

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/11/2027

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ANTIOXIDANTE
ASTAXANTINA ADICIONADO NO MEIO DE VITRIFICAÇÃO
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* DE BOVINO.**

**Nelise Kasue Samecima Prosperute
Médica Veterinária**

Jaboticabal/SP

2025



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA
ADICIONADO NO MEIO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN*
VITRO DE BOVINO.**

**Discente: Nelise Kasue Samecima
Prosperute
Orientadora: profa. Dra. Lindsay
Unno Gimenes.**

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

P966a

Prosperute, Nelise Kasue Samecima

Avaliação do efeito protetor do antioxidante astaxantina adicionado no meio de vitrificação de embriões produzidos in vitro de bovino. /

Nelise Kasue Samecima Prosperute. -- Jaboticabal, 2026

72 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Criopreservação. 2. miRNA. 3. Carotenoides. 4. Estresse oxidativo. 5. Espectroscopia Raman. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Os resultados deste estudo têm potencial para impactar significativamente o campo da criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* e as biotecnologias da reprodução animal. Ao investigar a ação da astaxantina durante a vitrificação e demonstrar sua influência sobre vias moleculares relacionadas ao estresse oxidativo e apoptose, a pesquisa contribui para a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na sobrevivência embrionária pós-aquecimento. Esses achados podem orientar o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e biologicamente fundamentados, ampliando a viabilidade e a qualidade dos embriões criopreservados. Em nível produtivo e comercial, tais melhorias podem favorecer programas de transferência de embriões, aumentar o aproveitamento de embriões produzidos *in vitro* e otimizar estratégias de melhoramento genético. Além disso, o estudo abre novas perspectivas para o uso de antioxidantes não convencionais na criopreservação, estimulando investigações futuras e a inovação em tecnologias reprodutivas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The findings of this study have the potential to significantly impact the field of cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos and animal reproductive biotechnologies. By investigating the action of astaxanthin during vitrification and demonstrating its influence on molecular pathways related to oxidative stress and apoptosis, this research contributes to a deeper understanding of the cellular mechanisms involved in post-warming embryo survival. These insights may guide the development of more efficient and biologically grounded protocols, enhancing the viability and quality of cryopreserved embryos. At the productive and commercial levels, such improvements may benefit embryo transfer programs, increase the utilization of *in vitro*-produced embryos, and optimize genetic improvement strategies. Furthermore, this study opens new perspectives for the use of non-conventional antioxidants in cryopreservation, stimulating future research and innovation in reproductive technologies.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA ADICIONADO NO MEIO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO DE BOVINO


AUTORA: NELISE KASUE SAMECIMA PROSPERUTE

ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

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

 Documento assinado digitalmente
LINDSAY UNNO GIMENES
Data: 04/11/2025 19:12:03 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

 Documento assinado digitalmente
FABIOLA FREITAS DE PAULA LOPES
Data: 04/11/2025 19:34:39 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

 Documento assinado digitalmente
MAIRA BIANCHI RODRIGUES ALVES
Data: 04/11/2025 22:29:58 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Jaboticabal, 04 de novembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NELISE KASUE SAMECIMA PROSPERUTE – nascida na cidade de Ribeirão Preto – São Paulo, no dia 11 de maio de 1994. Completou o ensino médio junto com o curso técnico profissionalizante em Nutrição e Dietética pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial – SENAC, concluído em 2012. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária com bolsa de estudos concedida pelo Programa Universidade para Todos – PROUNI, pela Faculdade Doutor Francisco Maeda – FAFRAM, em janeiro de 2018, sendo concluído em dezembro de 2022. Em março de 2023, deu início ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Veterinárias com ênfase nas biotecnologias aplicadas à produção *in vitro* de embriões bovinos no Laboratório de Biotecnologias da Reprodução – LABOR, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal/SP, sob orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, com recebimento de bolsa CAPES. Atualmente, exerce o cargo de Embriologista Responsável na Empresa Fertiliza Consultoria em Reprodução Animal, sediada no município de Cuiabá/MT.

