

LARA ERENO FERREIRA

**REVISÃO DE LITERATURA: EFEITOS SOBRE O RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES BOVINOS
QUANDO SUPLEMENTADOS COM TUDCA NAS ETAPAS DE MIV OU
DE CIV**

ASSIS

2022

LARA ERENO FERREIRA

**REVISÃO DE LITERATURA: EFEITOS SOBRE O RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES BOVINOS
QUANDO SUPLEMENTADOS COM TUDCA NAS ETAPAS DE MIV OU
DE CIV**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Faculdade de Ciências e Letras - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Assis, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Biotecnológica.

Assis, 08 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Fabio Gouveia Nogueira
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências e Letras, Campus de Assis

M.V. MSc. Camila Bortoliero Costa Giovannetti
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Celso Rocha
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências e Letras, Campus de Assis

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ivone Ereno, e meu pai, Valter Augusto Ferreira, que me deram todo o suporte necessário durante a minha formação acadêmica e torceram muito por mim.

Às minhas amigas, Gabriela, Brisa e Maria Júlia por tornarem tudo sempre mais leve e não medirem esforços para qualquer ajuda. Ao meu namorado, Rodrigo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao prof^o Marcelo, Camila e Elisa por todo ensinamento e paciência durante os anos de estágio e de desenvolvimento da iniciação científica. Foi a experiência que mais me fez crescer durante a graduação.

RESUMO

Embriões produzidos *in vitro* (PIV) possuem diferenças morfológicas dos *in vivo*. O processo de produção *in vitro* pode afetar negativamente o retículo endoplasmático (RE) pelo acúmulo de proteínas que não se dobraram ou dobraram-se incorretamente, ocasionando danos celulares como apoptose e degeneração. Dependendo da intensidade e para combater os efeitos deletérios do estresse do RE, as células desenvolvem várias estratégias, coletivamente conhecida como resposta a proteínas mal formadas ou UPR (*Unfolded Protein Response*). Assim, a regulação do estresse do RE mostra-se possivelmente um mecanismo importante durante as etapas de PIV. Desta forma, vários inibidores já foram utilizados para reduzir o estresse do RE, sendo o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) utilizado para minimizar o estresse do RE de oócitos e de embriões *in vitro* em várias espécies quando suplementado ao meio de maturação ou no meio de cultivo, respectivamente.

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

ABSTRACT

Embryos produced in vitro (IVP) have morphological differences from those in vivo. The in vitro process can negatively affect the endoplasmic reticulum (ER) by accumulating proteins that did not fold or fold incorrectly, causing cell damage such as apoptosis and degeneration. Depending on the intensity and to combat the deleterious effects of ER stress, cells have developed several strategies, collectively known as Unfolded Protein Response (UPR). Thus, the regulation of ER stress is possibly an important mechanism during the stages of IVP. Several inhibitors have already been used to reduce ER stress. The tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) has been used to minimize the ER stress of oocytes and embryos in vitro in various species when supplemented in the maturation medium or in the culture medium, respectively.

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

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 – Comparativo da evolução da produção *in vitro* vs *in vivo* com o passar do tempo.

Figura 2 – Exemplificação das etapas da PIVE, sendo MIV: maturação, FIV: fertilização e CIV: cultivo *in vitro*.

Figura 3 – Relação entre os estágios de desenvolvimento embrionário, fatores ambientais estressantes, resposta celular e suas consequências.

Figura 4 – Elucidação da ação do TUDCA nos receptores de membrana e suas consequências.

Tabela 1 - Resumo da suplementação do TUDCA nas etapas de MIV ou CIV.

LISTA DE ABREVIATURA

CIV – Cultivo *in vitro*

ER – Retículo endoplasmático

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FIV – Fertilização *in vitro*

IETS – *International Embryo Technology Society* (Sociedade internacional na transferência de embriões)

MIV – Maturação *in vitro*

OPU – *Ovum Pick Up* (Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia)

PIV – Produção *in vitro*

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

TUDCA – Ácido tauroursodesoxicólico

UPR – *Unfolded Protein Response* (Resposta a Proteínas Mal Formadas)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 7 |
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 10 |
| 4. A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINO | 10 |
| 5. O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO | 14 |
| 5.1 O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES .. | 15 |
| 6. O ÁCIDO TAUROURSO DESOXICÓLICO | 18 |
| 6.1 O ÁCIDO TAUROURSO DESOXICÓLICO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES | 19 |
| 7. DISCUSSÃO | 22 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 24 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução animal contribuem de modo decisivo para a cadeia produtiva da pecuária de corte e de leite no mundo (Lopes *et al.*, 2012). A crescente demanda alimentícia pela população mundial evidencia a relevância das biotécnicas, uma vez que sua aplicação à reprodução animal fornece diversas ferramentas para a produção de um rebanho superior (Smidt, 1999).

A participação do setor do agronegócio no PIB brasileiro para 2022 foi estimado em 25,5%, calculado pelo Cepea (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), da Esalq/USP, em parceria com a CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil). Com a expressiva representatividade econômica, a demanda por eficiência na produção de gado apresenta tendência de aumento.

Dentre as biotécnicas utilizadas na pecuária, uma das que mais se destaca em números é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual consiste na produção de embriões em condições artificiais, englobando as etapas de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Entretanto, sabe-se que as condições *in vitro* causam uma variedade de estresses celulares que contribuem para a perda da competência na maturação oocitária e no desenvolvimento do embrião (Lane e Gardner *et al.*, 2005). Principais fatores causadores de estresse celular incluem alterações térmica, osmótica, oxidativa, hipóxia, hiperóxia, restrição de nutrientes, pH, osmolaridade, tensão de cisalhamento, toxinas, lipídios, citocinas e fatores endócrinos (Latham, 2015).

As consequências à tais fatores podem ser decisivos na cadeia de produção. Alterações na expressão gênica, epigenética, apoptose e no metabolismo são recorrentes, acarretando a diminuição ou inibição do desenvolvimento embrionário quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. (Lane e Gardner, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Fong *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2009).

