DAVISON *et al.*, 2009; ZEISEL, 2012; ACOSTA *et al.*, 2016; FRISO *et al.*, 2017).

Ainda, a ingestão materna de colina pré-natal previne mudanças na fosforilação oxidativa e no metabolismo da metionina apresentadas por modelos animais com doença de Wilson (MEDICI *et al.*, 2016), assim como previne as alterações de histonas (redução de H3K4me2 e 3 e aumento de H3K9me2) encontradas em neurônios expostos ao etanol no período prenatal (BEKDASH *et al.*, 2013).

2.4 ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

As proteínas são responsáveis pelos processos moleculares de um organismo e são vitais à sua sobrevivência. Suas funções são dependentes da estrutura em que se apresentam, que podem ser: primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é construída por meio da montagem de aminoácidos ditada pelo RNA mensageiro e realizada pelos ribossomos no retículo endoplasmático. A identidade dos aminoácidos é o que determina a estrutura final de uma proteína e sua função. Assim, após a síntese dos aminoácidos, fortes interações entre a sequência específica dos aminoácidos e o ambiente provocam o dobramento e montagem da proteína em uma conformação secundária, terciária ou quaternária mais estável (UPAGUPTA *et al.*, 2017).

O retículo endoplasmático é uma organela altamente especializada que forma uma rede extensa responsável pela síntese de aproximadamente um terço do proteoma de organismos eucariotos, incluindo proteínas secretórias, de membrana e para o próprio lúmen do retículo endoplasmático. Além disso, é também responsável pelo armazenamento de cálcio juntamente com a mitocôndria, síntese de colesterol e inúmeros lipídios de membrana (SHARMA *et al.*, 2015; SOZEN e OZER, 2017; UPAGUPTA *et al.*, 2017).

O retículo pode ser morfológicamente dividido em duas estruturas interconectadas: retículo endoplasmático rugoso (RER; ou nuclear) e retículo endoplasmático liso (REL; ou periférico). O RER contém compartimentos semelhantes a sacos achatados e ribossomos associados à sua membrana externa, que próximos ao núcleo celular, realizam a tradução dos aminoácidos de forma rápida e eficiente. O REL, por sua vez, é caracterizado por diversas estruturas tubulares, onde ocorre a

biossíntese de esteroides e ácidos graxos, neutralização de drogas e armazenamento de Ca^{2+} . Todavia, apesar de suas características e funções distintas, RER e REL são compartimentos interconectados de uma mesma organela, que permitem o acesso de biomoléculas, como as proteínas, a toda a sua extensão (VAN VLIET e AGOSTINIS, 2017).

A correta montagem de proteínas não é somente um processo crucial para a manutenção da homeostase como também altamente complexo demandando grande quantidade de energia, no qual enzimas de montagem e o potencial oxidante do ambiente exercem importante assistência. Assim, o RE desenvolveu ao longo do tempo o ambiente ideal para a montagem das proteínas, na presença de diversos fatores celulares, chamados de maquinaria de controle de qualidade, responsáveis pelo dobramento adequado das proteínas, seu perfeito funcionamento, sua concentração e localização adequadas em situações normais e sob estresse ambiental. Dentre esses fatores encontram-se chaperonas, lecitinas, calreticulina, calnexina e enzimas dedicadas a modificações pós-traducionais como formação de pontes bissulfeto, além de oxiredutases (VAN VLIET E AGOSTINIS, 2017; VINCENZ-DONNELLY e HIPPI, 2017).

Sabe-se que proteínas secretórias montadas de maneira anômala e sua agregação são potencialmente tóxicas para as células. Com o objetivo de evitar interações e agregações aberrantes de proteínas, as chaperonas se ligam a proteínas do substrato, por meio do reconhecimento de aminoácidos hidrofóbicos expostos nas conformações aberrantes, facilitando a montagem e correta remontagem, evitando agregação e às vezes até dissolvendo agregados proteicos (VINCENZ-DONNELLY e HIPPI, 2017).

Em proteínas de sequência longa, diferentes regiões da sequência não estão próximas o suficiente para serem submetidas às forças de aproximação responsáveis pela manutenção da estrutura apropriada, acarretando em uma montagem anômala que favorece um estado termodinâmico baixo. Tal conformação é geralmente menos estável, e por apresentar um estado termodinâmico mínimo, representa um maior desafio na sua correção. Nesse estado, regiões hidrofóbicas da proteína, que deveriam estar contidas no interior da estrutura, encontram-se expostas ao ambiente aquoso. Na tentativa de evitar sua interação com o meio, a estrutura se liga a outras porções hidrofóbicas da mesma proteína e de outras proteínas,

provocando a formação de agregados proteicos (UPAGUPTA *ET AL.*, 2017; VINCENZ-DONNELLY e HIPPI, 2017).

A montagem anômala das proteínas e subsequente agregação é uma condição natural e frequente em células mamíferas. A quantidade de agregados é mantida relativamente baixa por chaperonas, moléculas que proporcionam ambiente adequado e energia suficiente para que as sequências longas de aminoácido sejam montadas ou remontadas em estruturas favoráveis. Em certas condições fisiológicas ou patológicas em que há a interrupção do funcionamento adequado dos mecanismos de controle de qualidade do RE, ocorre o acúmulo de proteínas de estrutura anômala e seus agregados provocando o estresse da organela e desencadeando um complexo mecanismo adaptativo de resposta ao estresse (SOZEN e OZER, 2017).

A resposta ao estresse é constituída por uma cascata de reações com o objetivo de sobreviver às perturbações causadas por fatores estressantes como depleção de Ca²⁺, stress oxidativo, privação de glicose e alteração de pH que levam ao acúmulo de agregados proteicos, e restaurar a homeostase celular (LATHAM, 2015; SHARMA *et al.*, 2015; VAN VLIET e AGOSTINIS, 2017). O processo é iniciado por proteínas sensíveis/mediadoras (PERK, IRE1 e ATF6) localizadas nas membranas do RE por meio da ativação de mecanismos de sinalização intracelulares pró-sobrevivência que estimulam a expressão gênica para produção de chaperonas, pausam a síntese proteica convencional e aumentam a produção de lipídios de membranas, acelerando o processamento das proteínas anômalas acumuladas no RE (SAI *et al.*, 2016).

Durante prolongado estresse de RE ou frente à impossibilidade de restaurar sua homeostase, a sinalização da PERK é redirecionada de pró-sobrevivência para pró-apoptótica, ou seja, à promoção da morte celular programada por ativação da caspase, com o objetivo de proteger o organismo hospedeiro da célula afetada. Entretanto, quando em grande extensão, a apoptose por estresse de RE tem sido apontada como causa de aproximadamente 50 diferentes doenças por perda de função tecidual, como desordens degenerativas, demência, amiloidose, fibrose cística, diabetes tipo II, doenças hepáticas, renais e pulmonares, cânceres e infertilidade masculina (UPAGUPTA *et al.*, 2017; VINCENZ-DONNELLY e HIPPI, 2017).

2.4.1 Estresse De Retículo Endoplasmático No Desenvolvimento Embrionário

O desenvolvimento de oócitos de alta qualidade e, por conseguinte, embriões de alta qualidade está intimamente ligado à correta comunicação entre o oócito em desenvolvimento, as células do cúmulus e outras células do folículo ovariano (HAO *et al.*, 2014). Portanto, o estresse a que folículos são submetidos pode também, indiretamente, influenciar a viabilidade oocitária e embrionária.

Oócitos e embriões são submetidos a inúmeros tipos de estresse durante a produção *in vitro*, resultando na redução de sua viabilidade (SHARMA *et al.*, 2015). A progressão de oócitos e de embriões na fase inicial de clivagem é principalmente controlada pelo recrutamento, tradução e degradação de RNA mensageiro materno no oócito em seu devido tempo. Assim, mesmo que a resposta ao estresse de RE possa promover a sobrevivência da célula e do embrião, isso ocorre às custas de uma intervenção na temporalidade normal dos eventos regulados por mecanismos pós-transcricionais, o que pode desencadear o bloqueio do desenvolvimento, incapacidade de eclosão, defeitos nas divisões celulares e apoptose na MCI. Ainda, no caso da ativação da apoptose no embrião inicial, células danificadas que não podem ser recuperadas pela resposta ao estresse são eliminadas com o intuito de proteger o restante do organismo, o que para um embrião de poucas células significa uma perda substancial de células e redução no seu potencial de desenvolvimento (LATHAM, 2015).

Sabe-se que embriões não possuem mecanismos regulatórios de osmolaridade como células somáticas e dependem de aminoácidos para exercerem a função de osmólitos orgânicos. O estresse osmótico tem consequências graves em embriões durante o desenvolvimento inicial, incluindo bloqueio de desenvolvimento em condições sub-ótimas de cultivo. Assim, a deficiência de aminoácidos não só afeta o metabolismo proteico como também compromete o mecanismo de osmoregulação e de transporte de moléculas do RE para o complexo de Golgi (LATHAM, 2015).

Zigotos e embriões possuem ainda capacidade limitada de regular o pH intracelular, tornando-os altamente susceptíveis ao ambiente. Quando cultivados em meio alcalinizado ou levemente ácido, é possível observar o efeito do estresse de RE na transcrição gênica, direcionamento de linhagem celular, sobrevivência celular e programação do desenvolvimento fetal futuro (ZANDER *et al.*, 2006; ZANDER-FOX *et al.*, 2010).

Sabe-se que o excesso de glicose também pode ser altamente tóxico às células e embriões. O mecanismo pelo qual a hiperglicemia promove um aumento nas espécies reativas de oxigênio é por intermédio do estresse de RE. Esse quadro encontra-se presente tanto na hiperglicemia aguda, quanto na hiperglicemia crônica (WALSH *et al.*, 2016). Assim, a exposição temporária a concentrações elevadas de glicose *in vitro*, ou a formulações de meio com maiores níveis de glicose utilizadas antigamente, assim como a exposição do oócito e embrião à hiperglicemia materna, provoca impactos negativos à meiose no oócito, metabolismo mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio, expressão gênica e metabolismo energético no embrião (LATHAM, 2015).

2.4.2 Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular programada, processo fisiológico cujo objetivo é a manutenção da saúde do organismo como um todo por meio da eliminação de células que já cumpriram seu ciclo e envelhecera ou células danificadas por patógenos ou condições do meio. A apoptose é caracterizada pela ativação extremamente ordenada de mecanismos que levam ao término da vida de determinada célula por modificações morfológicas e bioquímicas específicas na célula em processo de morte, incluindo retração celular, condensação e fragmentação da cromatina, formação de protuberâncias nas membranas e perda de adesão às células vizinhas ou à matriz extracelular. Dentre as mudanças bioquímicas encontram-se fragmentação de DNA e proteólise (OUYANG *et al.*, 2012).

Inúmeros são os fatores que podem ativar a apoptose nas células, dentre eles estão a radiação ionizante, terapia fotodinâmica, ativação de receptores de morte celular, estresse oxidativo, liberação de citocromo pela mitocôndria, deficiência de fatores de crescimento, que em geral levam a danos no DNA e desordens na progressão do ciclo celular. Tais fatores podem ser divididos em dois grupos distintos: fatores endógenos ou intracelulares, dos quais faz parte o dano de DNA; e extrínseco ou extracelular, dos quais faz parte a ativação dos receptores de morte (BORYS *et al.*, 2017).

Existem diferentes tipos de mecanismos de sinalização da apoptose, que geralmente envolvem a ativação de caspases. Caspases são enzimas da famílias das proteases, liberadas inativas no citoplasma e que podem fazer parte de um grupo

iniciador (caspases 2, 8, 9 e 10), efetor (caspases 3, 6 e 7) ou inflamatório (caspases 1, 4 e 5). Além dessas, existe a caspase 12, localizada na face citoplasmática do retículo endoplasmático, que sinaliza exclusivamente o estresse de RE. Na presença de proteólise são ativadas e por meio de uma cascata de sinalizações levam à morte celular (ULUKAYA *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015; BORYS *et al.*, 2017).

O mecanismo induzido por stress de RE, especificamente, é resultado do influxo anormal de Ca^{2+} , excessivo estresse oxidativo e acúmulo de proteínas no retículo que levam ao processo de apoptose mitocondrial. Quando iniciado, os canais mitocondriais se abrem e liberam aproximadamente 40 tipos diferentes de proteínas, como o citocromo c. Uma vez no citoplasma, o citocromo c se liga a fatores ativadores de apoptose que se ligam, por sua vez, à caspase 12 ativando a 9 iniciadora, que ativa a caspase 3 efetora, bloqueando a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e ativando DNases, provocando a condensação e fragmentação do DNA (ULUKAYA *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015; BORYS *et al.*, 2017).

Quando há fragmentação do DNA (deleção de nucleotídeos ou quebra de fita simples ou dupla de DNA) por irradiação ou presença de substâncias deletérias no meio, a proteína p53 presente no citoplasma como monômero bloqueia a progressão do ciclo celular com o objetivo de proporcionar à célula tempo suficiente para a reparação do DNA. Se o dano for irreversível, a p53 forma um pentâmero que funciona como sinalização ao aumento da expressão de Bax. A apoptose, nesse caso, é então induzida pelo desequilíbrio entre Bax e Bcl-2, cuja função anti-apoptótica é exercida por inibição de caspases (ULUKAYA *et al.*, 2011)

Morfologicamente, o primeiro estágio da apoptose corresponde à condensação da cromatina, retração e subsequente fragmentação. Na próxima etapa, ocorre a retração do citoplasma celular e a formação de protuberâncias nas membranas, que dão origem aos corpos apoptóticos (cromatina condensada, citoplasma e organelas funcionais). O estágio final consiste na fagocitose desses corpos (BORYS *et al.*, 2017).

2.5 ÁCIDO TAUROURSODEOIXICÓLICO (TUDCA)

O ácido tauroursodeoxicólico, também conhecido como TUDCA, é um ácido biliar conjugado. Amplamente estudado, tem-se demonstrado seu significativo potencial de inibição do estresse de RE e seus mecanismos de resposta (LATHAM,

2015; LAUNAY *et al.*, 2017). Pesquisas sugerem sua atuação via inibição de translocação de BAX e aumentando a expressão de Bcl-2 evitando, conseqüente, a perturbação mitocondrial e ativação de caspases (LATHAM, 2015; SHARMA *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016), além de atuar como chaperona química ligando-se às regiões hidrofóbicas expostas das proteínas, prevenindo a formação de agregados proteicos (PARIDAENS *et al.*, 2017).

Pesquisas têm salientado que a administração de TUDCA a humanos via oral e parenteral é segura, e sua aplicação como tratamento contra o estresse oxidativo induzido por alta concentração de glicose (como na hiperglicemia pós-prandial) tem sido bem-sucedida (WALSH *et al.*, 2016). Além disso, a molécula tem reduzido processos inflamatórios em quadros como colites e pancreatites e também injúrias traumáticas (CHA *et al.*, 2016). Ainda, seu efeito neuroprotetor têm sido comprovados em inúmeros modelos animais para doença de Alzheimer, Huntington, Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e derrames encefálicos, uma vez que o ácido biliar é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (ROMERO-RAMIREZ *et al.*, 2017).

Na reprodução assistida, pesquisas têm focado sua atenção das últimas duas décadas na tentativa de melhorar os protocolos de criopreservação de gametas e embriões (ZHAO *et al.*, 2015; SANCHES *et al.*, 2016). Sabe-se que os resultados insatisfatórios obtidos com a criopreservação de oócitos estão associados ao estresse de RE, provavelmente por alterações das organelas, como inchaço do REL, que acabam por ativar a caspase 12. Nesse sentido, a utilização de TUDCA tem inibido o estresse de RE e melhorado a viabilidade de oócitos vitrificados e reaquecidos e sua subsequente competência embrionária em camundongos (ZHAO *et al.*, 2015).

