

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo deste
doutorado será disponibilizado
somente a partir de
29-05-2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU**

Maysa Rocha de Souza

**Efeito da vitamina D em embriões na fase de pré-
implantação advindos de ratas diabéticas: Estudos *in vivo* e
*in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Tocoginecologia.

(Área de Concentração: Embriologia)

Orientadora: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**

Coorientador: **Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato**

Botucatu

2025

Maysa Rocha de Souza

**Efeito da vitamina D em embriões na fase de pré-implantação
advindos de ratas diabéticas: Estudos *in vivo* e *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Tocoginecologia.

(Área de Concentração: Embriologia)

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

**Botucatu
2025**

S729e

Souza, Maysa Rocha de

Efeito da vitamina D em embriões na fase de
pré-implantação advindos de ratas diabéticas: Estudos in vivo e
in vitro / Maysa Rocha de Souza. -- Botucatu, 2025

95 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Gustavo Tadeu Volpato

1. Diabetes. 2. Embrião. 3. Vitamina D. 4. Ratos. 5. Estresse
oxidativo. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Os resultados deste estudo poderão fornecer evidências sobre o papel da vitamina D3 na melhoria do desenvolvimento embrionário, especialmente em pré-embriões oriundos de um ambiente intrauterino comprometido pela hiperglicemia materna. A comparação entre os modelos *in vitro* e *in vivo* permitirá identificar se o cultivo em presença de vitamina D3 reproduz de forma confiável os efeitos observados em condições fisiológicas, fortalecendo a utilização de modelos experimentais para investigar o impacto do diabetes materno sobre o desenvolvimento inicial. Esses achados poderão apoiar futuras estratégias para otimizar meios de cultura e protocolos de suplementação, contribuindo para avanços na reprodução assistida e na compreensão de mecanismos que protegem o embrião em situações de estresse metabólico.

Maysa Rocha de Souza

Efeito da vitamina D em embriões na fase de pré-implantação advindos de ratas diabéticas: Estudos *in vivo* e *in vitro*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, para obtenção do título de Grau acadêmico Doutor(a) em Tocoginecologia.

Área de Concentração: Embriologia

Data da defesa: 29/05/2025

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **DEBORA CRISTINA DAMASCENO MEIRELLES DO**
Data: 15/08/2025 10:05:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Débora Cristina Damasceno
UNESP - Faculdade de Medicina - Campus de Botucatu

Documento assinado digitalmente
 **KLEBER EDUARDO DE CAMPOS**
Data: 12/08/2025 21:42:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos
UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso – Campus do Araguaia

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA ELAINE PEROBELLI**
Data: 12/08/2025 13:19:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Juliane Elaine Perobelli
Unifesp – Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista

Wellerson
 Assinado de forma digital por
Wellerson Rodrigo Scarano
Data: 2025.08.12 13:27:56

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
UNESP - Faculdade de Medicina - Campus de Botucatu

Documento assinado digitalmente
 **THAISY TINO DELLAQUA**
Data: 14/08/2025 15:29:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Thaisy Tino Dellaqua
CEO Genética Reprodução Animal

Dedicatória

Dedico primeiramente a Deus
e a todos aqueles que, de
alguma forma, me
incentivaram a chegar até aqui.

Agradecimientos

Agradeço a **Deus** por toda a minha trajetória até aqui, que foi um ambiente de muito crescimento pessoal e profissional, entrei uma pessoa verde e agora estou saindo completamente madura. Obrigada Deus por tudo o que tem me proporcionado e o que já me proporcionou até aqui.

A minha família por todo apoio, meus pais **Joaquim de Souza Filho e Maria das Dores Rocha**, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e por me deixarem livre para fazer todas as escolhas que eu precisei fazer. Obrigada.

A minha irmã **Gabriela Rocha de Souza** que está distante, mas me apoia diariamente nas minhas alegrias, tristezas e momentos de indecisão. Foi uma das pessoas mais difíceis de ter deixado para trás ao vir para Botucatu.

Ao meu namorado **Vitor Augusto Soares**, por todo o apoio emocional e intelectual, obrigada por estar sempre do meu lado me apoiando e me jogando para cima, agradeço muito a Deus por ter colocado você na minha vida. Aos familiares do **Vitor** que me acolheram como da família e estão sempre me incentivando a crescer mais e mais.

À **Profa. Débora C. Damasceno**, agradeço profundamente pela orientação cuidadosa, pelo apoio emocional constante e pelo companheirismo inestimável. Sua presença fez toda a diferença em momentos decisivos e me inspirou a seguir em frente com confiança. Nunca soltou minha mão nos momentos difíceis e isso foi essencial para meu crescimento e meu otimismo de acreditar que tudo iria dar certo mesmo diante das dificuldades.

Ao **Carlos Meirelles e Daniela Damasceno Meirelles**, pelo incentivo e por me acolherem em sua casa nos dias difíceis e “apertados” que eu e professora Débora tivemos que trabalhar.

