

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo deste
documento será
disponibilizado somente a
partir de 27/02/2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS – FCAV
CÂMPUS DE JABOTICABAL/SP**

**Avaliação do antioxidante astaxantina adicionado ao meio
de direct transfer “DT” de embriões bovinos produzidos *in
vitro*.**

**Thalis de Melo Oliveira
Médico Veterinário**

**Jaboticabal/SP
2026**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS – FCAV
CÂMPUS DE JABOTICABAL/SP**

**Avaliação do antioxidante astaxantina adicionado ao meio de direct transfer
“DT” de embriões bovinos produzidos *in vitro***

.

**Discente: Thalís de Melo Oliveira
Orientadora: profa. Dra. Lindsay
Unno Gimenes.**

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – FCAV, Campus
de Jaboticabal/SP, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.**

O48a Oliveira, Thalís de Melo
Avaliação do antioxidante astaxantina adicionado ao meio de direct transfer "DT" de embriões bovinos produzidos in vitro. / Thalís de Melo Oliveira. -- , 2026
89 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes Unno Gimenes

1. Antioxidant. 2. Apoptosis. 3. Cryopreservation. 4. Raman Spectroscopy. 5. MicroRNAs. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Impacto social desta pesquisa

Os resultados demonstraram que a astaxantina reduziu danos oxidativos em embriões bovinos criopreservados, preservando estruturas celulares e melhorando parâmetros de qualidade embrionária. Esses achados ampliam o conhecimento sobre criopreservação e podem contribuir para biotecnologias reprodutivas mais eficientes e sustentáveis na produção pecuária.

Potential impact of this research

Results showed that astaxanthin reduced oxidative damage in cryopreserved bovine embryos, preserving cellular structures and improving embryo quality parameters. These findings advance knowledge in embryo cryopreservation and may contribute to more efficient and sustainable reproductive biotechnologies in livestock production



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA ADICIONADO AO MEIO DE DIRECT TRANSFER "DT" DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

AUTOR: THALIS DE MELO OLIVEIRA

ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área: Morfofisiologia e Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br LINDSAY UNNO GIMENES
Data: 06/03/2026 15:00:26 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Profa. Dra. FABIOLA FREITAS DE PAULA LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Diadema/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIOLA FREITAS DE PAULA LOPES
Data: 03/03/2026 17:08:31 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Documento assinado digitalmente
gov.br MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES
Data: 03/03/2026 17:18:41 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THALIS DE MELO OLIVEIRA – nascido na cidade de Barretos – São Paulo, no dia 12 de julho de 1999. Completou ensino médio integrado ao curso técnico profissionalizante em agropecuária pela escola técnica agropecuária municipal São Francisco de Assis – ETAM, concluído em 2017. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária com bolsa de estudos concedida pelo Programa Universidade para Todos – PROUNI, pelo Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, em janeiro de 2019, sendo concluído em dezembro de 2023. Em janeiro de 2024, deu início ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências veterinárias com ênfase nas biotecnologias aplicadas à produção *in vitro* de embriões bovinos no Laboratório de Biotecnologias da Reprodução – LABOR, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal/ SP, sob orientação da Prof^a Dr^a Lindsay Unno Gimenes, com recebimento de bolsa CAPES – PROEX. Atualmente é doutorando do mesmo programa, universidade e orientação.

“A melhor maneira de ter uma boa ideia é ter muitas.”

(Linus Pauling)

“A única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.”

(Steve Jobs)

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim, amigos e colegas que auxiliaram com cada parte para que esse projeto pudesse ser realizado, seja de forma direta ou indireta, dedico principalmente esse trabalho aos meus pais, minha noiva, avó e irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me guiarem e jamais me desampararem nos momentos mais críticos desta caminhada. Sou grato por terem me concedido um ambiente tranquilo, harmonioso e cercado de pessoas boas, fundamentais para que este trabalho pudesse ser desenvolvido com êxito.