Como resposta ao estresse gerado, as células ativam algumas vias para retornar ao seu estado de homeostase. O retículo endoplasmático (RE) corresponde a uma das principais organelas a responder a esse estímulo. O estresse exógeno afeta o RE ao desencadear o não/mau dobramento de proteínas no seu lúmen. (Kaufman, 1999). Quando a concentração de proteínas mal dobradas excede a capacidade de dobragem, o RE ativa algumas vias de resposta na tentativa de retornar ao equilíbrio, conhecidas como Resposta a Proteínas Mal Formadas ou UPR (Unfolded Protein Response) (Schroder e Kaufman, 2005). Entretanto, quando os

fatores estressantes são constantes e prolongados, a UPR não consegue retornar a célula aos seus padrões ideais e ativa a via apoptótica, desencadeando a morte oocitária/embrionária (Szegezdi *et al.*, 2006). Assim, a regulação do estresse/homeostase do RE provavelmente é um mecanismo importante durante a PIVE.

O uso de moléculas anti-estressoras e antioxidantes com o objetivo de minimizar as consequências do estresse do RE *in vitro* vem sendo utilizado nas etapas de maturação oocitária e de cultivo *in vitro* de blastocistos em várias espécies. O ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), uma chaperona química atuante no RE, já demonstrou regular positivamente a expressão de transcritos relacionados ao estresse e a apoptose (Khatun *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo realizar o levantamento bibliográfico a respeito do uso do TUDCA sobre oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*, considerando que essa forma de produção induz estresse exógeno no retículo endoplasmático, e o TUDCA pode atuar como molécula anti-estressora.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consiste em uma revisão bibliográfica realizada por meio do levantamento de artigos científicos disponíveis on-line nos bancos de dados Pubmed e Google Scholar. Mais de 80 artigos foram revisados, dentre estes, 39 foram selecionados para amparar a revisão realizada.

As palavras-chaves utilizadas para seleção dos artigos foram: *Blastocyst; Cattle; Endoplasmic reticulum stress; IVP; Oocyte; TUDCA.*

3. OBJETIVOS

O objetivo geral dessa revisão foi apresentar os efeitos causados no retículo endoplasmático de oócitos e de embriões bovinos quando suplementados com TUDCA nas etapas de MIV e de CIV.

4. A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINO

A produção *in vitro* de embriões é uma técnica de reprodução assistida que consiste na preparação e co-cultivo de gametas em ambiente laboratorial para

geração do zigoto, e seu cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado (Oliveira, 2014).

Na produção comercial, a PIV possibilita acelerar a produção de animais geneticamente superiores e evitar que fêmeas geneticamente privilegiadas sejam descartadas precocemente em decorrência de problemas que inviabilizam a reprodução natural (Gonçalves *et al.*, 2002). Já na pesquisa, permite agregar informações referentes a espécies tanto para interesse comercial quanto para preservação de espécies ameaçadas de extinção.

A PIVE possui destaque no cenário mundial, uma vez que o número de embriões PIVE ultrapassou o número de embriões bovinos produzidos *in vivo* em 2016 (Figura 1), no entanto, os valores enviados à International Embryo Transfer Society correspondem ao volume enviado por voluntários, assim, não incluem o total real da produção mundial, não excluindo a possibilidade do evento ter ocorrido antes (IETS, 2018).

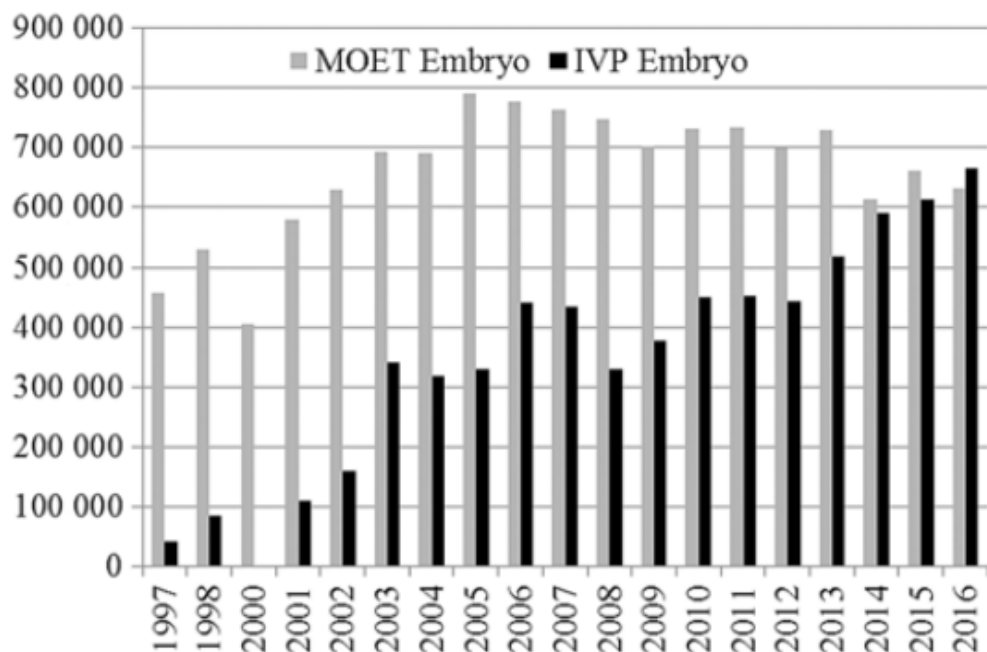


Figura 1. Evolução na quantidade de embriões produzidos *in vivo* (MOET) e *in vitro* (IVP) em todo o mundo para *Bos indicus* e *Bos taurus*. Adaptado de IETS, 2018.

Apesar do aumento da produção de embriões PIV, sabemos que existem diferenças entre estes e seus pares produzidos *in vivo* (Gad *et al.*, 2012). Apesar dos grandes esforços direcionados para melhorar o rendimento de blastocistos a partir de

oócitos imaturos *in vitro*, a qualidade desses blastocistos fica continuamente atrás da dos blastocistos produzidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2008). Recentemente, estudos indicaram que as condições *in vitro* causam uma variedade de estresses celulares que contribuem para a perda da competência no desenvolvimento do embrião (Song *et al.*, 2012). Assim, os danos à maturação oocitária e ao desenvolvimento embrionário são grandes obstáculos para a produção em larga escala de embriões PIV de alta qualidade.