Em complementariedade a tais resultados, o tratamento com TUDCA têm proporcionado melhores taxas de prenhez, desenvolvimento embrionário, implantação e de camundongos nascidos vivos (LIN *et al.*, 2015). Na biotecnologia *in vitro*, melhorias também têm sido demonstradas nas taxas de blastocisto em camundongos, bovinos e suínos, pela redução do estresse de RE durante o cultivo (SHARMA *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016).

No entanto, mais pesquisas se fazem necessárias para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação deste e de outros candidatos a componentes dos meios de cultivo *in vitro* para que sejam sugeridos e incrementados à biotécnica

da reprodução animal, permitindo também, no futuro, sua implementação à reprodução humana assistida.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, D. A.; DENICOL, A. C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M. I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORREA, M. N.; HANSEN, P. J.; CARDOSO, F. C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1669-1679, Jun 2016. ISSN 0093-691x.

BAGG, M. A.; NOTTLE, M. B.; ARMSTRONG, D. T.; GRUPEN, C. G. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 7, p. 797-803, 2007. ISSN 1031-3613 (Print)

BEKDASH, R. A.; ZHANG, C.; SARKAR, D. K. Gestational choline supplementation normalized fetal alcohol-induced alterations in histone modifications, DNA methylation, and proopiomelanocortin (POMC) gene expression in beta-endorphin-producing POMC neurons of the hypothalamus. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 7, p. 1133-1142, Jul 2013. ISSN 0145-6008.

BERTOLDO, M.; HOLYOAKE, P. K.; EVANS, G.; GRUPEN, C. G. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 8, p. 1222-1229, 2010. ISSN 1031-3613 (Print)

BORYS, S.; KHOZMI, R.; KRANC, W.; BRYJA, A.; DYSZKIEWICZ-KONWIŃSKA, M.; JESETA, M.; KEMPISTY, B. Recent Findings of the Types of Programmed Cell Death. **Advances in Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2017. ISSN 2080-2218.

BOU, G.; LIU, S.; GUO, J.; ZHAO, Y.; SUN, M.; XUE, B.; WANG, J.; WEI, Y.; KONG, Q.; LIU, Z. Cdx2 represses Oct4 function via inducing its proteasome-dependent degradation in early porcine embryos. **Developmental Biology**, v. 410, n. 1, p. 36-44, 2/1/ 2016. ISSN 0012-1606.

BURTON, A.; TORRES-PADILLA, M.-E. Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, n. 5-6, p. 444-454, 12/23 2010. ISSN 2041-2649

CAO, S.; HAN, J.; WU, J.; LI, Q.; LIU, S.; ZHANG, W.; PEI, Y.; RUAN, X.; LIU, Z.; WANG, X.; LIM, B.; LI, N. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 4, 2014. ISSN 1471-2164.

CHA, B. H.; JUNG, M. J.; MOON, B. K.; KIM, J. S.; MA, Y.; ARAI, Y.; NOH, M.; SHIN, J. Y.; KIM, B. S.; LEE, S. H. Administration of tauroursodeoxycholic acid enhances

osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Bone**, v. 83, p. 73-81, Feb 2016. ISSN 1873-2763.

DAVISON, J. M.; MELLOTT, T. J.; KOVACHEVA, V. P.; BLUSZTAJN, J. K. Gestational Choline Supply Regulates Methylation of Histone H3, Expression of Histone Methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA Methylation of Their Genes in Rat Fetal Liver and Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 4, p. 1982-1989, January 23, 2009 2009.

DESHMUKH, R. S.; OSTRUP, O.; OSTRUP, E.; VEJLSTED, M.; NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v. 6, n. 2, p. 177-187, Feb 2011. ISSN 1559-2294.

DICKHOUT, J. G.; KREPINSKY, J. C. Endoplasmic reticulum stress and renal disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2341-2352, Sep 2009. ISSN 1523-0864.

DICKS, N.; AGELLON, L. B.; BORDIGNON, V. Somatic Cell Nuclear Transfer and the Creation of Transgenic Large Animal Models. In: LI, X.-Q.; DONNELLY, D. J., *et al* (Ed.). **Somatic Genome Manipulation: Advances, Methods, and Applications**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.123-143. ISBN 978-1-4939-2389-2.

FRISO, S.; UDALI, S.; DE SANTIS, D.; CHOI, S. W. One-carbon metabolism and epigenetics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 28-36, Apr 2017. ISSN 0098-2997.

GIRITHARAN, G.; DELLE PIANE, L.; DONJACOUR, A.; ESTEBAN, F. J.; HORCAJADAS, J. A.; MALTEPE, E.; RINAUDO, P. In vitro culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophectoderm. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 3, p. 243-252, Mar 2012. ISSN 1933-7191.

GRUPEN, C. G. The evolution of porcine embryo in vitro production. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 24-37, Jan 01 2014. ISSN 0093-691x.

HAJARIAN, H.; AGHAZ, F.; KARAMI SHABANKAREH, H. Replacement of serum with sericin in in vitro maturation and culture media: Effects on embryonic developmental competence of Sanjabi sheep embryo during breeding season. **Theriogenology**, v. 92, p. 144-148, Apr 01 2017. ISSN 0093-691x.

HAJKOVA, P.; JEFFRIES, S. J.; LEE, C.; MILLER, N.; JACKSON, S. P.; SURANI, M. A. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. **Science**, v. 329, n. 5987, p. 10.1126/science.1187945, 2010. ISSN 0036-8075

HAN, Y. M.; ABEYDEERA, L. R.; KIM, J. H.; MOON, H. B.; CABOT, R. A.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1110-1113, May 1999. ISSN 0006-3363 (Print)

HAO, L.; MIDIC, U.; GARRIGA, J.; LATHAM, K. E. Contribution of CBX4 to cumulus oophorus cell phenotype in mice and attendant effects in cumulus cell cloned embryos. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 2, p. 66-80, Jan 15 2014. ISSN 1094-8341.

HE, C.; COLE, P. Introduction: epigenetics. **Chemical reviews**, v. 115, n. 6, p. 2223, 2015.

HOSSEINI, S. M.; DUFORT, I.; CABALLERO, J.; MOULAVI, F.; GHANAEI, H. R.; SIRARD, M. A. Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. **BMC Developmental Biology**, v. 15, p. 49, Dec 18 2015. ISSN 1471-213x.

JEONG, Y. J.; CUI, X. S.; KIM, B. K.; KIM, I. H.; KIM, T.; CHUNG, Y. B.; KIM, N. H. Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. **Zygote**, v. 13, n. 1, p. 17-21, Feb 2005. ISSN 0967-1994 (Print)

KHARCHE, S.; JHA, B. Natural Parthenogenesis. **Regenerative Medicine-from Protocol to Patient**, v. 2, p. 426, 2016. ISSN 978-3-319-27608-3.

LATHAM, K. E. Chapter Six - Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Mammalian Oocytes and Embryos: Life in Balance. In: KWANG, W. J. (Ed.). **International Review of Cell and Molecular Biology**: Academic Press, v. Volume 316, 2015. p.227-265. ISBN 1937-6448.

LAUNAY, N.; RUIZ, M.; GRAU, L.; ORTEGA, F. J.; ILIEVA, E. V.; MARTINEZ, J. J.; GALEA, E.; FERRER, I.; KNECHT, E.; PUJOL, A.; FOURCADE, S. Tauroursodeoxycholic bile acid arrests axonal degeneration by inhibiting the unfolded protein response in X-linked adrenoleukodystrophy. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 283-301, Feb 2017. ISSN 0001-6322.

LEE, J.-W.; TIAN, X. C.; YANG, X. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 1, p. 51-57, 2004. ISSN 1098-2795.

LEERMAKERS, E. T. M.; MOREIRA, E. M.; KIEFTE-DE JONG, J. C.; DARWEESH, S. K. L.; VISSER, T.; VOORTMAN, T.; BAUTISTA, P. K.; CHOWDHURY, R.; GORMAN, D.; BRAMER, W. M.; FELIX, J. F.; FRANCO, O. H. Effects of choline on health across the life course: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 8, p. 500-522, 2015. ISSN 0029-6643.

LI, L.; LU, X.; DEAN, J. The maternal to zygotic transition in mammals. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 919-938, 10// 2013. ISSN 0098-2997.

LIM, K. T.; JANG, G.; KO, K. H.; LEE, W. W.; PARK, H. J.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 239-248, Jan 30 2008. ISSN 0378-4320 (Print) 0378-4320.

LIN, T.; DIAO, Y. F.; KANG, J. W.; LEE, J. E.; KIM, D. K.; JIN, D. I. Tauroursodeoxycholic acid improves the implantation and live-birth rates of mouse embryos. **Reproductive Biology**, v. 15, n. 2, p. 101-105, Jun 2015. ISSN 1642-431x.

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. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 4, p. 269-278, Dec 2016. ISSN 1642-431x.

LUNARDELLI, P. A.; MARINHO, L. R.; DA SILVA, C. B.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. UTILIZACIÓN DE EMBRIONES COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DEL GANADO LECHERO. **Spermova**, v. 4, n. 2, p. 131-138, 2014. ISSN 2308-4928.

LUNARDELLI, P. A.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, C. O.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of *Bos indicus* cattle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3189-3200, 2016. ISSN 1679-0359.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; SEREN, E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. **Gamete Research**, v. 20, n. 2, p. 177-183, Jun 1988. ISSN 0148-7280 (Print) 0148-7280.

MEDICI, V.; KIEFFER, D. A.; SHIBATA, N. M.; CHIMA, H.; KIM, K.; CANOVAS, A.; MEDRANO, J. F.; ISLAS-TREJO, A. D.; KHARBANDA, K. K.; OLSON, K.; SU, R. J.; ISLAM, M. S.; SYED, R.; KEEN, C. L.; MILLER, A. Y.; RUTLEDGE, J. C.; HALSTED, C. H.; LASALLE, J. M. Wilson Disease: Epigenetic effects of choline supplementation on phenotype and clinical course in a mouse model. **Epigenetics**, v. 11, n. 11, p. 804-818, Nov 2016. ISSN 1559-2294.

MUDD, A. T.; ALEXANDER, L. S.; JOHNSON, S. K.; GETTY, C. M.; MALYSHEVA, O. V.; CAUDILL, M. A.; DILGER, R. N. Perinatal Dietary Choline Deficiency in Sows Influences Concentrations of Choline Metabolites, Fatty Acids, and Amino Acids in Milk throughout Lactation. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 11, p. 2216-2223, Nov 2016. ISSN 0022-3166.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012. ISSN 1365-2184.

PARIDAENS, A.; RAEVENS, S.; DEVISSCHER, L.; BOGAERTS, E.; VERHELST, X.; HOORENS, A.; VAN VLIERBERGHE, H.; VAN GRUNSVEN, L.; GEERTS, A.; COLLE, I. Modulation of the Unfolded Protein Response by Tauroursodeoxycholic Acid Counteracts Apoptotic Cell Death and Fibrosis in a Mouse Model for Secondary Biliary Liver Fibrosis. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 1, p. 214, 2017. ISSN 1422-0067.

PELLEGATTI, M. The debate on animal ADME studies in drug development: an update. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, n. 12, p. 1615-1620, Dec 2014. ISSN 1742-5255.

PINCUS, G.; SHAPIRO, H. Further Studies on the Parthenogenetic Activation of Rabbit Eggs. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the U S A**, v. 26, n. 3, p. 163-165, 1940. ISSN 0027-8424

POWELL, C. L.; KOSYK, O.; BRADFORD, B. U.; PARKER, J. S.; LOBENHOFER, E. K.; DENDA, A.; UEMATSU, F.; NAKAE, D.; RUSYN, I. Temporal correlation of pathology and DNA damage with gene expression in a choline-deficient model of rat liver injury. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1137-1147, Nov 2005. ISSN 0270-9139 (Print)

PRATHER, R. S.; ROSS, J. W.; ISOM, S. C.; GREEN, J. A. Transcriptional, Post-Transcriptional and Epigenetic Control of Porcine Oocyte Maturation and Embryogenesis. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 66, p. 165-176, 2009.

RIVERA, R. M.; ROSS, J. W. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, n. 3, p. 423-432, 12// 2013. ISSN 0079-6107.

ROMERO-RAMIREZ, L.; NIETO-SAMPEDRO, M.; YANGUAS-CASAS, N. Tauroursodeoxycholic acid: more than just a neuroprotective bile conjugate. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 1, p. 62-63, Jan 2017. ISSN 1673-5374 (Print) 1673-5374.

SAI, K.; MORIOKA, S.; TAKAESU, G.; MUTHUSAMY, N.; GHASHGHAIEI, H. T.; HANAFUSA, H.; MATSUMOTO, K.; NINOMIYA-TSUJI, J. TAK1 determines susceptibility to endoplasmic reticulum stress and leptin resistance in the hypothalamus. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 9, p. 1855-1865, May 01 2016. ISSN 0021-9533.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-1151, Apr 01 2016. ISSN 0093-691x.

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**, v. 84, n. 2, p. 200-207, Jul 15 2015. ISSN 0093-691x.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F. G.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, Mar 10 2017. ISSN 0936-6768.

SOZEN, E.; OZER, N. K. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. **Redox Biology**, v. 12, p. 456-461, Mar 06 2017. ISSN 2213-2317.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S. W. Epigenetics: the link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 753-764, Jul-Aug 2013. ISSN 0098-2997.

TANG, C.; PRUEKSARITANONT, T. Use of in vivo animal models to assess pharmacokinetic drug-drug interactions. **Pharmacology Research**, v. 27, n. 9, p. 1772-1787, Sep 2010. ISSN 0724-8741.

TOYOOKA, Y.; OKA, S.; FUJIMORI, T. Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes. **Developmental Biology**, v. 411, n. 1, p. 50-60, 3/1/ 2016. ISSN 0012-1606.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 6, p. 468-480, Aug 2011. ISSN 0263-6484.

UPAGUPTA, C.; CARLISLE, R. E.; DICKHOUT, J. G. Analysis of the potency of various low molecular weight chemical chaperones to prevent protein aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 1, p. 163-170, Apr 22 2017. ISSN 0006-291x.

VAN VLIET, A. R.; AGOSTINIS, P. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Mar 28 2017. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217x.

VINCENZ-DONNELLY, L.; HIPPI, M. S. The Endoplasmic Reticulum: A Hub of Protein Quality Control in Health and Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017. ISSN 0891-5849.

WALSH, L. K.; RESTAINO, R. M.; NEURINGER, M.; MANRIQUE, C.; PADILLA, J. Administration of tauroursodeoxycholic acid prevents endothelial dysfunction caused by an oral glucose load. **Clinical Science (Lond)**, v. 130, n. 21, p. 1881-1888, Nov 01 2016. ISSN 0143-5221.

WASIELAK, M.; WIĘSAK, T.; BOGACKA, I.; JALALI, B. M.; BOGACKI, M. Maternal effect gene expression in porcine metaphase II oocytes and embryos in vitro: effect of epidermal growth factor, interleukin-1 β and leukemia inhibitory factor. **Zygote**, p. 1-11, 2016. ISSN 0967-1994.

WHITELAW, C. B.; SHEETS, T. P.; LILLICO, S. G.; TELUGU, B. P. Engineering large animal models of human disease. **Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 247-256, Jan 2016. ISSN 0022-3417.

WU, G.; AOYAMA, C.; YOUNG, S. G.; VANCE, D. E. Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in

phosphatidylcholine biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 3, p. 1456-1462, Jan 18 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

WU, G.; SCHÖLER, H. R. Chapter Seventeen - Lineage Segregation in the Totipotent Embryo. In: PAUL, M. W. (Ed.). **Current Topics in Developmental Biology**: Academic Press, v. Volume 117, 2016. p.301-317. ISBN 0070-2153.

YARA, M.; IWAO, B.; HARA, N.; YAMANAKA, T.; UCHINO, H.; INAZU, M. Molecular and functional characterization of choline transporter in the human trophoblastic cell line JEG-3 cells. **Placenta**, v. 36, n. 6, p. 631-637, Jun 2015. ISSN 0143-4004.