À minha orientadora, Lindsay Unno Gimenes, minha profunda gratidão por ter acreditado em meu potencial e me concedido a oportunidade de trilhar este caminho. Agradeço pela dedicação, empenho e amor pelo trabalho ao longo de toda essa trajetória, e, sobretudo, pelo acolhimento humano com seus alunos, sempre disposta a orientar, apoiar e incentivar o desenvolvimento de um pensamento crítico, ético e rigoroso.

Aos meus pais, Renata e Ademar, agradeço por acreditarem em minhas escolhas e me apoiarem incondicionalmente, sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário. Em especial à minha mãe, que não mediu esforços diante de tantas dificuldades para garantir a educação e a formação de seus filhos, - Náthaly e Thalís — exemplo de força, coragem e perseverança, uma mulher batalhadora que inspira diariamente.

À minha avó, Eunice, pelo amor e zelo constantes, por um carinho singular e por estar sempre presente, preocupada com meu bem-estar e pronta a ajudar da forma que lhe é possível.

À minha irmã, Náthaly, que caminha ao meu lado em todos os momentos, auxiliando nas dificuldades e na resolução de problemas, sempre empenhada em promover o melhor ambiente possível para nossa convivência familiar.

À minha noiva, Vanessa, minha gratidão vai além das palavras. Obrigado por ter sido base fundamental para a conclusão e o aperfeiçoamento deste trabalho, contribuindo com ideias, discussões e apoio constante. Obrigado por estar ao meu lado em todas as decisões, conquistas, momentos de desespero e angústia — e até por aprender a descongelar embriões para me auxiliar nas longas madrugadas em que permaneci sozinho no laboratório. Seu amor e parceria foram essenciais.

Aos meus amigos Alex, Carol, Willian, Júlio, Vitória e Matheus, agradeço por vibrarem comigo, por todo apoio, pelas diferentes visões de mundo compartilhadas e

por serem incentivo constante para jamais desistirmos de nossos sonhos. Obrigado por cada palavra, cada torcida e por anos de amizade verdadeira.

Aos meus sogros, Jairo e Andrea, agradeço o acolhimento e por me receberem com tanto carinho em sua família, oferecendo suporte por meio de orações, conselhos e amor sincero.

Aos amigos que o laboratório me proporcionou — Nelise, Victória, Laís, André, Cláudia, aos alunos de iniciação científica Maria Júlia e Lívia, e a todos os estagiários que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho — minha sincera gratidão. Em especial, à Nelise e à Victória, por todo auxílio em momentos que não caberiam em palavras. Sou eternamente grato por cada discussão, cada aprendizado, cada desafio compartilhado e pelo esforço conjunto para fazer de nossas pesquisas o melhor que pudemos, colhendo os resultados alcançados.

Ao Laboratório de Biotecnologias da Reprodução – UNESP/FCAV, Campus de Jaboticabal (LABOR), agradeço pela infraestrutura, pelo ambiente de aprendizado e pela oportunidade de realização deste estudo. Meu reconhecimento especial à equipe de suporte, Roberta e Sr. Edson, pelo auxílio técnico, dedicação e apoio constante durante a condução dos experimentos — e pelas conversas e cafezinhos com pipoca que tornavam os dias mais leves.

Aos professores e pesquisadores do LABOR, Dr^a Maíra, Dr. Tiago e Dr^a Fernanda, agradeço pelas contribuições científicas e pelo apoio ao longo do trabalho. Em especial à Prof^a Maíra, sempre solícita em discutir resultados, esclarecer conceitos, auxiliar na resolução de problemas do laboratório e, acima de tudo, preocupada com nosso bem-estar e com a melhoria contínua do ambiente de trabalho.

Ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD – USP/FZEA), agradeço a toda a equipe, em especial aos professores Juliano Coelho, Felipe Perecin e à Camila Azzolin, pelo suporte nas análises. À Ana Beatriz e à Vitória, meu agradecimento pelo apoio durante a estadia, pelas conversas, pelo acolhimento e pelos momentos de lazer.

