



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BRENDA KARINE LIMA DO AMARAL

**ADIÇÃO DA MELATONINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE
A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

São Luís – MA
2017



BRENDA KARINE LIMA DO AMARAL

**ADIÇÃO DA MELATONINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE
A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

São Luís- MA
2017

Amaral, Brenda Karine Lima do.

Adição da melatonina em diferentes concentrações sobre produção in vitro de embriões bovinos / Brenda Karine Lima do Amaral - São Luís, 2017.
46f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

1. Bovinos 2. Melatonina 3. Produção in vitro I. Título

CDU 636.2:591.3



BRENDA KARINE LIMA DO AMARAL

**ADIÇÃO DA MELATONINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE
A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Breno Glaessner Gomes Fernandes de Souza
Mestrando em Ciência Animal
1º Membro

Higor da Silva Ferreira
Mestrando em Ciência Animal
2º Membro

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior
Doutor em Reprodução Animal - UFPI
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que sem Ele não poderia ter chegado até aqui, sem Sua grandiosa sabedoria, não apenas neste período, mas em todos os momentos da minha vida. Assim como aos meus pais, Joseline Cunha Lima e Luiz Cláudio Ferreira do Amaral, que sou grata por todos os ensinamentos, pelo amor, pela luta e incentivo para me tornar tudo que sou hoje, eles são e serão sempre os meus maiores exemplos. Agradeço a minha tia e segunda mãe Raquel Cunha Lima Corrêa e seu marido Romerson Vinicius Moraes Corrêa por todo apoio e carinho, as minhas avós Joana Corrêa Cunha Lima e Alderes Ferreira do Amaral (in memorian) por todo carinho e amparo quando precisei, aos meus irmãos Luis Henrique Lima do Amaral e Deucerli Ramos por todos momentos de companhia e risadas. Essa vitória também é de vocês. Eu amo vocês imensamente!

Agradeço a Universidade Estadual do Maranhão e todo seu corpo docente pelos anos de aprendizado e minha formação acadêmica.

Gostaria de agradecer ao Laboratório de Reprodução Animal - LABRA representado pelo professor Dr. Ricardo de Macêdo Chaves por contribuir imensamente no conhecimento adquirido durante a minha formação. Assim como a sua disponibilização do espaço para realização do trabalho. Agradeço ainda a todos componentes do LABRA, em especial, Luciana, Hallef, Sérgio, Breno, Felipe Lucas, Alan pela disponibilidade na realização do experimento proposto.

Agradeço ao meu orientador Felipe de Jesus Moraes Júnior, por conceder seu tempo, seus ensinamentos, sua confiança e acolhimento para realizarmos este trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves e ao Mestrando Higor da Silva Ferreira por aceitarem o convite para compor a Banca Examinadora.

Agradeço a todos os meus amigos, Marcella Matos Pereira Coelho, Alcindo Torquato Sousa Neto, Joanna Jessica Sousa Albuquerque, Danielle Ferreira dos Santos, Milena Silva Lemos, Clarissa Costa Durães, Lorena Santos Rodrigues de Araújo, Samuel Lemos, Douglas Marinho Abreu, por toda amizade e apoio ao longo desses anos, vocês foram fundamentais para tornar os dias mais alegres, mesmo diante de tantas dificuldades. Eu amo vocês.

Agradeço a todos os animais, em especial aos meus cachorros José, Dobby (in memorian) e Fofucha (in memorian), por me ensinarem sobre amor e despertarem em mim o orgulho pela Veterinária.