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”

(Horácio)

Entretanto, “O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo.”

(Aristóteles)

Dedico este trabalho à todos que acreditaram em mim, amigos e colegas que contribuíram com cada pedacinho desse projeto, seja de forma direta ou indireta, principalmente, ao meu marido Antônio, meus pais, meu irmão e todos meus amados afilhados!

Amo Vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por me guiarem e sustentarem em cada desafio dessa trajetória.

Ao meu marido, Antônio, que esteve ao meu lado desde o início da graduação, apoiando, motivando e acreditando em mim todos os dias. Essa conquista é nossa.

À minha família, especialmente aos meus pais, Silvana e Élcio, pelo amor, apoio e presença mesmo à distância. Ao meu irmão Élcio Jr. e à minha cunhada Maria Fernanda, por serem exemplos de resiliência, esforço e dedicação.

Às minhas crianças — Lucas, Miguel, Eleanor, Letícia, Sophia, Maitê, Matheus, Felipe (*in memorian*) e Alice —, que me inspiram diariamente a ser uma pessoa e profissional melhor.

Aos meus avós de coração, Dona Edir e Sr. Dito (*in memorian*), que me acompanharam de perto. Vôzinho, o senhor que me contava as notícias do Globo Rural e perguntava quando os bezerrinhos do laboratório nasceriam — pois é, eles começaram a nascer. Sei que, de onde estiver, o senhor acompanha cada um deles com orgulho.

À minha sogra Elaine, e aos meus cunhados Adam, Adriele, Mary Helen e Mary Li, pelo carinho e incentivo constantes.

Aos meus amigos e compadres Jaqueline e Rodrigo, por serem uma família que a vida me presenteou.

Aos meus grandes amigos de bancada, Thalís e Victória, que tornaram essa caminhada muito mais leve. Obrigada por compartilharem comigo a rotina do laboratório, os cafés com bolo de chocolate do Thalís, os perrengues vencidos e as conversas que recarregavam as energias. Vick, por ser meu apoio emocional quando achei que não conseguiria; você acreditou em mim, me motivou e caminhou comigo até o fim. Conseguimos! Levarei essa amizade para a vida toda.

À Roberta e ao Sr. Edson, por toda a paciência, pelas conversas, pelos ensinamentos e pelo apoio no laboratório. Rô, obrigada por me ensinar desde o início e por toda dedicação. Sr. Edson, pelos cafés e pelas histórias que sempre tornavam o dia mais leve — meu sincero agradecimento a vocês.

À empresa Fertiliza e à equipe, especialmente Claudiney e Priscila, pela paciência e compreensão durante esse período de finalização, e por contribuírem todos os dias com meu crescimento técnico e profissional.

À minha orientadora, Dra. Lindsay Unno Gimenes, pela paciência, sabedoria e por estar presente até nos momentos mais difíceis, por me trazer calma e me ajudar a administrar todo meu caos interno. Obrigada pelo carinho Prôf!

Aos laboratórios parceiros — NUPECCE, Caunesp, LMMD e LEME — pelo suporte técnico e infraestrutura.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Tiago Henrique Câmara De Bem e Dra. Alessandra Bridi, pelas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho. Às professoras Dra. Maíra Bianchi Rodrigues Alves e Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes, por aceitarem participar da banca de defesa.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (LABOR), que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste estudo. Aos frigoríficos Franca Boi, Boi Baio, Olhos d'Água e Pantanal, pelo fornecimento dos ovários utilizados no experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa (Processo nº 2021/13932-5), e à CAPES, pelo apoio institucional (Código de Financiamento 001).