Ao **Prof. Gustavo Tadeu Volpato**, que me incentivou a fazer doutorado aqui em Botucatu e sempre esteve do meu lado como professor e amigo. Obrigada por toda ajuda na construção do nosso trabalho.

Ao **peçoal do LAPGO**, meu muito obrigado por tornarem esse caminho mais leve e colaborativo. À **Franciane Quintanilha Gallego**, pela amizade verdadeira, por me escutar sempre e pela ajuda prática nos experimentos. Sua parceria foi essencial em muitas etapas do trabalho. Ao **Vinícius Soares Barco**, por toda a amizade e disposição em ajudar nos experimentos, seu apoio foi constante e sempre muito valioso, obrigada por me aguentar de todas as formas possíveis. À **Verônyca Gonçalves Paula**, pela grande amizade, por me apoiar e me escutar sempre nos momentos difíceis e por todo apoio emocional e acadêmico durante a elaboração da tese. Sua generosidade e carinho foram fundamentais. À **Maria Eduarda P. Gomes**, pela amizade sincera e por toda a ajuda, tanto nos experimentos quanto na construção da tese. Sua dedicação e atenção fizeram uma enorme diferença. Ao **Danilo Chaguri**, pela parceria nos experimentos e pela amizade que tornou o ambiente do laboratório mais leve e colaborativo. Ao **Jurandir Antonio** por cuidar dos nossos animais.

À equipe do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente ao **Prof. José Eduardo Corrente**, pelos cálculos de tamanho amostral e

análises estatísticas do estudo.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FMB/Unesp, pelo auxílio concedido durante a realização do doutorado, em especial à **Sra. Solange S. Cagliari** (secretária do Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia).

Ao **Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNIPEX e Biblioteca**, pela oportunidade do uso das instalações que possibilitaram o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço imensamente aos laboratórios parceiros, que foram verdadeiros presentes de Deus em minha trajetória acadêmica.

Ao **laboratório da Profa. Adriana Camargo Ferrasi**, minha gratidão pela parceria tão generosa, que surgiu como uma benção no momento certo. Agradeço por todo o suporte na parte do PCR, que foi essencial para nossos aprendizados e para o desenvolvimento do trabalho. Professora Adriana, deixo meu reconhecimento e carinho por sua dedicação, atenção e disponibilidade constantes. Sua orientação foi valiosa em todos os sentidos. À **Aline Faria Galvani**, que conheci durante os experimentos, agradeço pela amizade que nasceu de repente, pelo companheirismo e pela sua energia vibrante, que sempre trouxe ânimo nos dias difíceis. Sua presença foi um verdadeiro alívio em momentos de desânimo. Obrigada por se dedicar tanto ao meu trabalho como se fosse seu. Durante essa trajetória, ainda ganhamos um presentinho que foi à espera da Sarinha. Sei o quanto foi desafiador, mas, ao mesmo tempo, muito gratificante para você. Torço por sua plena felicidade nesta jornada e nova família linda que você está construindo.

Ao **laboratório do Prof. Wellerson Rodrigo Scarano**, meu muito obrigado por me acolher de forma tão completa. Foi uma parceria maravilhosa, pela qual sou muito grata a Deus. À **Vanessa Aguiar Rocha**, que se tornou uma amizade essencial durante minha passagem por Botucatu, agradeço por todo acolhimento, tanto no âmbito pessoal quanto no profissional. Sua generosidade e cuidado foram fundamentais. Ao **Patrick Vieira**, minha gratidão pela atenção e pela amizade sincera ao longo dessa caminhada. Às alunas de Iniciação Científica (IC) da Vanessa que me auxiliaram quando a Vanessa não podia estar por perto.

Às meninas do **laboratório do Prof. José Buratini**, pela disponibilidade de uso das instalações do laboratório. **Dra. Thaisy Tino Dellaqua**, agradeço do fundo do coração por ter sido uma pessoa essencial por todos os meus aprendizados com embriões. Sua paciência, apoio e partilha de conhecimento fizeram toda a diferença em minha formação. Sou muito grata por tudo que vivemos juntas. À **Thaina Bacco**, agradeço pela amizade que nasceu através da Thaisy e que, rapidamente, tornou-se um vínculo forte, unidas na ajuda mútua e no companheirismo. Obrigada por caminhar ao meu lado com tanto apoio e leveza.

Ao **laboratório do Prof. Marcos Chiaratti**, em São Carlos, meu sincero agradecimento por ter me concedido a oportunidade de realizar um estágio tão enriquecedor. Foi através dessa experiência que pude aprender toda a parte de coleta de zigotos, um conhecimento

fundamental para meu desenvolvimento acadêmico e técnico. Muito obrigada por toda a parceria e generosidade em compartilhar conhecimento. À **Dra. Mirella Brochado**, agradeço de coração pela receptividade e por toda a paciência e dedicação ao me ensinar sobre as coletas e manipulações com embriões. Seu apoio foi essencial para que eu pudesse realmente aprender e aproveitar ao máximo essa experiência.