E por fim, agradeço todos as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

“Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la”

Johann Goethe

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da melatonina sobre aspectos morfológicos da maturação dos complexos *cumulus-oócito* (CCOs) e na produção in vitro de embriões bovinos. O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão. Foram utilizados cerca de 100 CCOs viáveis que foram distribuídos entre os tratamentos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} μ M de Melatonina. O experimento foi dividido em duas fases, onde a primeira avaliou o efeito de diferentes concentrações de melatonina (tratamentos) sobre a taxa de maturação dos CCOs, e a segunda verificou o efeito dos tratamentos com melatonina sobre a produção in vitro de embriões bovinos. Os CCOs foram classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV. O delineamento foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos em 100 repetições e as variáveis estudadas foram comparadas pelo teste do χ^2 , para $P < 0,05$. Na primeira fase a taxa de maturação dos CCOs cultivados in vitro não houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Na segunda fase a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário não houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Entretanto, quanto a taxa de blastocisto, o grupo tratado com melatonina na concentração 10^{-5} μ M foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) aos demais grupos em estudo. Dessa forma, a suplementação da melatonina no meio de maturação in vitro não evidenciou melhoras na taxa de maturação dos CCOs cultivados assim como da mesma forma não evidenciou melhoras na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário, entretanto mostrou-se eficiente na produção de blastocistos de embriões produzidos in vitro.

Palavras-chave: bovinos; melatonina; produção in vitro

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of melatonin on morphological aspects of *cumulus-oocyte* complexes (CCOs) and in vitro production of bovine embryos. The experiment was conducted at the Animal Reproduction Laboratory of the State University of Maranhão. About 100 viable CCOs were used which were distributed between 0, 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5} μ M Melatonin treatments. The experiment was divided in two phases, where the first one evaluated the effect of different concentrations of melatonin (treatments) on the maturation rate of the CCOs and the second, the effect of the treatments with melatonin on the in vitro production of bovine embryos. The CCOs were classified according to morphological quality in degrees I, II, III and IV. The design was completely by chance with four treatments in 100 replicates and the variables studied were compared by the χ^2 test, for $P < 0.05$. In the first phase, the in vitro cultivated CCO maturation rate showed no difference between the treatments ($P < 0.05$). In the second phase the rate of cleavage and embryonic development did not differ between treatments ($P < 0.05$). However, for the blastocyst rate, the group treated with melatonin in the 10^{-5} μ M concentration was statistically superior ($P < 0.05$) to the other groups under study. Thus, the in vitro maturation of melatonin did not show improvement in the maturation rate of in vitro cultured CCO, as it did not show improvement in the rate of embryo development and cleavage, but was efficient in the production of blastocysts of embryos produced in vitro.

Keywords: cattle; melatonin; in vitro production

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AANAT- Acetilação da enzima N- acetiltransferase

