

## Efeito da astaxantina no estresse oxidativo em oócitos bovinos

### Effect of astaxanthin on oxidative stress of bovine oocytes

#### RESUMO

Muitos bovinos sofrem a altas temperaturas no verão, podendo apresentar estresse térmico no qual observa-se um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, aumentando as espécies reativas de oxigênio (ROS) e provocando o estresse oxidativo celular, causando vários problemas ao animal, dentre eles o comprometimento na competência oocitária. A suplementação com um antioxidante poderá ajudar na eliminação das ROS, melhorando a qualidade oocitária. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da suplementação com o antioxidante astaxantina na qualidade de oócitos bovinos pela quantificação do estresse oxidativo destes gametas. Realizou-se um delineamento experimental comparando três grupos de tratamento de astaxantina no verão, sendo eles o controle (n=15 fêmeas), onde não foi administrada astaxantina e os demais grupos suplementados via oral com 0,25 ou 0,50 mg/ kg de peso vivo/ por dia (n=15 fêmeas bovinas por grupo). Após 75 dias de suplementação, foi feita a coleta dos oócitos por OPU para análise morfológica. Na próxima etapa do estudo, será a análise das amostras por PCR em tempo real para determinar a expressão do gene HSP70, importante na resposta ao estresse térmico. Espera-se que o tratamento com astaxantina ofereça melhora da qualidade dos oócitos em relação à análise morfológica e ao estresse oxidativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Temperatura; Antioxidante; Qualidade.

#### ABSTRACT

Many cattle show high temperatures in the summer, and may experience thermal stress in which an imbalance between oxidizing and antioxidant compounds is observed, increased as reactive oxygen species (ROS) and causing cellular oxidative stress, causing several problems to the animal, among them commitment to oocyte competence. Supplementation with an antioxidant can help eliminate ROS, improving oocyte quality. The aim of this work was to verify the effect of supplementation with the antioxidant astaxanthin on the quality of bovine oocytes by quantifying the oxidative stress of these gametes. An experimental design was carried out comparing three treatment groups of astaxanthin in the summer, being the control (n = 15), where astaxanthin was not administered and the other groups supplemented orally with 0.25 or 0.50 mg / kg of live weight / per day (n = 15 cattle per group). After 75 days of supplementation, the oocytes were collected by OPU for morphological analysis. In the next stage of the study, it will be a real-time PCR analysis to determine the expression of the HSP70 gene, important in the response to thermal stress. It is expected that treatment with astaxanthin will improve the quality of oocytes in relation to morphological analysis and oxidative stress.

**KEYWORDS:** Temperature; Antioxidant; Quality.

**Deborah Lizama Boettcher**  
[debotahboettcher@alunos.utfpr.edu.br](mailto:debotahboettcher@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

**Flavia Regina Oliveira de Barros**  
[flaviabarros@utfpr.edu.br](mailto:flaviabarros@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

**Rafael Arcenio da Costa**  
[rafaelcosta11@hotmail.com](mailto:rafaelcosta11@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

**Ione Castro**  
[fertilizaembryo@hotmail.com](mailto:fertilizaembryo@hotmail.com)  
Fertiliza Embryo Reprodução Animal, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

**Marcelino Mattiello**  
[marcelinoveterinario@gmail.com](mailto:marcelinoveterinario@gmail.com)  
Fertiliza Embryo Reprodução Animal, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

**Jorge A. Souza**  
[fertilizaembryo@hotmail.com](mailto:fertilizaembryo@hotmail.com)  
Fertiliza Embryo Reprodução Animal, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Na região tropical encontra-se a maior parte do rebanho bovino brasileiro, no qual a temperatura fica acima da zona de termoneutralidade, e com isso os animais ficam longos períodos sob estresse térmico (FIALHO et al, 2018). Tal condição prejudica o equilíbrio no corpo do animal, provocando alterações sobre os eventos reprodutivos da fêmea como diminuição ou atraso do estro, alteração do desenvolvimento folicular ovariano, alteração do desenvolvimento embrionário e comprometimento da competência oocitária (MACEDO et al., 2014). O tempo de crescimento do oócito varia entre as espécies e se ele for exposto a uma temperatura acima de 40°C durante seu crescimento, sua função estará comprometida antes do tempo necessário para completar sua maturação, reduzindo assim a atividade mitocondrial (LOPES et al., 2017).