Ao Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação do CAUNESP, em especial ao Prof. Diogo e ao Dr. Arno, agradeço a disponibilização do suporte necessário para a aquisição das imagens de microscopia, fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), em especial ao Prof. Maurício Barbante, às alunas Bianca Ferrari, Eluzai e Agda, e ao Sr. João Airton, agradeço o auxílio nas aquisições das imagens de microscopia fluorescente.

Ao Laboratório de Epigenética e Metabolismo Embrionário (LEME – UFABC), agradeço por todo o suporte nas análises de espectroscopia Raman, que forneceram dados valiosos para este trabalho. Agradeço também à Prof^a Raquel Rocha, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pelo auxílio na análise estatística.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a Clara Slade e Prof. Joaquim Mansano Garcia, agradeço por aceitarem o convite e pelas contribuições valiosas que enriqueceram este trabalho. Aos membros da banca de defesa, Prof^a Fabíola e Prof^a Maíra, meu agradecimento por aceitarem o convite e por agregarem ainda mais qualidade a esta pesquisa.

Por fim, agradeço à FAPESP (Processo nº 2021/13932-5) e à CAPES (Código de Financiamento 001) pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento desta pesquisa, bem como os frigoríficos Franca Boi e Boi Baio, pelo fornecimento dos ovários utilizados nos experimentos.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - Processo nº 2021/13932-5

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	i
.....	ii
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
RESUMO –.....	vii
ABSTRACT –.....	viii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Hipótese.....	21
1.2. Objetivos.....	21
1.2.1. Geral:	21
1.2.2. Específicos:.....	21
2. REFERENCIAL TEORICO	21
2.1 Princípios básicos da criopreservação de embriões bovinos.....	21
2.1.1. Qualidade embrionária	21
2.1.2. Crioprotetores	23
2.2. Métodos de criopreservação.....	24
2.2.1. Congelação lenta.....	25
2.2.2. Alterações celulares induzidas pela congelação lenta.....	26
2.2.3. Produção de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante...28	
2.2.4. Impactos celulares do estresse oxidativo em embriões	31
2.3 Astaxantina: características gerais e aplicação biotecnológica	31
REFERENCIAS.....	35

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA ADICIONADO AO MEIO DE DIRECT TRANSFER “DT” DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN ¹	39
RESUMO	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E METODOS	43
2.1. Produção dos Embriões <i>In Vitro</i> (PIVE)	43
2.1.1. Obtenção e seleção dos oócitos.	43
2.1.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	44
2.1.3. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	44
2.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	45
2.2. Congelação lenta para direct – transfer e descongelação dos embriões	45
2.2.1. Diluição das diferentes concentrações de astaxantina ao meio de congelação lenta.	45
2.2.2. Congelação lenta para direct-transfer “DT”	46
2.2.3. Descongelação	47
2.3. Delineamento Experimental	48
2.4. Análises Experimentais	49
2.4.1. Taxa de sobrevivência pós- descongelação	49
2.4.2. Avaliação da produção total de espécies reativas ao oxigênio (EROs)	49
2.4.3. Avaliação de apoptose	51
2.4.4. Expressão dos miRNAs	52
2.4.5. Expressão gênica mRNAs	55
2.4.6. Análise bioquímica por espectroscopia Raman	56
2.5. Análise Estatística	57

3. RESULTADOS	58
3.1. Taxa de sobrevivência pós-descongelamento	58
3.2. Avaliação da produção total de espécies reativas ao oxigênio (EROs) 59	
3.3. Avaliação de apoptose	60
3.4. Expressão de microRNAs	61
3.5. Expressão gênica (mRNA)	63
3.6. Análise bioquímica por espectroscopia Raman.....	63
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	73
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	80

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “Desempenho na produção in vitro de embriões bovinos com o uso do antioxidante astaxantina no meio de cultivo e congelação lenta para DT “direct transfer””, protocolo nº 1407/2024, sob a responsabilidade da Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de abril de 2024.