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO –	ix
ABSTRACT –	x
<i>CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais</i>	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. Hipótese	3
3. Objetivos.....	3
3.1. Geral:.....	3
3.2. Específicos:	3
4. REFERENCIAL TEORICO	4
4.1. Produção <i>in vitro</i> de Embriões (PIVE).....	4
4.2. Criopreservação.....	5
4.3. Estresse Oxidativo e Defesa Antioxidante	7
4.4. Astaxantina	9
REFERÊNCIAS.....	12
<i>CAPÍTULO II – Artigo Científico</i> ¹	18
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAIS E METODOS.....	21
2.1. Produção dos Embriões <i>In Vitro</i> (PIVE).....	21
2.1.1. Obtenção e seleção dos oócitos.....	22
2.1.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	22

2.1.3.	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	22
2.1.4.	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	23
2.2.	Vitrificação e Aquecimento dos Embriões	23
2.2.1.	Diluição das diferentes concentrações de astaxantina no meio de vitrificação.	23
2.2.2.	Vitrificação	24
2.2.3.	Aquecimento.....	25
2.3.	Delineamento Experimental	25
2.4.	Análises Experimentais	26
2.4.1.	Análise de sobrevivência pós-aquecimento.....	26
2.4.2.	Avaliação da produção total de espécies reativas ao oxigênio (ERO) .	27
2.4.3.	Avaliação de apoptose (TUNEL).....	28
2.4.4.	Expressão dos miRNAs.....	30
2.4.5.	Análise bioquímica por espectroscopia Raman.....	32
2.5.	Análise Estatística	33
3.	RESULTADOS.....	34
3.1.	Produção <i>in vitro</i> dos embriões	34
3.2.	Análise de sobrevivência pós-aquecimento.	35
3.3.	Avaliação da produção total de espécies reativas ao oxigênio (ERO)	37
3.4.	Avaliação de apoptose	37
3.5.	Expressão de microRNAs.....	39
3.6.	Análise bioquímica por espectroscopia Raman	39
4.	DISCUSSÃO	41
5.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	MATERIAL SUPLEMENTAR	50

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito protetor do antioxidante astaxantina adicionado em meio de vitrificação de embrião bovino", protocolo nº 2278/2024, sob a responsabilidade da Profª. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de maio de 2024.

Vigência do Projeto	16/05/2024 a 20/12/2025
Espécie / Linhagem	Bovinos
Nº de animais	50 – 100 animais (ovários dos bovinos de abatedouro)
Peso / Idade	500 kg / ~2 a 3 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Frigoríficos no entorno de Jaboticabal

Jaboticabal, 15 de maio de 2024

Helena C D Brito

Dra. Helena Cristina Delgado Brito
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTX	Astaxantina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
BX	Blastocisto expandido
CAT	Catalase
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONT	Controle
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Limite de ciclo)
D1	Meio de desvitrificação etapa 1
D2	Meio de desvitrificação etapa 2
D3	Meio de desvitrificação etapa 3
D4	4º dia de cultivo <i>in vitro</i>
D7	7º dia de cultivo <i>in vitro</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EO	Estresse oxidativo
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas ao oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i> (Glutathiona peroxidase)
hCG	<i>(Human Chorionic Gonadotropin</i> (Hormônio coriônico humano)
IA	Índice apoptótico
LABOR	Laboratório de Biotecnologias da Reprodução
LAV	Meio de Lavagem
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise discriminante linear)
LOOCV	<i>Leave-one-out cross validation</i>