Agradeço também ao **Prof. Felipe Perecin** e ao **Prof. Juliano Rodrigo Sangalli**, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de Pirassununga, por me receberem com tanto carinho e por me apresentarem à equipe do laboratório do professor Marcos Chiaratti. Sua acolhida e incentivo foram fundamentais para a realização desse trabalho.

A todo pessoal da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da FMB/Unesp, por ter me auxiliado quando precisei, aos assistentes de suporte acadêmico: **Leandro Alves dos Santos**, **Denise Perone**, **Flávia H. B. Trovão**, **Danielle Hamae Yamauchi**, **Dijon S. Campos**, **Vickeline Namba Androcioli** e **Márcio de Carvalho**. Agradeço também aos professores: **Prof. Rodrigo Mattos dos Santos**, **Profa. Camila R. Camacho Corrêa**, **Profa. Patrícia Pintor Reis**, por terem sido tão solícitos.

Às agências de fomento pelas bolsas de doutorado e auxílio financeiro à pesquisa, FAPESP (Bolsa de Doutorado - Processo No. 2022/15285-0) e **CAPES**. Ao grupo DOHaD por todas as oportunidades, ensinamentos e *networking*.

Aos **animais** que participaram do trabalho. Sem eles eu não poderia realizar este trabalho.

"O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano."

— *Isaac Newton* —

PROBLEMÁTICA DOS MEIOS DE CULTURA PARA EMBRIÕES DE RATOS

RESUMO CAPÍTULO 1

Em mamíferos, diversos modelos *in vitro* usando células em desenvolvimento são descritos para explorar questões fundamentais da Biologia do Desenvolvimento, especialmente no caso de embriões humanos, que apresentam limitações éticas e técnicas para seu uso. O cultivo embrionário tem o grande desafio de reproduzir as condições intrauterinas naturais, essenciais para garantir o desenvolvimento adequado dos embriões. Em função da problemática existente para o preparo dos meios de cultura, em particular para ratos, nosso estudo teve como objetivo comparar a atuação de diferentes meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de embriões de ratos e discorrer sobre o melhor método de cultivo observado, considerando a morfologia e qualidade dos embriões antes da implantação. Ratas Sprague Dawley adultas receberam hormônios femininos para estimular a superovulação foram acasaladas para a coleta de seus zigotos 18 horas pós-injeção hormonal. Os zigotos foram submetidos a três diferentes meios de cultivo: mR1ECM, mKSOM-R e M16aa. Para cada meio, houve procedimentos diferentes para a incubação dos zigotos coletados das ratas. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp (Protocolo No. 2022/1432). $P < 0,05$ foi considerado como limite de significância estatística. O meio mR1ECM e mKSOM-R apresentaram taxas maiores de clivagem dos embriões em comparação aos cultivados e incubados no meio M16aa. Quanto à taxa de blastocistos, foi verificado que os meios M16aa e mKSOM-R não proporcionam uma taxa adequada de desenvolvimento e apresentam mais embriões degenerados ao final do cultivo comparado ao meio mR1ECM. Portanto, concluímos que, após compararmos o desenvolvimento de embriões de ratas cultivados em três meios de cultura diferentes (mR1ECM, mKSOM-R e M16aa), o meio mR1ECM proporciona taxa de desenvolvimento e qualidade de embriões melhores, que favorecem a redução do número de ratas-mães a ser usado no estudo e viabiliza os experimentos *in vitro*.

Palavras-chave: Meios de cultura, embrião, K-SOM, R1ECM, M16, ratos.

SEVERAL PROBLEMS OF CULTURE MEDIA FOR RAT EMBRYOS

ABSTRACT OF CHAPTER 1

Several in vitro models derived from mammalian developmental cells have been described to explore fundamental questions in developmental biology, especially in human embryos, which have ethical and technical limitations for use. Embryo culture presents the great challenge of reproducing natural intrauterine conditions, which are essential to ensure adequate embryo development. Due to the existing problems in preparing culture media, particularly for rats, our study aimed to compare the performance of different culture media during in vitro development of rat pre-embryos and discuss the best culture method considering the morphology and quality of the embryos before implantation. Adult Sprague Dawley rats received female hormones to stimulate superovulation and were then mated for collection of their zygotes 18 hours after hormonal injection. These zygotes were cultured in three different media: mR1ECM, mKSOM-R and M16aa, which are widely used for in vitro embryo culture but have controversial results. For each medium, there were different procedures for incubating the zygotes collected from rats. Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Botucatu Medical School - Unesp approved all procedures in this study (Protocol Number: 2022/1432). $P < 0.05$ was considered as the statistically significant limit. The mR1ECM and mKSOM-R medium showed higher embryo cleavage rates compared to those cultured and incubated in the M16aa medium. Regarding the blastocyst rate, the M16aa and mKSOM-R media showed no adequate development rate and present more degenerated embryos at the end of the culture compared to mR1ECM. Therefore, we conclude that, after the comparative analysis of the development of rat embryos cultured in three different culture media (mR1ECM, mKSOM-R and M16aa), the mR1ECM medium provides a better development rate and embryo quality, which favors the reduction of the number of rats in the study and makes in vitro experiments viable.