Vigência do Projeto	01/04/2024 a 31/12/2024
Espécie / Linhagem	Bovino
Nº de animais	500 -100 animais (ovários dos bovinos de abatedouro)
Peso / Idade	~500 kg / ~2-3 anos
Sexo	Feminino
Origem	Frigorífico no entorno de Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de abril de 2024.


Dr.ª Helena Cristina Delgado Brito
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE

CERTIFICATE

We certify that the research project entitled "**PERFORMANCE IN THE IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS USING THE ANTIOXIDANT ASTAXANTHIN IN THE CULTURE MEDIUM AND SLOW FREEZING FOR DT "DIRECT TRANSFER"**", protocol nº. 1407/2024, under the responsibility of Dr. LINDSAY UNNO GIMENES, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the Chordata phylum, vertebrate subfile (except man), for the purposes of scientific research (or teaching) - is in accordance with the precepts of Law no. 11,794, of October 8, 2008, in Decree 6,899, of July 15, 2009, and with the rules issued by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA), from the SCHOOL OF AGRICULTURAL AND VETERINARY SCIENCES, UNESP - JABOTICABAL - SP Campus, at april 17, 2024 an ordinary meeting.

Jaboticabal, April 17, 2024.


Drª Helena Cristina Delgado Brito
Coordinator – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fca.vunesp.br

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar S 1 - Lista dos 44 miRNAs comumente detectados entre os tratamentos (Controle, 0,5 pM, 0,5 nM, 1nM) em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

.....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTX	Astaxantina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
BAX	Proteína X associada a Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
BX	Blastocisto expandido
CAT	Catalase
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONTROL	Controle
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Limite de ciclo)
D4	4º dia de cultivo <i>in vitro</i>
D7	7º dia de cultivo <i>in vitro</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EO	Estresse oxidativo
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i> (Glutathiona peroxidase)
hCG	<i>(Human Chorionic Gonadotropin</i> (Hormônio coriônico humano)
h	Horas

HSPA1A	Proteína de choque térmico da família A (Hsp70), membro 1A (Heat Shock Protein Family A Member 1A)
IA	Índice apoptótico
LABOR	Laboratório de Biotecnologias da Reprodução
LAV	Meio de Lavagem
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise discriminante linear)
LOOCV	<i>Leave-one-out cross validation</i>
LPO	Peroxidação lipídica
MGVa	Mean gray value área
MGVb	Mean gray value background
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinase)
miRNA	MicroRNA
MIV	Meio de maturação in vitro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
nM	Nanomolar
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NFkb	Fator nuclear kappa B
PBS	Phosphate Buffered Saline (solução tampão fosfato salina)
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PFA	Paraformaldeído
PIVE	Produção in vitro de embriões
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
Rap1	Proteína 1 relacionada a Ras (Ras-related protein 1)
Ras	Proteína Ras (família de pequenas GTPases)
RT – qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TGFBR2	Receptor 2 do fator de crescimento transformador beta

TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
SE	Solução estoque
SFB	Soro fetal bovino
SI	Solução intermediária
SOD	Superoxido dismutase
SOF	Synthetic Oviduct Fluid (Fluido sintético de oviduto)
TCM199	Tissue Culture Medium 199 (Meio de cultura 199)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling
UAF	Unidades arbitrárias de fluorescência

AVALIAÇÃO DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA ADICIONADO AO MEIO DE DIRECT TRANSFER “DT” DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.