LPO	Peroxidação lipídica
MGVa	<i>Mean gray value área</i>
MGVb	<i>Mean gray value backgourd</i>
miRNA	MicroRNA
MIV	Meio de maturação <i>in vitro</i>
NaCl	Cloreto de sódio
nM	Nanomolar
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução tampão fosfato salina)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PFA	Paraformaldeído
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
pM	Picomolar
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT – qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
SE	Solução estoque
SFB	Soro fetal bovino
SI	Solução intermediária
SOD	Superoxido dismutase
SOF	<i>Synthetic Oviduct Fluid</i> (Fluido sintético de oviduto)
TCM199	<i>Tissue Culture Medium 199</i> (Meio de cultura 199)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dutp Nick End Labeling</i>
UAF	Unidades arbitrárias de fluorescência
V1	Meio de vitrificação etapa 1
V2	Meio de vitrificação etapa 2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos ao longo das 23 rotinas experimentais.....	35
Tabela 2 - Número total de células, células apoptóticas em embriões bovinos vitrificados tratados com diferentes concentrações de astaxantina.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do preparo das diluições seriadas de astaxantina para obtenção dos tratamentos experimentais 0,5pM Astx, 0,5nM Astx e 1nM Astx.	24
Figura 2 - Taxa de sobrevivência (%) de embriões bovinos após vitrificação com diferentes concentrações de astaxantina.	35
Figura 3 - Efeito do tempo de recultivo sobre a sobrevivência (%) de embriões bovinos vitrificados.....	36
Figura 4 - Fluorescência relativa de EROs em embriões bovinos vitrificados com diferentes concentrações de astaxantina.	37
Figura 5 - Avaliação do índice apoptótico (%) em embriões bovinos vitrificados tratados com diferentes concentrações de astaxantina.	38
Figura 6 - Expressão relativa do miRNA bta-miR-301b em embriões bovinos vitrificados com astaxantina.	39
Figura 7 - Análise Discriminante Linear (LDA) das amostras dos espectros completos (400–3500 cm ⁻¹) de RAMAN, pré – processados, com sobreposição evidente entre classes.....	40
Figura 8 - Matriz de confusão da Análise Discriminante Linear (LDA) das amostras dos espectros completos (400–3500 cm ⁻¹) de RAMAN, pré – processados, com 11% de erro no <i>Leave-One-Out Cross Validation</i> (LOOCV).	40

MATERIAL SUPLEMENTAR

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

.....50

AValiação DO EFEITO PROTETOR DO ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA ADICIONADO NO MEIO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO DE BOVINO.

RESUMO –

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, especialmente pela vitrificação, é uma ferramenta amplamente empregada na reprodução animal, porém ainda limitada pelos danos celulares decorrentes do estresse oxidativo induzido durante as etapas de exposição às soluções crioprotetoras e do reaquecimento. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) compromete a estabilidade das membranas, aumenta a apoptose e reduz a viabilidade pós-aquecimento. Nesse contexto, antioxidantes têm sido investigados como estratégia para mitigar tais efeitos na vitrificação. A astaxantina (ASTX), carotenoide de elevado potencial antioxidante e reconhecida capacidade de estabilização lipídica, apresenta-se como molécula promissora, embora ainda não explorada em protocolos de vitrificação de embriões bovinos. Diante disso, formulou-se a hipótese de que a adição de ASTX ao meio de vitrificação — aplicada exclusivamente durante o curto período de exposição embrionária às soluções crioprotetoras, de aproximadamente 9 minutos — pode reduzir o acúmulo de EROs e a apoptose, resultando em maior sobrevivência e melhor qualidade pós-aquecimento. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes concentrações de ASTX adicionadas ao meio de vitrificação sobre variáveis morfológicas, celulares e moleculares, incluindo taxa de reexpansão, avaliação indireta de EROs, índice apoptótico, expressão de microRNAs e perfil bioquímico por espectroscopia Raman. Os resultados mostraram que houve aumento da expressão relativa de um microRNA (bta-miR-301b) que revelou influência da ASTX sobre vias associadas ao aumento da apoptose, enquanto o perfil bioquímico por espectroscopia Raman demonstrou separação evidente entre os tratamentos. Esses achados contribuem para a compreensão dos efeitos da ASTX na vitrificação e auxiliam no aprimoramento dos protocolos de criopreservação aplicados às biotecnologias da reprodução animal.

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

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE ANTIOXIDANT ASTAXANTHIN ADDED TO THE VITRIFICATION MEDIUM OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO.