Keywords: Culture media, embryos, K-SOM, R1ECM, M16, rat.

EFEITO DA VITAMINA D3 EM EMBRIÕES NA FASE DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO ADVINDOS DE RATAS DIABÉTICAS

RESUMO DO CAPÍTULO 2

Mulheres com *Diabetes mellitus* tipo 2 (diabete pré-gestacional) têm um risco 2,69 vezes maior de infertilidade em comparação com mulheres sem diabetes. Além disso, o risco de infertilidade não resolvida por gravidez subsequente foi 3,40 vezes maior. O tratamento desta envolvendo dieta equilibrada, prática regular de exercícios físicos e/ou uso adequado de insulina tem impacto positivo na função reprodutiva. O objetivo foi verificar o efeito da vitamina D3 no útero de ratas diabéticas e em seus embriões para compreender melhor se esta suplementação durante o período pré-gestacional e no início da prenhez melhora as condições uterinas e o desenvolvimento embrionário, especialmente com relação ao quadro de estresse oxidativo gerado pelo diabete. Todos os protocolos deste estudo foram aprovados pela CEUA local. Ratos da linhagem Sprague-Dawley foram fornecidos por um centro especializado em produção animal e mantidos na no biotério sob condições controladas. Na vida adulta, as ratas não diabéticas (C) e diabéticas (DMod) (indução química na vida neonatal) foram tratadas durante 15 dias consecutivos com veículo (óleo de girassol) ou solução de vitamina D3 (VIT), diluída em óleo. Em seguida, foram acasaladas, continuaram sendo tratadas e, após a confirmação da prenhez (dia de prenhez- DP1), o tratamento ocorreu até o DP4. No dia seguinte, as ratas foram anestesiadas e eutanasiadas para exposição dos cornos uterinos para análises estrutural e imunoistoquímica das amostras uterinas e dos embriões para contagem, análise morfológica e de fluorescência (ROS e enzima antioxidante). $p < 0,05$ foi considerado como o limite de significância estatística. Em conclusão, as ratas diabéticas suplementadas com vitamina D3 tiveram redução da espessura do útero (endométrio, miométrio e perimétrio), da atividade secretora de glicogênio e do número de mastócitos ativados, além de promover acúmulo de colágeno, possivelmente pela inibição de metaloproteinasas, aumentou proliferação celular e apoptose das células uterinas, dificultando o processo de remodelação uterina para receber o embrião. Os embriões de ratas diabéticas suplementadas tiveram menor número de células marcadas para GSH (antioxidante) e maior número de células positivas para MDA (oxidante). Além disso, apresentaram perda do potencial de membrana mitocondrial, conferindo comprometimento mitocondrial e consequente estresse oxidativo. Portanto, a vitamina D3, na dose e período de administração empregados, não trouxe melhoras significativas para o útero materno e para o embrião, especialmente com relação ao estresse oxidativo gerado pelo diabete, inviabilizando uma adequada implantação embrionária.

Palavras-chave: colecalciferol, estresse oxidativo, diabete, pré-implantação, embrião.

EFFECT OF VITAMIN D3 ON PREIMPLANTATION EMBRYOS FROM DIABETIC RATS

ABSTRACT OF CHAPTER 2

Women with type 2 diabetes mellitus (pregestational diabetes) have a 2.69-fold higher risk of infertility compared to women without diabetes. Furthermore, the risk of unresolved infertility due to subsequent pregnancies was 3.40-fold higher. Treatment of this condition involving a balanced diet, regular exercise, and/or adequate use of insulin has a positive impact on reproductive function. The objective was to verify the effect of vitamin D3 on the uterus of diabetic rats and their embryos to understand better whether this supplementation during the pregestational period and early pregnancy improves uterine conditions and embryonic development, especially concerning the oxidative stress generated by diabetes. All protocols of this study were approved by the local CEUA. Sprague-Dawley rats were provided by a center specialized in animal production and kept in the vivarium under controlled conditions. In adulthood, non-diabetic (C) and diabetic (DMod) rats (chemically induced in neonatal life) were treated for 15 consecutive days with vehicle (sunflower oil) or vitamin D3 solution (VIT) diluted in oil. They were then mated, continued to be treated and, after pregnancy confirmation (pregnancy day - DP1), treatment continued until DP4. The following day, the rats were anesthetized and euthanized for exposure of the uterine horns for structural and immunohistochemical analysis of uterine samples and embryos for counting, morphological and fluorescence analysis (ROS and antioxidant enzyme). $p < 0.05$ was considered as the limit of statistical significance. In conclusion, diabetic rats supplemented with vitamin D3 had reduced uterine thickness (endometrium, myometrium, and perimetrium), glycogen secretory activity, and the number of activated mast cells, in addition to promoting collagen accumulation, possibly by inhibiting metalloproteinases, increased cell proliferation and apoptosis of uterine cells, hindering the uterine remodeling process for receiving the embryo. Embryos from supplemented diabetic rats showed fewer cells stained for GSH (an antioxidant) and more cells positive for MDA (an indicator of oxidative stress). In addition, they showed loss of mitochondrial membrane potential, conferring mitochondrial impairment and consequent oxidative stress. Thus, vitamin D3, at the administered dose and treatment period, failed to induce significant improvements in either the maternal uterus or the embryo, especially regarding the oxidative stress generated by diabetes, preventing adequate embryo implantation.