ASMT- Acetilserotonina O- metiltransferase

°C- graus Celsius

CCOs – Complexos *cumulus*- *oócitos*

CIV – Cultivo in vitro

CO²- Gás carbônico

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DMSO- Dimetilsulfóxido

ERN – Espécie reativas de nitrogênio

EROS – Espécie reativas de oxigênio

FIV – Fertilização in vitro

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

GSH – Glutathione

h- Horas

H²O² – Peróxido de Hidrogênio

Km- quilômetro

LABRA- Laboratório de Reprodução Animal

LH – Hormônio Luteinizante

MA- Maranhão

MIV – Maturação in vitro

mL- Mililitro

mm- Milímetro

Mol/L- Mol por Litro

nº- Número

N²- Nitrogênio

NAS- N- acetilserotonina

ng- Nanograma

O²- Radical superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

OPU- *Ovum Pick- Up*

PIV- Produção in vitro

SBTE- Sociedade Brasileira de Tecnologia

SFB- Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD- Superóxido dismutase

SOF- Synthetic Oviductal Fluid

TCM 199®- Tissue Culture Medium

T-5-H- Triptofano- 5- hidroxilase

μM- Micrometro

μL- Microlitro

VG- Vesícula Germinativa

%- Porcentagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Taxa de maturação oocitária cultivados in vitro em meio suplementado com diferentes concentrações de melatonina e total de complexos <i>cumulus</i> - <i>oócitos</i> (CCOs) utilizados por tratamento.	30
Tabela 2 - Taxa de clivagem de CCOs oriundos de ovários post-mortem coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.	31
Tabela 3 - Taxa de blastocistos produzidos in vitro a partir de CCOs oriundos de ovários post-mortem coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.	32
Tabela 4 - Taxa de desenvolvimento embrionário com base no estágio de desenvolvimento in vitro a partir de CCOs oriundos de ovários post-mortem coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Fisiologia de fêmeas bovinos	17
3.1.1. Oogênese	17
3.1.2. Foliculogênese	17
3.2. Produção <i>in vitro</i>	18
3.2.1. Conceito	18
3.2.2. Etapas da Produção <i>in vitro</i>	18
3.2.2.1. Coleta de oócitos e Classificação de complexos <i>cumulus-oócitos</i>	18
3.2.2.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	19
3.2.2.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	20
3.2.2.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	21
3.3. Estresse Oxidativo	22
3.3.1. Espécies reativas de oxigênio	22
3.3.2. Estresse oxidativo na produção <i>in vitro</i>	23
3.3.3. Antioxidantes	23
3.4. Melatonina	24
3.4.1. Síntese da Melatonina	24
3.4.2. Ação antioxidante da melatonina	25
3.4.3. Melatonina como antioxidante na produção <i>in vitro</i>	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Comitê de Ética	27
4.2. Local do Experimento	27
4.3. Grupos Experimentais	27
4.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	27
4.4.1. Punção folicular ou “ <i>Ovum Pick-Up</i> ” (OPU)	27
4.4.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	28
4.4.2.1. Efeito da melatonina na maturação oocitária	28

4.4.3. Fecundação in vitro (FIV)	28
4.4.4. Cultivo in vitro (CIV)	29
4.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. PRIMEIRA FASE: Efeito da melatonina sobre a taxa de maturação dos complexos <i>cumulus</i>- <i>oócitos</i> (CCOs)	30
5.2. SEGUNDA FASE: Efeito da melatonina sobre a produção in vitro de embriões bovinos	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

A produção de embriões bovinos no Brasil tem aumentado significativamente na última década. Segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), este aumento está diretamente relacionado com o desenvolvimento da produção in vitro destes embriões (LOIOLA, 2013).

A produção in vitro (PIV) é uma técnica desenvolvida rotineiramente em laboratórios de pesquisas e comerciais e envolve uma série de etapas como a obtenção, seleção e maturação de oócitos e fecundação in vitro (FIV). Estes embriões são desenvolvidos até o estágio de blastocisto para em seguida serem transferidos às receptoras sincronizadas ou congelados para transferências futuras (VARAGO et al., 2008).

A maturação in vitro (MIV) é a etapa inicial da PIV na qual os oócitos são maturados na ausência de fatores originários do ovário e do organismo. A MIV envolve a remoção dos complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) dos folículos antrais seguido do cultivo de células previamente selecionadas durante 24 a 48 horas (CUNHA, 2014). A qualidade e a integridade dos CCOs influencia o sucesso da fertilização in vitro, assim como a competência do desenvolvimento até o estágio de embrião (TAKADA, 2008).

Desta forma tanto os CCOs quanto os embriões são extremamente sensíveis a todas as mudanças que ocorrem no meio em que estão expostos, podendo comprometer a eficiência da biotécnica (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; DURANTHON et al., 2008). Foi observado que a inadequada maturação do oócito reflete em taxas reduzidas de fecundação e menor desenvolvimento embrionário (CHAVES, 2010). Assim, o estresse oxidativo atua como um dos fatores que prejudica o desenvolvimento in vitro dos CCOs até a fase de blastocisto.