ABSTRACT –

The cryopreservation of in vitro–produced bovine embryos, especially by vitrification, is a widely employed tool in animal reproduction; however, it is still limited by cellular damage resulting from oxidative stress induced during exposure to cryoprotective solutions and the warming process. The accumulation of reactive oxygen species (ROS) compromises membrane stability increases apoptosis, and reduces post-warming viability. In this context, antioxidants have been investigated as a strategy to mitigate these effects during vitrification. Astaxanthin (ASTX), a carotenoid with high antioxidant potential and a recognized capacity for lipid stabilization, emerges as a promising molecule, although it has not yet been explored in vitrification protocols for bovine embryos. Therefore, the hypothesis was formulated that the addition of ASTX to the vitrification medium—applied exclusively during the short period of embryonic exposure to cryoprotective solutions, approximately 9 minutes—could reduce ROS accumulation and apoptosis, resulting in higher survival and improved post-warming quality. The objective of this study was to evaluate different concentrations of ASTX added to the vitrification medium on morphological, cellular, and molecular variables, including re-expansion rate, indirect assessment of ROS, apoptotic index, microRNA expression, and biochemical profiling by Raman spectroscopy. The results showed an increase in the relative expression of one microRNA (bta-miR-301b), indicating an influence of ASTX on pathways associated with increased apoptosis, while the biochemical profile obtained by Raman spectroscopy demonstrated clear separation among treatments. These findings contribute to the understanding of the effects of ASTX on vitrification and assist in improving cryopreservation protocols applied to animal reproduction biotechnologies.

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

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos impõe à pecuária o desafio de aumentar a produtividade de forma sustentável, com menor impacto ambiental e maior eficiência reprodutiva (BARUSELLI, 2023). Nesse contexto, as biotecnologias aplicadas à reprodução animal, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm se destacado por permitir o aprimoramento genético e a multiplicação rápida de indivíduos superiores (GONÇALVES; VIANA, 2019). Apesar dos avanços alcançados, a técnica ainda apresenta etapas críticas que necessitam de otimização, especialmente quanto à manutenção da qualidade embrionária durante os processos de cultivo e criopreservação.

Durante as etapas da PIVE, as condições de cultivo, sobretudo as condições atmosféricas (alta concentração de oxigênio), favorecem o desenvolvimento do estresse oxidativo (EO), caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do sistema em neutralizá-las (LEIVAS, 2006). As EROs incluem radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$), e espécies não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que embora mais estável, pode originar novos subseqüentes (AGARWAL et al., 2006; ROCHA, 2012; LEITE, 2017). Em níveis fisiológicos, essas moléculas participam de processos normais de sinalização e metabolismo celular. No entanto, o excesso de EROs, pode provocar danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a qualidade e o potencial de desenvolvimento embrionário (DALVIT et al., 2005). Fatores como hiperosmolaridade, manipulação mecânica, alta tensão de oxigênio e estresse mitocondrial, intensificam a produção de EROs — condições que se agravam durante a criopreservação, quando danos osmóticos, mecânicos e a toxicidade dos crioprotetores promovem disfunção mitocondrial e aumentam o estresse oxidativo (GUALTIERI et al., 2021).

A criopreservação de embriões consiste em manter a viabilidade celular por meio do armazenamento em baixas temperaturas, possibilitando maior flexibilidade logística na transferência, transporte e comercialização de material genético

(GONÇALVES; FIGUEIREDO; GASPERIN, 2021). De forma geral, a vitrificação é considerada o padrão-ouro para a criopreservação de oócitos e embriões de mamíferos, pois minimiza a formação de cristais de gelo e apresenta taxas de sobrevivência superiores ao congelamento lento (VAJTA; KUWAYAMA, 2006). No entanto, esse processo também impõe desafios significativos, incluindo estresse osmótico, alterações metabólicas e aumento da produção de EROs, fatores que podem comprometer a qualidade e o potencial de desenvolvimento embrionário pós-descongelamento (CASTILLO-MARTÍN et al., 2015; LEITE, 2017; GAVIRIA et al., 2019; FEUCHARD et al., 2025).