Keywords: *colecalfiferol, oxidative stress, diabetes, pre-implantation, embryo.*

ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO ÚTERO E EMBRIÕES DE RATAS DIABÉTICAS NA DECIDUALIZAÇÃO

RESUMO DO CAPÍTULO 3

Este estudo investigou o estado redox embrionário e no tecido uterino de ratas diabéticas após a implantação dos embriões, período de decidualização (dia 10 de prenhez). Ratos da linhagem Sprague-Dawley foram fornecidos por um centro especializado em produção animal e mantidos no biotério sob condições controladas. Na vida adulta, as ratas não diabéticas (C) e diabéticas (DMod) (diabete induzido quimicamente na vida neonatal). Aos 75 dias de idade, todas as fêmeas foram submetidas a um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) para confirmação do estado diabético. Os animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos: Controle (não diabético) e DMod (diabete moderado). Após o agrupamento, as fêmeas foram acasaladas com machos não-diabéticos. No 10º dia gestacional, as ratas foram eutanasiadas para coleta de amostras de útero e dos embriões. Os embriões foram congelados rapidamente em TRIzol para extração de RNA e análise de PCR em tempo real para avaliar enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase) e posterior análise da expressão de Sry. As amostras uterinas foram fixadas e processadas para imunohistoquímica, visando marcação de superóxido dismutase (SOD1- antioxidante) e malondialdeído (MDA- marcador de lipoperoxidação). Foram usados os testes t de Student ou o Exato de Fisher, com significância de $p < 0,05$. Não houve diferença na expressão gênica de enzimas antioxidantes dos embriões. Quanto à expressão do gene Sry, as ratas diabéticas tiveram maiores taxas de embriões fêmeas. As análises das imunomarcações uterinas para SOD foram menores e as para MDA não estavam alteradas, mostrando que houve aumento da utilização da enzima antioxidante que controlou a lipoperoxidação no útero. Portanto, o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia materna foi contido no tecido uterino devido à ação da enzima antioxidante SOD, mostrando uma adaptação antioxidante precoce para auxiliar na implantação do embrião. Nos embriões, não houve modificação na defesa antioxidante e houve maior número de embriões fêmeas nas ratas diabéticas, restando entender o papel do dimorfismo sexual em relação ao sistema redox.

Palavras-chave: Rato, Diabete, Embrião Estresse oxidativo, Antioxidante.

UTERINE AND EMBRYONIC OXIDATIVE CHANGES IN DIABETIC RATS DURING DECIDUALIZATION

ABSTRACT OF CHAPTER 3

This study aimed to investigate the redox state of embryos and uterine tissue in diabetic rats after embryo implantation (decidualization period - day 10 of pregnancy). Sprague-Dawley rats were obtained from a specialized animal production facility and housed in a vivarium under controlled conditions. In adulthood, non-diabetic (C) and diabetic (DMod) rats (with chemically induced diabetes during the neonatal period) were selected. At 75 days of age, all females underwent an oral glucose tolerance test (OGTT) to confirm the diabetic condition. The animals were then randomly assigned to two groups: Control (non-diabetic) and DMod (moderate diabetes). After grouping, the females were mated with non-diabetic males. On the day 10 of pregnancy, the rats were euthanized for the collection of uterine and embryonic samples. Embryos were rapidly frozen in TRIzol for RNA extraction and real-time PCR analysis to assess antioxidant enzyme expression (catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase), as well as subsequent analysis of Sry gene expression. Uterine samples were fixed and processed for immunohistochemistry to detect superoxide dismutase (SOD1 – an antioxidant enzyme) and malondialdehyde (MDA – a marker of lipid peroxidation). Student's t-test or Fisher's exact test was used for statistical analysis, with significance set at $p < 0.05$. No differences were observed in the gene expression of antioxidant enzymes in the embryos. Regarding Sry gene expression, diabetic rats showed a higher proportion of female embryos. Uterine immunostaining for SOD1 was decreased, while MDA levels were unchanged, suggesting increased utilization of the antioxidant enzyme SOD, which controlled lipid peroxidation in the uterus. Therefore, oxidative stress induced by maternal hyperglycemia was mitigated in the uterine tissue through the SOD action, indicating an early antioxidant adaptation that supports embryo implantation. In embryos, antioxidant defenses were unaltered, and there was a higher incidence of female embryos in diabetic rats, highlighting the need for further investigation into the role of sexual dimorphism in the redox system.