Este desequilíbrio provocado pelo estresse térmico calórico interfere na homeostase entre compostos oxidantes e antioxidantes, sendo este conhecido como estresse oxidativo (SILVA, GONÇALVES, 2010). Os radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) cumprem funções biológicas importantes, atuando como mediadores para a transferência de elétrons nas reações bioquímicas através das mitocôndrias, proporcionando a geração de ATP. Contudo, se ocorrer a produção em excesso de radicais livres e/ou ROS poderemos observar danos oxidativos em células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

Substâncias antioxidantes podem ser utilizadas para minimizar o problema causado pelo estresse oxidativo, pois são capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável, que podem ter origem dietética ou endógena (BARBOSA et al., 2010).

Dentre os antioxidantes, pode-se citar a astaxantina, ela é um pigmento oxicarotenóide de cor vermelho-alaranjada encontrada no meio marinho, sendo um dos mais potentes antioxidantes entre os carotenoides, associado a efeitos protetores contra algumas doenças (CHOCIAI et al., 2002). Suas características antioxidantes foram bem estabelecidas em 1990 (OLAIZOLA, 2003), e em estudos *in vitro* foi demonstrado que seu poder antioxidante é dez vezes maior que outros caratenóides (SUH et al., 2006).

Considerando ainda, que a astaxantina pode atuar em prol de algumas funções biológicas, tais como aumento da resposta imune, proteção contra efeitos da luz UV e proteção contra oxidação de ácidos graxos poli-insaturados essenciais (LORENZ, CYSEWIKI, 2000), é de grande interesse avaliar o seu potencial antioxidante para combater os efeitos observados no oócito que foi exposto ao estresse térmico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um delineamento experimental com três grupos de tratamento de astaxantina, sendo o primeiro grupo o controle, que não foi administrada astaxantina às vacas e nos demais grupos os animais suplementados via oral por meio de uma cápsula com 0,25 ou 0,50 mg/ kg peso vivo/ por dia durante 75 dias

em uma época do ano, o verão. Cada grupo foi composto de 15 fêmeas bovinas da raça Holandesa lactantes totalizando 45 animais. Todos os animais estão localizados em propriedade leiteira na cidade de Verê, PR e foram submetidos à três aspirações foliculares (OPU, do inglês *ovum pick-up*) com intervalo de 15 dias ao término de cada período de suplementação. Os oócitos foram obtidos por um médico veterinário capacitado pela técnica de OPU e avaliados morfológicamente pela acadêmica, classificando-os em graus 1, 2, 3 e 4 para determinar quais são viáveis, desta forma foi realizado um pool contendo os oócitos de grau 1 e 2 de cada coleta para cada tratamento, totalizando três triplicatas biológicas para cada tratamento, sendo depois congelados estes oócitos para sua preservação para a próxima etapa, ainda a ser realizada.

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via após verificação distribuição normal dos dados e homogeneidade das variâncias. Dados não paramétricos foram transformados por raiz quadrada antes da análise de variância. Os grupos foram então comparados com o pós-teste de Tukey utilizando um nível de significância de 0,05. As análises foram realizadas pelo software Prism Graphpad versão 7.0 para MacOS.

### PCR em tempo real

Para avaliar se a astaxantina oferece uma melhora da resposta ao estresse térmico dos oócitos, será analisada a expressão gênica da proteína HSP70, pois ela é produzida pela codificação de genes de choque térmico.

Desta forma será realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), e sequência de primers utilizados foram obtidos de Paixão (2017).