As etapas iniciais da PIVE (Figura 2) consistem na obtenção e maturação do gameta feminino, no entanto a forma de coleta irá variar se o material é destinado ao comércio ou à pesquisa. Na primeira situação, a coleta do gameta feminino se dá por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (Ovum Pick Up; OPU). Antes do procedimento, é recomendado a sincronização da onda de crescimento folicular das doadoras de gameta para aumentar a probabilidade de sucesso na obtenção de complexos cumulus-oócito (CCOs). Quando destinada à pesquisa, a coleta do gameta feminino se dá por meio da aspiração folicular de ovários obtidos de animais de abatedouro (*pós mortem*) com o manuseio de agulha acoplada à seringa (Pfeifer *et al.*, 2009)

Em ambas situações, os CCOs passam por avaliação morfológica, levando em consideração a quantidade de camadas de células do *cumulus* ao redor do oócito, pois estas desempenham papel vital na regulação da maturação (Jainudeen *et al.*, 2004). Após a coleta e seleção dos CCOs, faz-se necessário induzir a maturação nuclear (migrando de prófase I para metáfase II) e citoplasmática do oócito. Nessa etapa, conhecida como maturação *in vitro* (MIV), os CCOs são incubados em ambiente controlado (temperatura, concentração atmosférica e umidade) por um período espécie dependente no caso de bovinos, por 24h (Jainudeen *et al.*, 2004).

A etapa seguinte, fertilização *in vitro* (FIV), consiste na seleção e capacitação (indução da reação acromática) dos espermatozoides criopreservados que apresentam nado progressivo por técnicas de hipermotilidade, como *swim up* ou gradiente de Percoll, seguido pelo co-cultivo dos gametas por um período de 18h a 20h também em ambiente controlado (Jainudeen *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 1995)

Posteriormente, as estruturas submetidas à FIV têm suas células do cumulus removidas para que não haja competição por nutrientes entre estas e o provável zigoto. As estruturas denudadas são incubadas em ambiente controlado, podendo ser de baixa (5%) ou alta (20%) tensão de oxigênio dependendo do protocolo. Essa etapa

é conhecida como cultivo *in vitro* (CIV). As interrupções na incubação mais usuais são feitas no dia 3 (o dia da FIV é considerado 0) para a taxa de clivagem e/ou feeding, dia 5 para segundo feeding, dia 7 para taxa de blastocistos e 8 e 9 para taxas de eclosão ou cinética de eclosão (Gonçalves *et al.*,2002).

De acordo com a finalidade da PIVE, o embrião pode ser criopreservado em fase de blastocisto expandido e posteriormente transferido para a fêmea receptora ou transferido à fresco, isto é, sem criopreservação prévia. Quando o embrião é destinado a pesquisa, pode ser criopreservado ou não para as análises propostas.

Os meios de cultivo utilizados ao longo de todo o processo possuem constituintes que permitem as modificações fisiológicas necessárias para cada etapa de produção, no entanto não são capazes de reverter as consequências do estresse celular causado pelas condições artificiais. Tais consequências podem desencadear apoptose, diminuindo a taxa de produção de blastocistos.

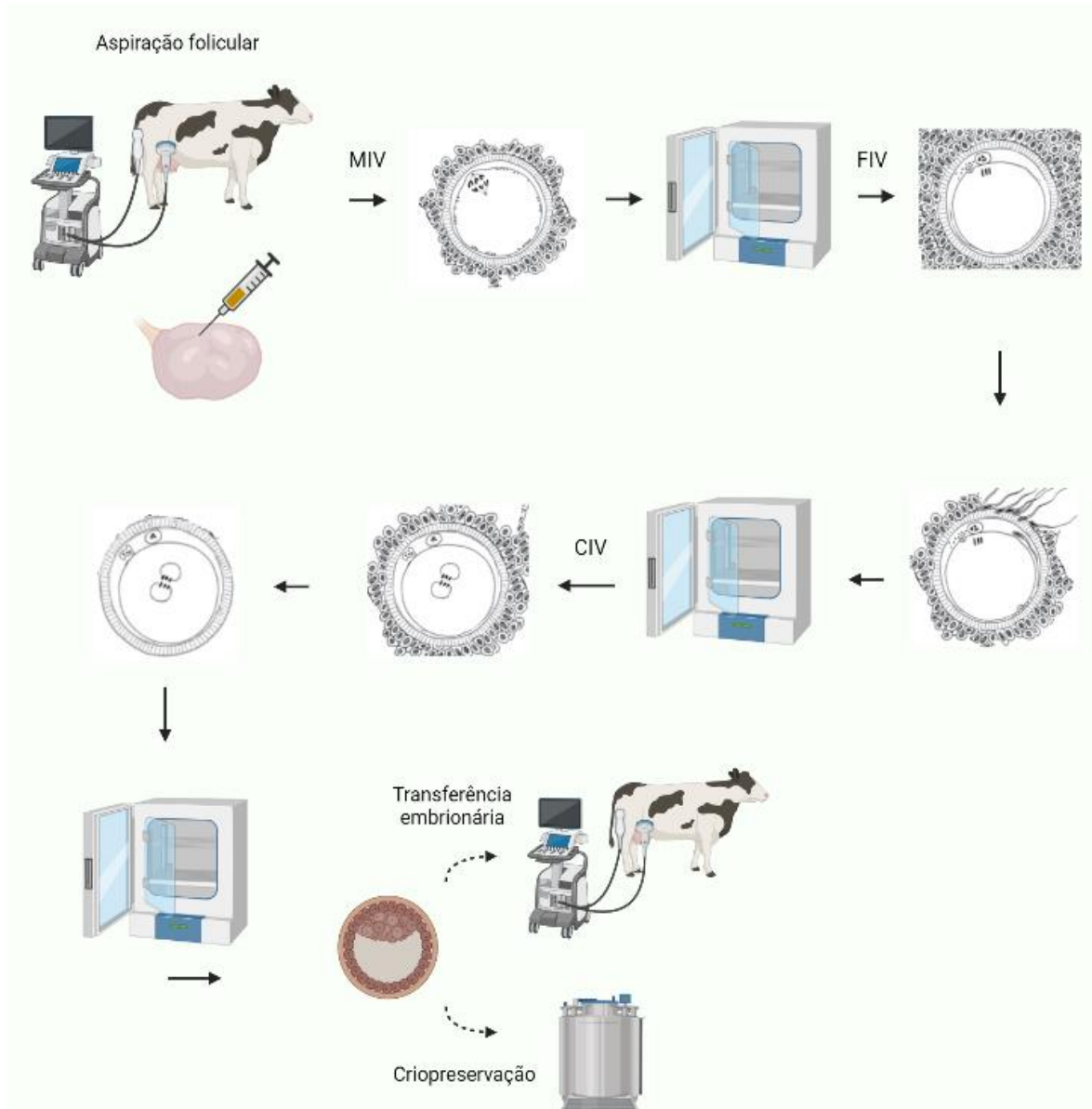


Figura 2. Exemplificação das etapas da PIVE, sendo MIV: maturação, FIV: fertilização e CIV: cultivo *in vitro*. Fonte: Autora (2022).