ZANDER-FOX, D. L.; MITCHELL, M.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Alterations in mouse embryo intracellular pH by DMO during culture impair implantation and fetal growth. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 21, n. 2, p. 219-229, Aug 2010. ISSN 1472-6483.

ZANDER, D. L.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 288-294, Feb 2006. ISSN 0006-3363

ZEISEL, S. H. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. **Mutation Research**, v. 733, n. 1-2, p. 34-38, May 01 2012. ISSN 0027-5107 (Print)

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, n. 7, p. e40433, 2012a. ISSN 1932-6203.

ZHANG, J. Y.; DIAO, Y. F.; OQANI, R. K.; HAN, R. X.; JIN, D. I. Effect of Endoplasmic Reticulum Stress on Porcine Oocyte Maturation and Parthenogenetic Embryonic Development In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, p. Article 128, 121-129, 2012/04/01 2012b. ISSN 0006-3363. Acesso em: 2017/04/11.

ZHANG, Y.-C.; JIN, L.; ZHU, H.-Y.; GUO, Q.; LI, X.-C.; ZHANG, G.-L.; XING, X.-X.; XUAN, M.-F.; LUO, Q.-R.; LUO, Z.-B.; WANG, J.-X.; CUI, C.-D.; LI, W.-X.; CUI, Z.-Y.; YIN, X.-J.; KANG, J.-D. The developmental competence of oocytes parthenogenetically activated by an electric pulse and anisomycin treatment. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 2, p. 189-196, 2017. ISSN 1573-6776.

ZHAO, N.; LIU, X. J.; LI, J. T.; ZHANG, L.; FU, Y.; ZHANG, Y. 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, n. 1, p. 48-52, Feb 2015. ISSN 0011-2240.

3 HIPÓTESES

- Colina e TUDCA adicionadas ao meio de maturação oocitária ou cultivo embrionário aumentam as taxas de produção *in vitro* de embriões suínos

- Colina e TUDCA adicionadas ao meio de cultivo embrionário minimizam os efeitos do estresse induzido por glicose nas taxas de produção *in vitro* de embriões suínos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de colina sozinha ou em associação com ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) nas taxas de produção *in vitro* de embriões suínos durante a maturação oocitária e o cultivo embrionário *in vitro*, sob condições normais ou de estresse.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a melhor concentração e duração da suplementação de colina no meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos;
- Avaliar o efeito da suplementação de colina isolada ou em associação com TUDCA ao meio de maturação *in vitro* de oócitos suínos;
- Avaliar o efeito da suplementação de colina isolada ou em associação com TUDCA ao meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos;
- Avaliar o efeito da suplementação de colina isolada ou em associação com TUDCA ao meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos submetidos ao estresse por glicose;

5 ARTIGO A

CHOLINE: POTENTIAL SUPPLEMENT FOR *IN VITRO* CULTURE MEDIA?

Lunardelli, P.A.¹; Dicks, N.²; Seneda, M. M.¹; Bordignon, V.²

¹ Laboratory of Animal Reproduction, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, Brazil.

² Department of Animal Science, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

ABSTRACT

As a valuable tool for fertility preservation, *in vitro* embryo production (IVEP) technique has been subject of many researches. Aiming to improve media conditions, choline have been considered a possible enhancer component of the *in vitro* culture media attenuating the stress imposed by the technique. However, its effects on IVEP in unknown. The aim of the present study was to investigate and stablish the optimum concentration and duration for choline supplementation. For that, oocytes were obtained from porcine ovaries from a local slaughterhouse by puncture with an 18-gauge needle. In experiment I, selected oocytes were subjected to standard *in vitro* maturation and parthenogenetic activation. Then presumptive zygotes (n = 1030) went through *in vitro* culture in standard medium (Control group) or supplemented with choline at 2.5mM, 5mM, 7.5mM or 10mM for 7 days. In experiment II, oocytes were subjected to standard IVM and parthenogenetic activation and 872 presumptive zygotes were cultured in standard medium (Control group), or supplemented with 3.73mM choline for 3 days (D0-D3), 5 days (D0-D5), 7 days (D0-D7), from day 3 to 7 (D3-D7) or from day 5 to 7 (D5-D7). In all experiments, cleavage, blastocyst and hatching rates were recorded, as well as day 7-blastocyst were subjected to immunofluorescence for total cell number, cleaved caspase 3 and Sox2 assessment. Statistical analyses were performed using the JMP software through Oneway ANOVA and means were compared through Tukey-Kramer HSD test. Statistical α adopted was 0.05. In experiment I, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage, blastocyst or hatching rates, total cell number or cleaved caspase 3-positive cells. However, the 10mM concentration promoted lower Sox2-positive cells proportion when compared to 2.5mM group ($P < 0.05$). In experiment II, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage, blastocyst or hatching rates, cleaved caspase 3- or Sox2-positive cells. However, the D0-D5 treatment promoted lower total cell number when compared to Control, D0-D3 and D5-D7 groups ($P < 0.05$). Our results showed that choline supplementation can be detrimental for blastocyst quality, if carried out at a 10mM concentration for 7 days or at 3.73mM for the first 5 days of *in vitro* culture.

Key words: Porcine. Blastocyst. Total cell number. Sox2. Caspase 3.

Introduction

Currently, the porcine species occupies a very prominent position among the scientific society. Besides their large importance in agricultural sectors, pigs are considered the most adequate experimental model for human conditions such as cancer and infertility, due to their high morphological and physiological similarity to humans (CAO *et al.*, 2014; DICKS *et al.*, 2015).

In vitro embryo production (IVEP) followed by cryopreservation is a growing biotechnology that allows women suffering from infertility from non-ovarian causes, or patients subjected to chemotherapy, for example, to preserve a reproductive status (BEDOSCHI e OKTAY, 2013). However, *in vitro* conditions are still suboptimal, eventually leading to epigenetic alterations, cellular stress and impairment of embryo development (DESHMUKH *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2016). Aiming to improve culture conditions, researchers have experimented the addition of different substances to the *in vitro* culture medium.

A candidate that has called scientists' attention is choline, a dietary nutrient that participates in cell membranes composition and signaling as well as in epigenetic coding, by donating methyl radicals (LEERMAKERS *et al.*, 2015) and has been proven to be necessary for normal neurological development and epigenetics in fetuses (FRISO *et al.*, 2017). Yet, there is no study addressing choline addition to embryos' culture media in current literature. Therefore, more applied studies need to be held in order to better understand its acting mechanisms and function in embryos, aiming its future application on human assisted reproduction techniques.

Thus, the objective of this study was to establish the optimum concentration and duration of choline supplementation to *in vitro* porcine embryo culture medium.

Materials and Methods

Unless stated otherwise, chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA).

Oocyte Collection and In Vitro Maturation

Oocytes were collected from prepubertal gilt ovaries collected in a local slaughterhouse (Olymel S.E.C./L.P., Saint-Esprit, QC, CA) and transported to the laboratory in 0.9% NaCl at 32°C. Follicles ranging from 3 to 6 mm in diameter were punctured using an 18-gauge needle. Only cumulus-oocyte complexes (COCs) showing a minimum of three cumulus cell surrounding layers and homogeneously granulated cytoplasm were subjected to IVM.

Groups of 20 to 30 COCs were cultured in 90 µl of maturation medium covered by mineral oil in incubator with 5% CO₂ and 95% air at 38.5°C. The medium consisted of TCM 199 (Life Technologies, Burlington, ON, CA) supplemented with 20% porcine follicular fluid, 1 mM dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (cAMP), 0.1 mg/ml cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor (Life Technologies), 0.91 mM sodium pyruvate, 3.05 mM D-glucose, 0.5 µg/ml luteinizing hormone (LH; Sioux Biochemical, Inc., Sioux Center, IA), 0.5 µg/ml follicle-stimulating hormone (FSH; Sioux Biochemical), and 20 µg/ml gentamicin (Life Technologies).

After 22 h of maturation, oocytes were transferred to a similar IVM medium without LH, FSH, and cAMP, for additional 22 h under the same conditions. Cumulus cells were removed by pipetting in TCM 199 HEPES-buffered medium (Life Technologies) supplemented with 0.1% hyaluronidase, and oocytes were further parthenogenetically activated.

Oocyte Activation and Embryo Culture

Selected oocytes were washed in TCM 199 HEPES-buffered medium (Life Technologies) supplemented with 3 mg/ml bovine serum albumin (BSA; fatty acid-free) and exposed to 15 µM ionomycin for 5 min before being transferred to 10 mM strontium chloride in Ca²⁺-free porcine zygote medium (PZM-3) supplemented with cytochalasin B (7.5 µg/ml) and cycloheximide (10 µg/ml), in which they were incubated for 4 h. Oocytes were then washed in PZM-3 medium supplemented with 3 mg/ml BSA.

For being cultured, presumptive zygotes from Control group were placed in standard culture medium consisting of PZM-3 supplemented with 3 mg/ml BSA, hypotaurine (0.55mg/ml) and glutamine (2.92mg/ml) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 38.5°C, for seven days (D0-D7).

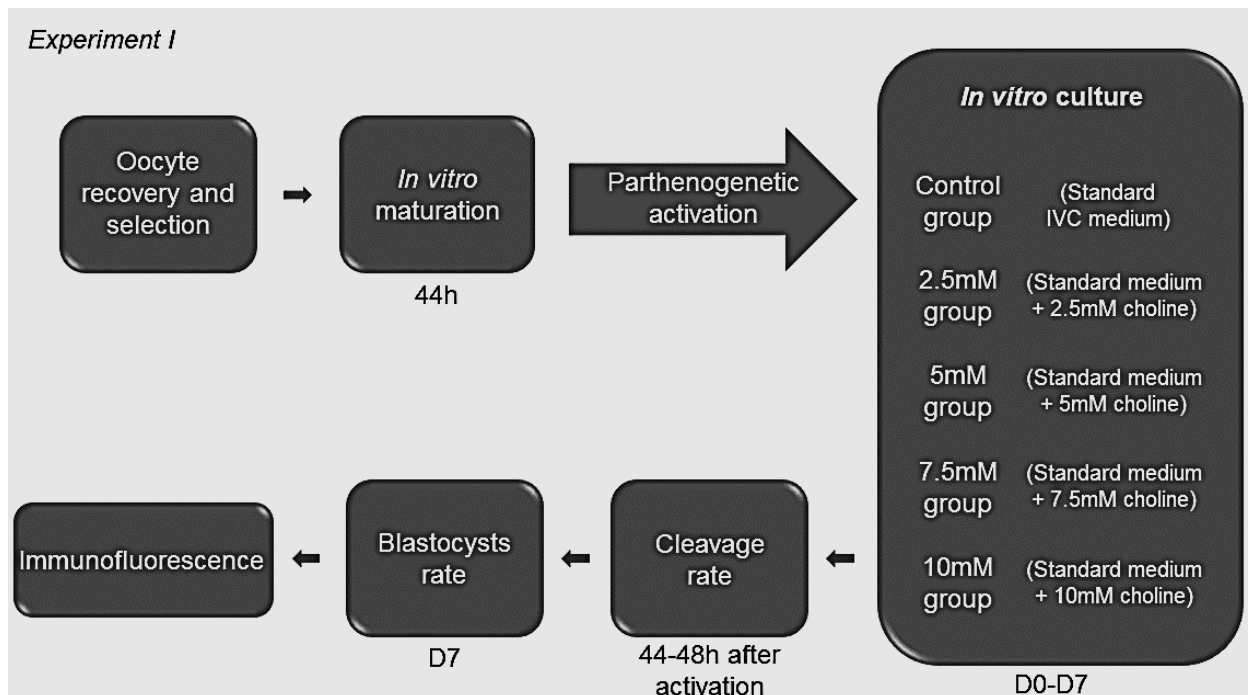
In experiment I, 1030 presumptive zygotes were obtained through three replicates and divided into Control and treated groups. For the treatments, standard medium was supplemented with Choline at 2.5mM, 5mM, 7.5mM or 10mM concentrations.

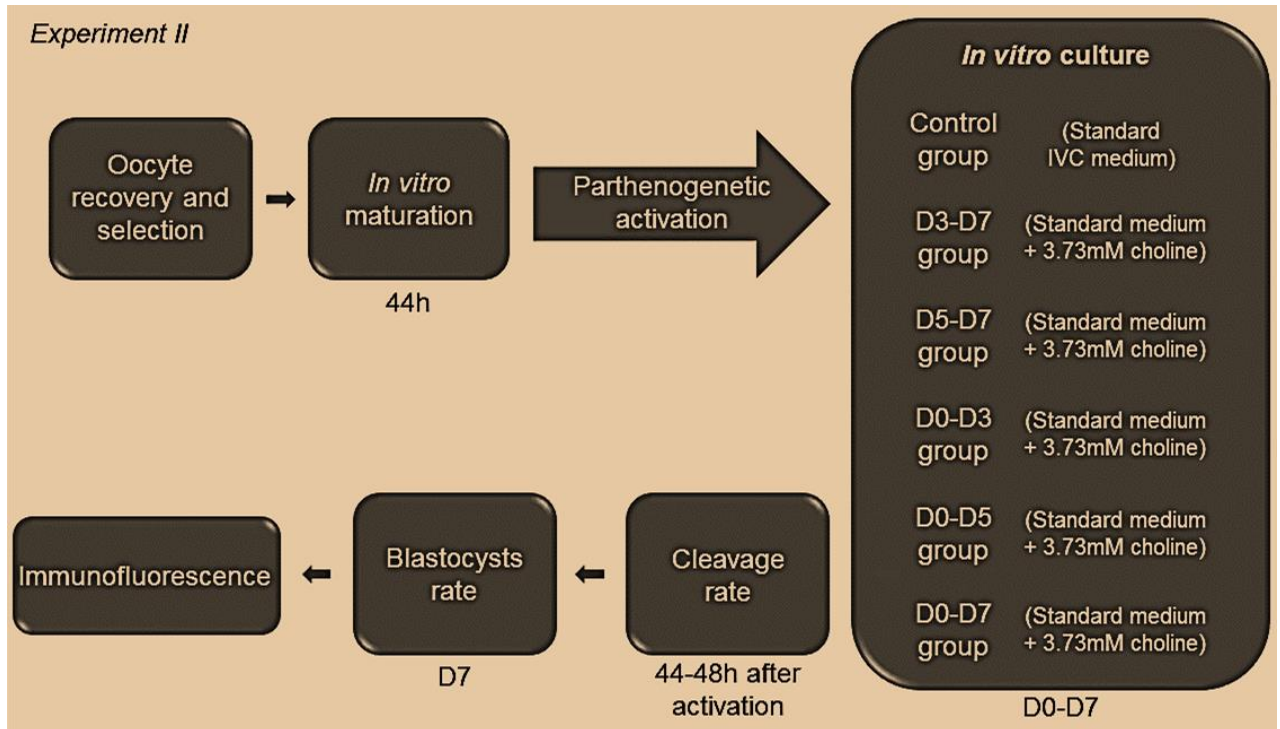
In experiment II, based on results from prior trials (unpublished data), the culture medium for the other groups was supplemented with 3.73mM Choline, throughout the entire culture period (D0-D7 group), from D0 to D3, from D0 to D5, from D3 to D7 or from D5 to D7. A total of 872 presumptive zygotes obtained from three replicates were used.

In both experiments, cleavage rate was evaluated at 44-48 h post-activation. On day 5, the culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum and blastocyst rate was evaluated on Day 7 and calculated out of the number of cleaved embryos. Subsequently, immunofluorescence was carried out.