Os antioxidantes exercem papel essencial na neutralização das EROs e na manutenção do equilíbrio redox celular (AGARWAL et al., 2014). Essa proteção é garantida por um sistema antioxidante formado por enzimas — como SOD, CAT e GPx — e moléculas não enzimáticas, como vitaminas A, C e E, glutatona, β -caroteno, selênio e zinco (AMBATI et al., 2014; ROCHA-FRIGONI et al., 2016; AGARWAL et al., 2014; ANJOS et al., 2025). Assim, diversos compostos com ação antioxidante têm sido testados em diferentes etapas da PIVE como, por exemplo, nos meios de maturação, cultivo e criopreservação, entre os quais se destacam a melatonina, a vitamina C (ROCHA-FRIGONI et al., 2016), o ácido alfa-lipoico (ANJOS et al., 2025), o resveratrol (GAVIRIA et al., 2019) e o mercaptoetanol (FEUCHARD et al., 2025). Esses compostos demonstraram potencial para reduzir o acúmulo de EROs e melhorar a viabilidade embrionária, reforçando a importância da suplementação antioxidante como estratégia de apoio às biotecnologias da reprodução.

Nesse contexto, a astaxantina (ASTX) destaca-se como um antioxidante promissor, sendo considerado um antioxidante 10 vezes mais potente do que outro antioxidante como, por exemplo, a vitamina C. É um carotenoide lipossolúvel presente em diferentes organismos marinhos, principalmente na alga *Haematococcus pluvialis*. Além de seu amplo uso em alimentos, nutracêuticos e fármacos, esse composto tem despertado crescente interesse na reprodução por sua elevada capacidade de neutralizar radicais livres e proteger estruturas celulares contra o estresse oxidativo (HUSSEIN et al., 2005; AMBATI et al., 2014; LI et al., 2020).

Evidências experimentais demonstram os efeitos benéficos da ASTX em diferentes etapas da PIVE. Namekawa et al. (2010) observaram que a adição de 0,25

ppm de ASTX ao meio de cultivo reduziu os danos causados pelo estresse térmico (40,5 °C) em embriões bovinos, diminuindo a expressão dos genes SHC1 e SOD2. De forma semelhante, Li et al. (2015) verificaram que a suplementação com 0,5 mg/L de ASTX durante a maturação aumentou as taxas de maturação e de blastocisto, inclusive em embriões de transferência nuclear. Apesar desses resultados promissores, a ação da ASTX durante a vitrificação de embriões bovinos ainda não foi elucidada, permanecendo sem evidências sobre seu potencial na criopreservação e na preservação da qualidade embrionária.

Em síntese, considerando os efeitos benéficos já descritos para diferentes antioxidantes e os desafios impostos pela criopreservação, o presente trabalho buscou avaliar a ASTX como agente protetor no meio de vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5. CONCLUSÃO

A suplementação do meio de vitrificação com ASTX durante o curto período de vitrificação – aproximadamente 9 minutos – promoveu efeitos dependentes da dose em embriões bovinos *in vitro*.

Após o recultivo dos embriões após o aquecimento de 18 a 20h, foi possível observar que a concentração de 0,5nM reduziu a apoptose, modulou a expressão do bta-miR-301b em conjunto com a apoptose em relação à dose de 0,5pM, enquanto a dose de 1nM apresentou efeitos citotóxicos.

Houve diferença metabólicas entre os grupos de tratamento pela espectroscopia Raman.

A taxa de sobrevivência durante os períodos de 1 a 2h e 18 a 20h e a avaliação indireta global de EROs não diferiram entre os grupos, mostrando limitação das análises morfológicas e funcionais.

Conclui-se que a eficácia da ASTX depende de ajuste preciso da concentração, e que miRNAs e o perfil bioquímico podem atuar como biomarcadores complementares da qualidade embrionária.

Agradecimentos:

Os autores agradecem aos frigoríficos Franca Boi, Boi Baio, Olhos da Água e Pantanal pelo fornecimento dos ovários bovinos utilizados neste estudo. Agradecem também ao Laboratório de Biotecnologias da Reprodução (LABOR), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária (PPG CVet), ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), ao Laboratório Comercial Fertiliza – Consultoria em Reprodução Animal, ao Laboratório de Morfofisiologia e Desenvolvimento Molecular (LMMD) e ao Laboratório de Epigenética e Metabolismo Embrionário (LEME) pelo suporte técnico e infraestrutura. E a todos colegas/profissionais que contribuíram para que a realização desse projeto fosse possível.