5. O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O retículo endoplasmático (RE) nas células eucariotas é uma importante organela que corresponde a um dos principais sítios de síntese, dobramento e transporte de proteínas, além de realizar síntese lipídica e de esteroides, metabolizar carboidratos e armazenar Ca^{2+} (Schwarz, 2016). Devido a sua relevância multifuncional, faz-se necessário que o RE consiga responder às mudanças intracelulares desencadeadas por questões ambientais. No entanto, *in vitro*, o microambiente do RE pode ser perturbado pela depleção de Ca^{2+} , hipóxia e a

disfunção da glicosilação N terminal, resultando em proteínas não dobradas ou que dobraram incorretamente (Kaufman, 1999).

Quando o fluxo dessas proteínas excede a capacidade de dobragem e de processamento, resulta na interrupção da homeostase e estresse do RE. O estresse pode desencadear a ativação de três vias por *upregulation*. As duas primeiras atuam como uma adaptação transitória, diminuindo o fluxo de proteínas para o RE (Schroder M., Kaufman RJ, 2005), enquanto a terceira está relacionada à apoptose, degeneração e carcinogênese (Yoon *et al.*, 2014). Estes mecanismos são coletivamente conhecidos como Resposta a Proteínas Mal Formadas ou UPR (Unfolded Protein Response), a qual as células desenvolveram para combater os efeitos deletérios do estresse do RE.

Inicialmente a UPR tenta restaurar a homeostase do RE pelo aumento da produção de chaperonas moleculares envolvidas no dobramento de proteínas e, quando não suficiente, atua para diminuir a demanda por dobramento proteico por *downregulation* da transcrição de genes, codificação de proteínas secretoras e tradução (Harding *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 2000). Concomitantemente induz a liberação ou degradação de proteínas mal formadas por *upregulation* (Hussain *et al.*, 2007).

Entretanto, o acúmulo excessivo e prolongado de proteínas mal formadas no lúmen do RE, redireciona a UPR para ativar a sinalização apoptótica (Szegezdi *et al.*, 2006) e é a base para doenças neurodegenerativas (Dimcheff *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000). A perda da sinalização UPR pode revogar secreção e causar doenças ligadas ao estresse do RE como diabetes (Delépine *et al.* 2000; Scheuner *et al.*, 2001). Além disso, perturbações celulares fora do microambiente do RE podem ser propagadas para o RE e ativar a UPR (Nishitoh *et al.*, 2002).

5.1 O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Oócitos e embriões produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro* podem passar por uma gama de fatores estressores ambientais. Tensão de cisalhamento, exposição prolongada a temperaturas inadequadas, pH alterado, alta tensão de O₂ e constituição nutricional desajustada do meio de cultura são alguns fatores causadores de estresse (Figura 3) (Lane e Gardner, 2000; Thompson *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2009).

Na PIVE, a tensão de cisalhamento, por exemplo, é causada principalmente pela manipulação via pipetagem de oócitos e de embriões, a qual, quando transitória pode não influenciar negativamente as estruturas, porém em situação prolongada pode induzir o estresse do RE (Xie *et al.*, 2007). O estresse térmico também já demonstrou estar correlacionado ao estresse do RE, causando aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na apoptose em oócitos e embriões (Paula-Lopes e Hansen, 2002; Tseng *et al.*, 2006). Os danos causados pela exposição prolongada em situações térmicas estão ligados tanto a temperaturas baixas, como na criopreservação, como também em temperatura ambiente (Saenz-de-Juano *et al.*, 2012; Hegele-Hartung *et al.*, 1991).

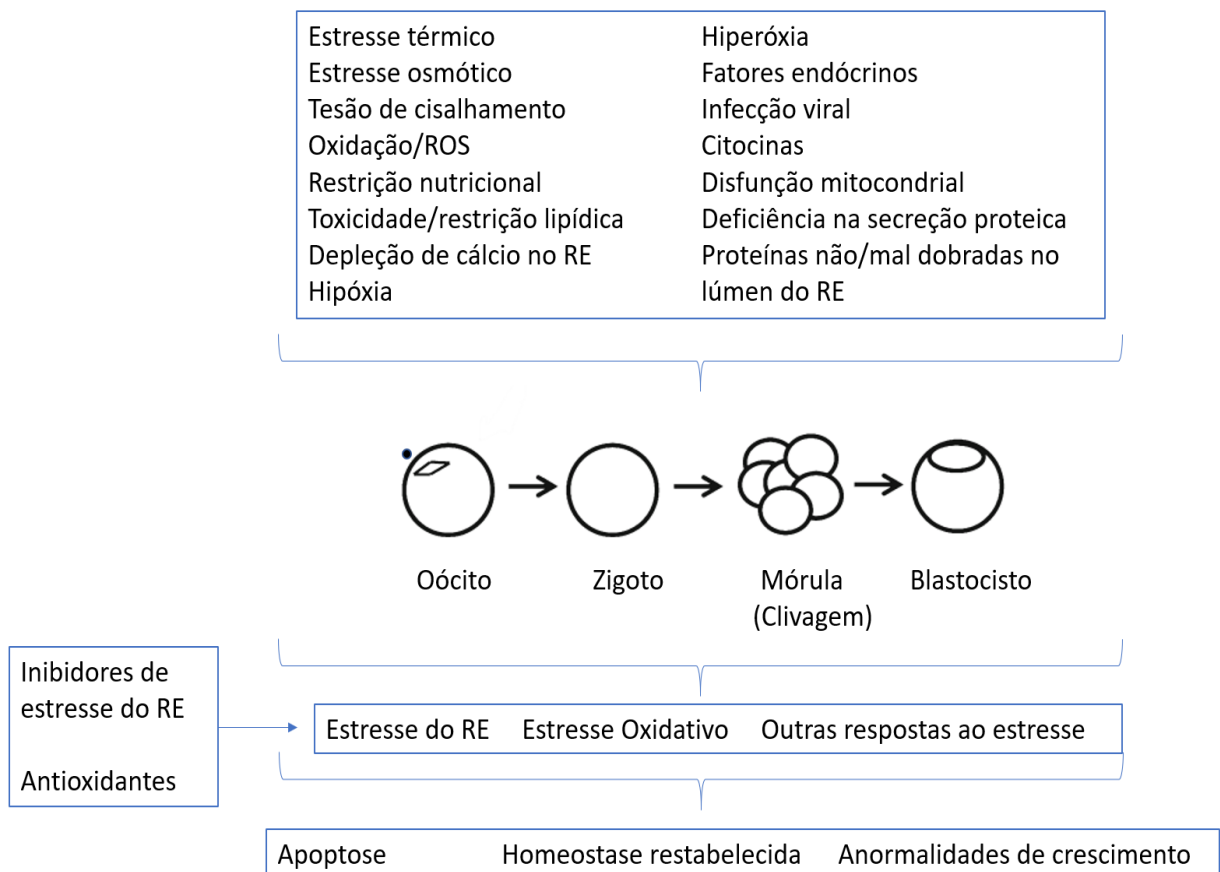


Figura 3. Relação entre os estágios de desenvolvimento, fatores ambientais estressantes, resposta celular e suas consequências. Adaptado de Latham, 2015.

O estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio tem conexão com o estresse do RE (Yoon *et al.*, 2014). O estresse oxidativo contribui para que não

ocorra o dobramento correto e transporte de proteínas, e impede a homeostase de cálcio, podendo desencadear o estresse do RE (Malhotra e Kaufman, 2007).

As consequências do estresse em oócitos podem incluir alterações na expressão gênica, função mitocondrial e nos fusos meióticos. Ao reduzir a qualidade oocitária, pode-se levar à morte do blastocisto ou causar anormalidades de crescimento (Latham, 2015), além de tornar o embrião pré-implantação mais suscetível ao estresse devido à ausência de alguns mecanismos homeostáticos padrão (Kolajova *et al.*, 2001; Steeves e Baltz 2005; Tartia *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 1995).

Como descrito anteriormente, as células desenvolveram maneiras de responder à esses estímulos negativos. Quando em situação de estresse no microambiente do RE, a UPR induz a *downregulation* da transcrição e tradução de genes. Entretanto tal estímulo pode resultar na inibição do recrutamento e na tradução do mRNA materno, prejudicando o desenvolvimento e a maturação apropriada do oócito, além de prejudicar a embriogênese inicial antes da ativação transcricional do genoma embrionário (Lee *et al.*, 2014; Barckmann *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Gosden *et al.*, 2003).

Já no estágio de blastocisto, a reação ao estresse também cascadeia alterações na expressão gênica, além de mudanças nos mecanismos epigenéticos e no metabolismo, podendo prejudicar ou inviabilizar o desenvolvimento embrionário pré implantação. Basar *et al.* demonstram que, sob condições de cultivo *in vitro*, as baixas taxas de desenvolvimento e formação de blastocisto estão atreladas à ativação severa da sinalização UPR mediada pelo estresse do RE. Portanto, a regulação da homeostase e o controle do estresse do RE provavelmente são mecanismos chave durante a maturação do oócito e no desenvolvimento do blastocisto (Latham *et al.*, 2015; Guzel *et al.*, 2017).

De forma geral, os estudos mencionados apresentam os principais fatores que estimulam o estresse do RE e suas vias de sinalização UPR no ambiente *in vitro* em oócitos e blastocistos. Por esses motivos, há estudos sobre a suplementação com agentes anti-estressores nos meios de maturação e cultivo durante as etapas da PIVE, uma vez que parecem desempenhar papéis críticos durante a retomada meiótica oocitária e no desenvolvimento embrionário pré-implantação (Song *et al.*, 2014; Sutton-McDowall *et al.*, 2015; Latham *et al.*, 2016).

6. O ÁCIDO TAUROURSODESOXICÓLICO

Os ácidos biliares são popularmente conhecidos por emulsificar moléculas de gordura permitindo a lipólise, entretanto não se resumem apenas nisso. São atuantes em vias de modulação ao interagir com diversos receptores celulares, principalmente, no fígado e no trato gastrointestinal (Hylemon *et al.*, 2009).

O ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) corresponde ao conjugado de taurina do ácido ursodesoxicólico (UDCA), um ácido biliar secundário endógeno considerado uma chaperona química. Por ser secundário, em humanos, o UDCA é produzido exclusivamente pela microbiota intestinal, direcionado ao fígado pela circulação entero-hepática e então conjugado com a taurina, formando o TUDCA (Kusaczuk, 2019).

É sabido que o TUDCA tem maior afinidade pelos receptores de membrana TGR5, S1PR2 e $\alpha 5\beta 1$ (Figura 4). A ativação desses receptores cascadeia em complexas reações com ativação e/ou inibição de vias moleculares, como as ERKs (quinases reguladas por sinais extracelulares) e AKT (proteína quinase B), as quais estão envolvidas no processo de modulação apoptótica, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, sobrevivência e proliferação celular. (Zangerolamo *et al.*, 2021).