Keywords: Rat, Diabetes, Embryo, Oxidative stress, Antioxidant

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	2
METODOLOGIA	4
Animais.....	4
Superovulação e coleta de zigotos.....	6
Formulação dos meios e cultivo embrionário	6
Zigotos cultivados no meio de cultura mR1ECM	6
Zigotos cultivados no meio de cultura mKSOM-R	7
Zigotos cultivados no meio de cultura M16aa	8
Avaliação de clivagem e fragmentação de embriões	8
Análise estatística.....	8
RESULTADOS	9
DISCUSSÃO.....	9
CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

2. CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODO	19
Animais e Indução do diabetes experimental	19
Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) das ratas.....	19
Grupos experimentais de acordo com o tratamento das ratas com vitamina D3	20
Acasalamento das ratas	20
Coleta de amostras maternas e dos embriões no dia 5 de prenhez	20
Parâmetros Maternos: Preparo e análise das amostras de sangue	21
Parâmetros Maternos: Preparo e análise das amostras de útero	21
Coleta dos Embriões (dia 5 de prenhez): Preparo e análise morfológica.....	21
Contagem de células dos embriões por <i>Hoechst</i>	22

Detecção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) intracelular em embriões.....	22
Análise do sistema antioxidante (glutathiona reduzida – GSHr) para embriões.....	23
Avaliação do potencial da membrana mitocondrial (<i>Mitotracker</i>)	24
Interpretação das análises de fluorescência.....	25
Análise Estatística.....	28
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

3. CAPÍTULO 3

INTRODUÇÃO	59
MATERIAIS E MÉTODO	60
Animais e Indução do diabetes experimental	61
Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) das ratas.....	61
Formação dos grupos experimentais.....	61
Acasalamento.....	62
Coleta de amostras maternas e dos embriões no dia 10 de prenhez	63
Parâmetros Maternos: Preparo e análise das amostras de útero.....	64
Parâmetros dos Embriões: Preparo e análise das amostras de útero.....	64
Análise Estatística.....	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

4. ANEXO

CAPÍTULO 1

PROBLEMÁTICA DOS MEIOS DE CULTURA PARA EMBRIÕES DE RATOS

Este capítulo será formatado de acordo com as normas para autores e submetido ao periódico *Biology of Reproduction* (Fator de Impacto = 3,1).

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma diversificada de modelos *in vitro* derivados de células (de mamíferos) em desenvolvimento foi descrita visando explorar questões fundamentais na Biologia do Desenvolvimento, particularmente no caso do embrião humano, que apresentam limitações éticas e técnicas de seu uso (Fu *et al.*, 2021; Moris *et al.*, 2021). Esses modelos abrem novos caminhos para avanços biomédicos de fertilização *in vitro* (FIV), pesquisa clínica e triagem de medicamentos com impacto na sociedade em diversos campos (Moris *et al.*, 2021). O cultivo de embriões enfrenta o grande desafio de reproduzir as condições intrauterinas naturais, essenciais para garantir o desenvolvimento embrionário adequado. O ambiente uterino fornece fatores bioquímicos, físicos e mecânicos que regulam a divisão celular, a ativação genômica e a preparação para a implantação embrionária. Se essas condições não forem as ideais, os embriões poderão sofrer bloqueios no desenvolvimento, menor taxa de viabilidade e apresentar estresse oxidativo (Besenfelder & Havlicek, 2023).

Padronizar o cultivo de embriões continua sendo um desafio, especialmente em animais de laboratório, porque existem dificuldades de entendimento quanto ao fenômeno conhecido como “bloqueio de duas células e de quatro células” (Mayer & Fritz 1974; Ouhibi *et al.*, 1994; Agca & Agca, 2014). Este bloqueio ocorre *in vitro* e, geralmente, acontece durante a fase de ativação do gene zigótico. Esta interrupção na clivagem ocorre em embriões de diferentes mamíferos (Telford *et al.*, 1990, Yamada & Nishikimi, 1999). Os meios de cultura de embriões de mamíferos mostram similaridade com soluções fisiológicas de cloreto de sódio, como *Earle Balanced Saline Solution*, *Tyrode solution* e KRB (bicarbonato de Krebs-Ringer). O meio M16 é baseado em *Tyrode solution*, conhecido como um meio de cultura convencional e é usado rotineiramente na cultura de embriões de camundongos (Whitten, 1971). Também foi usado experimentalmente para desenvolver embriões de rato, embora sem sucesso devido ao bloqueio de desenvolvimento (Popova *et al.*, 2011). Nos anos 90, ainda não havia nenhum meio de cultura que desenvolvesse embriões de ratas com sucesso (Miyoshi, 2016) e, alguns meios, tiveram suas composições modificadas após a compreensão da fisiologia (metabolismo energético) dos embriões de mamíferos (Miyoshi *et al.*, 1995a; Men *et al.*, 2023). Miyoshi *et al.* (1995a) sintetizaram meios especiais para desenvolver embriões de ratas e criaram o R1ECM (meio de cultura de embriões de 1 célula de rata). Após a inclusão de aminoácidos e redução da osmolaridade, os mesmos pesquisadores o renomearam de mR1ECM (meio de cultura de embriões de 1 célula de rato modificado) (Miyoshi *et al.* 1995b). Apesar do êxito no desenvolvimento dos meios de cultura para ratos, estes ainda são comercialmente de difícil acesso e há necessidade de alto investimento em insumos para fabricação própria nos laboratórios de pesquisa. Em 2016, Nakamura *et al.* (2016) desenvolveram o KSOM-R para embriões de rato, inspirado no meio KSOM (*Potassium simplex optimized media*), considerado padrão-ouro na cultura de embriões de camundongos, com a diferença de que, no meio de ratos, não havia fosfato de potássio e a proporção de cloreto de potássio e de aminoácidos foi dobrada.