Financiamento: Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio nº 2021/13932-5 e pela CAPES – Código de financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- [1] 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*. 2020. *Theriogenology*. 143:74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.001>
- [2] MOGAS, T., GARCÍA-MARTÍNEZ, T., MARTÍNES-RODERO, I. Methodological approaches in vitrification: Enhancing viability of bovine oocytes and in vitro-produced embryos. 2024. *Reprod Dom Anim*. V.59(Suppl. 3):e14623. <https://doi.org/10.1111/rda.14623>
- [3] FEUCHARD, V. L. D. S., OLIVEIRA, C. S., SARAIVA, N. Z., QUINTÃO, C. C. R., OLIVEIRA, L. Z. Reactive oxygen species attenuation improves the quality of vitrified-warmed bovine embryos. 2025. *Anim. Reprod.* v.22 (1). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0035>.
- [4] VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. *Improving cryopreservation systems*. **Theriogenology**, v. 65 (1), p. 236-244, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>
- [5] DODE, M. A. N., LEME, L. O., SPRICIGO, J. F. W. *Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013.
- [6] AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. *The role of free radicals and antioxidants in reproduction*. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology** 18(3):p 325-332, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e>
- [7] ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M. F.; MINGOTI, G. Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. 2014. *Reproduction, Fertility and Development* 26(6) 797-805 <https://doi.org/10.1071/RD12354>
- [8] DALVIT, G. C., CETICA, P. D., PINTOS, L. N., BECONI, M. T. *Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production*. **Biocell**, 29(2), 209–212. 2005.
- [9] AMBATI, R.R., PHANG, S.M., RAVI, S., ASWATHANARAYANA, R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. 2014. *Marine Drugs*. [S. I.] v. 12, p. 128-152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>

- [10] LI, X., WANG, X., DUAN, C., YI, S.; GAO, Z., XIAO, C., AGATHOS, S. N., WANG, G., LI, J. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. 2020. *Biotechnology Advances*, v. 43. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>
- [11] HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, MATSUMOTO K, WATANABE H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. 2005. *J Nat Prod. Mar*;69(3):443-9. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np050354+>
- [12] 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. 2015. *Reprod Domest Anim.* 50(5):793-9. <https://doi.org/10.1111/rda.12589>
- [13] ISPADA, J.; RODRIGUES, T. A.; RISOLIA, P. H. B.; LIMA, R. S.; GONÇALVES, D. R.; RETTORI, D. et al. *Astaxanthin protects heat-shocked oocytes*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 9, p. 1169–1179, 2018. <https://doi.org/10.1071/RD17271>
- [14] LI, X., WANG, X., DUAN, C., YI, S.; GAO, Z., XIAO, C., AGATHOS, S. N., WANG, G., LI, J. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. 2020. *Biotechnology Advances*, v. 43. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>
- [15] DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. M. Morphology of immature bovine oocytes. 1989. *Gamete Research*, v. 24, n. 2, p. 197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>.
- [16] STRINGFELLOW, D. A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões Jaboticabal*: SBTE, 1998. p.83-96.
- [17] OSORNIO D, CONTRERAS DA, JIMENEZ-DIAZ E, FIORDELISIO T, LÓPEZ-DAMIAN P, MARTÍNEZ JF, GALINA CS. Comparison of CellRox green fluorescence upon thawing on *in vitro* *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos cryopreserved by slow freezing or vitrification. 2024. *Zygote*. Jun;32(3):243-249. <https://doi.org/10.1017/S0967199424000121> Epub 2024 Sep 18. PMID: 39291606.
- [18] MESQUITA, L.G.; PERECIN, F.; SANGALLI, J.R.; ADONA, P.R.; FUKUMASU, H.; CHIARATTI, M.R.; LEAL, C.L.V., SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V. Bovine mitochondrial depletion and supplementation at the 1-cell stage in apoptosis process. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, Supl. 2, p. 785, 2010.
- [19] BASTOS, N.M.; GOULART, R.S.; BRIDI, A.; MAZZARELLA, R.; ALVES, L.; DA SILVA ROSA, P.M. et al. The bovine oviductal environment and composition are negatively affected by elevated body energy reserves. 2025. *PLoS One* 20(6): e0326138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0326138>
- [20] SANTOS, E. C.; MARTINHO, H. S.; ANNES, K.; LEITE, R. F.; MILAZZOTTO, M. P. Rapid and noninvasive technique to assess the metabolomics profile of

bovine embryos produced in vitro by Raman spectroscopy. *Biomed. Opt. Express* 6, 2830-2839. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002830>