Experimental Design

Experiments were carried out as follows:





Immunofluorescence Staining

In all experiments, blastocysts at Day 7 were fixed for 15 to 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized in 1% Triton X-100 in PBS for 30 min at 37°C. Samples were incubated at room temperature in blocking solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in PBS) for 1 h and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (rabbit polyclonal anti-Cleaved Caspase-3 [Asp175], 1:400 dilution; Cell Signaling Technology, Boston, MA; goat polyclonal anti-Sox-2, 1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) diluted in blocking solution. Embryos were co-incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies anti-goat immunoglobulin G (IgG) Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluted 1:1000 or anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluted 1:1000. Samples' DNA was stained with 10 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) in blocking solution for 20 min. Then, samples were mounted on microscope slides, using a drop of Mowiol. The slides were kept in a dark box and examined by epifluorescence through an Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were captured at 200x magnification, using a Retiga 2000R Monochromo digital camera (Qimaging, Surrey, BC). Images were evaluated by using SimplePCI imaging software (Compix, Inc., Sewickley, PA).

Statistical Analysis

In all experiments, statistical analyses were performed using the JMP software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Continuous data were analyzed through Oneway ANOVA, and means were compared through Tukey-Kramer HSD test for multiple pairs comparisons. Rates are shown as means \pm SEM and means \pm SDM when cell numbers. Statistical confidence level (α) adopted was 0.05.

Results

In experiment I, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage, blastocyst or hatching rates, total cell number or cleaved caspase 3-positive cells ($P > 0.05$). However, the 10mM concentration promoted lower Sox2-positive cells proportion when compared to 2.5mM group ($P < 0.05$; Tables 1 and 2 and Figure 1).

Table 1. Effect of different concentrations of choline supplementation during culture on *in vitro* embryo production outcomes.

Group	Cultured	Cleaved	Blastocysts	Hatched
	n	Mean % \pm SEM (n/n)	Mean % \pm SEM (n/n)	Mean % \pm SEM (n/n)
Control	207	64.3 \pm 6.8 ^a (133/207)	62.4 \pm 7.3 ^a (82/133)	15.8 \pm 5.5 ^a (14/82)
2.5mM	206	65.4 \pm 5.8 ^a (134/206)	52.8 \pm 2.1 ^a (71/134)	3.9 \pm 2.1 ^a (3/71)
5mM	207	64.9 \pm 3.1 ^a (134/207)	65.7 \pm 3.5 ^a (88/134)	3.5 \pm 2.1 ^a (3/88)
7.5mM	205	66.4 \pm 4.3 ^a (136/205)	60.1 \pm 1.3 ^a (82/136)	6.8 \pm 3.8 ^a (5/82)
10mM	205	63.1 \pm 11.1 ^a (130/205)	58.3 \pm 3.9 ^a (74/130)	4.9 \pm 3.3 ^a (3/74)

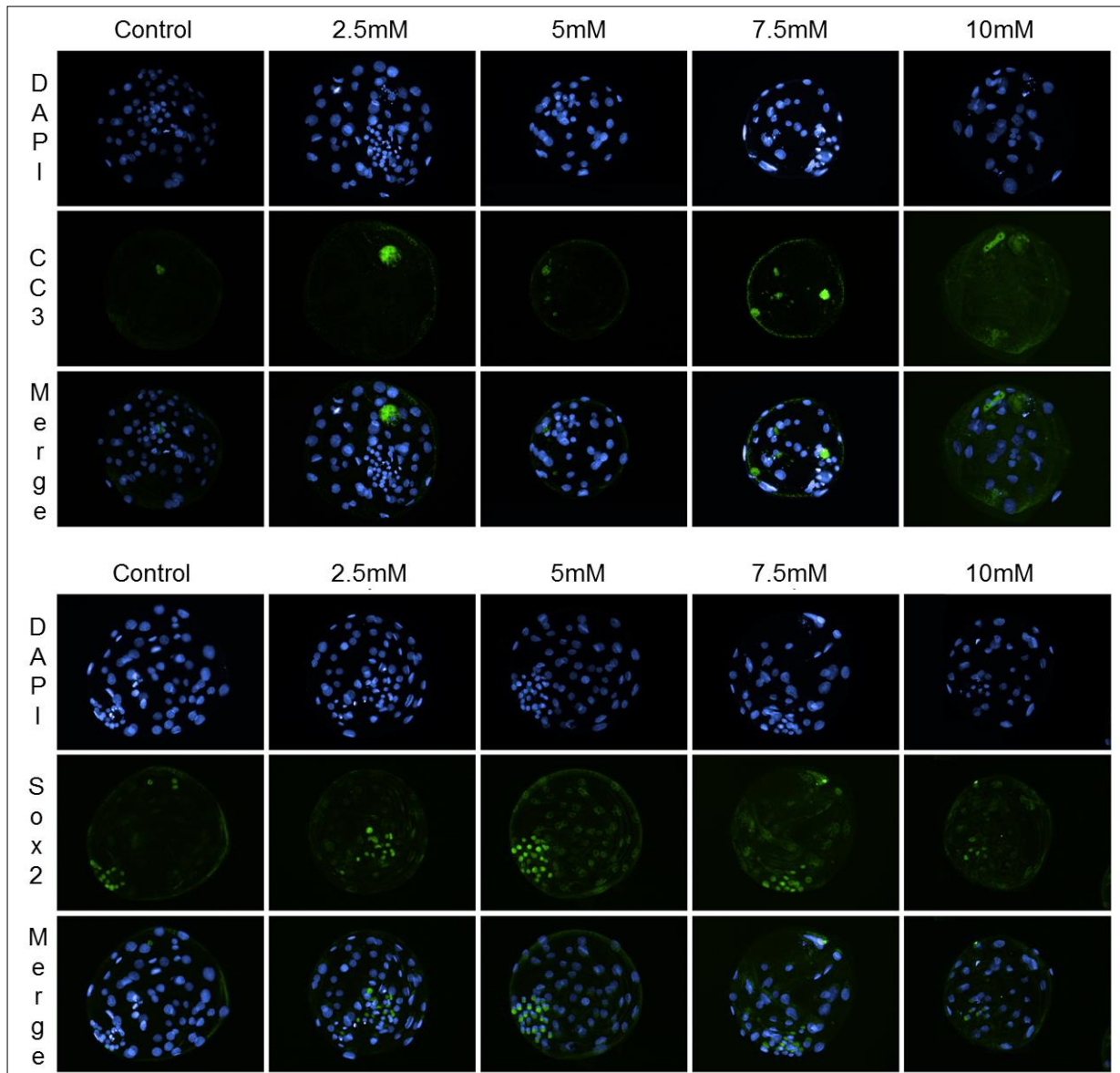
^a – Same letter between lines in the same column indicate no statistical difference ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of different concentrations of choline supplementation during *in vitro* culture of parthenogenetic porcine embryos on apoptosis and inner cell mass proportion.

Group	Blastocysts	Total cell number	Blastocysts	CC3+/total	Blastocysts	Sox2+/total
	n	Mean \pm SDM	n	Mean% \pm SDM	n	Mean% \pm SDM
Control	47	60.1 \pm 24.3 ^a	27	4.8 \pm 5.2 ^a	20	13,4 \pm 7,9 ^{ab}
2.5mM	39	54.5 \pm 25.3 ^a	24	2.9 \pm 4.1 ^a	15	16,9 \pm 12,1 ^a
5mM	46	50.3 \pm 17.7 ^a	20	2.1 \pm 3.2 ^a	26	13,6 \pm 8,9 ^{ab}
7.5mM	50	52.0 \pm 19.9 ^a	23	4.2 \pm 5.2 ^a	27	12,6 \pm 10,1 ^{ab}
10mM	46	49.0 \pm 20.4 ^a	19	2.2 \pm 2.8 ^a	27	8,4 \pm 7,3 ^b

^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference (P < 0.05).

Figure 1. Representative panel of day 7 porcine blastocysts parthenogenetically activated and cultured in choline-supplemented medium in different concentrations.



Cell nuclei are stained with DAPI in blue. Cleaved Caspase-3 (CC3) positive cells, representing apoptosis (1st. panel) and Sox2 positive cells, representing the inner cell mass (2nd. panel), are stained in green. 200x magnification.

In experiment II, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage, blastocyst or hatching rates (Table 3), cleaved caspase 3- or Sox2-positive cells ($P > 0.05$). However, the D0-D5 treatment promoted lower total cell number when compared to Control, D0-D3 and D5-D7 groups ($P < 0.05$; Table 4 and Figure 2).

Table 3. Effect of different durations of 3.73mM choline supplementation on porcine *in vitro* embryo culture outcomes.

Group	Cultured	Cleaved	Blastocysts	Hatched
	n	Mean % ± SEM (n/n)	Mean % ± SEM (n/n)	Mean % ± SEM (n/n)
Control	146	61.8 ± 8.9 ^a (89/146)	62.5 ± 4.4 ^a (56/89)	32.2 ± 5.0 ^a (18/56)
D3-D7	150	64.7 ± 11.3 ^a (88/150)	67.2 ± 2.3 ^a (64/88)	15.3 ± 2.7 ^a (10/64)
D5-D7	148	62.1 ± 12.6 ^a (95/148)	58.6 ± 4.3 ^a (54/95)	31.0 ± 7.8 ^a (16/54)
D0-D3	143	68.6 ± 7.6 ^a (97/143)	58.3 ± 9.8 ^a (57/97)	21.2 ± 7.0 ^a (12/57)
D0-D5	145	64.8 ± 5.7 ^a (93/145)	64.5 ± 2.7 ^a (60/93)	18.8 ± 5.1 ^a (11/60)
D0-D7	143	69.6 ± 5.1 ^a (88/143)	52.2 ± 7.7 ^a (52/88)	5.8 ± 5.8 ^a (4/52)

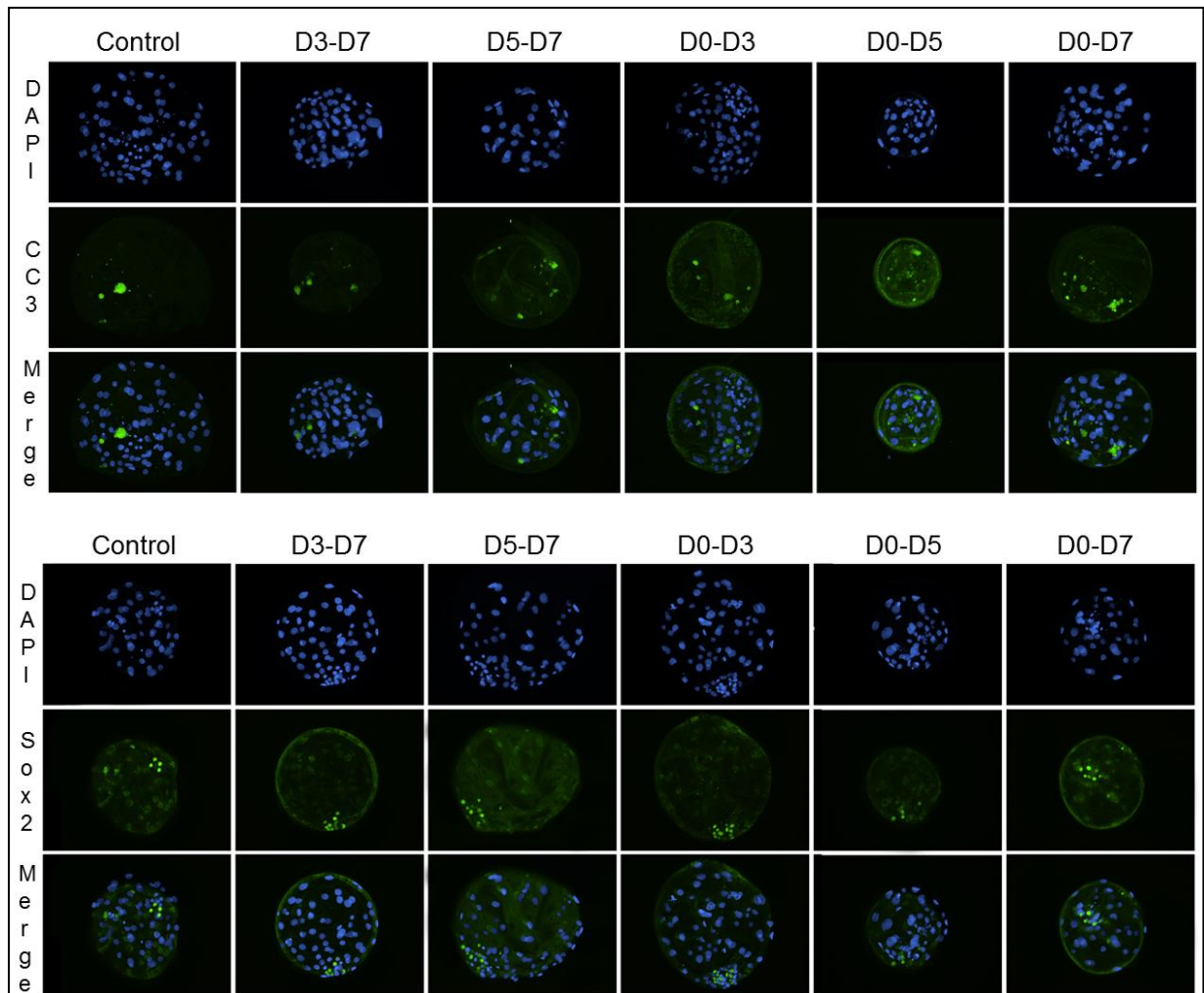
^a – Same letter between lines in the same column indicate no statistical difference (P < 0.05).

Table 4. Effect of different durations of 3.73mM choline supplementation on *in vitro* culture of parthenogenetic porcine embryos on apoptosis and inner cell mass proportion.

Group	Blastocysts	Total cell number	Blastocysts	CC3+/total	Blastocysts	Sox2+/total
	n	Mean \pm SDM	n	Mean% \pm SDM	n	Mean% \pm SDM
Control	47	61.7 \pm 29.1 ^a	23	7.4 \pm 5.7 ^a	23	9.2 \pm 8.7 ^a
D3-D7	51	56.6 \pm 28.9 ^{ab}	24	6.8 \pm 9.1 ^a	27	6.4 \pm 7.0 ^a
D5-D7	43	64.6 \pm 26.3 ^a	23	6.6 \pm 5.2 ^a	19	5.4 \pm 5.2 ^a
D0-D3	36	63.7 \pm 26.1 ^a	17	3.5 \pm 4.8 ^a	19	5.0 \pm 5.3 ^a
D0-D5	49	45.5 \pm 21.5 ^b	27	7.1 \pm 7.6 ^a	22	8.4 \pm 10.6 ^a
D0-D7	40	50.5 \pm 23.6 ^{ab}	20	9.9 \pm 10.6 ^a	20	6.1 \pm 6.9 ^a

^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

Figure 2. Representative panel of day 7 porcine blastocysts parthenogenetically activated and cultured in choline-supplemented medium during different periods.



Cell nuclei are stained with DAPI in blue. Cleaved Caspase-3 (CC3) positive cells, representing apoptosis (1st. panel) and Sox2 positive cells, representing the inner cell mass (2nd. panel), are stained in green. 200x magnification.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to address the effect of culture media supplementation with choline in different concentrations and periods on pre-implantation embryo development.

Our results showed no statistical influence of different concentrations in choline supplementation during IVC on IVEP rates. However, there is an effect on Sox2 positive cells. The 2.5mM concentration had the higher Sox2 presence ($16.90 \pm$

12.06 $P < 0.05$), followed by 5mM, Control and 7.5mM with similar values ($P > 0.05$), while 10mM group provided the lower Sox2 positive cells proportion (8.41 ± 7.29 ; $P < 0.05$) when compared to the highest one. Our results support the literature stating that culture media components alter ICM or trophectoderm (TE) cells allocation (VAN SOOM *et al.*, 1996).