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e os agentes antioxidantes é denominado estresse oxidativo ou desequilíbrio redox. Durante o processo de ovulação são produzidas no interior dos folículos espécies reativas de oxigênio, formadas como consequência de reações bioquímicas oxidativas e de fatores externos (PAPIS et al., 2007). No entanto, uma quantidade excessiva de EROS causa estresse oxidativo e pode danificar o oócito e as células da granulosa. Por outro lado, os sistemas de defesa antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH), responsáveis pela defesa natural e presentes dentro dos folículos, encarregam-se do equilíbrio entre as EROS e os antioxidantes (TAMURA et al., 2012).

O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica de membrana, oxidação de proteínas, danos ao DNA e indução da apoptose (TAMURA

et al., 2013; CRUZ et al., 2014 a, b; ZHANG et al., 2013). Durante a MIV o oócito é mais suscetível ao estresse oxidativo, devido a reduzida defesa antioxidante, prejudicando o desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI, 2012; ZHANG et al., 2013).

Nesse contexto a melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina) produzida a partir do triptofano na glândula pineal, de maneira circadiana em mamíferos, pode ser utilizada como uma alternativa para a PIV (REITER et al., 2009; KUMAR 2015; TIAN et al., 2014). A melatonina pode funcionar como um antioxidante, visto sua atuação citoprotetora (antioxidante e antiapoptótica) contra radicais livres e sua natureza anfifílica (hidrofílica e hidrofóbica), uma vez que lhe permite atravessar facilmente a barreira morfofisiológica de todo organismo, protegendo as células do estresse oxidativo em ambos os ambientes celulares (lipídicos e aquosos) (REITER, 2000).

Contudo, seus efeitos ainda são desconhecidos em meios de maturação para a produção *in vitro* de embriões em espécies não sazonais como os bovinos. Assim, o estudo do papel que a melatonina desempenha em oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*, possibilitará a obtenção de conhecimento que contribuirá para o desenvolvimento de protocolos adequados na produção *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da melatonina sobre aspectos morfológicos da maturação dos complexos *cumulus-oócito* (CCOs) e na produção in vitro de embriões bovinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar os complexos *cumulus-oócito* (CCOs) de acordo com sua qualidade morfológica;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de melatonina, sobre a taxa de maturação dos complexos *cumulus-oócito* (CCOs) cultivados in vitro;
- Analisar a taxa de clivagem em diferentes concentrações de melatonina;
- Analisar a taxa de blastocistos em diferentes concentrações de melatonina;
- Verificar a influência da melatonina sobre o desenvolvimento embrionário na produção in vitro de embriões bovinos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fisiologia em fêmeas bovinos

3.1.1. Oogênese

O processo de desenvolvimento dos oócitos é denominado de oogênese e tem início durante a vida fetal. As células germinativas primordiais se originam do endoderma do saco vitelino primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a multiplicar-se por divisões mitóticas (VAN DEN HURK et al, 1997). Ao final da proliferação mitótica as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991), dentre os quais, alguns já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Neste último estágio, o oócito organiza seu núcleo em vesícula germinativa (VG), caracterizando o primeiro bloqueio da meiose. O núcleo do oócito permanecerá nesse estágio até que o animal atinja a puberdade (RICHARDS, 1980).

Quando o animal atinge a puberdade, devido a liberação da onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH), algumas horas antes da ovulação a meiose é retomada e o núcleo oocitário entra em diacinese. Nesse momento se inicia o processo de rompimento da VG, seguida das fases de metáfase I, anáfase I, telófase I, quando então ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, resultando na formação do oócito secundário. Sendo caracterizada por uma progressão até a metáfase II, quando ocorre o segundo bloqueio da meiose. O oócito retornará a meiose somente se houver penetração espermática (FIGUEIREDO et al., 2002). O processo de divisão meiótica em bovinos se inicia aos 75-80 dias de gestação (PICKTON, 2001).