[21] CANDELORO, P.; GRANDE, E.; RAIMONDO R.; DI MASCOLO, D.; GENTILE, F.; COLUCCIO, M. L.; PEROZZIELLO, G.; MALARA, N.; FRANCARDI, M.; DI FABRIZIOAC, E. Raman database of amino acids solutions: a critical study of Extended Multiplicative Signal Correction. 2013. *Analyst*, 138, 7331–7340. <https://doi.org/10.1039/C3AN01665J>

[22] ROSA, A. B.; OLIVEIRA, T. D. M.; TAGUTI, Y. C. T.; PROSPERUTE, N. K. S.; PAGLIONE, M. P.; ALVES, M. B. R.; GIMENES, L. U. Evaluation of the antioxidant potential of Astaxanthin in the vitrification of bovine embryos – Preliminary results. 2024. 203:147. *In: Abstracts - 37th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Anim. Reprod.* 21(3). Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/66ab6dbea9539570a57bd825/pdf/animreprod-21-3-66ab6dbea9539570a57bd825.pdf> [acessado em 30 de julho de 2025].

[23] LOU J, LIU X, XIE Y, WU M, MAO W, YING X. MiR-301b-3p promotes breast cancer development through inhibiting the expression of transforming growth factor-beta receptor 2. 2024. *PeerJ* 12: e18324 <https://doi.org/10.7717/peerj.18324>

[24] ZHOU, X., LI, X.; WU, M. miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection. 2018. *Sig Transduct Target Ther* 3, 14 <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0006-9>

[25] MEREDITH, B. K.; BERRY, D. P.; KEARNEY, F.; FINLAY, E. K.; FAHEY, A. G.; BRADLEY, D. G.; LYNN, D. J. A genome-wide association study for somatic cell score using the Illumina high-density bovine beadchip identifies several novel QTL potentially related to mastitis susceptibility. 2013. *Frontiers in genetics*, 4, 229. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00229>

[26] LI, L., ZHANG, M., ZHAO, C. et al. Circadian clock gene Clock-Bmal1 regulates cellular senescence in Chronic obstructive pulmonary disease. 2022a. *BMC Pulm Med* 22, 435 <https://doi.org/10.1186/s12890-022-02237-y>

[27] LI, H., LI, M., CHEN, K. ET AL. The circadian clock gene ARNTL overexpression suppresses oral cancer progression by inducing apoptosis via activating autophagy. (2022b). *Med Oncol* 39, 244. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01832-7>

[28] SANTOS, E. C., MARTINHO, H. S., ANNES, K., LEITE, R. F., & MILAZZOTTO, M. P. Rapid and noninvasive technique to assess the metabolomics profile of bovine embryos produced in vitro by Raman spectroscopy. (2015). *Biomedical Optics Express*, 6(8), 2830–2839. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002830>

[29] TAGUTI, Y. C. T.; PROSPERUTE, N. K. S.; PAGLIONE, M. P.; OLIVEIRA, T. D. M.; ROSA, A. B.; PANOSSO, A. R.; ALVES, M. B. R.; GIMENES, L. U. Assessing Activity Of Astaxanthin At Different Levels In The In Vitro Culture Of

Bovine Embryos By Indirect Evaluation Of Ros. 2024; 203:76. *In: Abstracts - 37th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Anim. Reprod.* 21(3). Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/66ab6dbea9539570a57bd825/pdf/animreprod-21-3-66ab6dbea9539570a57bd825.pdf> [acessado em 30 de julho de 2025].

[30] CARVALHO, A.M.D. Adição de astaxantina ao meio de criopreservação de embriões bovinos na técnica de transferência direta. 2023. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2023.