Since 2.5mM and 5mM provided statistically similar results placed among the best numbers, experiment II was carried out using an intermediate value that was our research group's concentration of choice (3.73mM). Regarding the treatment duration with such concentration, no difference was observed on developmental rates among groups. At immunofluorescence, Control (61.72 ± 29.12), D0-D3 (63.69 ± 26.06), D5-D7 (64.58 ± 26.35), D3-D7 (56.57 ± 28.93) and D0-D7 (50.47 ± 23.57) groups did not statistically differ among each other ($P > 0.05$). Nevertheless, D0-D5 group showed significantly lower total cell number (45.47 ± 21.46 ; $P < 0.05$), when compared to Control.

The fact that D0-D3 and D5-D7 groups had higher cell number while D0-D5 had the lowest numbers, suggests the occurrence of a detrimental effect of choline supplementation during a specific period around D3-D5. It corresponds to the 4-8 cell stage (MARRABLE, 1971) when the embryo is subjected to sensitive epigenetic modifications for the maternal-zygotic transition (LI *et al.*, 2013). That said, a possible explanation for the negative effect of choline supplementation during this period, is that it donates methyl radicals for the maternal genome that is undergoing passive demethylation (LI *et al.*, 2013), interfering on future methylation status of the blastocyst. When supplementation was carried out before or after that period, embryos were positively influenced, and therefore, a neutral outcome was obtained from D0-D7 supplementation regarding blastomeres number.

It is known that Sox2 is a transcription activator factor that promotes pluripotency in the ICM, by regulating the Cdx2 expression for differentiated lineage, originating and supporting all further development of the embryo itself (GOOLAM *et al.*, 2016). Therefore, it is the consensus to reason that the less ICM cells, the lower the embryo quality. On the other hand, the total blastomeres number is considered, as well, an indicator of embryo quality and implantation potential (DU *et al.*, 2016). Those facts taken together, suggest that choline supplementation can be detrimental for blastocyst quality, if carried out at a 10mM concentration for 7 days or at 3.73mM for the first 5 days of *in vitro* culture.

Conclusions

Our results showed that choline supplementation can be detrimental for porcine blastocyst quality, if carried out at a 10mM concentration for 7 days or at 3.73mM for the first 5 days of *in vitro* culture.

References

- BEDOSCHI, G.; OKTAY, K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, p. 1496-1502, 03/25 2013. ISSN 0015-0282 1556-5653.
- CAO, S.; HAN, J.; WU, J.; LI, Q.; LIU, S.; ZHANG, W.; PEI, Y.; RUAN, X.; LIU, Z.; WANG, X.; LIM, B.; LI, N. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 4, 2014. ISSN 1471-2164.
- DESHMUKH, R. S.; OSTRUP, O.; OSTRUP, E.; VEJLSTED, M.; NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v. 6, n. 2, p. 177-187, Feb 2011. ISSN 1559-2294.
- DICKS, N.; AGELLON, L. B.; BORDIGNON, V. Somatic Cell Nuclear Transfer and the Creation of Transgenic Large Animal Models. In: LI, X.-Q.; DONNELLY, D. J., *et al* (Ed.). **Somatic Genome Manipulation: Advances, Methods, and Applications**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.123-143. ISBN 978-1-4939-2389-2.
- DU, Q.-Y.; WANG, E.-Y.; HUANG, Y.; GUO, X.-Y.; XIONG, Y.-J.; YU, Y.-P.; YAO, G.-D.; SHI, S.-L.; SUN, Y.-P. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 4, p. 910-919. e911, 2016. ISSN 0015-0282.
- FRISO, S.; UDALI, S.; DE SANTIS, D.; CHOI, S. W. One-carbon metabolism and epigenetics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 28-36, Apr 2017. ISSN 0098-2997.
- GOOLAM, M.; SCIALDONE, A.; GRAHAM, SARAH J.; MACAULAY, IAIN C.; JEDRUSIK, A.; HUPALOWSKA, A.; VOET, T.; MARIONI, JOHN C.; ZERNICKA-GOETZ, M. Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 61-74, 2016. ISSN 0092-8674
- LEERMAKERS, E. T. M.; MOREIRA, E. M.; KIEFTE-DE JONG, J. C.; DARWEESH, S. K. L.; VISSER, T.; VOORTMAN, T.; BAUTISTA, P. K.; CHOWDHURY, R.; GORMAN, D.; BRAMER, W. M.; FELIX, J. F.; FRANCO, O. H. Effects of choline on

health across the life course: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 8, p. 500-522, 2015. ISSN 0029-6643.

LI, L.; LU, X.; DEAN, J. The maternal to zygotic transition in mammals. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 919-938, 10// 2013. ISSN 0098-2997.

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. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 4, p. 269-278, Dec 2016. ISSN 1642-431x.

MARRABLE, A. W. The embryonic pig a chronological account. London, 1971.

VAN SOOM, A.; BOERJAN, M.; YSEBAERT, M. T.; DE KRUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 2, p. 171-182, Oct 1996. ISSN 1040-452X (Print)

6 ARTIGO B

CHOLINE ADDITION TO IVM AND IVC MEDIA IMPAIRS IMPLANTATION POTENTIAL AND EMBRYO QUALITY REGARDLESS OF TUDCA SUPPLEMENTATION

Lunardelli, P.A.¹; Dicks, N.²; Seneda, M. M.¹; Bordignon, V.²

¹ Laboratory of Animal Reproduction, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, Brazil.

² Department of Animal Science, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

ABSTRACT

Many researchers have driven their attention to adding different components to culture media, such as the tauroursodeoxycholic bile acid (TUDCA). However, TUDCA's effects on embryos are still debatable. Choline is another candidate molecule for improving media composition. Yet no study has assessed its effects associated with TUDCA on oocyte or embryo *in vitro* media of any species. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of choline and TUDCA addition to maturation and culture media of *in vitro* produced porcine embryos under standard or stressed conditions. Embryo quality and developmental potential were evaluated. For that, oocytes were obtained from gilts' ovaries from a local slaughterhouse by puncture with an 18-gauge needle. In experiment I, 1141 oocytes were subjected to IVM in standard maturation medium (Control group), supplemented with 50µM TUDCA (TUDCA group), or with 3.73mM Choline (Choline group) or 50µM TUDCA + 3.73mM Choline (TUDChol group). Maturation rates were recorded and oocytes presenting polar body were subjected to standard parthenogenetic activation and *in vitro* culture. Cleavage, blastocyst and hatching rates were recorded. In experiment II, oocytes were subjected to standard IVM and parthenogenetic activation and 1645 presumptive zygotes were cultured in standard medium (Control group), supplemented with 50µM TUDCA (TUDCA group), or with 3.73mM Choline (Choline group) or 50µM TUDCA + 3.73mM Choline (TUDChol group). In experiment III, selected oocytes were subjected to standard *in vitro* maturation and parthenogenetic activation. Then presumptive zygotes (n = 1756) went through *in vitro* culture in standard medium (Control group) or supplemented with 7mM Glucose, Glucose + 50µM TUDCA, Glucose + 3.73mM choline and Glucose + 50µM TUDCA + 3.73 choline. Cleavage, blastocyst and hatching rates were recorded. Day 7-blastocyst were then subjected to immunofluorescence for total cell number, cleaved caspase 3 and Sox2 assessment. In all experiments, statistical analyses were performed using the JMP software through Oneway ANOVA and means were compared through Tukey-Kramer HSD test. Statistical α adopted was 0.05. In experiment I, maturation and blastocyst rates showed no significant difference between Control and treated groups (P

> 0.05). However, Choline and TUDChol groups showed significant decrease in the number of cleaved embryos (30.21 ± 3.44 and 32.39 ± 4.52 , respectively) and hatched blastocysts (3.33 ± 3.33 and 11.86 ± 6.67 , respectively), when compared to TUDCA group (57.22 ± 3.38 for cleavage and 32.96 ± 4.14 for hatching rate; $P < 0.05$). In experiment II, cleavage and blastocyst were not significantly different between Control and treated groups ($P > 0.05$). However, Choline and TUDChol groups showed again significant decrease in the number of hatched blastocysts (1.64 ± 1.12 and 6.23 ± 2.63 , respectively), when compared to TUDCA group (23.06 ± 4.90 ; $P < 0.05$). At immunofluorescence, Choline blastocysts showed a decrease in total cell number (53.72 ± 25.21) compared to their Control and TUDCA counterparts (69.53 ± 33.65 and 68.07 ± 32.86 , respectively; $P < 0.05$). There was no difference between groups regarding the staining for cleaved caspase-3 (CC3), although, TUDCA group presented lower proportion of Sox2 positive cells (10.00 ± 7.24) than Control group (17.49 ± 12.72 ; $P < 0.05$). In experiment III, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage rates and cleaved caspase 3-positive cell proportion ($P > 0.05$). However, blastocyst and hatching rates, as well as total cell number, were lower than Control ($P < 0.05$) in all treatments. Regarding inner cell mass proportion, CholGlu group had lower percentages of Sox2-positive cells than TUDGlu and Control groups ($P < 0.05$). In conclusion, data from the present study show, for the first time, that choline supplementation during *in vitro* maturation and *in vitro* culture impairs preimplantation embryo development and quality under standard conditions, besides impairing embryos development when stressed by glucose and supplemented alone or in the presence of TUDCA. Furthermore, despite its tendency to improve development, TUDCA was not able to minimize embryos' damage caused by choline.

Key words: Porcine. *In vitro* embryo production. TUDCA. Choline. Glucose.

Introduction

In vitro embryo production (IVEP) can be the most useful biotechnique for controlled multiplying of porcine individuals. In addition to the production of a large number of embryos, it enables the reproduction of genetically selected females and allows the utilization of prepubertal females, shortening generation intervals (GRUPEN, 2014). Nevertheless, *In vitro* produced (IVP) embryos still significantly differ from their *in vivo* counterparts regarding structure, metabolism and morphology, which leads to lower production rates. Thus, a better understanding of early embryo physiology is needed for developing adequate *in vitro* production media and improving production outcomes (LUNARDELLI *et al.*, 2016).

Aiming the improvement of media features, many researchers have driven their attention to adding different components to culture media (WASIELAK *et al.*, 2016; HAJARIAN *et al.*, 2017; SOVERNIGO *et al.*, 2017). By working as chemical chaperones, Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a natural conjugated bile acid, has been proven to alleviate endoplasmic reticulum (ER) stress and cell death in many different animal and human tissues (DICKHOUT e KREPINSKY, 2009; ROMERO-RAMIREZ *et al.*, 2017). However, its effects on embryos are still debatable. Some researches showed improvement on developmental rates (ZHANG *et al.*, 2012a; LIN *et al.*, 2016) at the same time that other show attenuation of ER stress but no effect on development (SHARMA *et al.*, 2015).

Choline is another candidate molecule for media component. As a dietary nutrient, it participates in amino acids metabolism such as methionine, neurotransmitters such as acetylcholine and cell membranes signaling by composing phosphatidylcholine, not to mention its role as a methyl donor (LEERMAKERS *et al.*, 2015). It has been proved that choline deficiency in mothers' diets promotes embryo loss, several central nervous system diseases, as well as epigenetic abnormalities in fetuses (ZEISEL, 2012; ACOSTA *et al.*, 2016; FRISO *et al.*, 2017). However, no study has assessed the effect of maturation and culture media supplementation with choline associated with TUDCA on oocyte or embryo quality and pre-implantation development of any species. Therefore, applied studies need to be held in order to better understand its acting mechanisms and function in embryos under different environment conditions, and to make possible its future application on human assisted reproduction techniques.

In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of choline and/or TUDCA supplementation during maturation and culture on porcine *in vitro* embryo production outcomes, under standard or stress culture conditions.

Materials and Methods

Unless stated otherwise, chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA).

Experiment I

Oocyte Collection and In Vitro Maturation

Oocytes were collected from prepubertal gilts' ovaries obtained from a local slaughterhouse (Olymel S.E.C./L.P., Saint-Esprit, QC, CA) and transported to the laboratory in 0.9% NaCl at 32°C. Follicles from 3 to 6 mm in diameter were punctured using an 18-gauge needle. In experiment I, through four replicates, 1141 cumulus-oocyte complexes (COCs) surrounded by a minimum of three cumulus cell layers and showing a homogeneously granulated cytoplasm were subjected to IVM.

Groups of 20 to 30 COCs were cultured in 90 µl of maturation medium under mineral oil in incubator with 5% CO₂ and 95% air at 38.5°C. Standard maturation medium consisted of TCM 199 (Life Technologies, Burlington, ON, CA) supplemented with 20% porcine follicular fluid, 1 mM dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (cAMP), 0.1 mg/ml cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor (Life Technologies), 0.91 mM sodium pyruvate, 3.05 mM D-glucose, 0.5 µg/ml luteinizing hormone (LH; Sioux Biochemical, Inc., Sioux Center, IA), 0.5 µg/ml follicle-stimulating hormone (FSH; Sioux Biochemical), and 20 µg/ml gentamicin (Life Technologies).

In experiment I, Control group medium was the same as the standard medium. Maturation medium for TUDCA group was the standard medium supplemented with 50µM TUDCA (Calbiochem, 580549, Darmstadt, Germany), based on the literature (ZHANG *et al.*, 2012b). Choline group medium was supplemented with 3.73mM Choline chloride (Alfa Aesar, A15828, Ward Hill, MA, USA) based on our first article. Finally, medium for TUDChol group consisted of standard maturation medium, 50µM TUDCA and 3.73mM Choline.

After 22 h of maturation, oocytes were transferred to a similar IVM medium that did not contain LH, FSH, and cAMP, for additional 22 h under the same conditions. Cumulus cells were removed by pipetting in TCM 199 HEPES-buffered medium (Life Technologies) supplemented with 0.1% hyaluronidase, and oocytes were further parthenogenetically activated.

In experiment I, after IVM, oocytes were assessed regarding the presence of an extruded polar body for evaluating maturation rate. Only the ones that had polar bodies were put under activation.

Oocyte Activation and Embryo Culture

Selected oocytes were washed in TCM 199 HEPES-buffered medium (Life Technologies) supplemented with 3 mg/ml bovine serum albumin (BSA; fatty acid-free) and exposed to 15 μ M ionomycin for 5 min before being transferred to 10 mM strontium chloride in Ca²⁺-free porcine zygote medium (PZM-3) supplemented with cytochalasin B (7.5 μ g/ml) and cycloheximide (10 μ g/ml), in which they were incubated for 4 h. Oocytes were then washed in PZM-3 medium supplemented with 3 mg/ml BSA and cultured in PZM-3 supplemented with 3 mg/ml BSA, hypotaurine (0.55mg/ml) and glutamine (2.92mg/ml) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 38.5°C.

In experiment I, all groups had their embryos cultured under the aforementioned condition.

Cleavage rate was evaluated at 44-48 h post-activation. On day 5, the culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum and blastocyst rate was evaluated on Day 7 and calculated out of the number of cleaved embryos.

Experiment II

Oocyte Collection and In Vitro Maturation

In experiment II, collection and *in vitro* maturation were carried out as stated for experiment I. Except for the maturation media, which in this case consisted of the standard medium for all oocytes.