3.1.2. Foliculogênese

A foliculogênese é o processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são selecionados para ovulação (WEBB et al., 1999). O folículo é uma das unidades funcionais do ovário, responsável pela produção de hormônios como o hormônio folículo-estimulante (FSH), LH e estradiol, e com função de favorecer um microambiente para o crescimento do oócito (GORDON, 1994). Trata-se de uma estrutura bastante complexa, composta por célula germinal e tipos distintos de células somáticas, mantendo uma íntima associação durante todo o desenvolvimento primordial até os estágios pré-ovulatórios (DE LOOS et al., 1991).

A foliculogênese nas vacas é caracterizada por ondas de desenvolvimento folicular (ALMEIDA, 1998). Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias, apenas um dos folículos recrutados continua seu desenvolvimento, enquanto que os

outros sofrem decréscimo de tamanho, estabelecendo-se o fenômeno da divergência folicular (BARUSELLI et al., 2007), sendo que cada onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (REIS, 2005).

Segundo Figueiredo et al (1997) há variações no número de ondas foliculares entre os animais de mesma raça e até mesmo no próprio animal, podendo ocorrer até três ou quatro ondas foliculares. Em bovinos esse número varia de duas a três ondas foliculares por ciclo (SIROIS & FORTUNE, 1988; OLIVEIRA, 1997; BORGES, 1999).

Estes folículos na espécie bovina crescem até alcançarem 8-9 mm de tamanho, momento em que apenas um folículo, o folículo dominante, continua seu crescimento enquanto que os demais cessam seu crescimento e regredem por atresia (SAVIO, et al., 1988). O oócito sofre significantes modulações quando está incluso no folículo dominante, especialmente em relação à sua ultraestrutura e atividades funcionais, as quais atribuem ao folículo o desempenho de papel fundamental na aquisição de plena competência do desenvolvimento do oócito, uma vez que ele o atinge sua capacitação oocitária (HYTTEL et al., 1997).

3.2. Produção in vitro (PIV)

3.2.1. Conceito

A produção in vitro (PIV) de embriões é uma importante biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e o cultivo ou co-cultivo in vitro (CIV) de zigotos e de embriões fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

O principal objetivo da PIV consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético, e também aquelas que não estão mais aptas a produzirem descendentes por técnicas convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos na PIV. Outra vantagem está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos, aumentando a vida reprodutiva das doadoras e diminuindo o intervalo de produção dos embriões. Esta biotécnica permite a utilização de touros diferentes para doadoras individuais e viabiliza o emprego do sêmen sexado (BRACKETT e ZUELKE, 1993; SANTL et al., 1998; BUENO e BELTRAN, 2008).

3.2.2. Etapas da Produção in vitro

3.2.2.1. Coleta de oócitos e Classificação de Complexo *cumulus*- oócitos

A coleta de oócitos para a produção in vitro de embriões pode ser feita *post mortem*, a partir da punção folicular de ovários obtidos de abatedouro, e in vivo por laparotomia,

laparoscopia via flanco ou vaginal e pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008). Sabe-se que a eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está relacionada à metodologia utilizada, interferindo na quantidade e morfologia do complexo *cumulus-oócito* (CCOs) recuperado, e consequentemente na competência para o desenvolvimento *in vitro* (GIBBONS et al., 1994; GARCIA et al., 2004).

As células da granulosa que envolve e circundam o oócito dão origem ao *cumulus oophorus*. A camada de células que cobre diretamente o oócito é chamada de corona radiata. Estas células estão conectadas com oolema por filamentos citoplasmáticos que penetram na zona pelúcida. O oócito também coordena o desenvolvimento e a diferenciação das células da granulosa no complexo *cumulus- oócito* através de uma regulação bidirecional que é necessária tanto para o desenvolvimento do folículo como para o oócito (EPPIG, 2001).

De acordo com Leibfried e First, (1979), os CCOs são classificados de acordo com a qualidade morfológica em Grau I, II, III, IV e Degenerados/ Expandidos, onde Grau I apresenta o *cumulus* compacto, contendo mais de três camadas de células, com ooplasma apresentando granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; Grau II também apresenta *cumulus* compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida; Grau III apresenta *cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico, degenerando, vacuolizando ou fragmentando e Grau IV o oócito encontra-se desnudo (sem células do *cumulus*).