Para a técnica de qPCR primeiramente o RNA total de *pools* de 30 oócitos por réplica (3 réplicas biológicas por grupo; 3 grupos experimentais = total de 9 *pools* de amostras) será extraído pelo método de Trizol-Clorofórmio e quantificado por fluorimetria (Qubit 2.0 Fluorometer, Life Technologies). Já a síntese de DNA complementar (cDNA) será realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, EUA), e sua quantificação com o kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) pela técnica de PCR em tempo real. Com isso as instruções do fabricante foram seguidas para todos os procedimentos. A concentração de cDNA será normalizada e a qPCR realizada com uma reação de ciclo de duas etapas, sendo a primeira por 2 min a 50 °C e em seguida por 10 min a 95 °C, e a segunda por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e depois 60 °C por 1 min, seguida de uma curva de dissociação (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A quantificação será realizada pelo método relativo descrito por Pfaffl (2001), utilizando como genes endógenos GAPDH e ACTB (DE BARROS et al., 2012).

### RESULTADOS PARCIAIS

Os dados referentes à análise morfológica dos oócitos coletados por aspiração folicular após período experimental (suplementação com astaxantina) estão apresentados abaixo (Figura 1). Não foi observada diferença estatística quanto à quantidade de oócitos recuperados ( $p=0,0952$ ). Contudo, fêmeas suplementadas com 0,5 mg/ kg de peso vivo/ dia de astaxantina ofereceram oócitos de maior qualidade (Graus I, II e III) comparado com o grupo controle ( $p=0,0292$ ).

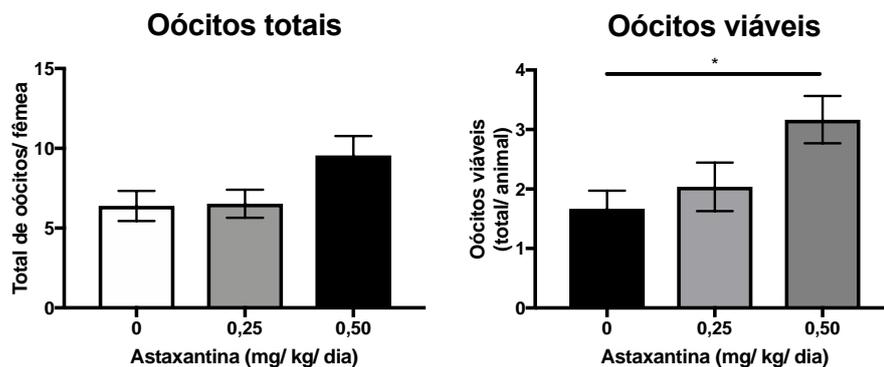


Figura 1. Média de oócitos recuperados por fêmea (A) e média de oócitos viáveis (Graus I, II e III) por fêmea (B). Dados não transformados + erro padrão da média. \* representa diferença significativa com p < 0,05.

Fonte: autoria própria (2020).

## DISCUSSÃO

Observou-se, no presente trabalho, melhora da qualidade dos oócitos coletados de vacas suplementadas com 0,5 mg de astaxantina por kg de peso vivo por dia (75 dias). Na próxima etapa será verificada a expressão do gene HSP70 relacionado à resposta ao estresse térmico. Os dados preliminares deste estudo são positivos e sustentam a hipótese que a astaxantina pode ser benéfica na obtenção de oócitos de maior qualidade de vacas leiteiras.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, p. 629-643, jul./ago. 2010.

CHOCIAI, M. B. *et al.* Cultivo de levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, out./dez. 2002.

DE BARROS, F. R. O. *et al.*  $\alpha$ -6 Integrin Expression in Bovine Spermatogonial Cells Purified by Discontinuous Percoll Density Gradient. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 6, p. 887-890, 2012.

FIALHO, A. L. L. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 64-72, 2018.

LOPES, F. F. P. *et al.* **Immediate and transgenerational epigenetic effects of heat stress on female gametes.** Universidade Federal de São Paulo - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas. São Paulo, 2017.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. **TIBTECH**, v. 18, p. 160-167, April 2000.

MACEDO, G.G. *et al.* O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e o embrionário. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.38, p.80-85, 2014.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45 – 45, 2001, Acesso: 25/08/2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>.

SILVA, A. A. DA; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas de oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p. 994-1002, abr. 2010.

SUH, I. S.; JOO, H-N; LEE, C-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous Haematococcus pluvialis cell growth and astaxanthin accumulation. **Journal of Biotechnology**, 2006.