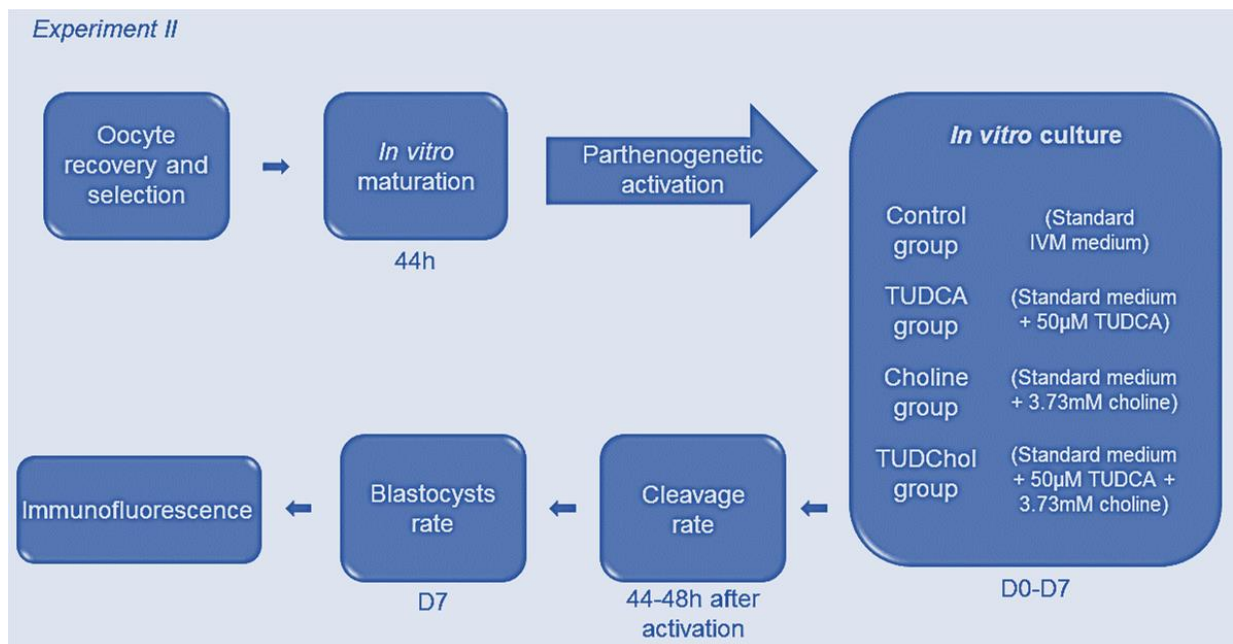
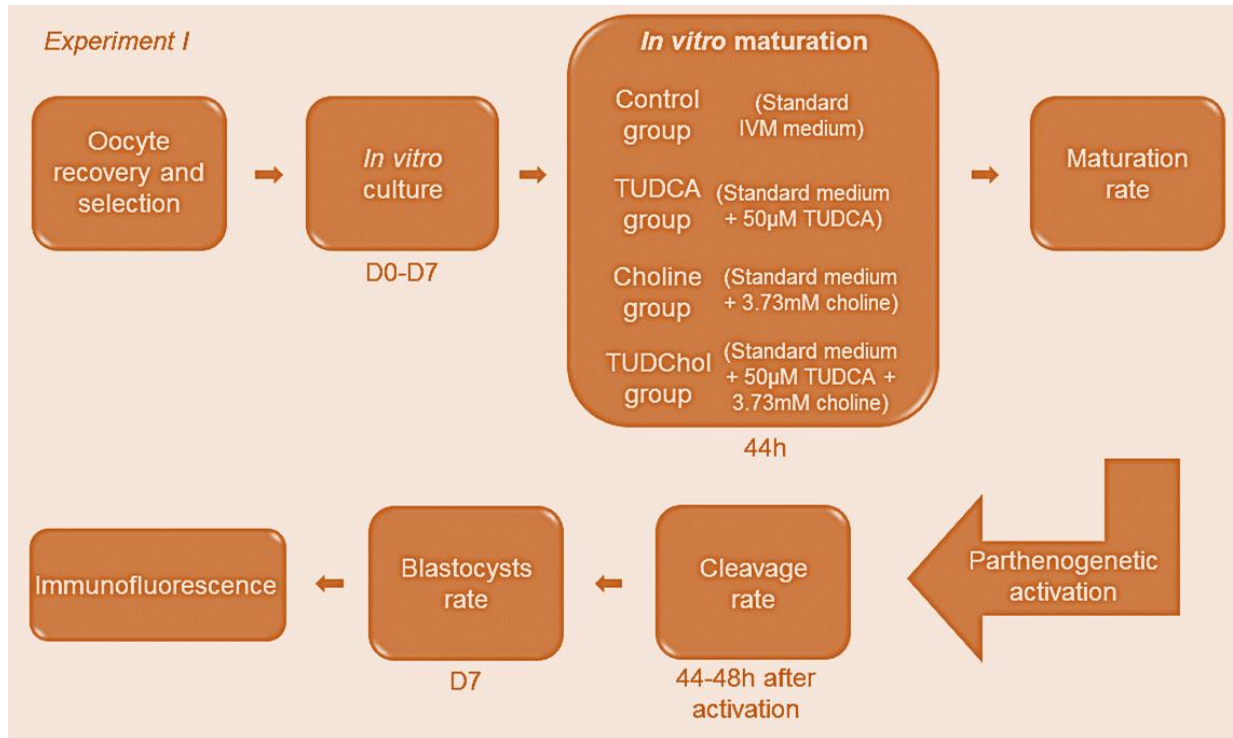
Oocyte Activation and Embryo Culture

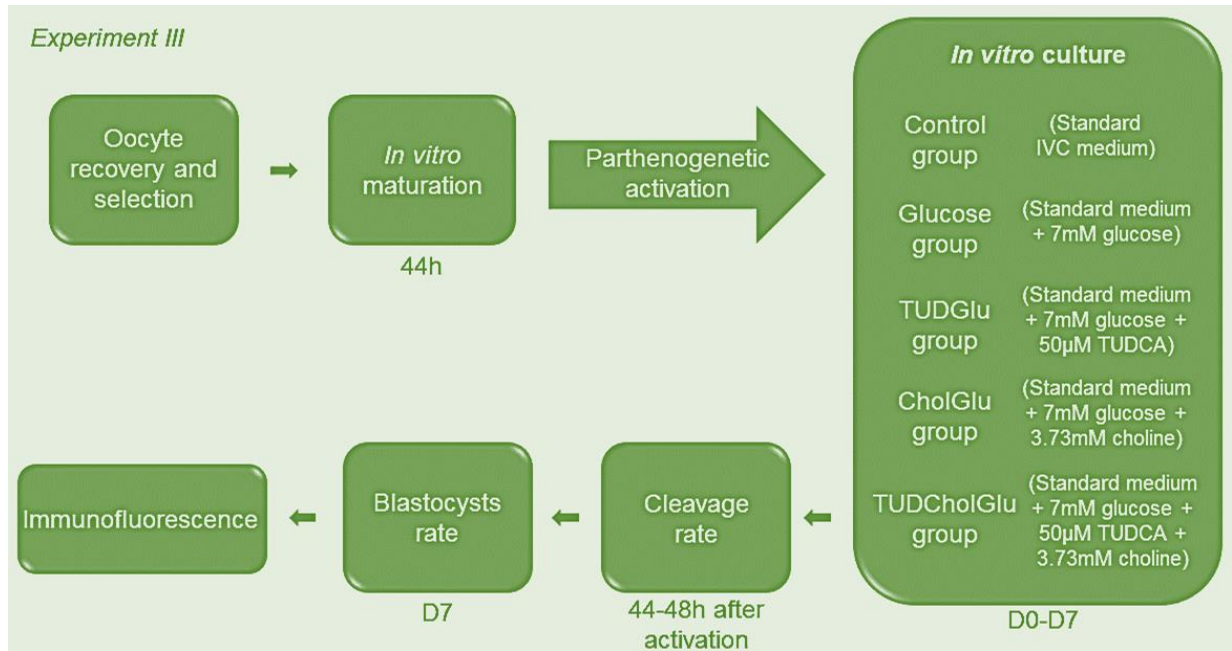
In experiment II, parthenogenetic activation and *in vitro* culture were carried out as stated for experiment I. For this experiment, 1645 presumptive zygotes were obtained through eight replicates. The culture media (from day 0 to day 7) for control group was the same as the standard one. However, the culture medium for TUDCA group was supplemented with 50µM TUDCA, Choline group medium was supplemented with 3.73mM Choline, and the medium for TUDChol group consisted of standard culture medium, 50 µM TUDCA and 3.73mM Choline.

In experiment III, 1437 presumptive zygotes were obtained through five replicates and divided into Control and treated groups. The culture medium for Glucose group was supplemented with 7mM glucose (G6152), dose chosen from preliminary experiments (data not shown). TUDGlu group was submitted to culture under Glucose group's medium supplemented with 50µM TUDCA (Calbiochem, 580549, Darmstadt, Germany), based on the literature (ZHANG *et al.*, 2012b), CholGlu group medium was cultured under Glucose group's medium supplemented with 3.73mM Choline as in the previous experiments from our group, and the medium for TUDCholGlu group consisted of Glucose culture medium, 50 µM TUDCA and 3.73mM Choline.

Experimental Design

Experiments were carried out as follows:





Immunofluorescence Staining

In both experiments, blastocysts at Day 7 were fixed for 15 to 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS and then permeabilized in 1% Triton X-100 in PBS for 30 min at 37°C. Samples were incubated for 1 h at room temperature in blocking solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in PBS) and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (rabbit polyclonal anti-Cleaved Caspase-3 [CC3; Asp175], 1:400 dilution; Cell Signaling Technology, Boston, MA; goat polyclonal anti-Sox-2, 1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) diluted in blocking solution. Embryos were co-incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies anti-goat immunoglobulin G (IgG) Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluted 1:1000 or anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluted 1:1000. Samples' DNA was stained with 10 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) in blocking solution for 20 min. Samples were then mounted on microscope slides, using a drop of Mowiol. The slides were kept in a dark box and examined by epifluorescence through an Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were captured at 200x magnification, using a Retiga 2000R Monochromo digital camera (Qimaging, Surrey, BC). Images were evaluated by using SimplePCI imaging software (Compix, Inc., Sewickley, PA).

Statistical Analysis

In both experiments, statistical analyses were performed using the JMP software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Continuous data were analyzed through Oneway ANOVA, and means were compared through Tukey-Kramer HSD test for multiple pairs comparison. Data are shown as means \pm SEM when rates, and \pm SDM when cell numbers. Statistical confidence level (α) adopted was 0.05.

Results

In experiment I, maturation and blastocyst rates showed no significant difference between Control and treated groups ($P > 0.05$). However, Choline and TUDChol groups showed significant decrease in the number of cleaved embryos and hatched blastocysts, when compared to TUDCA group ($P < 0.05$; Table 1).

Table 1. Effect of supplementation with 50 μ M tauroursodeoxycholic acid, 3.73mM choline or both during *in vitro* maturation of porcine oocytes on *in vitro* embryo production outcomes.

Group	Oocytes	Matured	Cleaved	Blastocysts	Hatched
	n	Mean% \pm SEM (n/n)	Mean% \pm SEM (n/n)	Mean% \pm SEM (n/n)	Mean% \pm SEM (n/n)
Control	294	79.2 \pm 7.4 ^a (232/294)	53.4 \pm 2.3 ^a (124/231)	52.4 \pm 7.9 ^a (66/124)	23.2 \pm 3.6 ^{ab} (14/66)
TUDCA	290	79.8 \pm 4.6 ^a (231/290)	57.2 \pm 3.4 ^a (132/231)	49.5 \pm 4.8 ^a (65/132)	33.0 \pm 4.1 ^a (17/65)
Choline	286	72.0 \pm 7.8 ^a (205/286)	30.2 \pm 3.4 ^b (63/204)	30.0 \pm 7.9 ^a (21/63)	3.3 \pm 3.3 ^b (1/21)
TUDChol	271	78.0 \pm 6.6 ^a (211/271)	32.4 \pm 4.5 ^b (71/211)	39.8 \pm 3.0 ^a (29/71)	11.9 \pm 6.7 ^b (4/29)

^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

In experiment II, cleavage and blastocyst were not significantly different between Control and treated groups ($P > 0.05$). However, Choline and TUDChol groups showed again significant decrease in the number of hatched blastocysts, when compared to TUDCA group ($P < 0.05$; Table 2). At immunofluorescence, Choline blastocysts showed a decrease in total cell number compared to their Control and TUDCA counterparts ($P < 0.05$). There was no difference between groups regarding the staining for cleaved caspase-3 (CC3), although, TUDCA group presented lower proportion of Sox2 positive cells than Control group ($P < 0.05$; Table 3 and Figure 1).

Table 2. Effect of supplementation with 50 μ M tauroursodeoxycholic acid, 3.73mM choline or both during *in vitro* culture of parthenogenetic porcine embryos on *in vitro* embryo production outcomes.

Group	Cultured	Cleaved	Blastocysts	Hatched
	n	Mean% \pm SEM (n/n)	Mean% \pm SEM (n/n)	Mean% \pm SEM (n/n)
Control	406	45.7 \pm 6.0 ^a (182/406)	46.3 \pm 6.3 ^a (93/182)	14.6 \pm 5.5 ^{ab} (13/93)
TUDCA	419	45.4 \pm 2.9 ^a (188/419)	53.6 \pm 5.1 ^a (101/188)	23.1 \pm 4.9 ^a (25/101)
Choline	400	50.7 \pm 3.6 ^a (200/400)	56.9 \pm 4.4 ^a (113/200)	1.6 \pm 1.1 ^b (2/113)
TUDChol	420	50.3 \pm 3.9 ^a (210/420)	54.1 \pm 2.9 ^a (113/210)	6.2 \pm 2.6 ^b (8/113)

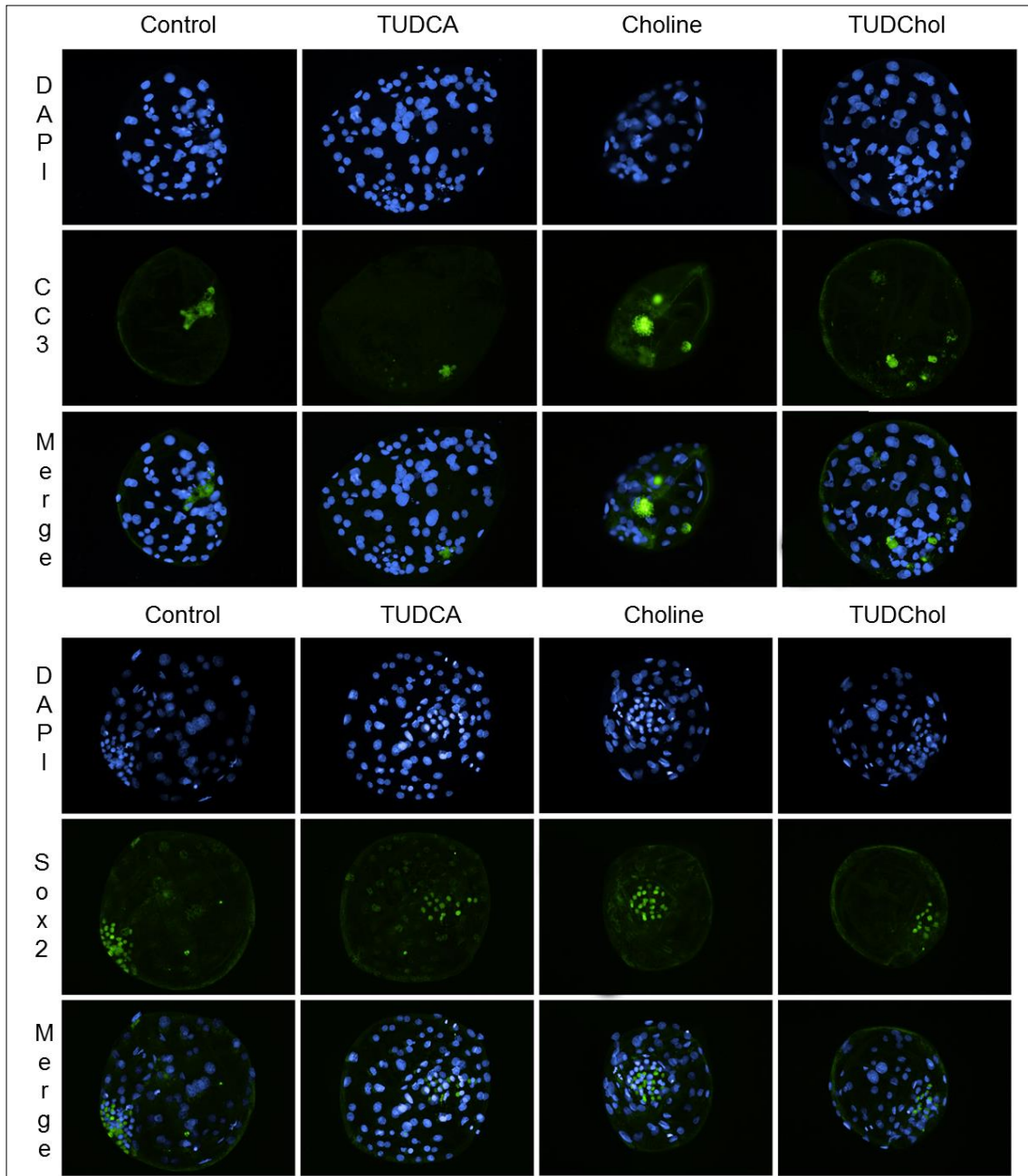
^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of supplementation with 50 μ M tauroursodeoxycholic acid, 3.73mM choline or both during *in vitro* culture of parthenogenetic porcine embryos on total cell number, apoptosis and inner cell mass proportion.