Após a recuperação dos CCOs, os três processos biológicos subsequentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem as etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

3.2.2.2. Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que este possa ser fecundado e, posteriormente, possa se desenvolver até o estágio de blastocisto. Durante todo o seu desenvolvimento, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa. O reinício da meiose ou maturação nuclear *in vivo* ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, o que ocorreria naturalmente com a ovulação, sabendo-se que a retirada do contato entre o oócito e as células foliculares é o fator

primordial para dar início ao processo de maturação nuclear. Desse modo, observa-se que a maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio de diplóteno da prófase (meiose I) até a fase de metáfase (meiose II) (LONERGAN et al., 1994; GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

A eficiência dessa tecnologia é limitada por fatores intrínsecos do oócito, no que se refere ao estado bioquímico e molecular do oócito maturado em tornar-se potencialmente competente para a fertilização normal e para o desenvolvimento embrionário. Também há limitações na compreensão dos exatos constituintes oocitários relacionados à aquisição de sua competência, dentre eles, o papel que o ambiente folicular em torno do oócito exerce no progresso do desenvolvimento competente (GILCHRIST e THOMPSON, 2008).

Existem diversos sistemas de maturação para a PIV de embriões bovinos. Até os dias atuais, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados e testados na maturação dos oócitos in vitro, tais como o Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®). Desses sistemas, o meio de cultivo TCM199® é o mais difundido entre os laboratórios de produção in vitro, sendo geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, hormônio folículo-estimulante (FSH), LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000). Além do meio, torna-se necessária a presença de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO² em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

Durante o processo de maturação do oócito as células do *cumulus* secretam ácido hialurônico que se acumula entre as células formando uma matriz gelatinosa, o que constitui o processo conhecido como expansão do *cumulus* (EPPIG, 1989; HESS et al., 1999). As células da granulosa são indispensáveis para o crescimento folicular, para a diferenciação, para o estágio nuclear meiótico, para a maturação citoplasmática e para a atividade transcricional genômica, uma vez que atingido um diâmetro limite, os oócitos suprimem a habilidade das células da granulosa de promover a continuidade do crescimento do folículo, e indiretamente, o seu próprio crescimento (MATZUK et al., 2002).

3.2.2.3. Fecundação in vitro (FIV)

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito gerando o zigoto, e posteriormente se desenvolve até o estágio de blastocisto (MELLO et al., 2016).

O meio mais usado para a fecundação *in vitro* é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que contém agentes capazes de promover a capacitação espermática, como a heparina. Além deste, outros fatores importantes para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio de fecundação. Com relação ao co-cultivo (espermatozoide e oócito), este é realizado por um período que varia de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO² em ar e umidade saturada. Para tanto, os espermatozoides vivos são adicionados nas gotas de fecundação contendo os oócitos em uma concentração final que pode variar de 1,0 a 5,0 x 10⁶ espermatozoides viáveis/mL de meio (IRITANI e NIWA, 1977; DAYAN, 2001).

No processo *in vitro*, para que ocorra todo esse processo, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

3.2.2.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após as etapas de maturação e fecundação, e já se tendo formado o zigoto, este deverá passar por inúmeras divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto, estágio adequado para realização da transferência não cirúrgica (BLONDIN e SIRARD, 1995; MINAMI, 1996).