Vários estudos mostram que embriões de mamíferos se desenvolvem melhor em tensão reduzida de oxigênio (Hashimoto *et al.*, 2000; Bavister, 2004; Popova *et al.*, 2011). Outros afirmam que concentrações mais altas de oxigênio são tóxicas, provavelmente, devido à formação de radicais livres de oxigênio, que induzem efeito prejudicial, não apenas no desenvolvimento *in vitro*, mas também no metabolismo (Orsi & Leese, 2001) e na expressão gênica dos embriões (Rinaudo *et al.*, 2006). Porém, existem centros de pesquisa que ainda não possuem estrutura e investimento para manter incubadoras com baixa tensão de oxigênio, optando pela incubadora de alta tensão.

Com relação aos estudos translacionais utilizando murinos (ratos e camundongos), cabe destacar que o rato desempenha um papel crucial na pesquisa biomédica graças às suas características biológicas e fisiológicas que complementam as pesquisas realizadas com camundongos. Estes roedores procriam rapidamente em grande número e são adequados para alojamento em um ambiente de pesquisa (McCarron *et al.*, 2021). Quando comparados com os camundongos, os ratos são consideravelmente maiores, o que permite estudos exploratórios aprimorados e fornecem maior quantidade de amostras de tecidos para diferentes tipos de análises. Possuem anatomia, fisiologia e farmacocinética bem caracterizadas, com isso, ratos têm sido amplamente utilizados em pesquisas biomédicas para ensaios farmacológicos e toxicológicos (Tuggle *et al.*, 2014; McCarron *et al.*, 2021). Além disso, ratos são particularmente importantes para avaliar os efeitos do diabetes materno no desenvolvimento embrionário (Mattsson *et al.*, 2021), visto que há anos pesquisas tentam compreender os fatores etiológicos e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infertilidade e falhas gestacionais em mulheres diabéticas (Livshits & Seidman, 2009; Szaboova & Devendra, 2015; Mattsson *et al.*, 2021). Outro fator positivo para o uso de ratos é que as similaridades aos humanos os tornam relevantes para a pesquisa translacional (Ghasemi & Jeddi, 2023).

Além das dificuldades citadas acima, existe ainda uma escassez de estudos na literatura que descreva uma metodologia mais detalhada e padronizada com estratégias para aumentar a chance de sucesso no cultivo de embriões de ratos, bem como ausência de microfotografias que mostre a morfologia e a qualidade destes embriões pós-cultivo. Em função desta problemática, nosso estudo teve como objetivo comparar a atuação de diferentes meios de cultura no desenvolvimento (*in vitro*) de embriões de ratos e discorrer sobre o melhor método de cultivo, considerando a morfologia e qualidade dos embriões antes da implantação.