Group	Blastocysts	Total cell number	Blastocysts	CC3+/total	Blastocysts	Sox2+/total
	n	Mean \pm SDM	n	Mean% \pm SDM	n	Mean% \pm SDM
Control	56	69.5 \pm 33.6 ^a	31	5.0 \pm 6.7 ^a	25	17.5 \pm 12.7 ^a
TUDCA	66	68.1 \pm 32.9 ^a	38	3.1 \pm 4.7 ^a	28	10.0 \pm 7.2 ^b
Choline	69	53.7 \pm 25.2 ^b	36	4.1 \pm 4.3 ^a	33	11.5 \pm 10.3 ^{ab}
TUDChol	69	58.9 \pm 29.0 ^{ab}	32	7.3 \pm 17.8 ^a	36	13.2 \pm 9.2 ^{ab}

^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

Figure 1. Representative panel of day 7 porcine blastocysts parthenogenetically activated and cultured in TUDCA- and/or choline-supplemented medium.



Cell nuclei are stained with DAPI in blue. Cleaved Caspase-3 (CC3) positive cells, representing apoptosis (1st. panel) and Sox2 positive cells, representing the inner cell mass (2nd. panel), are stained in green. 200x magnification.

In experiment III, there was no statistical difference between control and treated groups regarding cleavage rates and cleaved caspase 3-positive cell

proportion ($P > 0.05$). However, blastocyst and hatching rates, as well as total cell number were lower for all treatments when compared to Control ($P < 0.05$). Regarding inner cell mass (ICM) proportion, CholGlu group had lower percentages of Sox2-positive cells than TUDGlu and Control groups ($P < 0.05$; Tables 5 and 6 and Figure 3).

Table 4. Effect of 3.73mM choline, 50 μ M TUDCA or simultaneous supplementation of high-glucose culture medium on *in vitro* embryo production outcomes.

Group	Cultured	Cleaved	Blastocysts	Hatched
	n	Mean % \pm SEM (n/n)	Mean % \pm SEM (n/n)	Mean % \pm SEM (n/n)
Control	284	63.9 \pm 7.0 ^a (169/284)	67.3 \pm 3.6 ^a (123/169)	17.3 \pm 5.6 ^a (21/123)
Glucose	289	61.6 \pm 6.9 ^a (183/289)	37.5 \pm 4.0 ^b (69/183)	0.0 \pm 0.0 ^b (0/69)
TUDGlu	286	58.0 \pm 8.9 ^a (171/286)	38.5 \pm 5.3 ^b (66/171)	0.0 \pm 0.0 ^b (0/66)
CholGlu	275	63.8 \pm 5.9 ^a (178/275)	32.1 \pm 2.6 ^b (59/178)	0.0 \pm 0.0 ^b (0/59)
TUDCholGlu	303	62.3 \pm 8.6 ^a (196/303)	31.6 \pm 3.4 ^b (66/196)	0.0 \pm 0.0 ^b (0/66)

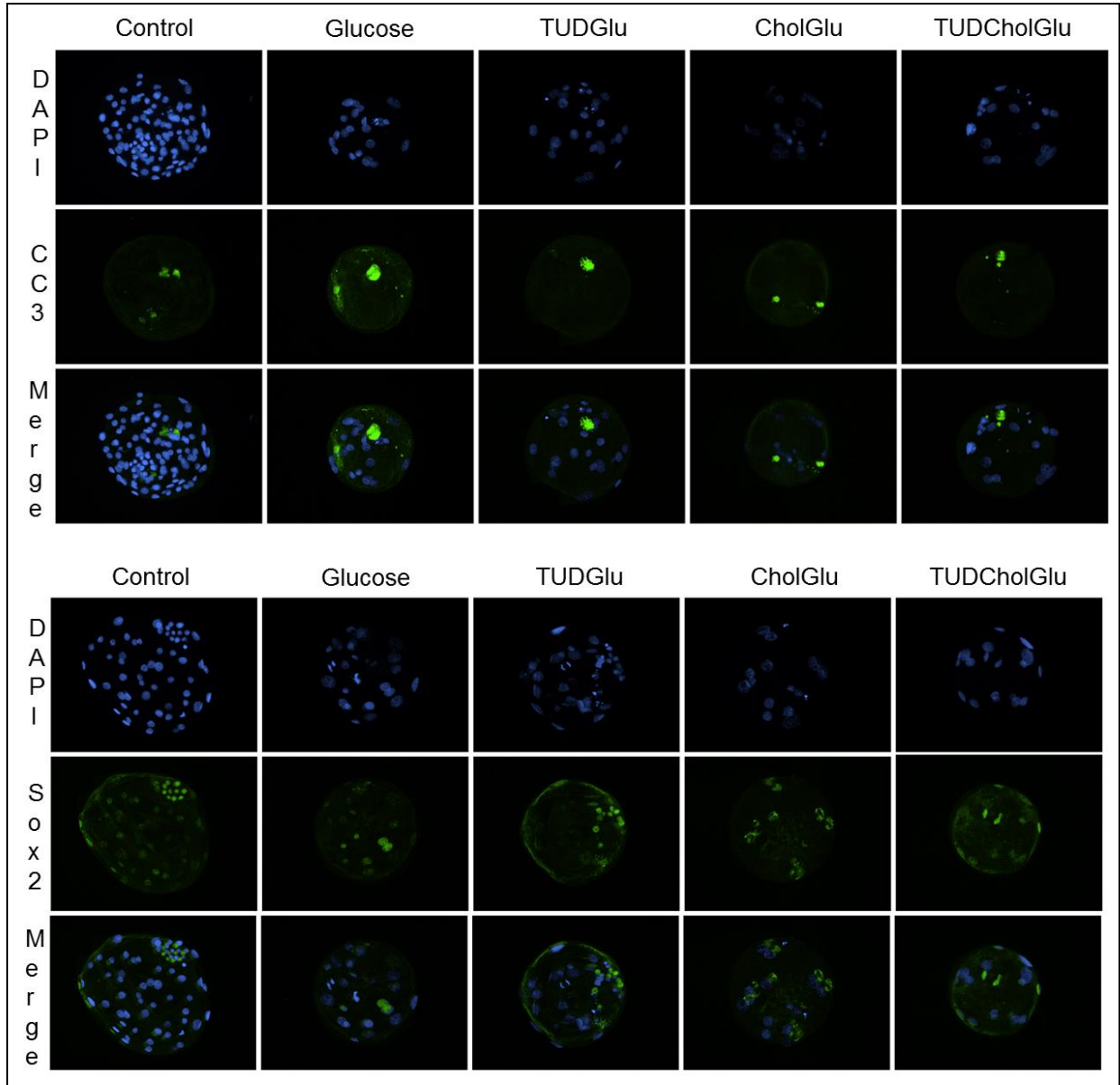
^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of 3.73mM choline, 50µM TUDCA or simultaneous supplementation of high-glucose culture medium on *in vitro* culture of parthenogenetic porcine embryos on total cell number, apoptosis and inner cell mass proportion.

Groups	Blastocysts		Total cell number		Blastocysts		CC3+/total		Blastocysts		Sox2+/total	
	n	Mean ± SDM	n	Mean% ± SDM	n	Mean% ± SDM	n	Mean% ± SDM	n	Mean% ± SDM	n	Mean% ± SDM
Control	100	57.3 ± 30.9 ^a	42	5.6 ± 7.1 ^a	58	13.0 ± 9.5 ^a						
Glucose	65	25.3 ± 17.2 ^b	29	4.2 ± 9.7 ^a	36	8.6 ± 12.7 ^{ab}						
TUDGlu	44	21.5 ± 12.6 ^b	22	2.9 ± 4.7 ^a	22	13.2 ± 19.6 ^a						
CholGlu	43	16.2 ± 11.2 ^b	21	2.6 ± 5.5 ^a	22	0.0 ± 0.0 ^b						
TUDCholGlu	39	17.3 ± 7.9 ^b	21	6.1 ± 11.4 ^a	18	4.6 ± 8.2 ^{ab}						

^{a,b} – Different letters between lines in the same column indicate statistically significant difference (P < 0.05).

Figure 2. Representative panel of day 7 porcine blastocysts parthenogenetically activated and cultured in TUDCA- and/or choline-supplemented medium containing a high glucose level.



Cell nuclei are stained with DAPI in blue. Cleaved Caspase-3 (CC3) positive cells, representing apoptosis (1st. panel) and Sox2 positive cells, representing the inner cell mass (2nd. panel), are stained in green. 200x magnification.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to address the effect of maturation and culture media supplementation with choline associated with TUDCA

on oocyte and pre-implantation embryo development. In addition, we evaluate for the first time the effect of supplementing culture media with choline and TUDCA on glucose induced-stressed embryos *in vitro* produced. Our results show that choline supplementation during IVM and IVC impairs preimplantation embryo quality.

Choline supplementation of IVM medium had no effect on maturation rate, in other words, did not alter polar body extrusion. On the other hand, it could be interfering in other features that we did not evaluate at this moment, since an unexpected detrimental effect could already be seen at cleavage stage, lowering rates in a significant manner from 53.40 ± 2.34 (Control group) and 57.22 ± 3.38 (TUDCA group) to 30.21 ± 3.44 and 32.39 ± 4.52 (Choline and TUDChol groups, respectively).

According to previous studies, porcine embryos IVP, either by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation or by somatic cell nuclear transfer, show significantly higher levels of global DNA methylation, due to the epigenetic disturbances imposed by the *in vitro* environment (Deshmukh et al., 2011). An explanation for the negative influence of choline on cleavage rate is that this period coincides with maternal-zygotic transition, which is a period strongly dependent of proper passive maternal DNA-demethylation (LI et al., 2013). By offering the oocyte a supplementation of methyl donor nutrient during this period, it is reasonable to infer that an even higher interference on epigenetic mechanisms can be occurring.

It is known that blastocyst rate is not the most accurate parameter for assessing implantation potential, since many abnormal embryos achieve this stage with lower ability for further development (CAPALBO et al., 2014). Our results are in accordance with that. Even though no difference was observed in blastocyst rate among groups ($P > 0.05$), lower hatching rates were obtained from choline-treated groups (3.33 ± 3.33 and 11.86 ± 6.67 for Choline and TUDChol, respectively), intermediate rates from Control (14.65 ± 5.53 ; $P > 0.05$) and higher from TUDCA (23.06 ± 4.90 ; $P < 0.05$) groups.

When supplemented during culture, no effects were observed on cleavage or blastocyst rates. However, similarly to IVM experiment, embryo quality was impaired by choline and improved by TUDCA, when comparing hatching rates from both groups (1.64 ± 1.12 and 6.23 ± 2.63 , for Choline and TUDChol, respectively vs. 23.06 ± 4.90 for TUDCA). Interestingly, in both experiments, TUDCA was not able to recover embryos' quality when simultaneously supplemented with choline.

Acknowledging choline participation on cell membrane constitution, cell division and tissue expansion, choline supplementation during IVM and IVC period could be promoting some changes on membrane constitution leading to thicker membranes, making it difficult to hatch (GHANNADI *et al.*, 2011; YARA *et al.*, 2015). Another reason for the blastocysts not to hatch is the fact that embryos from Choline group had less total cell number (53.72 ± 25.21) than Control and TUDCA (69.53 ± 33.65 and 68.07 ± 32.86 ; $P < 0.05$) groups, which is an indicator of embryo quality and implantation potential (DU *et al.*, 2016).

Considering that *in vitro* conditions can signify a stressful environment for the embryos (SHARMA *et al.*, 2015), cleaved caspase-3 was assessed for evaluating ER stress and the effect of supplemented molecules on it. In the present experiment, however, no statistical difference was observed regarding the CC3 positive cell rate among the groups, possibly indicating that all embryos were still able to alleviate ER stress avoiding activation of the apoptosis pathway (VAN VLIET e AGOSTINIS, 2017).

Sox2 is a gene usually expressed in the inner cell mass (ICM) region in blastocyst stage, responsible for signaling cells to form the epiblast (MISTRI *et al.*, 2016). When assessed for targeting the ICM and evaluating the ICM/trophectoderm (TE) proportion, Choline, TUDChol and Control groups showed no statistical difference. Nevertheless, TUDCA alone showed a lower proportion of ICM and higher TE proportion, which was contrary to other researchers findings on parthenogenetic pig embryos (ZHANG *et al.*, 2012b), probably due to the fact that the differential staining methodology used by the authors was of low specificity (MACHÁTY *et al.*, 1998) compared to the one from our study. The lower ICM proportion, taken together with the clear tendency of improvement (higher total cells number and higher hatching rates) may suggest that a severe quality control and selection of cells that stand for ICM play a major role in maintaining embryo quality than a higher number in ICM, as thought so far.

The third experiment was carried out for investigating whether choline supplementation at 3.73mM throughout the 7 days of culture period would exert an additional effect when administered alone or with TUDCA in a different environmental condition, such as glucose-induced stress. In this experiment, all glucose-treated groups showed statistically lower blastocyst and hatching rates, regardless of supplementation ($P < 0.05$). Although cleaved caspase-3 rate did not change among

groups ($P > 0.05$), total cell number was lower, as well, in all treated groups when compared to control.

These findings suggest that those blastocysts were, in fact, also under stressful conditions, yet still able to avoid apoptosis fate (VAN VLIET e AGOSTINIS, 2017). In addition, Sox2 positive cell proportion was strongly affected by choline supplementation (0.00 ± 0.00), when compared to control and TUDGlu groups (12.96 ± 9.49 and 13.23 ± 19.65 , respectively; $P < 0.05$), highlighting an even stronger negative effect of choline when supplemented in stressful conditions. That also corroborates with other studies, in which TUDCA showed positive effect on endoplasmic reticulum stress but no influence on embryo development (SHARMA *et al.*, 2015).

Conclusions

Choline supplementation during *in vitro* maturation and *in vitro* culture impaired preimplantation embryo development and quality under standard or stress conditions. In addition, besides seeming to improve standard development, TUDCA was not able to reestablish embryos' viability impaired by choline, in porcine *in vitro* produced embryos under the experimented conditions.

References

ACOSTA, D. A.; DENICOL, A. C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M. I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORREA, M. N.; HANSEN, P. J.; CARDOSO, F. C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1669-1679, Jun 2016. ISSN 0093-691x.

CAO, S.; HAN, J.; WU, J.; LI, Q.; LIU, S.; ZHANG, W.; PEI, Y.; RUAN, X.; LIU, Z.; WANG, X.; LIM, B.; LI, N. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 4, 2014. ISSN 1471-2164.

CAPALBO, A.; RIENZI, L.; CIMADOMO, D.; MAGGIULLI, R.; ELLIOTT, T.; WRIGHT, G.; NAGY, Z. P.; UBALDI, F. M. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. **Human Reproduction**, v. 29, n. 6, p. 1173-1181, Jun 2014. ISSN 0268-1161.