RESUMO –

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) por meio da congelação lenta constitui uma biotecnologia amplamente empregada em programas de melhoramento genético e na produção comercial de embriões, permitindo o armazenamento e a disseminação de material genético de alto valor. Apesar de ser um método consolidado, ainda apresenta limitações relacionadas à redução da sobrevivência embrionária e à qualidade celular após a descongelação. Durante o processo de resfriamento controlado, as alterações osmóticas, a formação de cristais de gelo e o estresse térmico podem intensificar o estresse oxidativo, caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo danos às membranas lipídicas, proteínas e ao DNA, além da ativação de vias apoptóticas que comprometem o potencial de desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, a suplementação de antioxidantes aos meios de criopreservação tem sido proposta como estratégia para minimizar esses efeitos deletérios. A astaxantina (ASTX), um carotenoide de elevado potencial antioxidante, destaca-se por sua capacidade de neutralizar radicais livres, estabilizar membranas celulares e modular mecanismos relacionados ao estresse oxidativo e à apoptose. O grupo suplementado com astaxantina 1nM, apresentou menor índice apoptótico, menor expressão relativa do miRNA bta-miR-187, menor expressão do gene *SOD2* em relação a menor dose e um perfil bioquímico mais estável em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foi possível encontrar diferenças em EROs e sobrevivência ($p > 0,05$). Conclui-se que a suplementação do meio DT com astaxantina exerce efeitos além da redução de EROs, alterando o perfil molecular e celular embrionário. A dose empregada nas condições testadas, foi capaz de exercer proteção parcial sob o estresse oxidativo, portanto, estudos futuros deverão otimizar a dose e o emprego de análises que promovam um entendimento integrado do metabolismo embrionário.

Palavras-chave: Antioxidante, Apoptose, Criopreservação, Espectroscopia Raman, MicroRNAs.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ASTAXANTHIN SUPPLEMENTED TO THE DIRECT TRANSFER (DT) MEDIUM IN IN VITRO-PRODUCED BOVINE EMBRYOS.

ABSTRACT –

Cryopreservation of in vitro-produced (IVP) bovine embryos by slow freezing constitutes a widely employed biotechnology in genetic improvement programs and in the commercial production of embryos, allowing the storage and dissemination of high-value genetic material. Despite being a consolidated method, it still presents limitations related to reduced embryonic survival and cellular quality after thawing. During the controlled cooling process, osmotic alterations, ice crystal formation, and thermal stress may intensify oxidative stress, characterized by the accumulation of reactive oxygen species (ROS), promoting damage to lipid membranes, proteins, and DNA, in addition to the activation of apoptotic pathways that compromise embryonic developmental potential. In this context, the supplementation of cryopreservation media with antioxidants has been proposed as a strategy to minimize these deleterious effects. Astaxanthin (ASTX), a carotenoid with high antioxidant potential, stands out due to its ability to neutralize free radicals, stabilize cellular membranes, and modulate mechanisms related to oxidative stress and apoptosis. The group supplemented with astaxanthin 1 nM presented a lower apoptotic index, lower relative expression of the miRNA bta-miR-187, lower expression of the SOD2 gene in relation to the lower dose, and a more stable biochemical profile in relation to the control group ($p < 0.05$). It was not possible to find differences in ROS and survival ($p > 0.05$). It is concluded that supplementation of the DT medium with astaxanthin exerts effects beyond the reduction of ROS, altering the embryonic molecular and cellular profile. The dose employed under the tested conditions was capable of exerting partial protection under oxidative stress, therefore, future studies should optimize the dose and the use of analyses that promote an integrated understanding of embryonic metabolism.

Keywords: Antioxidant, Apoptosis, Cryopreservation, Raman Spectroscopy, MicroRNAs.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões é uma biotecnologia amplamente utilizada na reprodução animal, especialmente em programas de melhoramento genético bovino, permitindo o armazenamento, transporte e uso estratégico de material genético de alto valor zootécnico. Entre as técnicas disponíveis, a congelação lenta permanece como um método amplamente empregado, sobretudo em sistemas comerciais, devido à sua reprodutibilidade, custo relativamente reduzido e compatibilidade com protocolos de transferência direta. No entanto, apesar de sua ampla aplicação, a congelação lenta está associada a diferentes tipos de injúrias celulares, que podem comprometer a viabilidade embrionária pós-descongelação e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo (CASCIANI et al., 2023; VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Durante o processo de congelação lenta, os embriões são expostos a condições extremas de estresse físico e químico, incluindo variações osmóticas, formação de cristais de gelo, desidratação celular e alterações na fluidez das membranas. Esses fatores, de forma isolada ou combinada, podem desencadear desequilíbrios metabólicos e estruturais que afetam a integridade celular. Entre os mecanismos mais frequentemente associados aos danos induzidos pela criopreservação está o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo e potencial comprometimento de estruturas celulares essenciais, como membranas, proteínas e ácidos nucleicos (AGARWAL et al., 2014, VALENTE et al., 2022).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade antioxidante celular, levando à oxidação de lipídios, proteínas e DNA (FEUCHARD et al., 2025). Em embriões mamíferos, esse fenômeno é particularmente relevante, uma vez que o estágio embrionário inicial apresenta sistemas antioxidantes ainda imaturos e uma elevada sensibilidade a alterações ambientais (KEANE et al., 2024). Evidências experimentais demonstram que a criopreservação pode exacerbar a produção de EROs, contribuindo para a redução da taxa de sobrevivência, atraso no desenvolvimento embrionário e aumento de eventos relacionados à morte celular programada (GUÉRIN et al., 2001; Martinez et al., 2020).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico que será submetido à revista *Theriogenology*

Nesse contexto, a utilização de antioxidantes como estratégia para mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo tem sido amplamente investigada. Diversos compostos antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, vêm sendo incorporados a protocolos de criopreservação embrionária, com o objetivo de preservar a integridade celular e melhorar os desfechos pós-descongelamento (AGARWAL et al., 2014). Em diferentes espécies de mamíferos, incluindo bovinos, suínos, ovinos e humanos, a adição de antioxidantes aos meios de congelamento, reaquecimento ou cultivo pós-descongelamento pode resultar em melhorias nos índices de sobrevivência, qualidade embrionária e redução de marcadores de danos celulares (RIZOS et al., 2008; TATONE et al., 2015). Apesar do crescente número de estudos sobre antioxidantes na criopreservação embrionária, ainda existem lacunas importantes na compreensão dos seus efeitos em nível molecular e bioquímico, especialmente quando considerados diferentes desfechos celulares avaliados de forma integrada. (AGARWAL et al., 2014).

Entre os antioxidantes avaliados, destacam-se compostos de origem natural, como carotenoides, polifenóis e vitaminas, que apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras da homeostase celular. A astaxantina, um carotenoide xantofila, tem recebido atenção crescente devido à sua elevada capacidade antioxidante e à sua atuação em diferentes sistemas biológicos. Em modelos celulares e embrionários, esse composto tem sido associado à redução de danos oxidativos, melhora da viabilidade celular e modulação de processos relacionados à sobrevivência celular (FASSET & COOMBE, 2011; NAGUIB, 2020).

Dessa forma, a investigação integrada de parâmetros celulares clássicos, perfis bioquímicos e expressão de miRNAs em embriões bovinos submetidos à congelamento lenta, na presença ou ausência de antioxidantes, contribui para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta embrionária ao estresse criogênico. Além disso, fornece subsídios científicos para o aprimoramento de protocolos de criopreservação, com potencial impacto direto na eficiência dos programas de reprodução assistida em bovinos.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico que será submetido à revista *Theriogenology*

1.1. Hipótese

A adição da astaxantina ao protocolo de congelação lenta de embriões bovinos modula a resposta celular ao estresse criogênico, refletindo-se em diminuições de espécie reativas de oxigênio, diminuição de células apoptóticas, modulação de expressão de microRNAs, perfil bioquímico e maior sobrevivência embrionária após a descongelação.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral:

Avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* criopreservados, com a suplementação do antioxidante astaxantina ao meio de congelação lenta DT.

1.2.2. Específicos:

- Avaliar a capacidade da sobrevivência dos embriões criopreservados com ASTX, em diferentes tempos de observação pós-descongelação;
- Avaliar indiretamente o estresse oxidativo, por meio da quantificação da oxidação do embrião;
- Avaliar o índice apoptótico por meio da fragmentação do DNA;
- Avaliar a expressão gênica por meio da presença de microRNAs (miRNA);
- Analisar o perfil bioquímico dos embriões por espectroscopia de Raman