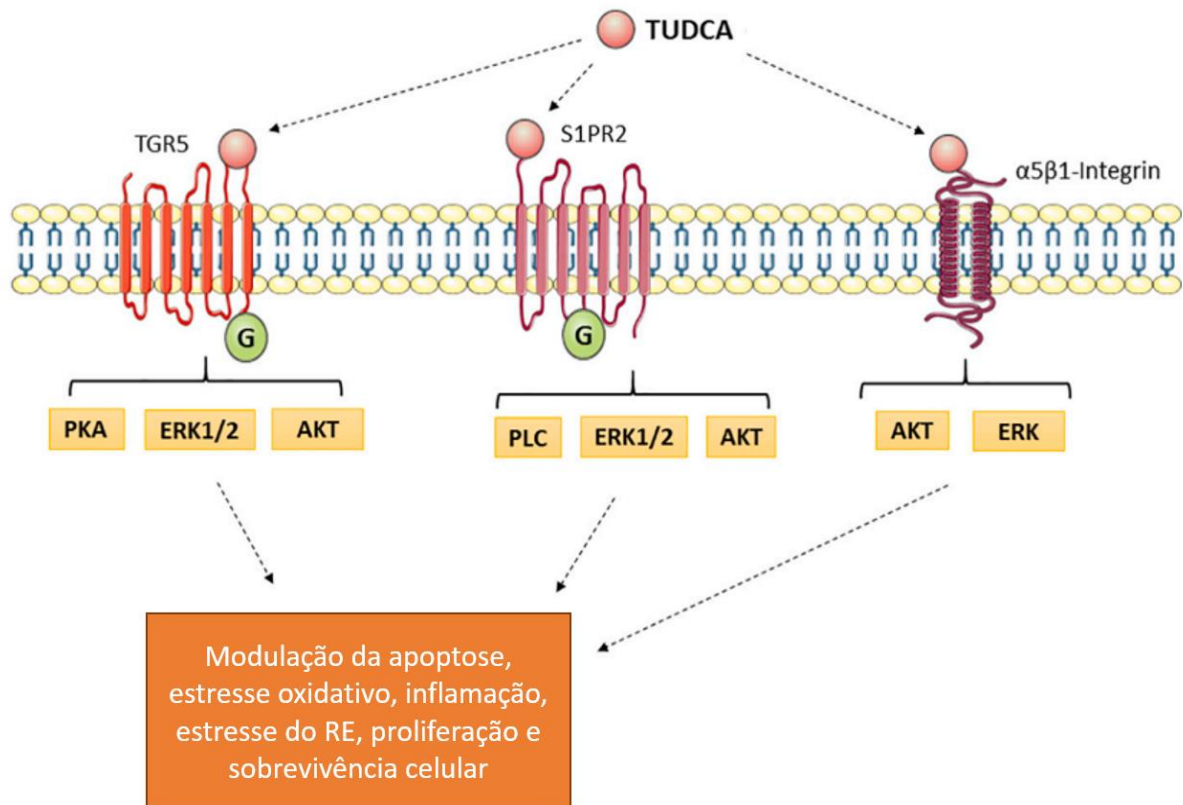


Figura 4. Elucidação da ação do TUDCA nos receptores de membrana e suas consequências. Adaptado de Zangerolamo *et al.*, 2021.

O TUDCA tem sido frequentemente estudado quanto ao seu potencial efeito de melhoria sobre patologias ligadas ao estresse do RE como diabetes, obesidade e problemas cardiovasculares (Ni & Lee, 2007; Okada *et al.*, 2004; Kudo *et al.*, 2008). As chaperonas químicas, quando em microambiente que contém proteínas mal dobradas, como no RE, podem atuar ligando-se e estabilizando o estado de transição do enovelamento das proteínas e toda a sua estrutura proteica, o que aumentaria a taxa de dobramento, todavia a exata interação química envolvida ainda não está inteiramente elucidada (Ringe, 2009).

6.1 O ÁCIDO TAUROURSODESÓXICÓLICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A ação do ácido tauroursodesoxicólico como chaperona química não se restringe em células somáticas, contemplando também gametas e blastocistos. O

TUDCA tem sido utilizado durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos ou no desenvolvimento embrionário em várias espécies (Zhang *et al.*, 2012; Mochizuki *et al.*, 2018; Khatun *et al.*, 2020). Conforme descrito, o benefício do TUDCA é atribuído à sua ação supressora da resposta deletéria deflagrada pelo acúmulo de proteínas incorretamente dobradas no lúmen do RE (Seyhun *et al.*, 2011) causado por indução de estresse no RE durante as etapas da PIVE.

Durante a MIV em bovinos anelorados, o TUDCA pareceu aliviar o estresse do RE nos oócitos ao reduzir a produção de espécies reativas do oxigênio e por regular positivamente os transcritos relacionados a via antioxidante (CAT, GPX1 e HMOX1) (Pioltine *et al.*, 2021). Entretanto, concentrações elevadas de TUDCA diminuíram as taxas de maturação nuclear, atividade mitocondrial e aumentou a expressão de genes pro-apoptóticos (Pioltine *et al.*, 2021). Já em vacas da raça Wagyu, foi observado aumento na taxa de maturação e diminuição de EROs, além de menor número de células apoptóticas em CCOs maturados causado pela diminuição na expressão gênica de CHOP e BAX sugerindo que os danos no RE gerados pelo estresse da MIV possam ser revertidos com o TUDCA (Khatun *et al.*, 2020).

Atualmente, referente a suplementação do TUDCA na MIV na espécie bovina, encontra-se na literatura apenas os dois trabalhos descritos acima, contudo existem estudos nas espécies suína e em camundongo. Em ambas espécies, de forma semelhante, o TUDCA demonstrou melhorar as taxas de maturação oocitária e amenizou a produção de ERO (Park *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2015).

Em relação ao uso do TUDCA na etapa de cultivo *in vitro* de blastocistos, na raça bovina Wagyu foi demonstrado redução das espécies reativas de oxigênio, a atenuação na expressão de genes relacionados ao estresse do RE (GRP78, ATF4, ATF6, IER1 e sXBP1) e nos genes pró-apoptóticos (CHOP e BAX), enquanto aumentou a expressão gênica anti-apoptótica BCL2 e os níveis de glutatona (Khatun *et al.*, 2020). Em búfalos, de forma semelhante, o uso do TUDCA não aumentou a qualidade ou a taxa de desenvolvimento embrionário, no entanto diminuiu a apoptose induzida pela tunicamicina ao regular negativamente o gene BAX e chaperonas do RE (Sharma *et al.*, 2015). Na espécie suína por outro lado, o TUDCA demonstrou melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário, evitando a apoptose induzida por estresse de RE ao interromper as vias clássicas de apoptose *in vitro* (Kim *et al.*, 2012). De maneira semelhante, o cultivo de embriões de camundongos com TUDCA sugere o aumento na taxa de desenvolvimento de embriões de duas células para blastocistos

ao atenuar tanto a expressão da proteína XBP1s no núcleo quanto a apoptose induzida por estresse de RE (Zhang, 2012).

Avaliando as condições de cultivo, Khatun *et al.*, (2020) demonstrou em bovinos que ao utilizar concentração baixa de TUDCA (10 μ M) suplementado ao meio CIV em ambiente de baixa tensão de O₂ (5%), há melhora na taxa de produção de blastocisto comparado ao controle. No entanto, a porcentagem de blastocistos diminuiu quando foi utilizada uma concentração maior (100 μ M), podendo ter sido tóxico para as estruturas ao induzir a apoptose. Porém, embriões submetidos a alta tensão de O₂ (20%), tiveram seus níveis de ERO e de mRNA marcadores de estresse do RE atenuados, ocasionando no aumento da taxa de blastocisto em bovinos e suínos quando suplementado com 50 e 200 μ M (Kim *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014; Pioltine *et al.*, 2021). Assim, provavelmente o efeito do TUDCA no CIV é potencializado dependendo da condição de cultivo, já que a alta tensão de O₂ está relacionada com o aumento de EROs e, por isso, faz-se necessário uma concentração mais elevada do anti-estressor para minimizar os efeitos negativos.

Embora os detalhes mecanicistas da ação do TUDCA em oócitos e blastocistos sobre a via de estresse do RE não estejam totalmente descritos, pelos artigos apresentados, pode-se concluir que essa chaperona química apresenta efeito citoprotetor e com grande potencial para atenuação e inibição de vias ligadas ao estresse do RE.