- Cederberg J, Eriksson UJ. Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology*. 1997;56:350-7.
- Codner E, Merino P, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: From mechanisms to clinical findings. *Hum Reprod Update*. 2012;18:568-85.
- Damasceno DC, Volpato GT, de Mattos Paranhos Calderon I, Cunha Rudge MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci*. 2002 Aug 15;72(3-4):235-44.
- Das D, Arur S. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. *Mol Reprod Dev*. 2017;84:444-59.
- De Souza MS, Lima PH, Sinzato YK, Rudge MV, Pereira OC, Damasceno DC. Effects of cigarette smoke exposure on pregnancy outcome and offspring of diabetic rats. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(4):562-7.
- Donaghay M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*. 2007;25(6):461-75.
- Engineer A, Saiyin T, Greco ER, Feng Q. Say NO to ROS: Their roles in embryonic heart development and pathogenesis of congenital heart defects in maternal diabetes. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(10):436.
- Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy. *Ups J Med Sci*. 2016;121:96-112.
- Eriksson UJ. Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009;14(2):85-93.
- Fantel AG, Barber CV, Mackles B. Ischemia reperfusion: a new hypothesis for the developmental toxicity of cocaine. *Teratology*. 1992;46:285-92.
- Frank I. Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med*. 1991;11:463-99.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med*. 2009;27(1):62-79.
- Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *Soc Gynecol Investig*. 2003;10:392-9.
- Ilessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MVC, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2:37.
- Ilessi IL, Dallaqua B, Sinzato YK, Gallego FQ, Nielsen JH, Volpato GT, Corrente JE, Damasceno DC. Maternal diabetes on fetal endocrine pancreas development in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2025 Mar 21;97(1):e20240807.
- Korac B, Kalezić A, Pekovic-Vaughan V, Korac A, Jankovic A. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol*. 2021 Jun;42:101887.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*. 2000;127(19):4195-202.
- Martínez de Toda I, González-Sánchez M, Díaz-Del Cerro E, Valera G, Carracedo J, Guerra-Pérez N. Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. *Mech Ageing Dev*. 2023 Apr;211:111797.
- Mauvais-Jarvis F, Merz NB, Barnes PJ, Brinton RD, Carrero JJ, DeMeo DL, et al. Sex and gender: modifiers of health, disease, and medicine. *Lancet*. 2020;396(10250):565-82.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):369-82.
- Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015;105:53-72.
- Paul ABM, Sadek ST, Mahesan AM. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(2):179-87.
- Poulsen HE, Weimann A, Henriksen T, Kjær LK, Larsen EL, Carlsson ER, Christensen CK, Brandslund I, Fenger M. Oxidatively generated modifications to nucleic acids in vivo: measurement in urine and plasma. *Free Radic Biol Med*. 2019;145:336-41.

- Poulsen-Silva E, Gordillo-Fuenzalida F, Velásquez P, Llancahuen FM, Carvajal R, Cabaña-Brunod M, Otero MC. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties of monofloral honeys from Chile. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(9):1785.
- Ramiro-Cortijo D, Rodríguez-Rodríguez P, López de Pablo AL, López-Giménez MR, González MC, Arribas SM. Fetal undernutrition and oxidative stress: influence of sex and gender. *Cham: Springer Int Publ AG*; 2017.
- Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil*. 1995;104:165–71.
- Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli M, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MVC. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2:26-34.
- Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14(5):815-26.
- Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α as predictors of alterations in the embryofetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(3):206-11.
- Sinzato YK, Klöppel E, Miranda CA, Paula VG, Alves LF, Nascimento LL, Campos AP, Karki B, Hampl V, Volpato GT, Damasceno DC. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Lab Anim*. 2021;55(4):329-40.
- Sivan E, Lee Y, Wu YK, Reece EA. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rat. *Teratology*. 1997;56:343–9.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000;43(5):550-7.
- Tagirov M, Rutkowska J. Sexual Dimorphism in the Early Embryogenesis in Zebra Finches. *PLoS One*. 2014 Dec 10;9(12):e114625.
- Tariq S, Nurulain SM, Rashed H, Lotfy M, Emerald SB, Koturan S, Tekes K, Adeghate E. Diabetes-induced changes in the morphology and nociceptinergic innervation of the rat uterus. *J Mol Histol*. 2016;47(1):21-33.
- Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology*. 2001;64(1):33-44.

ANEXO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU / Unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada pela Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1432/2023 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Efeito da vitamina D em embriões na fase de Pré-Implantação advindos de ratas diabéticas: Estudo *In Vivo* e *In Vitro*"**, conduzido pela Pesquisadora: **Maysa Rocha de Souza** – Orientador: Profa. Dra. Débora C. Damasceno – Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Vopato, registrado com o nº **1432/2023**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 27 de junho de 2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	26/06/2025
Espécie/Linhagem/Raça	Sprague Dawley
Nº Total de animais	47
Idade/Peso	90 Dias – 200 Gramas
Sexo	(14) Machos e (43) Fêmeas

Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

The research project registered by the number 1432/2023 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School – São Paulo State University (UNESP) on 27/June/2023.

Distribuição: Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18618-970 Fones: (14) 3880.1880 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br/sara.sampaio@unesp.br

Anexo 2- Comprovante de submissão de manuscrito

Biology of Reproduction SEVERAL PROBLEMS OF CULTURE MEDIA FOR RAT EMBRYOS --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	SEVERAL PROBLEMS OF CULTURE MEDIA FOR RAT EMBRYOS
Short Title:	Culture Media Issues for Rat Embryos
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Embryo
Keywords:	Culture media; embryo; K-SOM; R1ECM; M16; rats
Corresponding Author:	Debora Cristina Damasceno Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Botucatu, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Maysa Rocha de Souza
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Maysa Rocha de Souza
	Thaisy Tino Dellaqua
	Mirela Brochado Souza Cáceres
	Marcos Roberto Chiaratti
	Thainá Sallum Bacco Manssur
	Vanessa Aguiar Rocha
	Maria Eduarda Picolo Gomes
	Vinícius Soares Barco
	Debora Cristina Damasceno
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL