

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**“ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA”**

Aline Mariana de Carvalho
Médica Veterinária

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**“ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA”**

Discente: Aline Mariana de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus
Jaboticabal, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias.

2023

C331a	Carvalho, Aline Mariana de Adição de astaxantina ao meio de criopreservação de embriões bovinos na técnica de transferência direta / Aline Mariana de Carvalho. – Jaboticabal, 2023 63 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Lindsay Unno Gimenes 1. Antioxidante. 2. Carotenoide. 3. Congelação lenta. 4. Transferência direta. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA

AUTORA: ALINE MARIANA DE CARVALHO

ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Medicina Veterinária,
área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

gov.br

Documento assinado digitalmente
LINDSAY UNNO GIMENES
Data: 23/10/2023 08:48:43-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

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

Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participação Virtual)
Docente Aposentado / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisadora Dra. RAQUEL ZANETI PUELKER (Participação Virtual)
Botupharma Biotecnologia Animal / Botucatu/SP

gov.br

Documento assinado digitalmente
RAQUEL ZANETI PUELKER
Data: 30/10/2023 11:10:02-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Jaboticabal, 18 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE MARIANA DE CARVALHO – Nascida em 15 de junho de 1997 na cidade de São Sebastião do Paraíso, MG. Filha de Adriana Mariana de Brito Carvalho e Sebastião dos Reis de Carvalho. Recebeu o título de bacharel em Medicina Veterinária em janeiro de 2021, pela instituição de ensino Faculdade Dr. Francisco Maeda – FAFRAM. Ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-Unesp), sob orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso".

John Ruskin

Dedicatória

Dedico este árduo trabalho aos meus pais Adriana Mariana de Brito Carvalho e Sebastião dos Reis de Carvalho que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelas oportunidades a mim concedidas e aos aprendizados que pude retirar de tudo isso e por sempre me carregar no colo nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais Adriana e Sebastião, por sempre estarem ao meu lado me apoiando, incentivando e me educando, como pessoa e profissional. Graças à luta de vocês pude me tornar o que sou hoje.

Agradeço ao meu irmão Eduardo, por todo amor e carinho.

Agradeço ao meu companheiro de vida Frederico, por todo companheirismo e apoio.

Agradeço à minha orientadora Lindsay, por toda paciência, ajuda, apoio e ensinamentos a mim passados.

Agradeço a todas minhas colegas de mestrado, por toda amizade e ajuda, em especial à Cláudia por sempre ser prestativa e oferecer ajuda e transmitir ensinamentos e também à Joice pelo apoio e ajuda durante minha estada em São José do Rio Preto – SP, e também à Fernanda que me ofereceu o laboratório onde pude realizar meu experimento e me transmitiu ensinamentos.

Agradeço à Raquel por todo apoio, ensinamentos transmitidos e concessão dos meios de produção *in vitro* e criopreservação do meu experimento.

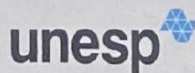
Agradeço a todos que passaram pela minha vida durante o mestrado e que contribuíram direta e indiretamente com minha vida profissional e pessoal e que auxiliaram em meu desenvolvimento.

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

SUMÁRIO

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	i
RESUMO	ii
Palavras-chaves:	ii
ABSTRACT	iii
Key Words.....	iii
LISTA DE FIGURA.....	iv
LISTA DE TABELAS	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Produção <i>in vitro</i> e criopreservação de embriões	2
3. REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2 – ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PELA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA.....	28
RESUMO.....	28
SUMMARY.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Obtenção dos oócitos	31
2.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	32
2.3. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	32
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	33
2.5. Congelação Lenta de Embriões para Transferência Direta.....	33
2.6. Delineamento experimental	35
2.7. Análises de qualidade embrionária.....	36
2.8. Análise estatística.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÕES	44
5. AGRADECIMENTOS	44
6. REFERÊNCIAS	44
7. FIGURAS E TABELAS.....	47
8. DECLARAÇÃO DE INTERESSE CONCORRENTE	49
9. CUIDADOS NO USO DE ANIMAIS	49

10.	MATERIAL SUPPLEMENTAR	50
-----	-----------------------------	----



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



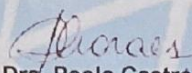
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Adição de astaxantina ao meio de criopreservação de embriões bovinos na técnica de transferência direta"** protocolo nº 1398/21, 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 24 de junho de 2021.

Vigência do Projeto	01/08/2021 a 01/03/2022
Espécie / Linhagem	<i>Bos indicus</i> / <i>Bovinae</i>
Nº de animais	350 animais totais (50 animais de cada grupo)
Peso / Idade	Aproximadamente $\pm$ 500 Kg, idade indefinida
Sexo	Fêmea
Origem	Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de junho de 2021.


Profª. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora – CEUA

ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS NA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA

RESUMO – Tendo em vista a grande expansão do mercado de produção *in vitro* de embriões no Brasil e no mundo é fundamental que pesquisadores busquem cada vez mais inovar na identificação de moléculas e concentrações adequadas para aprimorar e otimizar os protocolos de produção *in vitro* e criopreservação de embriões. A adição de antioxidantes aos meios contendo embriões pode ser benéfica, melhorando a viabilidade e qualidade embrionária. O presente estudo tem como objetivo testar o uso do antioxidante astaxantina adicionado ao meio de criopreservação de embriões, pela técnica de congelamento lento. Foi realizada a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos provindos de ovários de animais abatidos em frigorífico. O objetivo do experimento foi eleger a melhor dose de astaxantina adicionada ao meio de congelamento para transferência direta, quanto à reexpansão após descongelamento e apoptose. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle. A adição de astaxantina nas doses de 0,25 ou 1,5 μM ao meio de criopreservação de embriões não aumentou a viabilidade dos embriões pós congelamento e não reduziu a apoptose, mantendo-se similar ao grupo controle.

Palavras-chaves: antioxidante; carotenoide; congelamento lento; transferência direta.

ADDITION OF ASTAXANTHIN TO BOVINE EMBRYO CRYOPRESERVATION MEDIUM IN THE DIRECT TRANSFER TECHNIQUE

ABSTRACT – Due the great expansion of the *in vitro* embryo production in Brazil and in the world, it is essential that researchers innovate in the identification of molecules and adequate concentrations to improve and optimize *in vitro* production protocols and embryo cryopreservation. The addition of antioxidants to media containing embryos can be beneficial, improving embryo viability and quality. The present study aims to test the use of the antioxidant astaxanthin added to the embryo cryopreservation medium, using the slow freezing technique. The aim of the experiment was to choose the best dose of astaxanthin added to the embryo freezing medium for direct transfer, regarding re-expansion after thawing and apoptosis. There was no significant difference between treated and control groups. The addition of astaxanthin at doses of 0.25 or 1.5 μM to the embryo cryopreservation medium did not increase the viability of the post-freezing embryos and did not reduce apoptosis, remaining similar to the control group.

Key Words: antioxidant; carotenoid; slow freezing; direct transfer.

LISTA DE FIGURA

Capítulo 1

Figura 1. Representação esquemática de um embrião durante as etapas de congelamento lenta e vitrificação. 8

Capítulo 2

Figura 1. Fotomicrografias de embriões produzidos in vitro, criopreservados pela técnica de congelamento lenta..... 48

Figura 2. Fotomicrografias de embriões produzidos in vitro após tratamento com AST..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas da análise de reexpansão e eclosão	47
Tabela 2. Índices da análise de coloração Hoechst e Túnel.....	47
Tabela 3. Dose-resposta 1.....	50
Tabela 4. Dose-resposta 2.....	50

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Com o avançado desenvolvimento da produção *in vitro*, pesquisas são realizadas com o propósito de inovar e identificar uma combinação de moléculas que seja eficiente para criopreservação de embriões, oócitos e espermatozoides de diferentes espécies, com objetivo de diminuir os danos celulares e aumentar os índices de viabilidade (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2014).

Atualmente a maneira mais eficiente de manter a viabilidade embrionária por longos períodos é realizada por meio do processo de criopreservação. Por isso é importante desenvolver técnicas que sejam eficientes, simples, rápidas, viáveis e de fácil aplicação em pesquisas e em escala comercial (PRADO, 2011).

Um dos maiores obstáculos para disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos é devido à baixa criotolerância, ou seja, devido aos efeitos deletérios inerentes ao processo. A sobrevivência embrionária após o processo de criopreservação está relacionada a fatores como teor do conteúdo lipídico, metabolismo embrionário, índice apoptótico e padrão de expressão gênica (SUDANO et al., 2013). Uma forma de melhorar a qualidade das células e aumentar a criotolerância dos embriões é reduzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, por meio do uso de antioxidantes. Com isso é possível evitar lesões às células embrionárias e otimizar a sobrevivência dos embriões após descongelação (DINNYES et al., 2006; MEZZALIRA; VIEIRA, 2006).

Um antioxidante que vem se mostrando promissor na produção *in vitro* de embriões é a astaxantina. Quando adicionada aos meios de produção *in vitro* melhorou o desenvolvimento e a qualidade dos embriões, protegendo-os dos

efeitos deletérios do estresse térmico, otimizando as taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (LI et al, 2015). Lin et al., (2018), avaliaram o efeito da utilização de agentes antioxidantes durante a maturação *in vitro* de embriões e observaram uma melhora significativa na qualidade e no desenvolvimento de oócitos de baixa qualidade. Além disso, adição de antioxidantes diminuiu a produção de ROS, apoptose e lesões no DNA. O uso de antioxidantes como a astaxantina é capaz de reduzir os índices apoptóticos (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Entretanto, até o momento não foram encontrados estudos com a inclusão da AST na criopreservação de embriões bovinos.

O objetivo no presente estudo é testar a adição do antioxidante astaxantina ao meio de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, pela técnica de congelação lenta, visando reduzir os danos durante este processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* e criopreservação de embriões

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é usada como alternativa para aumentar e explorar o número de animais geneticamente superiores em um curto espaço de tempo, melhorando a eficiência reprodutiva e o desempenho dos rebanhos (VIANA; CAMARGO, 2007; VALENTE et al., 2019).

A utilização da produção *in vitro* aumentou significativamente no mercado, tanto na pecuária leiteira como na de corte nos últimos anos, sendo assim, o número de embriões derivados *in vitro* ultrapassou o número de embriões produzidos *in vivo*, a nível mundial (FERRÉ et al, 2020). O percentual de

embriões produzidos *in vitro* e criopreservados ainda é inferior à transferência a fresco, visto que esta ainda é a mais utilizada, pois apresenta índices maiores de prenhez (SUDANO et al., 2014; SANTOS-NETO et al., 2017; VIANA, 2018).

A transferência de embriões bovinos tornou-se uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético, nos quais a qualidade e o estado dos embriões (frescos ou congelados) é crucial em termos de sua aplicabilidade (FERRÉ et al, 2020; IETS 1997-2017; VALENTE et al., 2019).

A criopreservação permite conservar o embrião por longos períodos em estado de quiescência, possibilitando o transporte, a exportação e a importação de material genético de animais de interesse zootécnico, facilitando a multiplicação da genética em vários continentes diferentes, facilitando a logística de transporte e dispersão de material genético (ALMINANA; CUELLO, 2018; SARAGUSTY; ARAV, 2011). Por meio da criopreservação é possível manter a viabilidade de embriões excedentes produzidos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008). A técnica permite também que gametas sejam criopreservados e que bancos genéticos sejam criados a partir de diferentes raças e espécies se tornando uma ferramenta essencial, pois por meio dela é possível conservar o genoma de espécies com risco de extinção oferecendo maior variabilidade genética (ALMINANA; CUELLO, 2018).

A criopreservação é reversível quando bem aplicada e quando são eleitos embriões de boa qualidade, possibilitando que o embrião suporte a criopreservação e retome o seu metabolismo e desenvolvimento após a descongelação (SEIDEL JR., 1986; VAJTA; KUWAYAMA, 2006; SUDANO et al., 2013).

Segundo Carvalho et al. (2011), as técnicas de criopreservação mais aplicadas a nível de pesquisa e comercial são as técnicas de congelação lenta e vitrificação sendo os métodos de criopreservação que mais se destacam. Durante o processo de criopreservação remove-se o máximo de água intracelular para evitar a formação de cristais de gelo, o que causa danos celulares irreversíveis e então a água é substituída pelo crioprotetor, que irá possibilitar a técnica.

A técnica de vitrificação é baseada na eliminação total da formação de cristais de gelo. Sua desvantagem é devido às altas concentrações de crioprotetores que aumentam as chances de danos osmóticos e tóxicos, mas a alta velocidade de resfriamento resulta em uma rápida passagem através da temperatura crítica ao redor de 0°C, o que minimiza os danos causados pelo frio.

Atualmente, o método de criopreservação mais popular para embriões PIVE ainda é a vitrificação (VAJTA, 2006; FERRÉ et al., 2020). A vitrificação baseou seus pontos em ser uma técnica rápida e de menor custo de equipamento (VAJTA e KUWAYAMA, 2006) e pode ser mais adequada para embriões com maior teor lipídico do que a técnica de congelação lenta. Além disso, a vitrificação inclui várias etapas de equilíbrio antes da imersão em nitrogênio, o que torna problemática a vitrificação de um grande volume de embriões (VOLKEL; HU, 1992; VALENTE et al, 2019).

De acordo com Vajta (1997), a congelação tradicional de embriões é uma técnica que permite a manutenção do equilíbrio entre danos osmóticos e tóxicos, pois utiliza baixas concentrações de crioprotetores, controlando a formação de cristais de gelo através da congelação do meio extracelular e a desidratação do embrião.

O primeiro caso relatado obtendo sucesso durante a congelação e descongelação de embriões, foi no trabalho de Whittingham et al. em 1972, com testes realizados em embriões de camundongos. A partir de então, foram realizados novos estudos com objetivo de criopreservar sêmen e embriões (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2014). De acordo com Valente et al. (2019), a técnica foi aplicada com êxito em diferentes espécies, como na espécie bovina por Wilmot e Rowson em 1973.

Os embriões podem ser transferidos logo após realizada a descongelação, sem necessidade de diluir os meios de criopreservação, visto que já possuem concentração mínima (VOLKEL; HU, 1992). Leibo (1983) desenvolveu o método no qual a diluição do crioprotetor acontece na própria palheta após a descongelação, possibilitando a transferência direta para as receptoras sem avaliação microscópica prévia (VALENTE et al., 2019).

A congelação lenta conta com curvas de refrigeração e congelação programáveis controladas por um equipamento sofisticado específico. As desvantagens do método de congelação lenta são devido ao seu alto custo pela utilização de equipamentos específicos e o maior risco de formação de cristais de gelo intracelulares durante a criopreservação, causando danos celulares irreversíveis (CARVALHO et al., 2011).

O sucesso da realização da técnica de congelação lenta está em alcançar curvas adequadas de resfriamento e aquecimento e a utilização de crioprotetores eficientes (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Existe uma linha tênue entre a velocidade ideal de congelação e o surgimento de alterações nas estruturas celulares do embrião. Um gráfico em formato de “U” invertido é usado como referência às curvas ideais de

congelamento, no qual, de acordo com o aumento da curva de congelamento, há também aumento da sobrevivência dos embriões após realizada a descongelamento, até atingir o equilíbrio, então a curva para de subir e se mantém equilibrada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2014).

Em condições de exploração, os embriões DT oferecem uma grande vantagem sobre os protocolos de diluição pós-descongelamento. No entanto, apenas embriões *in vitro* de grau 1 (alta qualidade), segundo critério da IETS (1997–2017), são adequados para métodos de criopreservação DT, a fim de atingir taxas de prenhez aceitáveis (VAJTA, 2006; FERRÉ et al., 2020).

A capacidade de congelar embriões e transferi-los diretamente após um protocolo simples de descongelamento para receptoras previamente sincronizadas facilita a implementação em larga escala desta biotecnologia, ao mesmo tempo que estimula a comercialização nacional e internacional de genética de elite de forma segura. A principal vantagem do método DT sobre a remoção gradual do crioprotetor após a descongelamento baseia-se no aumento da produtividade devido à implantação de um grande número de embriões num curto período de tempo (VAJTA; KUWAYAMA, 2006; CARVALHO et al., 2011; FERRÉ et al., 2020).

Apesar da diferença entre embriões frescos e congelados *in vivo* ser muito pequena, o mesmo não ocorre com embriões derivados *in vitro*. Os principais desafios são relacionados à qualidade embrionária e à criotolerância dos embriões, apresentando baixa produção de blastocistos *in vitro*, baixas taxas de implantação embrionárias, altas de perdas gestacionais (MEZZALIRA; VIEIRA, 2006, GONÇALVES et al., 2008) e baixas taxas de sobrevivência após criopreservação (VALENTE et al., 2019),

As diferenças de qualidade entre os embriões produzidos *in vitro* e os embriões produzidos *in vivo* poderiam explicar o baixo desempenho de criosobrevivência dos *in vitro*. Entre elas estão o sistema de cultivo, com formulação de meios semidefinidos ou definidos, presença de fatores de crescimento, aditivos naturais e/ou sintéticos, presença de monocamada de células somáticas, ambiente de cultivo, densidade embrionária, condições atmosféricas e frequência de mudança e troca de meio. Condições de cultivo *in vitro* abaixo do ideal afetam o oócito e o embrião não apenas morfológicamente, mas fisiologicamente também. Além disso, o metabolismo do embrião, o conteúdo lipídico do citoplasma, a velocidade de divisão celular, a compactação da mórula e a expressão gênica, também contribuem para definir a qualidade do embrião, a competência de desenvolvimento e a criotolerância (FERRÉ et al, 2020).

A baixa criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* está relacionada com o índice de apoptose celular e a quantidade e conteúdo lipídico presentes no citoplasma (ABE et al., 2002; SUDANO et al., 2011 e 2014). Os danos causados pela criopreservação estão relacionados com a transição de fase lipídica e a peroxidação lipídica na congelação e descongelação. Em temperaturas fisiológicas, as gotículas de lipídios estão em uma fase fluida, proporcionando elasticidade às membranas e às estruturas intracelulares. No entanto, após o resfriamento ocorre a transição de fase lipídica, onde a taxa de difusão de moléculas hidrofóbicas e a permeabilidade das membranas diminuem, levando à rigidez das membranas, redistribuição de lipídios intracelulares e, potencialmente, ruptura de organelas associadas a gotículas lipídicas. Além disso, o grau de saturação lipídica varia entre espécies, raças e

estágios embrionários (ABE et al., 2002; SUDANO et al., 2011; FERRÉ et al, 2020).

Um protocolo inovador que aperfeiçoasse a produção *in vitro* e a técnica de criopreservação de embriões alavancaria e difundiria ainda mais esta biotecnologia, solucionando os principais gargalos que limitam seu uso (VAJTA, 2013, ALMINANA; CUELLO, 2018).

A figura 1 ilustra os processos de criopreservação, diferenciando as técnicas de congelação lenta e vitrificação. Ilustrando as diferenças de osmolaridade presente nos diferentes meios usados na realização da técnica e como isso impacta durante a criopreservação, ilustrando as crioinjúrias sofridas pelo embrião.

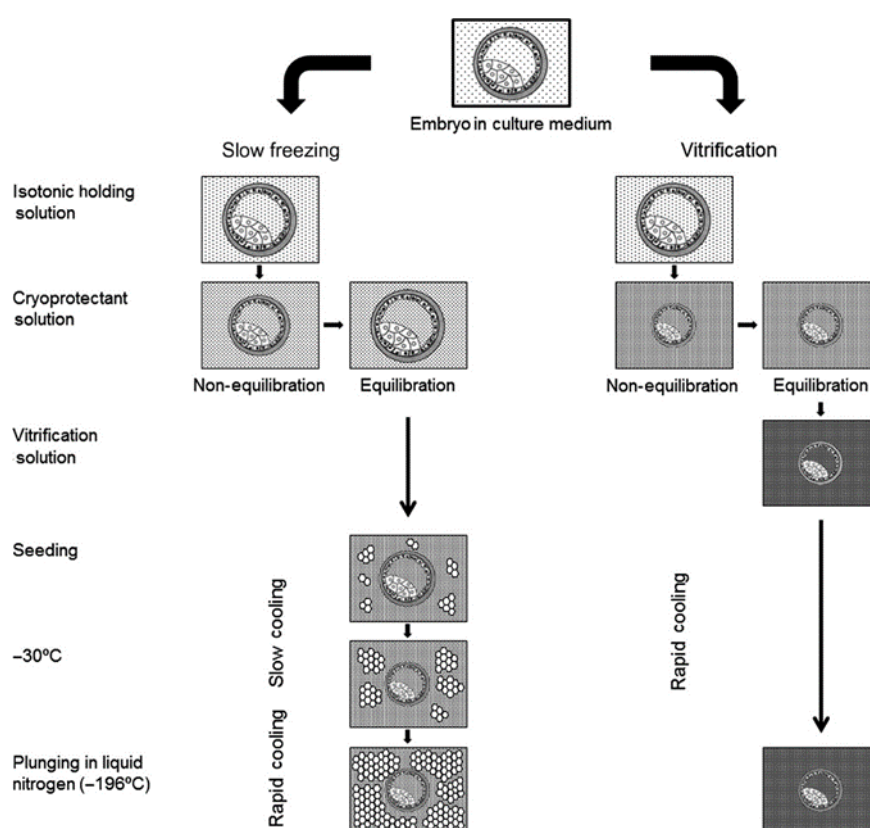


Figura 0-1. “Representação esquemática de um embrião durante as etapas de congelação lenta e vitrificação. O sombreamento mais escuro representa uma osmolaridade do crioprotetor utilizado mais elevada. As alterações no tamanho do embrião representam encolhimento e reexpansão em resposta à osmolaridade da solução e às concentrações de crioprotetores. Hexágonos

demonstram a formação de cristais de gelo” durante o processo de congelação lenta de acordo com a queda da temperatura. O mesmo não acontece com a vitrificação, onde o embrião não sofre com formação de cristais de gelo (Adaptação da figura de FERRÉ et al, 2020).

2.2. Lesões causadas ao embrião durante a criopreservação

As injúrias causadas nos embriões pelo processo de criopreservação reduzem as taxas de sobrevivência embrionária, causando consideráveis danos morfológicos e funcionais. Porém, a extensão das crio-injúrias pode ser variável e dependente da espécie, origem do embrião, se é produzido *in vitro* ou *in vivo* e o estágio de desenvolvimento embrionário no momento da criopreservação (DALCIN; LUCCI, 2010).

As alterações nos embriões durante a criopreservação, mais precisamente durante os ciclos de desidratação-reidratação, podem ser em nível celular e molecular. As alterações celulares são choque osmótico e lesões osmóticas que afetam o citoesqueleto, deformidades celulares e danos estruturais como, por exemplo, o acúmulo de detritos celulares e acúmulo de vesículas, podendo as mitocôndrias sofrerem também alterações. Embriões que sofrem pequenas lesões podem se recuperar e regenerar, liberando as células mortas, depois de cultivados por 24 horas (KASAI et al., 1996; VAJTA et al., 1997; DOBRINSKY et al., 2000; NAGAI et al., 2006; CUELLO et al., 2007; DALCIN et al., 2013; ZANDER-FOX et al., 2013).

Já as alterações em nível molecular afetam a integridade do DNA, causando fraturas ou fragmentação de DNA e também alterações na expressão de vários genes pelo excesso de radicais livres, podendo a adição de antioxidantes beneficiar o procedimento, reduzindo os efeitos nocivos dos

radicais livres nas células embrionárias (CUELLO et al., 2005; HOSSEINI et al., 2009; KADER et al., 2009; SHAW et al., 2012).

A criopreservação também aumenta a peroxidação lipídica, que é a degradação oxidativa de lipídios e ácidos graxos insaturados, que acontece devido à reação em cadeia de radicais livres presentes nas membranas celulares e causando danos às membranas biológicas, prejudicando sua estrutura e função. Isto causa disfunções celulares devido a variações no transporte de íons através da membrana, aumento da viscosidade, imobilização de proteínas e aumento de fosfolipídios, promovendo assim lise celular (DUMOULIN et al., 1999; LÓPEZ-DAMIÁN et al., 2020).

Embriões produzidos *in vitro* possuem menor taxa de viabilidade e resistência à criopreservação quando comparados com embriões produzidos *in vivo*, e é possível afirmar isso através das seguintes características que podem ser encontradas em embriões PIVE: formação de vacúolos em células trofoblásticas, conexões intercelulares reduzidas e aumento de conteúdo lipídico, o que reduz a criotolerância (LONERGAN et al., 2001). Este último fator ocorre, pois, o processo de contração osmótica (saída de água do meio intracelular para o meio extracelular, devido à maior concentração dos crioprotetores) faz com que as membranas se tornem mais flácidas e os blastômeros se tornem mais vulneráveis à perda de componentes celulares, sendo essas alterações associadas à transição lipídica podendo causar danos à estrutura da membrana, perda da fluidez e ruptura (WOLFE e BRYANT, 1999; ABE et al., 2002; VALENTE et al., 2019).

Ademais, o potencial da membrana mitocondrial e o aumento de espécies reativas de oxigênio causam danos ultraestruturais nas próprias mitocôndrias,

levando à diminuição do conteúdo de ATP, desregulação das mitocôndrias e aumento dos genes relacionados à apoptose. A disfunção mitocondrial foi correlacionada com a parada do desenvolvimento e morte embrionária (CAO et al., 2009; GUALTIERI et al., 2021).

A apoptose é essencial para o desenvolvimento e maturação de gametas e embriões, auxiliando no processo de formação de órgãos e estruturas vitais (TRANGUCH et al., 2003), sendo considerado um processo de morte celular programada. Está associada a mecanismos genéticos moleculares que sofrem estímulos externos ou internos e agem sobre células individuais (HARDY, 1999). Também pode ser considerado um mecanismo de defesa celular essencial (ELMORE, 2007), porém em níveis elevados causa a morte embrionária ou desenvolvimento de anomalias incompatíveis com a gestação (BRILL et al., 1999). O processo de apoptose celular pode ser desencadeado em resposta à estímulos não fisiológicos, como temperatura, agentes tóxicos, estresse oxidativo e radiação. As células apoptóticas possuem características morfológicas próprias como a marginalização da cromatina e formação de corpos apoptóticos (MEN et al., 2003).

Para que o processo de morte celular programada ou apoptose aconteça é necessário a presença de enzimas de caspase e seus mRNAs, que podem ser detectados em células embrionárias durante o processo de pré-implantação, no estágio de desenvolvimento blastocisto (dia 7) (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2014). Essas enzimas fazem parte de uma cascata provocada em resposta a manifestações de mecanismos pró-apoptóticos, que atuam na lise de proteínas essenciais para a homeostase celular, causando a morte celular. A enzima caspase é a principal desencadeadora da cascata de mecanismos pró-

apoptóticos, sendo regulada por proteínas da família Bcl-2 (BRILL et al,1999), que se localizam no interior das membranas celulares, consideradas como oncoproteínas prototípicas (HAUNSTETTER; IZUMO, 1998). A proteína Bcl-2 possui como função prevenir o mecanismo de apoptose, através da liberação de citocromo da mitocôndria (YANG et al., 1997). A proteína do gene Bax é o primeiro membro pró-apoptótico, sua expressão resulta em apoptose celular (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

Algumas estratégias podem ser empregadas para aumentar a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro* após a criopreservação, como por exemplo, a modificação das condições de cultivo *in vitro* para reduzir o acúmulo lipídico, suplementação do meio com agentes lipolíticos, cultivo sob sistema de baixa pressão de oxigênio para minimizar o estresse oxidativo e a adição de antioxidantes ao meio de cultivo, para reduzir as espécies reativas de oxigênio e agentes que causam oxidação celular (DODE et al., 2013).

2.3 Espécies reativas ao oxigênio (ROS)

O metabolismo mitocondrial é a principal fonte de energia em embriões de mamíferos (ALMANSA-ORDONEZ et al., 2020) e a criopreservação pode comprometer a função mitocondrial, levando a uma formação excessiva de espécies reativas de oxigênio, causando o estresse oxidativo intracelular elevado, o que diminui a competência dos espermatozoides, dos oócitos e a dinâmica da fertilização e do desenvolvimento embrionário. As mitocôndrias são organelas fundamentais para o metabolismo celular e a síntese de ATP, também são responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS),

processo fundamental e fisiológico. Também são responsáveis pela homeostase do cálcio e pela morte celular. As espécies reativas de oxigênio têm papel fundamental para o desenvolvimento embrionário, porém em excesso causam grandes malefícios (GUALTIERI et al., 2021).

As ROS são produzidas fisiologicamente em baixos níveis pelas células reprodutivas e são fundamentais para o desenvolvimento embrionário e essenciais na sinalização redox (desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes) levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e, consequentemente, dano celular. No entanto, quando a produção de ROS é excessiva sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante fisiológico da célula, então surge um estado de estresse oxidativo, que por sua vez, afeta a estrutura e função das proteínas, lipídios e DNA, danificando a atividade celular ou levando à morte celular (GUALTIERI et al., 2021).

O excesso de ROS é prejudicial ao desenvolvimento embrionário, sendo o principal causador de atraso ou parada no desenvolvimento e morte embrionária em diferentes estágios de desenvolvimento e indução de apoptose (TANAKA et al., 1995). Isso se deve principalmente ao fato de que as ROS reagem com moléculas complexas de lipídios, proteínas e o próprio DNA, causando graves disfunções como a inativação enzimática, anormalidade mitocondrial, fragmentação de DNA (ASHOK et al., 2003), metilação de DNA e acetilação de histonas, sendo estas relacionadas com modificações epigenéticas causadas no desenvolvimento inicial do embrião (LI et al., 2015).

As ROS são formadas por radical ânion superóxido, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, hidroxila e óxido nítrico (NO – espécie reativa de nitrogênio), que são participantes da reação redox (processo químico pelo qual

há transferência de elétrons). São formadas durante o metabolismo celular, que também causa estresse celular, e induzem a peroxidação lipídica no interior da membrana celular, resultando na diminuição da função celular e perda da integridade de membrana o que propicia a permeabilidade celular (HANCOCK et al., 2001; CHOI et al., 2004). O óxido nítrico (NO) atua regulando a divisão mitótica dos embriões, mas seu excesso pode causar a interrupção de desenvolvimento e induzir a apoptose embrionária (TRANGUCH et al., 2003).

2.4. Antioxidantes e Astaxantina

Antioxidante é uma molécula considerada capaz de impedir a oxidação e danos oxidativos em tecidos ou células causadas pelos radicais livres e ROS produzidos pelo próprio metabolismo aeróbio dos organismos. O aumento de moléculas oxidantes no organismo promove uma reação em cadeia com proteínas, lipídios e DNA causando danos nas próprias proteínas, lipídios, ao DNA e ao organismo como um todo. As moléculas oxidativas podem ser inibidas por antioxidantes endógenos (sistema de agentes antioxidantes produzidos pelo próprio organismo para controlar agentes oxidantes) e exógenos (suplementos contendo agentes antioxidantes, utilizados de maneira externa, ou seja, através de suplementação), como é o caso dos carotenoides, mais especificamente a astaxantina (NAGUIB, 2000). Os antioxidantes presentes nos carotenoides possuem a função de estabilizar os radicais livres formados após a reação com os radicais livres já ativos no sistema (LAWLOR; O'BRIEN, 1995). Outra propriedade interessante é que a astaxantina não se transforma em pró-oxidativa, como acontece com alguns antioxidantes (MARTIN et al, 1999).

Segundo Singh; Patil; Barkate (2020), a molécula astaxantina foi extraída e isolada pela primeira vez em uma lagosta, pelos pesquisadores Kuhn e

Sorensen em 1938 e então foi muito utilizada como corante alimentício em produtos para animais e humanos, devido ao seu pigmento alaranjado. Nos dias atuais, a astaxantina tem sido muito utilizada em setores da aquicultura, em cosméticos, formulações nutracêuticas e farmacêuticas e também em alimentos como corante e antioxidante (DAVINELLI; NIELSEN; SCAPAGNINI, 2018).

Considerado um carotenoide xantofila, a astaxantina pode ser encontrada comumente em algas marinhas e extraída principalmente de uma microalga verde, a *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum* e *Phaffia rhodozyma*, porém a astaxantina pode ser encontrada também em frutos do mar, como camarão, salmão e lagostas (AMBATI et al., 2014). Este poderoso antioxidante é muito encontrado em ambiente aquático, com um marcante pigmento alaranjado que pode ser encontrado nas espécies produtoras desta molécula (KIDD, 2011). A molécula natural é obtida a partir da microalga verde *Haematococcus pluvialis*, que possui células encistadas com astaxantina e é considerada uma das melhores fontes naturais da molécula; já a astaxantina vendida comercialmente é obtida grande parte através da levedura *Phaffia rhodozyma* ou por síntese química e uma pequena parte através da *Haematococcus pluvialis* (RANGA et al., 2010).

As algas marinhas acumulam maior quantidade de astaxantina quando estas são submetidas ao estresse. No caso, a astaxantina funciona como uma defesa, protegendo as algas de fatores como o aumento da salinidade, deficiência de nitrogênio, proteção contra a luz ultravioleta, aumento da temperatura e fatores oxidantes (RAVI et al., 2012). Deste modo, oferece tolerância ao estresse e atua como antioxidante, entre outras funções como controle da reação imunológica, auxilia na melhoria da capacidade reprodutiva e

também como fonte de pigmentação para diferentes espécies (DAVINELLI; NIELSEN; SCAPAGNINI, 2018).

A estrutura da molécula de astaxantina contém átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (HIGUERA; FELIX; GOYCOOLEA; 2006). A forma mais abundante na natureza consiste em estereoisômeros, isômeros geométricos, formas livres e esterificadas, já a forma sintética compreende a forma de isômeros. A forma molecular da astaxantina é $C_{40}H_{52}O_4$ e a sua massa molar é 596,84 g/mol (HIGUERA; FELIX; GOYCOOLEA; 2006). A astaxantina possui ligações duplas conjugadas no centro do composto o que é responsável pela cor e pela função antioxidante da molécula, pois essa ligação dupla conjugada atua doando elétrons e reagindo com radicais livres, dessa forma consegue convertê-los em um produto mais estável e encerrar a reação de radicais livres (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). Somente a astaxantina possui uma estrutura molecular única que a diferencia dos demais antioxidantes, conferindo assim uma maior propriedade antioxidante e permitindo que ela atue dentro e fora da membrana celular (HUSSEIN et al., 2006). A cadeia de polieno é responsável por capturar radicais livres presentes na membrana celular e o anel terminal por eliminar os radicais livres nas partes externas e internas da membrana celular (AUGUSTI et al., 2012).

A astaxantina é considerada o melhor e mais eficiente antioxidante em comparação aos outros carotenoides, devido à sua melhor atividade biológica e a sua forma de se ligar à membrana celular, que é de dentro para fora. A astaxantina promove aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (GPx) e liberação de cálcio no citosol. A astaxantina é capaz de proteger células, lipídios e lipoproteínas de membrana

contra os danos oxidativos, também é conhecida e muito utilizada devido às suas propriedades e funções anti-inflamatórias, imunomoduladoras e funções de reparo no DNA (RANGA et al., 2010; SINGH, PATIL E BARKATE, 2020).

A suplementação do antioxidante astaxantina tem se mostrado benéfica em diversos trabalhos realizados com modelos *in vitro*. A suplementação dos meios contendo embriões com astaxantina diminui significativamente a produção de ROS e melhora a estabilidade cromossômica (LI et al., 2015).

A suplementação com astaxantina foi positiva no trabalho de XIANG et al, 2021; onde foi observado efeitos benéficos do seu uso na maturação oocitária de suínos, além disso, os oócitos tratados com astaxantina durante a vitrificação e maturação melhoraram a qualidade e a competência de desenvolvimento. O tratamento com astaxantina durante os procedimentos de vitrificação e maturação *in vitro* aumentaram a taxa de sobrevivência do oócito.

Lin et al., (2018) avaliaram o efeito da utilização de antioxidantes durante a maturação *in vitro* de embriões e observaram uma melhora significativa na qualidade e no desenvolvimento de oócitos de baixa qualidade. Além disso, adição de antioxidantes diminuiu a produção de ROS, apoptose e lesões no DNA. O uso de antioxidantes como a astaxantina é capaz de reduzir os índices apoptóticos (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

ISPADA et al., (2018), também fizeram uso de astaxantina no meio de maturação de oócitos bovinos, observando efeitos benéficos onde houve resgate dos efeitos negativos do choque térmico. A astaxantina neutralizou o aumento induzido por choque térmico de espécies reativas de oxigênio (ROS) e restaurou a competência de desenvolvimento do oócito. Eles não observaram efeito da astaxantina na peroxidação lipídica do meio de maturação ou na atividade da

glutathiona peroxidase na peroxidação lipídica do meio de maturação ou na atividade da glutathiona peroxidase e catalase em oócitos e células do cumulus. Em resumo, o choque térmico direto reduziu a competência oocitária, que foi restaurada pela astaxantina, possivelmente através da regulação da atividade de ROS e superóxido dismutase (SOD) em oócitos e células do cúmulo bovino.

ABDEL-GHANI et al, 2019 fez uso do antioxidante astaxantina no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos para testar o efeito antioxidante da molécula. Eles encontraram resultados positivos com o uso de astaxantina, onde observou-se melhora na viabilidade de oócitos, baixa nos níveis de ROS, melhores taxas de formação de blastocisto e número total de células em relação ao grupo controle. A suplementação do meio com astaxantina melhora a qualidade de oócitos bovinos e formação de blastocisto devido seus efeitos antioxidantes.

KUROKI, et al, 2013, utilizou astaxantina no meio de cultivo *in vitro* para reduzir o comprometimento induzido pelo estresse térmico em desenvolvimento de blastocistos. O desenvolvimento do blastocisto no tratamento de estresse térmico repetido diminuiu significativamente em comparação com aqueles em estresse térmico único ou tratamento térmico normal. A adição de astaxantina ao meio de cultivo levou a uma recuperação significativa no desenvolvimento do blastocisto, o antioxidante foi detectado no citoplasma dos embriões e observado nas mitocôndrias. Pode-se observar também que a astaxantina recuperou a atividade mitocondrial diminuída em embriões e melhorou a competência ao desenvolvimento de blastocistos induzido pelo estresse térmico. Os resultados encontrados sugerem que a ação direta da astaxantina na atividade mitocondrial via captação celular é um mecanismo dos efeitos de melhoria.

Deste modo, é possível concluir que a astaxantina inibe mecanismos que causam danos oxidativos, através da extinção de oxigênio singlete, eliminação de radicais livres evitando assim as reações em cadeia, regulação da expressão gênica, preservação da estrutura da membrana celular através da inibição da peroxidação lipídica (RANGA et al., 2010; KOMATSU et al., 2017), aumento das funções do sistema imunológico e também impedindo reações inflamatórias (PARK et al., 2010).

2.4 Avaliação de embriões produzidos *in vitro*

É importante que sejam realizadas análises em embriões que foram criopreservados após seu reaquecimento, com a finalidade de avaliar o procedimento, sendo as mais comuns a avaliação de re-expansão da blastocela e eclosão da zona pelúcida, que permitem avaliar viabilidade embrionária e a retomada de desenvolvimento metabólico após ser exposto a criopreservação (VALENTE et al., 2019). As avaliações das taxas de re-expansão e eclosão devem ser realizadas após 24 e 48 horas depois do início do recultivo embrionário após descongelação (LEITE, 2014).

O bom desenvolvimento embrionário é estabelecido pela proporção do número de células entre massa celular interna e trofoblasto (LANE; GARDNER, 1997). Assim, outra importante análise de qualidade que pode ser realizada é a contagem do número total de células embrionárias (COSTA et al., 2010). Esta análise consiste em realizar coloração de núcleos de células embrionárias com um corante específico para DNA, o Hoechst 33342, e examinados em microscópio de fluorescência (PURSEL et al., 1985).

Células expostas a estresse celular e metabólico desenvolvem mecanismos de autodefesa, como por exemplo, a apoptose, autofagia controlada ativada por proteases endógenas (PAROLIN; REASON, 2001). Um dos métodos utilizados para a detecção de células apoptóticas é a marcação extensa da fragmentação de DNA. Células em processo de apoptose possuem atividade de DNAase endógena, que pode ser vista na marcação de DNA (GJØRRET et al., 2003), por meio do Teste TUNEL (Transferase-mediated dUTP nick-end labelling).

3. REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANI, M. A. et al. Astaxanthin improves the developmental competence of in vitro-grown oocytes and modifies the steroidogenesis of granulosa cells derived from bovine early antral follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 2, p. 272-281, 2019.

ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T., HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.

ALMANSA-ORDONEZ, A., BELLIDO, R., VASSENA, R., BARRAGAN, M., ZAMBELLI, F. Oxidative stress in reproduction: a mitochondrial perspective. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 269, 2020.

ALMINANA, C; CUELLO, C. O que há de novo na criopreservação de embriões? **Reprodução Animal (AR)**, v. 12, n. 3, p. 418-427, 2018.

AMBATI, R. R., PHANG, S. M., RAVI, S., ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. **Marine drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, 2014.

ASHOK, B. T., DAVID, L., CHEN, Y. G., GARIKAPATY, V. P. S., CHANDER, B., KANDUC, D., MITTELMAN, A., TIWARI, R. K. Peptide mimotopes of oncoproteins as therapeutic agents in breast cancer. **International journal of molecular medicine**, v. 11, n. 4, p. 465-471, 2003.

AUGUSTI, P. R., QUATRIN, A., SOMACAL, S., CONTERATO, G. M., SOBIESKI, R., RUVIARO, A. R., MAURER, L. H., DUARTE, M. M. F., ROEHRS, M., EMANUELLI, T. Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, p. 11-74, 2012.

BRILL, A., TORCHINSKY, A., CARP, H., TODER, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 16, n. 10, p. 512-519, 1999.

CAO, Y. X., XING, Q., LI, L., CONG, L., ZHANG, Z. G., WEI, Z. L., & ZHOU, P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 4, p. 1306-1311, 2009.

CARVALHO, A. A., FAUSTINO, L. R., FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P. R., COSTA, A. P. R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.

CHOI, J. Y., KIM, C. I., PARK, C. K., YANG, B. K., CHEONG, H. T. Effect of activation time on the nuclear remodeling and *in vitro* development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 69, n. 3, p. 289-295, 2004.

- COSTA, E. P., LOPES, F. G., PEREIRA, E. C. M., QUEIROZ, V. L. D., MACEDO, G. G., ALMEIDA NETO, J. R. M., COSTA, A. H. A. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1507-1510, 2010.
- CUELLO, C., BERTHELOT, F., DELALEU, B., VENTURI, E., PASTOR, L. M., VAZQUEZ, J. M., ROCA, J., MARTINAT-BOTTÉ, F., MARTINEZ, E. A. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: An ultrastructural and cell death study. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 970-982, 2007.
- CUELLO, C., BERTHELOT, F., MARTINAT-BOTTÉ, F., VENTURI, E., GUILLOUET, P., VÁZQUEZ, J. M., ROCA, J., MARTÍNEZ, E. A. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. **Animal reproduction science**, v. 85, n. 3-4, p. 275-286, 2005.
- DALCIN, L. LUCCHI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 149-159, 2010.
- DALCIN, L., SILVA, R. C., PAULINI, F., SILVA, B. D., NEVES, J. P., LUCCHI, C. M. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 137-145, 2013.
- DAVINELLI, S., NIELSEN, M. E., SCAPAGNINI, G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 522, 2018.
- DINNYES, A., MENG, Q., POLGAR, Z., BOONKUSO, D., SOMFAI, T. Cryopreservation of mammalian embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 171-190, 2006.
- DOBRINSKY, J. R., PURSEL, V. G., LONG, C. R., JOHNSON, L. A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 3, p. 564-570, 2000.
- DODE, M. A. N., LEME, L. O., SPRICIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013.
- DUMOULIN, J. C., MEIJERS, C. J., BRAS, M., COONEN, E., GERAEDTS, J. P., EVERS, J. L. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 465-469, 1999.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- FERRÉ, L. B. et al. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 6, p. 659-676, 2020.

- GJØRRET, J. O., KNIJN, H. M., DIELEMAN, S. J., AVERY, B., LARSSON, L. I., MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1193-1200, 2003.
- GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2014.
- GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, M. A. L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M. M., VISINTIN, J. A., COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Roca, p. 261-291, 2008.
- GUALTIERI, R., KALTHUR, G., BARBATO, V., DI NARDO, M., ADIGA, S. K., TALEVI, R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 337, 2021.
- GUERIN, M., HUNTLEY, M. E., OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, 2003.
- HANCOCK, J. T., DESIKAN, R., NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 345-349, 2001.
- HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 125-134, 1999.
- HAUNSTETTER, A., IZUMO, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 82, n. 11, p. 1111-1129, 1998.
- HIGUERA-CIAPARA, I., FELIX-VALENZUELA, L., GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185-196, 2006.
- HOSSEINI, S. M., FOROUZANFAR, M., HAJIAN, M., ASGARI, V., ABEDI, P., HOSSEINI, L., OSTADHOSSEINI, S., MOULAVI, F., SAFAHANI-LANGRROODI, M., SADEGHI, H., BAHRAMIAN, H., EGHBALEID, S., NASR-ESFAHANI, M. H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, n. 6, p. 355-364, 2009.
- HUSSEIN, G., SANKAWA, U., GOTO, H., MATSUMOTO, K., WATANABE, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 443-449, 2006.
- ISPADA, Jéssica et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 9, p. 1169-1179, 2018.
- KADER, A., AGARWAL, A., ABDELRAZIK, H., SHARMA, R. K., AHMADY, A., FALCONE, T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after

ultrarapid and slow freezing. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 5, p. 2087-2094, 2009.

KASAI, M., ZHU, S. E., PEDRO, P. B., NAKAMURA, K., SAKURAI, T., EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v. 33, n. 4, p. 459-464, 1996.

KIDD, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 4, p. 355-64, 2011.

KOMATSU, T., SASAKI, S., MANABE, Y., HIRATA, T., SUGAWARA, T. Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171178, 2017.

KUROKI, T. et al. Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development In Vitro:—astaxanthin colocalization with and action on mitochondria—. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 5, p. 623-631, 2013.

LANE, M., GARDNER, D. K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 14, n. 7, p. 398-403, 1997.

LAWLOR, S. M., O'BRIEN, N. M. Astaxanthin: antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. **Nutrition Research**, v. 15, n. 11, p. 1695-1704, 1995.

LEITE, C. A. **Viabilidade pós vitrificação de embriões F1 holandês x zebu produzidos *in vitro* e cultivados em meio contendo ácido linoleico conjugado**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) em Reprodução Animal – UFMG, Belo Horizonte, 2014.

LI, R., WU, H., ZHUO, W. W., MAO, Q. F., LAN, H., ZHANG, Y., HUA, S. Astaxanthin normalizes epigenetic modifications of bovine somatic cell cloned embryos and decreases the generation of lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 793-799, 2015.

LIN, T., LEE, J. E., KANG, J. W., OQANI, R. K., CHO, E. S., KIM, S. B., IL JIN, D. Melatonin supplementation during prolonged *in vitro* maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects. **Molecular reproduction and development**, v. 85, n. 8-9, p. 665-681, 2018.

LONERGAN, P., RIZOS, D., WARD, F., BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001.

LÓPEZ-DAMIÁN, E. P., JIMÉNEZ-MEDINA, J. A., ALARCÓN, M. A., LAMMOGLIA, M. A., HERNÁNDEZ, A., GALINA, C. S., FIORDELISIO, T. Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. **Theriogenology**, v. 143, p. 74-81, 2020.

MARTIN, H.-D., JÄGER, C., RUCK, C., SCHMIDT, M., WALSH, R., PAUST, J. Anti-and prooxidant properties of carotenoids. **Journal für praktische Chemie**, v. 341, n. 3, p. 302-308, 1999.

MEN, H., MONSON, R. L., PARRISH, J. J., RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 73-81, 2003.

MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D. Cryopreservation of cows oocytes and embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 191-196, 2006.

NAGAI, S., MABUCHI, T., HIRATA, S., SHODA, T., KASAI, T., YOKOTA, S., SHITARA, H., YONEKAWA, H., HOSHI, K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 210, n. 2, p. 137-144, 2006.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1150-1154, 2000.

PARK, J. S., CHYUN, J. H., KIM, Y. K., LINE, L. L., CHEW, B. P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. **Nutrition & metabolism**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2010.

PAROLIN, M. B., REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PRADO, F. R. A. **Efeitos da congelação lenta e vitrificação sobre a qualidade e viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) em Medicina Veterinária (Área: Reprodução Animal) – FCAV/Unesp, 2011.

PURSEL, V. G., WALL, R. J., REXROAD Jr, C. E., HAMMER, R. E., BRINSTER, R. L. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 687-691, 1985.

RANGA RAO, A., RAGHUNATH REDDY, R. L., BASKARAN, V., SARADA, R., RAVISHANKAR, G. A. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8553-8559, 2010.

RAVI, S., AMBATI, R. R., KAMATH, S. B., CHANDRAPPA, D., NARAYANAN, A., CHAUHAN, V. S., RAVISHANKAR, G. A. Influence of different culture conditions on yield of biomass and value added products in microalgae. **Dynamic biochemistry and process biotechnology and molecular biology**, p. 77-85, 2012.

SANTOS-NETO, P. C., CUADRO, F., BARRERA, N., CRISPO, M., MENCHACA, A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of *in vivo* and *in vitro* produced ovine embryos. **Cryobiology**, v. 78, p. 8-14, 2017.

- SARAGUSTY, J., ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1, 2011.
- SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. **Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings. Fort Collins: Colorado State University-Animal Reproduction Laboratory**, p. 6, 1986.
- SHAW, L., SNEDDON, S. F., BRISON, D. R., KIMBER, S. J. Comparison of gene expression in fresh and frozenthawed human preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 144, n. 5, p. 569, 2012.
- SINGH, K. N., PATIL, S., BARKATE, H. Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19, n. 1, p. 22-27, 2020.
- STRINGFELLOW, D. A., SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: Um Guia de Procedimentos e Informações Gerais Para uso em Tecnologia de Transferência de Embriões Enfatizando Procedimentos Sanitários**. Savoy: Illinois, 1998.
- SUDANO, M. J., CAIXETA, E. S., PASCHOAL, D. M., MARTINS, A., MACHADO, R., BURATINI, J., LANDIM-ALVARENGA, F. D. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*-and *in vivo*-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129-1141, 2014.
- SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., MAZIERO, R. R. D., RASCADO, T. S., GUASTALI, M. D., CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., MONTEIRO, B. A., MARTINS JR, A., MACHADO, R., LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, p. 160-167, 2013.
- SUDANO, M.J., PASCHOAL, D.M., RASCADO, T. S., MAGALHÃES, L.C.O., CROCOMO, L.F., DE LIMA-NETO, J.F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, 75(7), pp.1211-1220, 2011.
- TANAKA, T., MAKITA, H., OHNISHI, M., MORI, H., SATOH, K., HARA, A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. **Cancer Research**, v. 55, n. 18, p. 4059-4064, 1995.
- TRANGUCH, S., STEUERWALD, N., HUET-HUDSON, Y. M. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1538-1544, 2003.
- VAJTA, G. Vitrificação em embriologia humana e animal doméstico: trabalho em andamento. **Reprodução, Fertilidade e Desenvolvimento**, v. 25, n. 5, p. 719-727, 2013.

- VAJTA, G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 15, p. 12-18, 1997.
- VAJTA, G., HYTTEL, P., CALLESEN, H. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 48, n. 1, p. 9-17, 1997.
- VAJTA, G., KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.
- VALENTE, R. S. Efeito da modulação da Acil-CoA Sintetase de cadeia longa no desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2019. 31F. Dissertação (Mestrado) Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – UNIPAMPA, 2019.
- VIANA, J. H. A produção de embriões bovinos em 2017: o mercado em stand-by. **JORNAL O EMBRIÃO**, v. 62, 2018.
- VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 915-924, 2007.
- VOELKEL, S. A., HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 23-37, 1992.
- WOLFE, J., BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 103-129, 1999.
- XIANG, D. C., JIA, B. Y., FU, X. W., GUO, J. X., HONG, Q. H., QUAN, G. B., & WU, G. Q. Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the in vitro maturation and vitrification of porcine oocytes. **Theriogenology**, 2021.
- YANG, J., LIU, X., BHALLA, K., KIM, C. N., IBRADO, A. M., CAI, J., PENG, T. I., JONES, D. P., WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1129-1132, 1997.
- YANG, M. Y., RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal reproduction science**, v. 70, n. 3-4, p. 159-169, 2002.
- ZANDER-FOX, D., CASHMAN, K. S., LANE, M. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 1, p. 107-116, 2013.

CAPÍTULO 2 – ADIÇÃO DE ASTAXANTINA AO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PELA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DIRETA

ADDITION OF ASTAXANTHIN TO BOVINE EMBRYO CRYOPRESERVATION MEDIUM BY DIRECT TRANSFER TECHNIQUE

Artigo escrito conforme as normas da revista ARS Veterinária.

A.M. CARVALHO¹, C. M. HERÉDIAS-RIBAS¹, F. S. AIDAR², R. Z. PUELKER³, A. VIDOTTO⁴, L. U. GIMENES^{1*}.

¹Depto de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n - Jaboticabal/SP - CEP 14884-900.

²Animal Breeding Europe, East Mains, Ormiston, Tranent, Edinburgh, Reino Unido – Zip Code EH35 5NG.

³Botupharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários, Rua Coronel Fonseca, 2111 - Botucatu/SP - CEP 18603-495.

⁴Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto/SP - 15090-000.

***Corresponding author:** lindsay.gimenes@unesp.br

RESUMO

Tendo em vista a grande expansão do mercado de produção *in vitro* de embriões no Brasil e no mundo é fundamental que pesquisadores busquem cada vez mais inovar na identificação de moléculas e concentrações adequadas para aprimorar e otimizar os protocolos de produção *in vitro* e de criopreservação de embriões. A adição de antioxidantes aos meios contendo embriões pode ser benéfica, melhorando a viabilidade e qualidade embrionária. O presente estudo tem como objetivo testar o uso do antioxidante astaxantina, nas doses 0,25 e 1,5 μM , adicionado ao meio de criopreservação de embriões para transferência direta, quanto à reexpansão após descongelação e apoptose. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle. A adição de astaxantina nas doses de 0,25 ou 1,5 μM ao meio de criopreservação de embriões não aumentou a viabilidade dos embriões pós congelação e não reduziu a apoptose, mantendo-se similar ao grupo controle.

Palavras-chaves: antioxidante; carotenoide; congelação lenta; transferência direta.

SUMMARY

Due the great expansion of the *in vitro* embryo production in Brazil and in the world, it is essential that researchers innovate in the identification of molecules and adequate concentrations to improve and optimize *in vitro* production

protocols and embryo cryopreservation. The addition of antioxidants to media containing embryos can be beneficial, improving embryo viability and quality. The present study aims to test the use of the antioxidant astaxanthin added to the embryo cryopreservation medium, using the slow freezing technique. The aim of the experiment was to choose the best dose of astaxanthin added to the embryo freezing medium for direct transfer, regarding re-expansion after thawing and apoptosis. There was no significant difference between treated and control groups. The addition of astaxanthin at doses of 0.25 or 1.5 μM to the embryo cryopreservation medium did not increase the viability of the post-freezing embryos and did not reduce apoptosis, remaining similar to the control group.

Keywords: antioxidant; carotenoid; slow freezing; direct transfer.

1. INTRODUÇÃO

Com o avançado desenvolvimento da produção *in vitro*, pesquisas são realizadas com o propósito de inovar e identificar uma combinação de moléculas que seja eficiente para criopreservação de embriões, oócitos e espermatozoides de diferentes espécies, com o objetivo de diminuir os danos celulares e aumentar os índices de viabilidade (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2014).

Atualmente a maneira mais eficiente de manter a viabilidade embrionária por longos períodos é realizada por meio do processo de criopreservação. Por isso é importante desenvolver técnicas que sejam eficientes, simples, rápidas e viáveis, de fácil aplicação em pesquisas e em escala comercial (PRADO, 2011).

Um dos maiores obstáculos para disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos é a baixa criotolerância devido aos efeitos deletérios inerentes ao processo. A solução consiste em utilizar estratégias para produzir embriões bovinos *in vitro* de melhor qualidade e aumentar a sobrevivência dos mesmos após a descongelação (VALENTE et al., 2019).

A sobrevivência embrionária após o processo de criopreservação está relacionada a fatores como teor do conteúdo lipídico e sua composição, metabolismo embrionário, índice apoptótico e padrão de expressão gênica

(SUDANO et al., 2013). Uma forma de melhorar a qualidade das células e aumentar a criotolerância dos embriões é reduzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, por meio do uso de antioxidantes. Com isso é possível evitar lesões às células embrionárias e otimizar a sobrevivência dos embriões após descongelação (DINNYES et al., 2006; MEZZALIRA; VIEIRA, 2006).

Um antioxidante promissor é a astaxantina, cuja suplementação no cultivo *in vitro* de embriões submetidos ao estresse térmico, recuperou as taxas de desenvolvimento embrionário, com taxas de blastocisto similares às dos grupos que não foram submetidos ao estresse térmico (KUROKI et al, 2013). Entretanto, são escassos os trabalhos na literatura com o uso deste antioxidante em diversas fases da produção *in vitro* de embriões bovinos, não sendo encontrados relatos para mitigar o efeito do estresse oxidativo durante a criopreservação de embriões.

Portanto, o objetivo do estudo proposto é testar a adição do antioxidante astaxantina ao meio de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, pela técnica de congelação lenta para transferência direta, visando avaliar o efeito após a descongelação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado em parceria com um laboratório comercial de produção de embriões *in vitro* (FERTVITRO, nas dependências da faculdade UNIRP), sediado em São José do Rio Preto – SP. A produção *in vitro* de embriões foi realizada a partir de oócitos de ovários oriundos de um abatedouro próximo ao laboratório (BOI BAIO), seguindo o protocolo padrão deste

estabelecimento. Todos os meios utilizados no estudo foram meios comerciais (BOTUPHARMA).

A diluição do antioxidante AST (Sigma SML0982) foi realizada de acordo com instruções do fabricante, em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1g/L (0,5 M) e as alíquotas foram congeladas a -20°C. A partir daí foram realizadas novas diluições, todas utilizando o veículo DMSO. No experimento utilizamos a concentração de 1 µL de solução equivalente a 500 µM de AST, sendo realizadas novas diluições para as doses utilizadas no experimento (0,125 µM; 0,25 µM; 0,5 µM e 1,25 µM; 1,5 µM; 2,5 µM). Após as diluições as doses foram incorporadas ao meio de criopreservação.

A curva de congelação utilizada no experimento iniciou-se em - 6°C. Após 2 minutos de estabilização dos embriões na máquina, realizou-se o seeding e a curva decresceu a 0,5°C por minuto, com término do processo de congelação em - 35°C. Após as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido a - 196°C.

2.1. Obtenção dos oócitos

Após a chegada dos ovários ao laboratório, foi realizada a aspiração folicular utilizando uma seringa de 3 mL e agulha 40x12 mm. O líquido folicular foi cuidadosamente colocado em tubos cônicos Falcon de 50 mL em aquecedor de tubos (WTA) a 37°C. O material aspirado foi levado para o fluxo laminar, onde sedimentou por 10 minutos e, após, avaliou-se o conteúdo do pellet formado em placas de poliestireno para o rastreamento dos oócitos sob estereomicroscópio. Apenas oócitos de graus I, II e III (viáveis; Leibfried e First adaptado por Gonçalves, Figueiredo, Freitas, 2014) foram colocados em uma placa contendo

3 mL de meio de lavagem (TCM-199 HEPES, piruvato, antibiótico e soro fetal bovino (SFB 10%)).

2.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos viáveis foram lavados em duas gotas de meio de lavagem e uma gota de meio de maturação (TCM-199, SFB 10%, piruvato, antibiótico, hormônio folículo estimulante (FSH) e estradiol) e então, foram transferidos em torno de 25 oócitos para gotas de 80 µL imersas em óleo mineral. As placas de MIV foram colocadas em estufa úmida a 38°C e 5% de CO₂ em ar por 18 a 24 horas.

2.3. Fertilização *in vitro* (FIV)

Após a MIV, os oócitos foram lavados em duas gotas de meio CAP® (BOTUPHARMA; contendo sais inorgânicos, enriquecida com vitaminas, aminoácidos, antibiótico e HEPES) e em uma de meio FIV (BSA, piruvato, heparina, PHE e antibiótico), sendo transferidos para gotas de 50 µL ($\pm$ 25 oócitos/gota). Para a seleção dos espermatozoides foi utilizado o gradiente de separação, com o Select Sperm® (BOTUPHARMA; coloide de sílica). Foi utilizado sêmen do touro testado para PIVE (produção média de 30% de blastocistos), empregando-se uma mesma partida durante todo o experimento. Em um eppendorf de 1,5 mL, o sêmen, descongelado a 37°C por 30 segundos, foi colocado sobre o gradiente de separação por sílica, formado por 250 uL de Select Sperm® + 250 uL de CAP® (45%) e no fundo do eppendorf 500 uL de Select Sperm® (90%) e levado para centrifugação a 5000 RPM (3075 RCF ou x

g) por 5 minutos (Eppendorf® centrifuge 5418). Após, o pellet formado foi depositado em um segundo eppendorf contendo 800 µL de meio FIV, homogeneizado e centrifugado a 1200 RPM (738 RCF ou x g) por 3 minutos. Após centrifugação o pellet foi retirado e foram utilizados 5 µL (1 a 2 milhões de espermatozoides por mL) de sêmen por gota de FIV. As condições de atmosfera foram as mesmas da MIV, com duração entre 18 a 24 horas. O dia da FIV foi considerado o dia 0 (D0).

2.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV os presumíveis zigotos foram desnudados parcialmente nas gotas de meio FIV e posteriormente lavados em duas gotas de meio CIV (SOF: sais, bicarbonato, piruvato, cloreto de cálcio, aminoácidos essenciais e não essenciais, glutamina, antibiótico e SFB 2,5%). Em seguida foram transferidos para placas com gotas de 80 µL de meio CIV, ($\pm$ 25 zigotos/gota), permanecendo a 38°C em alta tensão de oxigênio até o D4. Neste dia foi realizada a substituição de 50% do meio (feeding), avaliação da taxa de clivagem e remoção dos zigotos bloqueados. Um segundo feeding foi realizado no D6 e contagem dos possíveis embriões. No D7 foi avaliado o estágio de desenvolvimento dos embriões, de acordo com Stringfellow e Seidel (1998), em graus 1 a 4. Após esta avaliação os embriões foram preparados para a realização da técnica de congelamento lenta para transferência direta.

2.5. Congelamento Lento de Embriões para Transferência Direta

Para realização da técnica de congelamento lento foram selecionados blastocistos expandidos (BX) de grau 1 e 2 no D7.

A técnica de congelação lenta e descongelação dos embriões foi realizada de acordo com Gonçalves, Figueiredo e Freitas (2014) e adaptada de acordo com instruções do fabricante dos meios comerciais (BOTUPHARMA).

Os embriões foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementado com 20% de SFB (meio Holding®; PRADO, 2011). Posteriormente foram colocados em gotas de meio DT1 (meio contendo sucrose) onde ficaram por aproximadamente 1,5 a 3 minutos ou até sofrerem retração. Em seguida, foram passados para o meio de DT2 (meio contendo etilenoglicol) por 10 minutos para envase dos embriões. Para isto foi preparado um terceiro meio (DT3), constituído de 50% de meio holding e 50% de meio DT2. Os embriões foram envasados de modo a apresentarem a seguinte distribuição: DT3, ar, DT3, ar, embrião em DT2, ar, DT3, ar, DT3. Na sequência, as palhetas já envasadas foram colocadas na máquina de congelação (Cryologic®) com curva iniciada a -6°C, com decréscimo de 0,5°C por minuto. Ao atingir - 6°C foi realizada a cristalização (seeding) nas pontas adjacentes ao embrião utilizando-se haste flexível de algodão e, após, a curva de congelação foi retomada. Ao alcançar - 35°C, as palhetas foram retiradas e colocadas em raques para serem imersas em nitrogênio líquido a -196°C.

Para o processo de descongelação cada palheta foi exposta ao ar por 10 segundos e depois mergulhadas em banho-maria a 30°C por 30 segundos. Após, a palheta foi agitada para ressuspensão do embrião, o conteúdo foi transferido para uma placa de Petri, onde os embriões foram rastreados sob estereomicroscópio, lavados em gotas individuais e ressuspendidos em solução de diluição contendo glicose, meio de cultivo e 20% SFB. Após a ressuspensão, os embriões foram cultivados em estufa incubadora a 38°C com umidade de 95%

e 5% de CO₂, por 48 horas para avaliar as taxas de re-expansão da blastocela e eclosão da zona pelúcida.

2.6. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O tratamento com astaxantina foi adicionado após a produção dos embriões, ao meio de criopreservação. Foi realizado um comparativo entre o grupo controle negativo (CON; meio comercial de congelação lenta para transferência direta), e grupo Astaxantina (AST; suplementação de 0,25 µM ou 1,5 µM de AST diluída em 10 mL de meio comercial de congelação lenta).

A diluição do antioxidante AST (Sigma SML0982) foi realizada em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1g/L e as alíquotas foram congeladas a -20°C (LI et al, 2015).

A escolha da dose se deu a partir da realização de dois testes dose-resposta (Material suplementar - Dose-resposta 1: 1,25 µM; 1,5 µM; 2,5 µM; Tabela S1 e Dose-resposta 2: 0,125 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; Tabela S2), no qual foram comparadas as concentrações de AST ao meio de criopreservação. Uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos, as doses foram escolhidas com base na diferença numérica entre as taxas de reexpansão e de eclosão pós-descongelação, permanecendo as doses 0,25 µM e 1,5 µM.

Foram congelados um total de 805 embriões BX grau 1 (n=600) e 2 (n=205), obtidos em 10 réplicas; estes foram divididos de maneira homogênea entre as réplicas para congelamento e análises. Estes embriões foram subdivididos para realização das seguintes análises de qualidade: 1) reexpansão

e eclosão; 2) número total de células embrionárias, células apoptóticas e índice apoptótico (TUNEL).

2.7. Análises de qualidade embrionária

Após a descongelação, parte dos embriões ($n = 325$) foram mantidos em cultivo e foram avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão às 24 e 48 horas.

A outra parte dos embriões em D7 foi avaliada quanto à apoptose pelo teste TUNEL ($n = 160$). Para tanto, foi utilizado o protocolo do fabricante. Inicialmente, os embriões foram fixados em paraformaldeído tamponado com DPBS e, após, armazenados por pelo menos 1 hora em geladeira em solução permeabilizadora. Os embriões do grupo controle positivo foram lavados em PBS e colocados em solução DNASE (TRIS HCL, MgCL₂, DNASE, Água MILIQ). Os embriões do grupo controle negativo e as amostras do experimento foram lavadas em PBS e todos (positivo, negativo e amostras) foram mantidos em câmara úmida por 1 hora. Em seguida, os embriões do grupo controle negativo foram expostos à solução marcadora do kit de detecção de morte celular *in situ* (Roche, Penzberg, Alemanha) e os embriões do grupo controle positivo e as amostras foram expostos à solução enzimática e solução marcadora, sendo todos mantidos em câmara úmida por mais 1 hora. Posteriormente, todos os grupos foram lavados em PBS e expostos ao corante HOECHST 33342 em temperatura ambiente e no escuro por 10 minutos para coloração das células embrionárias, análise que foi realizada em conjunto com a reação de TUNEL. Após os 10 minutos todos foram lavados novamente em PBS e foram colocados em lâmina pré-identificadas e em gotas de VECTASHIELD. Em seguida foram

cobertas com lamínula e armazenadas em geladeira para posterior análise em microscópio de fluorescência.

A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência da marca Olympus, com o programa Image-Plus 7.0, com os filtros Current Driver Qemaging (7.0.3.23) e câmera Select Settings com o programa orfa_HE-06DEZ (Faculdade FAMERP, São José do Rio Preto – SP). Os filtros para visualização dos embriões foram 2 DAPI monocromáticos para visualização do corante HOESCHT e contagem do número total de células e filtro FITO RGB para visualização do corante TUNEL e contagem de células apoptóticas. A exposição utilizada para o corante HOESCHT foi de 40 X e para o corante TUNEL 900X. Foi utilizada a objetiva 40 X/ 0.75 do microscópio de fluorescência.

2.8. Análise estatística

Os dados foram analisados com o software SAS v. 9.3 e os dados percentuais foram transformados em arco seno antes da análise para garantir a normalidade dos dados. Todos os dados foram analisados por análise de variância (PROC GLM) e as médias foram testadas por teste T. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 3.432 oócitos de qualidade grau I, II e III, a partir dos quais foram produzidos 1.139 embriões e congelados 805 no estágio de blastocisto expandido (Figura 1A). Após a descongelação, os embriões

apresentaram baixa qualidade com aspecto degenerado, zona pelúcida rompida e grande parte mortos (Figura 1B a 1D).

Durante a elaboração e execução de nosso trabalho realizamos dois dose-resposta para escolha das doses, com base nos parâmetros morfológicos de reexpansão e eclosão dos embriões pós descongelação (Figuras 1E e 1F). A escolha foi realizada pelos dados numéricos, visto que não foram observadas diferenças estatísticas (Tabelas S1 e S2). A escolha das doses surgiu a partir do trabalho de Xiang et al. (2021), que adicionaram astaxantina 2, 5 μ M aos meios de maturação e vitrificação de oócitos suínos e obtiveram efeitos benéficos associados ao uso do antioxidante. Na literatura foram encontrados trabalhos utilizando astaxantina diluída em diferentes meios para oócitos e embriões bovinos e suínos, porém nenhum trabalho foi encontrado utilizando a astaxantina incorporada ao meio de criopreservação na técnica de congelação lenta (DT) de embriões bovinos.

Embora este seja o primeiro trabalho a empregar o antioxidante astaxantina no meio de criopreservação para transferência direta (Direct transfer – DT), não foram observados efeitos benéficos, uma vez que não houve efeito de tratamento para nenhuma das variáveis analisadas de reexpansão e eclosão (Tabela 1) ou apoptose (Tabela 2). Deste modo, os dados médios (agrupados) de taxa de sobrevivência embrionária foram de 40,28% (26,11% de taxa de re-expansão e 14,17% de taxa de eclosão) em 24 horas e de 16,57% (11,11% de taxa de re-expansão e 5,46% de taxa de eclosão) em 48 horas. Estes resultados são inferiores ao reportado na literatura sobre congelação lenta para transferência direta, que variam de 60,0 a 71,3% para taxa de sobrevivência com 24h (GÓMEZ et al., 2020; ARSHAD et al., 2021), 65,6% com 48 horas (GÓMEZ

et al., 2020) e de 57,0% com 72 horas (ARSHAD et al., 2021). É importante mencionar que há poucos trabalhos publicados com DT e avaliação de viabilidade *in vitro* e, portanto, a comparação com os demais trabalhos talvez não seja apropriada, uma vez que aparentemente há diferenças na forma de calcular a sobrevivência. No estudo de Gómez et al. (2020) cita-se que o critério adotado para classificar “live embryos” com 24 e 48h é baseado nas taxas de reexpansão e eclosão nestes momentos, porém foram apresentados apenas os dados de embriões eclodindo e eclodidos. Já no estudo de Arshad et al. (2021) esta taxa foi calculada como o número de embriões eclodidos pelo número de embriões expandidos com 24 ou 72h. O que se observa a campo (Puelker, 2023; Mansano, 2023 – comunicação pessoal) é que há grande variabilidade de resultados com esta técnica, tanto com relação à reexpansão e eclosão após a descongelação, quanto com relação a prenhez e mortalidade embrionária/ fetal.

Outro fator que pode ter contribuído com as baixas taxas de sobrevivência pós criopreservação embrionária pode estar associada com as raças pois, de acordo com a revisão realizada por Hansen (2020), há preocupações na indústria de que os embriões de bovinos *Bos indicus* sejam mais sensíveis à criopreservação do que os embriões de *Bos taurus*, mesmo que a produção e aproveitamento de gametas e embriões *in vitro* seja completamente inverso à afirmativa, sendo *Bos indicus* superior a *Bos taurus*. Isto justifica-se, pois, os embriões *Bos indicus* sofrem maior estresse oxidativo causado pelo processo de criopreservação, promovendo maiores danos celulares e diminuindo a viabilidade embrionária (LÓPEZ-DAMIÁN et al., 2020). Toda a produção *in vitro* do presente experimento foi oriunda de aspiração de ovários de abatedouro, sendo de animais *Bos indicus*, assim como o sêmen utilizado para a fertilização

in vitro. Já nos estudos de Gómez et al., (2020) e Arshad et al., (2021), o material era oriundo de animais taurinos. Portanto, o efeito de grupo genético pode ter contribuído também para a baixa sobrevivência dos embriões pós descongelação, uma vez que zebuínos são mais sensíveis aos processos de criopreservação.

Quanto à contagem total de núcleos, número de núcleos apoptóticos e índice apoptótico (Tabela 2), os valores médios obtidos no presente estudo foram de 77,35; 9,09 e 11,75%, respectivamente. Comparado à literatura, a contagem do número de células embrionárias pós descongelação varia de 96,9 a 118,5 (GÓMEZ et al., 2020; ARSHAD et al., 2021) e o índice apoptótico registrado para a técnica de DT foi de 8,45% (GÓMEZ et al., 2020). Foi possível realizar apenas duas análises de qualidade embrionária devido à baixa qualidade dos embriões pós descongelação. Contrariamente ao esperado, o antioxidante astaxantina não conseguiu fornecer suporte aos embriões durante a congelação e após a descongelação.

A técnica de criopreservação é considerada um teste de qualidade embrionária, visto que somente aqueles que estão em bom estado sobrevivem após a descongelação (EALY et al., 2019). As condições de meios, cultivo, atmosfera, entre outras, durante a produção *in vitro* do embrião pode afetar a capacidade de congelação e a competência para estabelecer uma boa taxa de sobrevivência após a descongelação e prenhez após a transferência (HANSEN, 2020). De acordo com as estatísticas anuais da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) (1997–2017), nos últimos cinco anos, uma média de quase 470.000 embriões bovinos produzidos *in vitro* foram transferidos anualmente em todo o mundo. Do número total de embriões transferidos, cerca

de 80% foram transferidos frescos, ou seja, não criopreservados; isto reflete a menor qualidade dos embriões após este processamento. Isso nos mostra que ainda há gargalos a serem solucionados nas técnicas de criopreservação (FERRÉ et al, 2020).

Embora a congelação lenta tenha taxas controladas e possa ser facilmente adaptada para transferência direta (DT), a formação de cristais de gelo continua sendo um problema (FERRÉ et al, 2020), além do estresse oxidativo, estresse osmótico e toxicidade dos crioprotetores (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Porém a congelação lenta continua sendo estudada e utilizada pois é uma técnica viável, uma vez que os embriões podem ser transferidos diretamente para a receptora após a descongelação (HANSEN, 2020). Acredita-se que, no presente trabalho, houve cristalização de gelo no interior dos embriões, pois após a descongelação grande parte dos embriões apresentaram rompimento de zona pelúcida e fragmentação de massa embrionária.

Outra possibilidade é que os embriões do presente estudo tenham sofrido com estresse oxidativo e peroxidação lipídica durante a congelação lenta e após a descongelação.

Após o processo de congelação e descongelação, os embriões sofrem aumento de espécies reativas de oxigênio. De modo similar, em estudos de congelação de sêmen, observou-se que a partir do momento em que os espermatozoides são colocados no crioprotetor, a concentração de radicais livres aumenta e sua produção se intensifica com a descongelação. Sabe-se que o processo de hipotermia-hipóxia, vivenciado na congelação, reduz os níveis de ATP acompanhado pelo desacoplamento do sistema interno da membrana mitocondrial, causando aumento nos níveis de oxigênio. Na descongelação há

reoxigenação e aumento abrupto de oxigênio, de modo que sua alta reatividade com as moléculas desencadeia a posterior formação de radicais livres. Sabe-se que os níveis elevados de ROS tem relação direta com a concentração de oxigênio consumido. Os radicais livres são moléculas usadas na sinalização celular e aumentam consideravelmente durante o processo de desenvolvimento embrionário, com isso há diminuição na atividade antioxidante pós-descongelação o que leva ao estado de estresse oxidativo, onde lipídios, proteínas e ácidos nucleicos são afetados causando danos por peroxidação lipídica e apoptose. Os resultados obtidos de índice apoptótico mostram uma média de 10,71% de núcleos positivos para TUNEL em embriões congelados, sugerindo que o processo de congelação aumenta as taxas de morte celular. Além disso, as diferenças no número de núcleos apoptóticos podem estar relacionadas aos níveis de radicais livres (LÓPEZ-DAMIÁN et al., 2020). Apesar desta hipótese, a mesma não foi testada no presente estudo.

A adição do antioxidante astaxantina foi realizada nos trabalhos dos pesquisadores Xiang et al. (2021), Ispada et al (2018), Abdel-Ghanl et al. (2019) e Kuroki et al. (2013). Todos estes autores encontraram efeito benéfico do antioxidante astaxantina em seus trabalhos, utilizando-a em diferentes meios e concentrações, sendo eles, maturação, cultivo e vitrificação, de oócitos e embriões. Porém no presente trabalho não pudemos observar efeitos benéficos do antioxidante, uma vez que a astaxantina foi utilizada no meio de criopreservação de embriões bovinos e, após a descongelação e processo de reidratação, observou-se embriões de baixa qualidade, não apresentando efeitos de melhora com o uso do antioxidante. Portanto a astaxantina não conseguiu reverter e / ou minimizar os efeitos deletérios inerentes ao processo de

criopreservação, possivelmente por não reduzir o estresse oxidativo sofrido pelos embriões, uma vez que não houve diferença entre os grupos tratamento e controle.

Outras hipóteses relacionadas à baixa taxa de sobrevivência embrionária pós descongelação, são de que o tempo de exposição ao antioxidante astaxantina pode ter sido insuficiente, pois os embriões ficaram expostos ao antioxidante apenas por um período de 10 minutos antes de dar início à queda de temperatura. Este tempo de exposição pode ter sido insuficiente, não permitindo ao antioxidante exercer alguma atividade protetora, necessitando de um período maior de exposição para exercer alguma eficácia. Porém, ao se comparar com o tempo de exposição empregado com o uso de antioxidantes em sêmen, este não parece ser um entrave, ainda que se tratem de materiais biológicos distintos. A utilização de antioxidantes incorporados ao meio de congelação durante a etapa de criopreservação de sêmen é muito comum, visto que, são altamente sensíveis a baixas temperaturas e ao estresse térmico ocasionado durante a criopreservação. Os antioxidantes estão relacionados com a melhora da criotolerância dos espermatozoides e também podem neutralizar o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (PAPAS et al., 2019).

Talvez a adição de astaxantina não seja proveitosa na etapa de criopreservação de embriões bovinos, talvez sendo mais eficiente em outras etapas da produção *in vitro*, a fim de produzir embriões de qualidade superior para suportar o processo de congelação.

Por fim, outra hipótese seria a que não foi encontrada a dose adequada para fornecer uma ação antioxidante e crioprotetora aos embriões. Portanto, sugere-se que sejam realizados mais estudos para avaliar os efeitos do

antioxidante astaxantina nas células embrionárias e a sua capacidade de proteger os embriões dos efeitos adversos da criopreservação. Neste trabalho, contrariamente ao esperado, a suplementação na etapa de congelação nas doses utilizadas não foi eficiente e, portanto, não se mostrou viável para uso.

4. CONCLUSÕES

A adição do antioxidante astaxantina nas doses de 0,25 ou 1,5 μM ao meio de criopreservação de embriões não aumentou a viabilidade dos embriões pós congelação e não reduziu a apoptose, mantendo-se similar ao grupo controle.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório Multiusuário (LMU) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Brasil e à FertVitro - Laboratório de Fertilização *In Vitro*, pela concessão na utilização do laboratório. À Botuphrama pela concessão de meios para a produção *in vitro* e de criopreservação de embriões. Ao Frigorífico Boi Baio pelo fornecimento dos ovários. À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (FCAV-Unesp). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Reprodução Animal (CAPES, Código Financeiro 001) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo no. 2021/13932-5) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANI, M. A. et al. Astaxanthin improves the developmental competence of in vitro-grown oocytes and modifies the steroidogenesis of

granulosa cells derived from bovine early antral follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 2, p. 272-281, 2019.

ARSHAD, U., SAGHEER, M., GONZALEZ-SILVESTRY, F. B., HASSAN, M., SOSA, F. Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. **Cryobiology**, v. 101, p. 1-11, 2021.

DINNYES, A., MENG, Q., POLGAR, Z., BOONKUSO, D., SOMFAI, T. Cryopreservation of mammalian embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 171-190, 2006.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; MCCOSKI, S. R. BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. **Journal of animal science**, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019.

FERRÉ, L. B. et al. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 6, p. 659-676, 2020.

GÓMEZ, E., CARROCERA, S., MARTÍN, D., PÉREZ-JÁNEZ, J. J., PRENDES, J., PRENDES, J. M., MUÑOZ, M. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 146, p. 39-47, 2020.

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2014.

HANSEN, P. J. Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. **Annual review of animal biosciences**, v. 8, p. 395-413, 2020.

HANSEN, P. J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it?. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 11, p. skaa288, 2020.

ISPADA, Jéssica et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 9, p. 1169-1179, 2018.

KUROKI, T. et al. Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development In Vitro:—astaxanthin colocalization with and action on mitochondria—. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 5, p. 623-631, 2013.

LI, R., WU, H., ZHUO, W. W., MAO, Q. F., LAN, H., ZHANG, Y., HUA, S. Astaxanthin normalizes epigenetic modifications of bovine somatic cell cloned embryos and decreases the generation of lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 793-799, 2015.

LÓPEZ-DAMIÁN, E. P., JIMÉNEZ-MEDINA, J. A., ALARCÓN, M. A., LAMMOGLIA, M. A., HERNÁNDEZ, A., GALINA, C. S., FIORDELISIO, T.

Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. **Theriogenology**, v. 143, p. 74-81, 2020.

MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D. Cryopreservation of cows oocytes and embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 191-196, 2006.

PAPAS, M., CATALÁN, J., FERNANDEZ-FUERTE, B., ARROYO, L., BASSOLS, A., MIRÓ, J., YESTE, M. Specific activity of superoxide dismutase in stallion seminal plasma is related to sperm cryotolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, p. 539, 2019.

PRADO, F. R. A. **Efeitos da congelação lenta e vitrificação sobre a qualidade e viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) em Medicina Veterinária (Área: Reprodução Animal) – FCAV/Unesp, 2011.

SARAGUSTY, J., ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1, 2011.

STRINGFELLOW, D. A., SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: Um Guia de Procedimentos e Informações Gerais Para uso em Tecnologia de Transferência de Embriões Enfatizando Procedimentos Sanitários**. Savoy: Illinois, 1998.

SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., MAZIERO, R. R. D., RASCADO, T. S., GUASTALI, M. D., CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., MONTEIRO, B. A., MARTINS JR, A., MACHADO, R., LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, p. 160-167, 2013.

VALENTE, R. S. Efeito da modulação da Acil-CoA Sintetase de cadeia longa no desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2019. 31f. Dissertação (Mestrado) Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – UNIPAMPA, 2019.

XIANG, D. C., JIA, B. Y., FU, X. W., GUO, J. X., HONG, Q. H., QUAN, G. B., & WU, G. Q.. Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the *in vitro* maturation and vitrification of porcine oocytes. **Theriogenology**, 2021.

7. FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Taxas de reexpansão e eclosão de embriões congelados pelo método DT e cultivados por 24 e 48 h, conforme o tratamento (CON: controle negativo; 0,25 μ M de astaxantina (AST) ou 1,5 μ M AST) adicionado ao meio de criopreservação.

TRATAMENTO/ VARIÁVEIS	CON (n = 75)	0,25 μ M AST (n = 78)	1,5 μ M AST (n = 74)	VALOR P
TX expansão com 24 h	25,83 $\pm$ 7,95	25,93 $\pm$ 6,17	26,58 $\pm$ 8,39	0,91
TX eclosão com 24 h	14,18 $\pm$ 5,15	13,68 $\pm$ 7,28	14,61 $\pm$ 6,65	0,94
TX sobrevivência com 24 h	40,02 $\pm$ 10,12	39,61 $\pm$ 10,49	41,20 $\pm$ 11,01	0,38
TX expansão com 48 h	11,36 $\pm$ 5,07	12,49 $\pm$ 4,46	9,44 $\pm$ 4,17	0,83
TX eclosão com 48 h	4,73 $\pm$ 3,19	7,69 $\pm$ 4,89	3,96 $\pm$ 2,18	0,62
TX sobrevivência com 48 h	16,09 $\pm$ 7,07	20,18 $\pm$ 8,18	13,40 $\pm$ 5,71	0,80

Tabela 2. Índices da análise de coloração Hoechst e Túnel

Média da contagem total de núcleos embrionários, núcleos apoptóticos e índice apoptótico de embriões congelados pelo método DT, conforme o tratamento (CON: controle negativo; 0,25 μ M de astaxantina (AST) ou 1,5 μ M AST) adicionado ao meio de criopreservação.

TRATAMENTO/ VARIÁVEIS	CON (n = 33)	0,25 μ M AST (n = 36)	1,5 μ M AST (n = 36)	VALOR P
Total núcleos	76,50 $\pm$ 9,77	77,89 $\pm$ 6,65	77,67 $\pm$ 4,10	0,10
Núcleos apoptóticos	5,81 $\pm$ 1,47	13,37 $\pm$ 3,10	8,10 $\pm$ 2,80	0,20
Índice apoptótico	7,88 $\pm$ 2,35	19,17 $\pm$ 5,64	14,16 $\pm$ 5,96	0,29

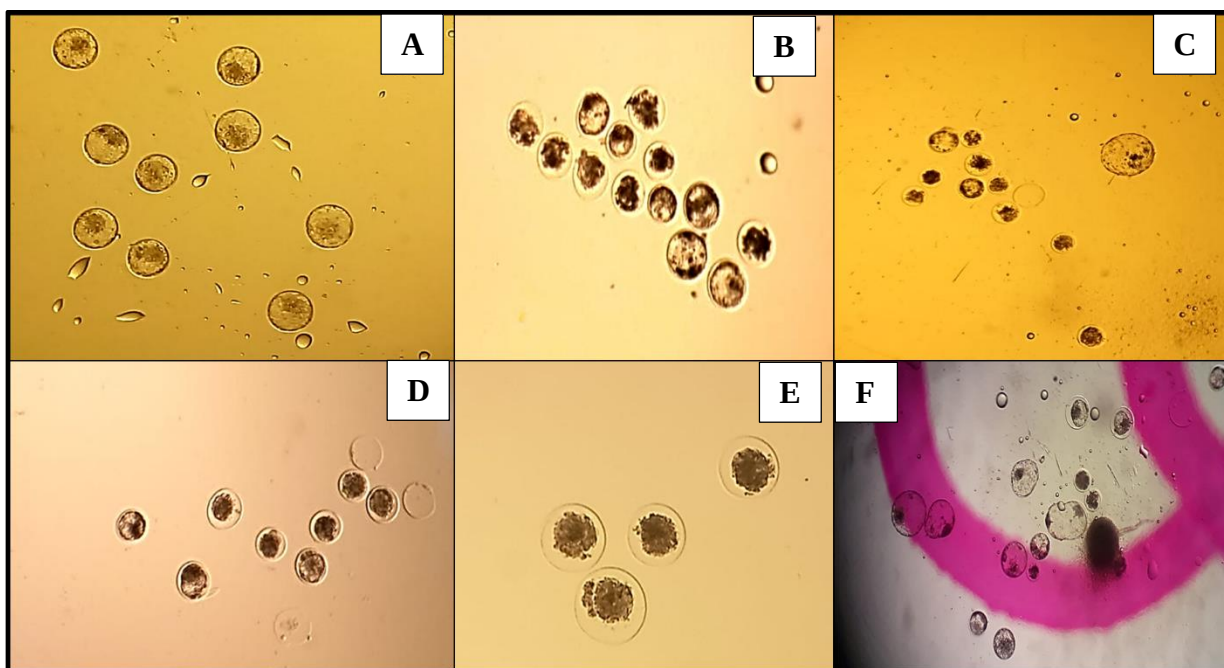


Figura 1. Fotomicrografias de embriões produzidos *in vitro*, criopreservados pela técnica de congelamento lento para transferência direta e submetidos à reexpansão e eclosão após descongelamento. **A.** Embriões grau I selecionados para a criopreservação, **B.** Embriões degenerados após descongelamento (grupo controle), **C.** Embriões degenerados após descongelamento (grupo 0,25 μ M AST), **D.** Embriões degenerados após descongelamento (grupo 1,5 μ M AST), **E.** Embriões reexpandidos/ em eclosão após descongelamento (grupo controle, dose-resposta 1), **F.** Embriões eclodidos após descongelamento (grupo controle, dose-resposta 2)

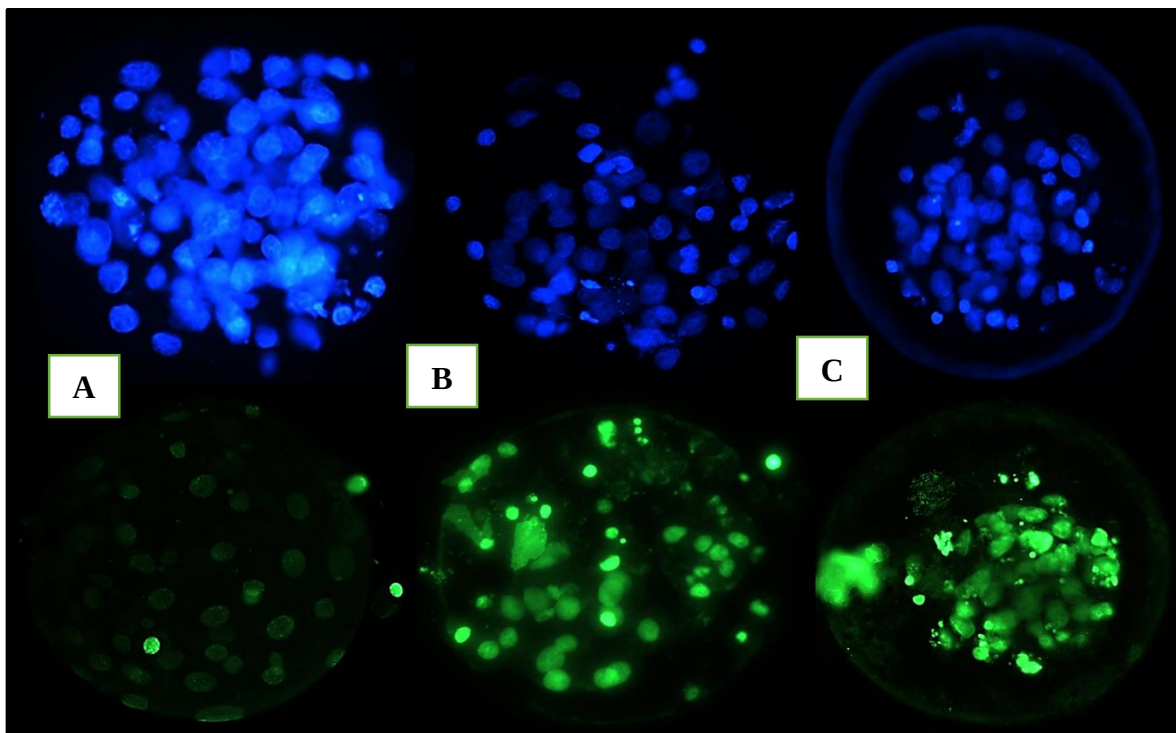


Figura 2. Fotomicrografias de embriões produzidos *in vitro* após tratamento com AST, para contagem de núcleos totais (azul, coloração Hoescht) e apoptóticos (verde, reação TUNEL). **A.** Grupo controle, **B.** grupo 0,25 μM , **C.** grupo 1,5 μM .

8. DECLARAÇÃO DE INTERESSE CONCORRENTE

Os autores declaram não haver conflito de interesses. As agências de fomento não tiveram nenhum papel no desenho do estudo; na colheita, análise ou interpretação de dados; na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

9. CUIDADOS NO USO DE ANIMAIS

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram avaliados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP/Jaboticabal (processo nº 1398/21), que aprovou e certificou sua conformidade com as

normas expedidas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

10. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Taxas de reexpansão e eclosão de embriões congelados pelo método DT e cultivados por 24 e 48 h, conforme o tratamento (CON: controle negativo; 0,5 μ M de astaxantina (AST), 1,5 μ M AST e 2,5 μ M AST) adicionado ao meio de criopreservação (Dose-resposta 1).

TRATAMENTO/ VARIÁVEIS	CON (n = 40)	0,5 μ M AST (n = 35)	1,5 μ M AST (n = 39)	2,5 μ M AST (n = 35)	VALOR de P
TX expansão com 24 h	35,42 $\pm$ 6,78	47,37 $\pm$ 12,55	52,62 $\pm$ 12,88	24,77 $\pm$ 9,20	0,28
TX eclosão com 24 h	14,58 $\pm$ 5,02	12,22 $\pm$ 7,77	3,33 $\pm$ 3,33	18,75 $\pm$ 10,96	0,52
TX sobrevivência com 24 h	50 $\pm$ 11,64	59,58 $\pm$ 8,77	55,95 $\pm$ 13,67	43,52 $\pm$ 7,79	0,73
TX expansão com 48 h	29,87 $\pm$ 5,53	16,95 $\pm$ 6,27	34,83 $\pm$ 13,34	14,47 $\pm$ 6	0,28
TX eclosão com 48 h	16,67 $\pm$ 10,54	32,22 $\pm$ 7,92	8,18 $\pm$ 6,53	31,95 $\pm$ 17,27	0,37
TX sobrevivência com 48 H	46,53 $\pm$ 10,45	49,17 $\pm$ 5,23	43,01 $\pm$ 13,08	46,42 $\pm$ 14,56	0,99

Tabela S2. Taxas de reexpansão e eclosão de embriões congelados pelo método DT e cultivados por 24 e 48 h, conforme o tratamento (CON: controle negativo; 0,125 μ M de astaxantina (AST), 0,25 μ M AST e 0,5 μ M AST) adicionado ao meio de criopreservação (Dose-resposta 2).

TRATAMENTO/ VARIÁVEIS	CON (n = 35)	0,125 μ M AST (n = 34)	0,25 μ M AST (n = 35)	0,5 μ M AST (n = 30)	VALOR de P
TX expansão com 24 h	46,22 $\pm$ 12,53	29,26 $\pm$ 7,80	28,40 $\pm$ 9,36	47,00 $\pm$ 8,93	0,52
TX eclosão com 24 h	16,50 $\pm$ 9,21	20,38 $\pm$ 8,52	40,36 $\pm$ 8,77	21,30 $\pm$ 7,47	0,26
TX sobrevivência com 24 h	62,72 $\pm$ 7,93	46,64 $\pm$ 5,29	68,76 $\pm$ 4,23	68,28 $\pm$ 9,18	0,30

TX expansão com 48 h	33,10 ± 10,54	21,46 ± 7,65	17,50 ± 4,79	16,95 ± 6,27	0,43
TX eclosão com 48 h	26,68 ± 6,66	26,67 ± 8,50	56,66 ± 8,50	36,44 ± 7,18	0,19
TX sobrevivência com 48 H	60,50 ± 9,39	49,14 ± 11,90	69,40 ± 4,45	67,42 ± 9,83	0,47