Tabela 1 - Resumo da suplementação do TUDCA nas etapas de MIV ou CIV.

| Estrutura | Etapas da suplementação | Espécie | Resultados | Referência |
|------------------|--------------------------------|----------------|--|-----------------------|
| Oócito | MIV | Bovino | Redução na produção de EROS e regulação positiva dos transcritos CAR, GPX1 e HMOX1. Concentrações elevadas diminuíram as taxas de maturação nuclear, atividade mitocondrial e aumentou a expressão de genes pro-apoptóticos. | Pioltine et al., 2021 |

| | | | | |
|-------------|-----|------------|--|---------------------------|
| Oócito | MIV | Bovino | Aumento na taxa de maturação, diminuição de EROs e na expressão gênica CHOP e BAX. | Khatun et al., 2020 |
| Oócito | MIV | Suíno | Aumento na taxa de maturação e diminuição de EROs. | Park <i>et al.</i> , 2017 |
| Oócito | MIV | Camundongo | Aumento na taxa de maturação e diminuição de EROs. | Zhao <i>et al.</i> , 2015 |
| Blastocisto | CIV | Bovino | Atenuação das espécies reativas de oxigênio, a atenuação na expressão de genes GRP78, ATF4, ATF6, IER1 e sXBP1 CHOP e BAX, e aumento na expressão de genes BCL2 e nos níveis de glutathione. | Khatun et al., 2020 |
| Blastocisto | CIV | Búfalo | Diminuição da taxa de apoptose induzida pela tunicamicina ao regular negativamente o gene BAX e chaperonas do RE. Não houve aumento na taxa de desenvolvimento embrionário. | Kim <i>et al.</i> , 2012 |
| Blastocisto | CIV | Camundongo | Atenuação na expressão da proteína XBP1s no núcleo e na apoptose induzida por estresse de RE. Houve aumento na taxa de desenvolvimento de duas células para blastocisto. | Zhang, 2012 |

Fonte: Autora (2022).

7. DISCUSSÃO

Este trabalho levantou os artigos relacionados ao impacto da suplementação de TUDCA, nas etapas de maturação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos, sobre o retículo endoplasmático.

Foi possível observar a crescente necessidade de melhoria da qualidade dos embriões PIV devido à crescente demanda no cenário nacional e internacional frente

a reprodução assistida animal, no entanto, o estresse que embriões produzidos *in vitro* são submetidos devido as condições de manipulação e cultivo, acarreta alterações no microambiente do retículo endoplasmático, resultando na interrupção da homeostase e no estresse do RE. Apesar das células ativarem vias UPR com o objetivo de reverter ou controlar os efeitos deletérios, nem sempre é o suficiente. Assim, faz-se necessário a busca por maneiras de minimizar estes efeitos. O uso de moléculas inibidoras de estresse, como o TUDCA vem sendo cada vez mais frequente como um aliado pelo seu efeito citoprotetor.

Os descritos acima sugerem que a suplementação com TUDCA no meio de maturação e de cultivo está ligada a atenuação de estresse no retículo endoplasmático e de estresse oxidativo no oócito e no embrião respectivamente.

Ao suplementar o meio de maturação com esta chaperona química, em bovinos anelados foi observado a modulação na produção de ROS e a regulação da expressão dos transcritos CAT, GPX1 e HMOX1, os quais estão ligados a vias antioxidantes, apesar de não refletir em aumento na taxa de maturação (Pioltine *et al.*,2021). Já em bovinos Wagyu, observou-se aumento na taxa de maturação, além do menor número de células apoptóticas ao diminuir a expressão dos genes pró apoptóticos CHOP e BAX (Khatun *et al.*,2020)

Ao suplementar o meio de cultivo com TUDCA, foi demonstrado redução de ROS, atenuação na expressão de genes relacionados ao estresse do RE (GRP78, ATF4, ATF6, IER1 e sXBP1) e nos genes CHOP e BAX, porém sem aumentar as taxas de produção de blastocisto em bovinos (Khatun *et al.*,2020). Entretanto, em suínos e em camundongos, o TUDCA pareceu modular o estresse do RE ao evitar a apoptose induzida, resultando em aumento nas taxas de produção (Kim *et al.*, 2012; Zhang, 2012). Todavia, em altas concentrações, o TUDCA pareceu ser tóxico tanto para oócitos quanto para blastocistos (Pioltine *et al.*,2021, Khatun *et al.*,2020).

Os detalhes mecanicistas da atuação do TUDCA ainda não foram totalmente descritos, assim, mais estudos são necessários, considerando que há oportunidade de pesquisa sobre sua modulação em outras espécies, em outras etapas da PIVE (ou em mais de uma etapa concomitantemente) e/ou em diferentes condições de cultivo (considerando pressão atmosférica, por exemplo).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do levantamento apresentado, tem-se que os principais resultados observados com este trabalho foram:

- A adição de TUDCA durante a maturação *in vitro* (MIV) pareceu atenuar o estresse do RE ao diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio no oócito e suprimir a expressão de genes ligados ao estresse e pró-apoptóticos.
- A adição de TUDCA durante o cultivo *in vitro* (CIV) pareceu atenuar a expressão de genes relacionados ao estresse do RE e nos genes pró-apoptóticos, enquanto aumentou a expressão gênica anti-apoptótica.
- A princípio, concentrações elevadas de TUDCA podem apresentar embriotoxicidade, devendo considerar as condições de cultivo, espécie e o protocolo no momento da determinação da concentração. Porém, mais estudos são necessários.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, H. C. L. (2021). The bile acid TUDCA and neurodegenerative disorders: An overview. *Life Sciences*, 272, 119252. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119252.
- BARCKMANN B., SIMONELIG M. Control of maternal mRNA stability in germ cells and early embryos. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1829:714–724. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.12.011.
- BASAR M., BOZKURT I., GUZELOGLU-KAYISLI O., SOZEN B., TEKMEI I., SCHATZ F., ARICI A., LOCKWOOD C.J., KAYISLI U.A. Unfolded protein response prevents blastocyst formation during preimplantation embryo development in vitro. *Fertil. Steril.* 2014;102:1777–1784. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.004.
- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. G. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 27 São Paulo: Varela. Cap. 10. p. 195-226, 2002.
- GUZEL, E.; ARLIER, S.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; TABAK, M.S.; EKIZ, T.; JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da Ovulação, Produção E Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (ed.). *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole. Cap. 29. p. 409-434, 2004.

HUSSAIN I, HAWKINS J, HARRISON D, HILLE C, WAYNE G, CUTLER L, BUCK T, WALTER D, DEMONT E, HOWES C, NAYLOR A, JEFFREY P, GONZALEZ MI, DINGWALL C, MICHEL A, REDSHAW S, DAVIS JB. Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo. *J Neurochem.* 2007 Feb;100(3):802-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04260.x. PMID: 17156133.

IETS. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: Embryo transfer newsletter, v. 36, n.4, 2019.

KAUFMAN RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999 May 15;13(10):1211-33. doi: 10.1101/gad.13.10.1211. PMID: 10346810.

TATEMOTO H, YAMANAKA KI. Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos. *Theriogenology.* 2020 Jan 15;142:131-137. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.042. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31593880.

KHATUN H, WADA Y, KONNO T, TATEMOTO H, YAMANAKA KI. Endoplasmic reticulum stress attenuation promotes bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction.* 2020 Apr;159(4):361-370. doi: 10.1530/REP-19-0492. PMID: 31990669.

KUSACZUK M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2019 Nov 20;8(12):1471. doi: 10.3390/cells8121471. PMID: 31757001; PMCID: PMC6952947.

LATHAM KE. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: a basis for intervention and improvement of outcomes. *Cell Tissue Res.* 2016 Jan;363(1):159-167. doi: 10.1007/s00441-015-2124-9. Epub 2015 Mar 7. PMID: 25743689; PMCID: PMC4561599.

LEE M.T., BONNEAU A.R., GIRALDEZ A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2014;30:581–613. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013027.

LI L., ZHENG P., DEAN J. Maternal control of early mouse development. *Development.* 2010;137:859–870. doi: 10.1242/dev.039487.

LOPES, B.C.; MATARIM, D.L.; FRANÇA, M.G.B.; et al. Genética bovina brasileira: mercado internacional e mapeamento das competências e tecnologias minerais. In: Edição de Beatriz Cordenonsi Lopes, p. 110, 2012.

MOCHIZUKI M, MIYAGI K, KISHIGAMI S. Optimizing treatment of tauroursodeoxycholic acid to improve embryonic development after in vitro maturation of cumulus-free oocytes in mice. *PLoS One*. 2018 Aug 27;13(8):e0202962. doi: 10.1371/journal.pone.0202962. PMID: 30148855; PMCID: PMC6110502.

OLIVEIRA, C. S. Biotécnicas da reprodução em bovinos. Juiz de Fora: EmbrapaGado de Leite, 2014. E-book.

PARRISH JJ, KROGENAES A, SUSKO-PARRISH JL. Effect of bovine spermseparation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995 Oct 15;44(6):859-69. doi:10.1016/0093-691x(95)00271-9. PMID: 16727781.

PIOLTINE EM, COSTA CB, BARBOSA LATORRACA L, FRANCHI FF, DOS SANTOS PH, MINGOTI GZ, DE PAULA-LOPES FF, NOGUEIRA MFG. Treatment of in vitro-Matured Bovine Oocytes With Tauroursodeoxycholic Acid Modulates the Oxidative Stress Signaling Pathway. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 19;9:623852. doi: 10.3389/fcell.2021.623852. PMID: 33681203; PMCID: PMC7933469.

PFEIFER LF, LEONARDI CE, CASTRO NA, VIANA JH, SIQUEIRA LG, CASTILHO EM, SINGH J, KRUSSER RH, RUBIN MI. The use of PGF2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. *Theriogenology*. 2014 Mar 15;81(5):689-95. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.11.016. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24412682.

RIZOS, D; CLEMENTE, M., BERMEJO-ALVAREZ, P.; et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 44-50, 2008.

SCHEUNER D, SONG B, MCEWEN E, LIU C, LAYBUTT R, GILLESPIE P, SAUNDERS T, BONNER-WEIR S, KAUFMAN RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1165-76. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00265-9. PMID: 11430820.

SCHWARZ DS, BLOWER MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jan;73(1):79-94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26433683; PMCID:PMC4700099.

GUZEL E, ARLIER S, GUZELOGLU-KAYISLI O, TABAK MS, EKIZ T, SEMERCI N, LARSEN K, SCHATZ F, LOCKWOOD CJ, KAYISLI UA. Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci*.

2017 Apr 8;18(4):792. doi: 10.3390/ijms18040792. PMID: 28397763; PMCID: PMC5412376.

MALO A, KRÜGER B, SEYHUN E, SCHÄFER C, HOFFMANN RT, GÖKE B, KUBISCH CH. Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Oct;299(4):G877-86. doi: 10.1152/ajpgi.00423.2009. Epub 2010 Jul 29. PMID: 20671193.

SINGLA SK, PALTA P, MANIK RS. Supplementation of tauroursodeoxycholic acid during IVC did not enhance in vitro development and quality of buffalo IVF embryos but combated endoplasmic reticulum stress. *Theriogenology*. 2015 Jul 15;84(2):200-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.009. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25881988.

NIEMANN H, RATH D, WRENZYCKI C. Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim*. 2003 Apr;38(2):82-9. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00409.x. PMID: 12654017.

SONG, B. S.; YOON, S. B.; KIM, J. S.; et al. Induction of autophagy promotes preattachment development of bovine embryos by reducing endoplasmic reticulum stress. *Biology of reproduction*, v. 87, n. 1, p. 8, 1-11, 2012.

SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, SAMALI A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006 Sep;7(9):880-5. doi: 10.1038/sj.embor.7400779. PMID: 16953201; PMCID: PMC1559676.

TRIVERS KJ, PATIL CK, WODICKA L, LOCKHART DJ, WEISSMAN JS, WALTER P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 2000 Apr 28;101(3):249-58. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80835-1. PMID: 10847680.

YOON SB, CHOI SA, SIM BW, KIM JS, MUN SE, JEONG PS, YANG HJ, LEE Y, PARK YH, SONG BS, KIM YH, JEONG KJ, HUH JW, LEE SR, KIM SU, CHANG KT. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Biol Reprod*. 2014 May;90(5):104. doi: 10.1095/biolreprod.113.113480. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24695629.

ZANGEROLAMO, L., VETTORAZZI, J. F., ROSA, L. R. O., CARNEIRO, E. M., & RINGE D, PETSKO GA. What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol*. 2009 Oct 13;8(9):80. doi: 10.1186/jbiol186. PMID: 19833004; PMCID: PMC2776907.

ZHANG JY, DIAO YF, OQANI RK, HAN RX, JIN DI. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. *Biol Reprod.* 2012 Apr 27;86(4):128. doi: 10.1095/biolreprod.111.095059. PMID: 22190710