

4-PSQ: INOVAÇÃO ANTIOXIDANTE NA REPRODUÇÃO BOVINA

BERNARDO DE CASTRO MAYER¹; RODRIGO ALBERTHO ALMEIDA WEDY²;
MARIANA BOSENBECKER DA SILVA³; MELISSA GOMES PETER⁴; PRISCILA
MARQUES MOURA DE LEON⁵; TIAGO VEIRAS COLLARES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bernardocastromayer@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – wedy.rodrigo@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mbosenbeckerdasilva@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – melissagomespeter@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – primleon@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – tiago.collares@ufpel.edu.br

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Uma estratégia emergente na busca e caracterização de compostos bioativos é a síntese de moléculas híbridas, resultantes da fusão de estruturas químicas que possuem propriedades biológicas relevantes. Diante desse cenário, e de acordo com as características farmacológicas dos derivados de quinolina e selênio, o Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LaSOL) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), desenvolveu a molécula 4-PSQ, de acordo com a metodologia apresentada por Savegnago *et al.* (2013), com o intuito de ser uma molécula antioxidante e promissora para novas alternativas terapêuticas.

O selênio (Se) destaca-se como um micronutriente fundamental, desempenhando funções fisiológicas importantes e propriedades antioxidantes. As selenoproteínas, incluindo as glutathione peroxidases (GPxs), estão diretamente ligadas à proteção antioxidante, contribuindo para a proteção celular contra os danos oxidativos. Desse modo, a presença do grupo organosselênio na estrutura do 4-PSQ desempenha uma grande influência na atividade antioxidante e nas propriedades biológicas deste composto (Vogt *et al.*, 2018).

Paralelamente, a quinolina e seus derivados têm atraído interesse dos pesquisadores devido às suas características biológicas. Estudos vêm sugerindo que determinados derivados quinolínicos possuem propriedades que protegem contra o estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2019). Além disso, derivados de quinolina apresentam amplo espectro farmacológico, sendo empregados como antivirais, antifúngico, agente anti-inflamatório e antibacteriano (Vogt *et al.*, 2018). Logo, a presente inovação, tem o intuito de ser uma molécula sintética com propriedades antioxidantes e promissora para a suplementação do meio de maturação *in vitro* como forma de otimizar os resultados da produção *in vitro* de embriões.

2. ANÁLISE DE MERCADO

Conforme dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), em 2024, o valor global de embriões bovinos que foram produzidos *in vitro*, conseguiu totalizar 2.029.007 embriões, o que representa um aumento de 8,1% em comparação ao ano anterior. No mesmo período, o Brasil ficou responsável por 24,3% do total mundial, produzindo 493.989 embriões *in vitro*, sendo considerado o país que mais produz embriões *in vitro* de bovinos no mundo (IETS, 2024). Logo, esses dados demonstram a importância que esse setor representa para a economia mundial e local, enfatizando a necessidade de aprimoramento constante das condições de cultivo e de maturação dos oócitos.

O uso de técnicas biotecnológicas para a produção *in vitro* de embriões (PIV) na reprodução animal, estabelece com uma abordagem fundamental, tanto para o aumento do desempenho reprodutivo, quanto para impulsionar o avanço

do melhoramento genético animal, sendo amplamente empregado no cenário atual (Brackett; Zuelke, 1993).

Dado isso a PIV envolve quatro etapas essenciais para a obtenção de embriões viáveis, e aptos a transferência para a fêmeas receptoras: coleta e aspiração folicular, maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Dentre essas etapas, a MIV é considerada uma das mais críticas, pois é nesse momento que o oócito passa por mudanças significativas que lhe conferem competência para seu desenvolvimento, exercendo influência direta sobre a qualidade nos eventos posteriores da PIV (Ferreira *et al.*, 2009).

Durante a Maturação *In Vitro* (MIV), o estresse oxidativo é gerado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar danos celulares que prejudicam o desenvolvimento do oócito. Para contornar esse problema e melhorar a competência oocitária, a principal estratégia é suplementar o meio de cultivo com compostos antioxidantes (Remião *et al.*, 2016).

Diversos centros de biotecnologia reprodutiva animal, adotam a suplementação com compostos antioxidantes no meio MIV para melhorar suas taxas de sucesso e consequente aumentar a qualidade dos embriões. Um dos aditivos mais amplamente utilizados e padronizado na indústria é a cisteamina, ao qual desempenha um papel de antioxidante no meio MIV, ao qual estudos já comprovaram a sua eficácia (Merton *et al.*, 2013).

No mercado, já há produtos que contêm compostos com propriedades antioxidantes nos meios de maturação. A Vitrolife por exemplo, possui o Gx-MOPS, que contém suplementação de aminoácidos, e o Gx-IVF, que é formulado com Acetil-L-Carnitina, Ácido Alfa-Lipoico e N-Acetil-L-Cisteína (NAC). Esses produtos no mercado demonstram a demanda e aplicabilidade de abordagens direcionadas a regulação do estresse oxidativo, criando um ambiente favorável para o desenvolvimento de novas soluções.

Logo, a combinação híbrida pode proporcionar características únicas de mecanismo, ainda pouco explorada comercialmente, representando uma oportunidade de desenvolvimento de um produto de inovação.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

O 4-PSQ apresenta propriedades biológicas que já foram comprovadas em estudos anteriores, como propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória, neuroprotetora (Luchese *et al.*, 2020), entre outras, demonstrando a versatilidade do composto nas mais diversas áreas. Dessa forma, o presente estudo visa testar seu uso para a biotecnologia reprodutiva, avaliando seu potencial no processo de MIV de oócitos e a citotoxicidade do composto.

A inovação tem a capacidade de futuramente integrar o mercado por meio de parcerias com empresas no setor de reprodução animal e produtores de meio de cultivo como a SALT Biotech, possibilitando o desenvolvimento e a validação do composto para a suplementação dos meios de MIV de oócitos bovinos.

Atualmente, o produto encontra-se no TRL 4 (nível 4 de maturidade tecnológica), onde o presente estudo buscou a validação tecnológica no ambiente laboratorial *in vitro*, podendo posteriormente avançar para avaliação em grande escala, próximas à aplicação comercial.

Neste estudo, foi realizada a avaliação citotóxica e a capacidade antioxidante do composto 4-PSQ. Onde, ovários de fêmeas da espécie *Bos taurus* foram coletados no frigorífico local. Os ovários foram transportados em solução de PBS 1% aquecida a 37°C em garrafas térmicas para o laboratório. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos seguindo a metodologia de

Paschoal *et al.*, (2020) com mínimas alterações. Após isso, os CCOs foram distribuídos aleatoriamente, com 25 a 40 estruturas por grupo, em quatro gotas de 200 µL de meio MIV (SALT BIOTECH). Cada grupo recebeu uma concentração de 4-PSQ (0, 1,5, 15 ou 150 µM), previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). O cultivo foi realizado em atmosfera controlada a 38,0°C e 5% de CO₂, com umidade máxima, por um período de 22 a 24 horas. Ao final do período de incubação, foi realizada a avaliação da taxa de maturação meiótica dos oócitos bovinos e a análise de expressão gênica das células do *cumulus*.

Os testes foram realizados a partir do ensaio colorimétrico Hoechst 33342 (10µg/ml), permitindo determinar a maturação meiótica pela avaliação da presença de corpúsculos polares, utilizando um microscópio de fluorescência (Paschoal *et al.*, 2020). Para avaliar a expressão gênica, utilizou-se as células do *cumulus* oriundas dos oócitos de cada tratamento. A extração de RNA total foi realizada utilizando o trizol (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente quantificada por meio de um NanoDrop. Em seguida, o cDNA foi sintetizado por meio da reação de transcriptase reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems). A avaliação da expressão dos genes glutathione peroxidase (GPX) e GAPDH (normalizador), foi conduzida por meio da amplificação desses genes com *primers* específicos (Remião *et al.*, 2016), utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, levando o grupo controle como referência e adotando o P<0,05.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

A expressão gênica demonstrou que o composto conseguiu promover o aumento da transcrição do gene GPX, chegando a ser de duas a três vezes mais em relação ao controle (Figura 1A). Essa análise é de extrema relevância, pois comprova a grande capacidade do composto de estimular mecanismos de defesa antioxidante no ambiente de cultivo e nos oócitos. Em relação à expansão das células do *cumulus*, o grupo controle teve 93,28% de expansão completa, o 1,5µM 91,60%, o 15µM 95,04% e o 150µM 92,86%. Já os ensaios de Hoechst indicaram uma tendência promissora na otimização da maturação oocitária, como podemos ver na concentração de 15µM (70,73%) em relação ao controle (62,88%), embora não havendo diferença estatística (Figura 1B).