DICKHOUT, J. G.; KREPINSKY, J. C. Endoplasmic reticulum stress and renal disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2341-2352, Sep 2009. ISSN 1523-0864.

DICKS, N.; AGELLON, L. B.; BORDIGNON, V. Somatic Cell Nuclear Transfer and the Creation of Transgenic Large Animal Models. In: LI, X.-Q.; DONNELLY, D. J., *et al* (Ed.). **Somatic Genome Manipulation: Advances, Methods, and Applications**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.123-143. ISBN 978-1-4939-2389-2.

DU, Q.-Y.; WANG, E.-Y.; HUANG, Y.; GUO, X.-Y.; XIONG, Y.-J.; YU, Y.-P.; YAO, G.-D.; SHI, S.-L.; SUN, Y.-P. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 4, p. 910-919. e911, 2016. ISSN 0015-0282.

FRISO, S.; UDALI, S.; DE SANTIS, D.; CHOI, S. W. One-carbon metabolism and epigenetics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 28-36, Apr 2017. ISSN 0098-2997.

GHANNADI, A.; KAZEROONI, M.; JAMALZADEH, F.; AMIRI, S.; ROSTAMI, P.; ABSALAN, F. The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 9, n. 2, p. 95, 2011.

GRUPEN, C. G. The evolution of porcine embryo in vitro production. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 24-37, Jan 01 2014. ISSN 0093-691x.

HAJARIAN, H.; AGHAZ, F.; KARAMI SHABANKAREH, H. Replacement of serum with sericin in in vitro maturation and culture media: Effects on embryonic developmental competence of Sanjabi sheep embryo during breeding season. **Theriogenology**, v. 92, p. 144-148, Apr 01 2017. ISSN 0093-691x.

LEERMAKERS, E. T. M.; MOREIRA, E. M.; KIEFTE-DE JONG, J. C.; DARWEESH, S. K. L.; VISSER, T.; VOORTMAN, T.; BAUTISTA, P. K.; CHOWDHURY, R.; GORMAN, D.; BRAMER, W. M.; FELIX, J. F.; FRANCO, O. H. Effects of choline on health across the life course: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 8, p. 500-522, 2015. ISSN 0029-6643.

LI, L.; LU, X.; DEAN, J. The maternal to zygotic transition in mammals. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 919-938, 10// 2013. ISSN 0098-2997.

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. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 4, p. 269-278, Dec 2016. ISSN 1642-431x.

LUNARDELLI, P. A.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, C. O.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of *Bos indicus* cattle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3189-3200, 2016. ISSN 1679-0359.

MACHÁTY, Z.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S. Development of Early Porcine Embryos In Vitro and In Vivo¹. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2, p. 451-455, 1998. ISSN 0006-3363.

MISTRI, T. K.; ARINDRARTO, W.; NG, W. P.; WANG, C.; LENG, H. L.; SUN, L.; CHAMBERS, I.; WOHLAND, T.; ROBSON, P. Dynamic changes in Sox2 spatio-temporal expression direct the second cell fate decision through Fgf4/Fgfr2 signaling in preimplantation mouse embryos. **BioRxiv**, 2016.

ROMERO-RAMIREZ, L.; NIETO-SAMPEDRO, M.; YANGUAS-CASAS, N. Tauroursodeoxycholic acid: more than just a neuroprotective bile conjugate. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 1, p. 62-63, Jan 2017. ISSN 1673-5374 (Print) 1673-5374.

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**, v. 84, n. 2, p. 200-207, Jul 15 2015. ISSN 0093-691x.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F. G.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, Mar 10 2017. ISSN 0936-6768.

VAN VLIET, A. R.; AGOSTINIS, P. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Mar 28 2017. ISSN 0070-217X (Print)

WASIELAK, M.; WIĘSAK, T.; BOGACKA, I.; JALALI, B. M.; BOGACKI, M. Maternal effect gene expression in porcine metaphase II oocytes and embryos in vitro: effect of epidermal growth factor, interleukin-1 β and leukemia inhibitory factor. **Zygote**, p. 1-11, 2016. ISSN 0967-1994.

YARA, M.; IWAO, B.; HARA, N.; YAMANAKA, T.; UCHINO, H.; INAZU, M. Molecular and functional characterization of choline transporter in the human trophoblastic cell line JEG-3 cells. **Placenta**, v. 36, n. 6, p. 631-637, Jun 2015. ISSN 0143-4004.

ZEISEL, S. H. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. **Mutation Research**, v. 733, n. 1-2, p. 34-38, May 01 2012. ISSN 0027-5107 (Print)

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, n. 7, p. e40433, 2012a. ISSN 1932-6203.

ZHANG, J. Y.; DIAO, Y. F.; OQANI, R. K.; HAN, R. X.; JIN, D. I. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, p. 128, Apr 2012b. ISSN 0006-3363.

7 CONCLUSÕES

- Avaliou-se pela primeira vez o efeito da adição de colina ao meio de cultivo de embriões suínos. A suplementação com colina nas concentrações de 10mM por 7 dias ou 3.73mM pelos primeiros 5 dias de cultivo promoveu os efeitos deletérios mais graves ao desenvolvimento e qualidade dos embriões suínos produzidos *in vitro* sob condições padrão de cultivo.

- A suplementação com colina isolada ou em associação com TUDCA durante a maturação oocitária promoveu efeitos deletérios ao desenvolvimento e qualidade de embriões suínos produzidos *in vitro*.

- A suplementação com colina isolada ou em associação com TUDCA durante o cultivo embrionário promoveu efeitos deletérios ao desenvolvimento e qualidade de embriões suínos produzidos *in vitro*.

- A suplementação com colina não foi capaz de minimizar o estresse induzido por glicose, independente da presença de TUDCA no cultivo *in vitro*.

ANEXO

Demais Produções Científicas

Artigos publicados em periódicos

1. MOROTTI, F.; LUNARDELLI, P.A.; CAMPOS, J. T.; BERGAMO, L.; COSTA, C. B.; SENEDA, M; M. InjecTable Progesterone for Timed Artificial Insemination in Cattle. *Animal Reproduction*, (submetido 28 nov. 2016).
2. LUNARDELLI, P.A.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, C.O.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of *Bos indicus* cattle Efeito do diâmetro folicular, momento da primeira clivagem e metilação da H3K4 na produção embrionária de vacas *Bos indicus*. *Semina. Ciências Agrárias (Online)*. , v.37, p.21 - 34, 2016.
3. SANCHES, B.V.; LUNARDELLI, P.A.; TANNURA, J.H.; CARDOSO, B.L.; PEREIRA, M.H.C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A.C.; ARNOLD, D.R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. , v.85, p.1147 - 1151, 2015.
4. GARCIA, S.M.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; SENEDA, M.M.; MEIRELLES, F.V. Developmental Block and Programmed Cell Death in *Bos indicus* Embryos: Effects of Protein Supplementation Source and Developmental Kinetics. *Plos One*. , v.10, p.e0119463, 2015.
5. LUNARDELLI, P.A.; MARINHO, L. S. R.; DA SILVA, C. B.; ROSA, C.O.; SENEDA, M. M. Utilización de Embriones como Estrategia para Mejorar la Eficiencia Reproductiva del Ganado Lechero. *Spermova.*, v.4, p.131 - 138, 2014.
6. BLASCHI, W.; LUNARDELLI, P.A.; MARINHO, L. S. R.; MAX, M. C.; SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; STERZA, F. A. M.; BALDASSARRE, H.; RIGO, T. R.; SENEDA, M. M. Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. *Journal of Veterinary Science (Seoul. Print)*., v.15, p.433 - 437, 2014.

Capítulos de livro publicados

1. SENEDA, M. M.; LUNARDELLI, P. A.; DA SILVA, C. B.; DA SILVA, N. C.; MOROTTI, F. Evolução da Pesquisa em Pecuária Leiteira. 1 ed.: Embrapa – Clima temperado, 2017, [em processo de publicação].
2. FRANCO, M. M.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P. A. Epigenetic Modifications and Their Roles in Animal Reproduction In: Epigenetic Modifications an Their Roles. In Animal Reproduction.1 ed.: Nova Science Publishers, 2016, p. 325-351.
3. SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; LUNARDELLI, PAULA ALVARES; COSTA, C. B. Female Reproductive Physiology: Current Concepts and Advanced Perspectives. In: Female Reproductive Physiology: Current Concepts and Advanced Perspectives.1 ed.: Nova Science Publishers, 2016, p. 1-26.
4. LUNARDELLI, PAULA ALVARES; SARAPIAO, F. D.; BERGAMO, L. Z.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. In Vitro Production of Bovine Embryos. In: In Vitro Production of Bovine Embryos.1 ed.: Nova Science Publishers, 2016, p. 174-194.
5. MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; ROSA, C.O.; SARAPIAO, F. D.; SENEDA, M.M. Large-Scale in vitro Embryo Production as a Tool to Improve Animal Breeding. In: Advances in Medicine and Biology.1 ed.Hauppauge - NY : Nova Science Publishers, Inc., 2015, v.85, p. 40-50.

Trabalhos completos publicados em anais de eventos

1. ROSSI, D. M.; LOPES, F. G.; CASTRO, F. A. B.; BASILE, B. H.; DA SILVA, C. B.; LUNARDELLI, P.A. Características seminais e perímetro escrotal de touros Nelore e Tabapuã criados na região norte do Paraná In: 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA, 2015, Curitiba. Anais do 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA. , 2015. v.42. p.1629 - 1633

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

1. MICHALOVIC, L.; CURRIN, L.; GUTIERREZ, K.; GLANZNER, W. G.; BOHRER, R. C.; DICKS, N.; CESARO, M. P.; ROSA, P. R. A.; LOPEZ, R.; LUNARDELLI, PAULA ALVARES; ALTAMURA, F.; MACEDO, M. P.; SCHUERMANN, Y.; TAIBI, M.; MADOGWE, E.; ST.-YVES, A.; BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. Comparing the expression profile of genes involved in follicular growth and oocyte maturation in granulosa cells of prepubertal and mature Holstein cows In: 9th Annual Symposium of the Réseau Québécois en reproduction, 2016, Quebec city, QC. Abstracts from the 9th Annual Symposium of the Réseau Québécois en reproduction. RQR, 2016. v.9. p.35 - 35
2. ROSA, C.O.; MARINHO, L.S.R.; ROSA, P. R. A.; CESARO, M. P.; LUNARDELLI, P. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M.M. Expression of genes involved in oocyte competence is higher in cumulus cells of Nelore cows with low compared to high number of antral follicle In: 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2016, Foz do Iguaçu - PR. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). , 2016. v.13. p.613 - 613
3. GOMES, C. A. C.; SERAFIM, C. C.; CIVIDINI, F. G.; PEREIRA, F. R.; CORREA, L. S.; DA SILVA, C. B.; LUNARDELLI, P.A.; KOETZ JUNIOR, C.; LOPES, F. G. Características Andrológicas em Touros da Raça Aberdeen Angus, Criados em Condições Extensivas, em uma Propriedade Rural no Norte do Paraná In: 18º Encontro de Atividades Científicas da Unopar, 2015, Londrina. Anais do Encontro de Atividades Científicas. Londrina: Unopar, 2015. v.18. p.112 - 113
4. ROSA, C.O.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; MACHADO, F. Z.; GONZALEZ, S. M.; ROSA, P. R. A.; CESARO, M. P.; BUENO, J. V. R.; SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. In vitro embryo development and gene expression in granulosa and cumulus cells from Bos indicus cows with different numbers of antral follicles In: 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society

- (SBTE), 2015, Gramado - RS. Animal Reproduction. , 2015. v.12. p.762 - 762
5. LUNARDELLI, P.A.; SARAPIAO, F. D.; BUENO, J. V. R.; COSTA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; LINDQUIST, A. G.; BUFALO, I.; SENEDA, M.M. Influence of follicle diameter and time of cleavage on embryo production and profile of histone H3K4 methylation in bovine blastocysts In: 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2015, Gramado - RS. Animal Reproduction. , 2015. v.12. p.773 - 773
 6. MARINHO, L. S. R.; ROSA, C.O.; LUNARDELLI, P.A.; SANCHES, B. V.; BOHRER, R. C.; GLANZNER, W. G.; GUTIERREZ, K.; ROSA, P. R. A.; SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. Pharmacological blocking of h3k27 trimethylation alters the expression of polycomb repressive complex 2 genes in bovine blastocysts produced in vitro In: 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2015, Gramado - RS. Animal Reproduction. , 2015. v.12. p.755 - 755
 7. SARAPIAO, F. D.; LUNARDELLI, P.A.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, C.O.; MARCANTONIO, T. N.; SENEDA, M. M. Influence of follicular diameter and time of cleavage in *Bos indicus* in vitro produced embryos In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Transfer Technology Society (SBTE), 2014, Natal - RN. Animal Reproduction. , 2014. v.11. p.416 - 416
 8. MARINHO, L. S. R.; ROSA, C.O.; LUNARDELLI, P.A.; MACHADO, F. Z.; SARAPIAO, F. D.; DA SILVA, C. B.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M. M. Pharmacological Inhibition of H3K27 Trimethylation in Bovine IVP Embryos In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2014, Natal - RN. Animal Reproduction. , 2014. v.11. p.467 - 467

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos expandidos)

1. MACEDO M.P., GLANZNER W.G., CURRIN L., RISSI V., SOUZA J., LOPEZ R., DICKS N., LUNARDELLI P.A., BALDASSARRE H., BORDIGNON V. Improved Protocol for Activation of Porcine Oocytes. Abstracts from the 50th Annual Meeting

of the Society for the Study of Reproduction (SSR), 2017. Washington D.C., USA., v. 50, n. 1, p. 525-525.

2. LOPES, F. G.; CORREA, L. S.; LUNARDELLI, PAULA ALVARES; DA SILVA, C. B.; SERAFIM, C. C.; FUMAGALLI, M. H.; BELAN, L.; KOETZ JUNIOR, C.; FERREIRA, M. B.; BASILE, B. H. CARACTERÍSTICAS ANDROLÓGICAS E CAUSAS DE REPROVAÇÃO DE TOUROS DA RAÇA CHIANINA, CRIADOS NA MESORREGIÃO NORTE CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ In: 19o encontro de atividades científicas da UNOPAR, 2016, Londrina. Anais do 19o encontro de atividades científicas da UNOPAR. Londrina: Unopar, 2016. v.19. p.218 - 2019
3. SILVA, M. E. A.; DA SILVA, C. B.; LUNARDELLI, P. A.; GUIDONI, P. B.; COSTA, B. K.; SERAFIM, C. C.; PEREIRA, F. R.; CASTRO, F. A. B.; BASILE, B. H.; LOPES, F. G. CARACTERÍSTICAS ANDROLÓGICAS E CAUSAS DE REPROVAÇÃO DE TOUROS DA RAÇA LIMOUSIN, CRIADOS NA MESORREGIÃO NORTE CENTRAL DO ESTADO PARANÁ In: 19o Encontro de Atividades Científicas da Unopar, 2016, Londrina. Anais do 19o Encontro de Atividades Científicas da Unopar. Londrina: Unopar, 2016. v.19. p.220 - 221
4. COSTA, B. K.; LUNARDELLI, P. A.; DA SILVA, C. B.; GUIDONI, P. B.; SERAFIM, C. C.; PEREIRA, F. R.; CASTRO, F. A. B.; BASILE, B. H.; LOPES, F. G. PARÂMETROS SEMINAIS E CAUSAS DE REPROVAÇÃO DE TOUROS DA RAÇA CANCHIM, CRIADOS NA MESORREGIÃO NORTE CENTRAL DO ESTADO PARANÁ In: 19o Encontro de Atividades Científicas da UNOPAR, 2016, Londrina. Anais do 19o Encontro de Atividades Científicas da UNOPAR. Londrina: Unopar, 2016. v.19. p.402 - 403