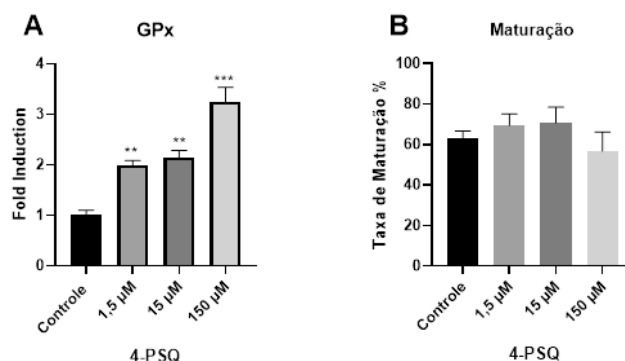


Figura 1. (A) Expressão do gene GPX de acordo com as concentrações do 4-PSQ, onde **p < 0.01; ***p < 0.001. (B) Porcentagem de maturação dos oócitos de acordo com as concentrações do 4-PSQ.

Dado a eficácia do 4-PSQ em nossos estudos, essa molécula se posiciona como uma solução tecnológica atrativa para neutralizar um dos gargalos da PIV, como o acúmulo de radicais livres. O produto poderá contribuir diretamente na formação de oócitos mais competentes e consequentemente em embriões de qualidade superior. Essa inovação representa uma oportunidade no mercado, capaz de aumentar a eficiência e a lucratividade do setor de reprodução animal, visto que essa área se encontra em expansão contínua e tem o Brasil como o maior produtor mundial de embriões bovinos *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

Considerando as complexidades e desafios relacionados a MIV, o 4-PSQ se demonstrou um potencial candidato como suplementação e aplicação na biotecnologia da reprodução animal. Pois ele conseguiu demonstrar seu possível envolvimento na resposta antioxidante do ambiente de cultivo devido ao aumento da expressão do gene GPX nas células do *cumulus* e não demonstrou evidência de citotoxicidade. Logo, serão necessários mais estudos com um número maior de amostras e em outras espécies para investigar sua segurança, mecanismos de ação e viabilidade comercial. A continuidade da pesquisa juntamente com parcerias de empresas no setor possibilitará a sua validação e sua eventual transferência para o mercado como um futuro produto para a reprodução animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IETS. 2024 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Disponível em: <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2024.pdf>.
- BRACKETT, Benjamin G. *et al.* Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 43–64, 1 jan. 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X).
- FERREIRA, E. M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, [S.l.], v. 71, n. 5, p. 836–848, 15 mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>.
- LUCHESE, Cristiane *et al.* Role of 7-chloro-4-(phenylselenanyl) quinoline as an anti-aging drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats. *Experimental Gerontology*, [S.l.], v. 130, p. 110804, 1 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2019.110804>.
- MERTON, J. S. *et al.* Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*, [S.l.], v. 80, n. 4, p. 365–371, 1 set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.025>.
- PASCHOAL, Júlia Damé Fonseca *et al.* Toxicological evaluation of 3-(4-Chlorophenylselenanyl)-1-methyl-1H-indole through the bovine oocyte *in vitro* maturation model. *Toxicology in Vitro*, [S.l.], v. 62, p. 104678, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104678>.
- REMIÃO, Mariana Härter *et al.* Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology*, [S.l.], v. 63, p. 70–81, 1 ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2016.05.016>.
- SAVEGNAGO, Lucielli *et al.* Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline–chalcogenium compounds. *Tetrahedron Letters*, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 40–44, 2 jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2012.10.067>.
- VOGT, Ane G. *et al.* Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenanyl-quinoline. *Chemico-Biological Interactions*, [S.l.], v. 282, p. 7–12, 25 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.003>.
- WANG, Ziqiang *et al.* Pyrroloquinoline quinine protects HK-2 cells against high glucose-induced oxidative stress and apoptosis through Sirt3 and PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S.l.], v. 508, n. 2, p. 398–404, 8 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.140>.