Semelhante aos processos de maturação e fecundação, o cultivo embrionário *in vitro* também requer um ambiente adequado, com tempo, atmosfera e temperatura controlados. Desse modo, o tempo de cultivo *in vitro* tem apresentado variação de 7 a 9 dias, dependendo do objetivo da rotina de produção *in vitro* (PIV), em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. Durante este processo, a taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia de cultivo, sendo que os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia para se avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

O monitoramento da cinética de desenvolvimento embrionário também tem sido uma estratégia interessante para obtenção de avanços na etapa de cultivo *in vitro* de embriões bovinos (MELLO et al, 2016). Milazzotto et al (2016), compararam o perfil de expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro* que foram classificados em duas categorias: embriões apresentando desenvolvimento lento e embriões apresentando desenvolvimento rápido. Estes autores ainda relacionaram a expressão gênica com o metabolismo energético (piruvato e lactato) dos embriões, sugerindo que diferentes velocidades de clivagem poderiam estar relacionadas com diferentes perfis metabólicos.

3.3. Estresse oxidativo

A qualidade embrionária relaciona-se muitas vezes com a dificuldade de mimetizar as condições uterinas hormonais de sinalização celular, nutrientes e principalmente na concentração de oxigênio disponível (LONERGAN et al., 2003). A atmosfera intrauterina possui uma concentração de oxigênio em torno de 2 a 8% de oxigênio, menor do que as concentrações trabalhadas ao longo do processo de produção in vitro. O excesso de oxigênio predispõe a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), o que pode levar a uma situação de estresse oxidativo ao embrião. (LONERGAN et al., 2008).

O estresse oxidativo pode levar ao aumento da proliferação celular (adaptação da célula para aumentar a expressão de sistemas de defesa) e a danos celulares. Os danos celulares associados ao estresse oxidativo afetam lipídeos, DNA, proteína e carboidratos (ABDELHAFEZ et al., 2011; LORD et al., 2013). Esses danos podem ser corrigidos, mas se não o forem pode ocorrer a ativação de apoptose, podendo levar a morte celular (ASSIS, 2014).

3.3.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Durante a respiração e outras reações metabólicas envolvendo o oxigênio, gera-se espécies reativas de oxigênio, que englobam radicais livres. Define-se como radicais livres moléculas que possuem elétrons de valência desemparelhados, ou seja, altamente reativas. O radical superóxido e a hidroxila, são radicais livres que participam da família de EROS, no entanto, o peróxido de hidrogênio também é considerado EROS, mas não é considerado um radical livre (HALLIWELL et al., 2007).

As EROS são produzidas dentro do folículo e possuem um papel essencial na ruptura folicular, além de agirem como segundas mensageiras na modulação da expressão de genes que regulam processos fisiológicos na maturação do oócito (TAMURA et al., 2012). No entanto o excesso de EROS produzidas pode ser responsável por causar o estresse oxidativo, danificando as moléculas e estruturas dos oócitos bem como as células da granulosa no folículo. As EROS devem ser continuamente desativadas, para manter apenas a pequena quantidade necessária à função celular normal (FATEHI et al., 2005). Componentes foliculares, células do *cumulus* e fluido folicular podem proteger os oócitos contra os efeitos prejudiciais das EROS. Também é conhecido que as enzimas antioxidantes endógenas e os antioxidantes não enzimáticos estão presentes nos folículos e são responsáveis por combater ou reduzir as EROS. A falha ou deficiência dessas defesas podem resultar na acumulação de EROS e o desenvolvimento do estresse oxidativo, causando danos aos oócitos (GUERIN et al., 2001).

As EROS, como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são conhecidas por serem prejudiciais para os oócitos. Elas causam

degradação dos lipídeos da membrana celular, destruição do DNA, indução de bloco de duas células, apoptose e inibição da fertilização. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo excessivo pode ser uma das causas de má qualidade dos oócitos e que o equilíbrio entre as EROS e os antioxidantes dentro do folículo pode ser necessário para a maturação oocitária (TAMURA et al., 2012).

3.3.2. Estresse oxidativo na produção *in vitro*

O metabolismo celular normal produz espécies reativas, as quais regulam diversas funções (DENNERY, 2007). Há relatos do envolvimento das EROS em concentrações fisiológicas na maturação oocitária (HAMMADEH et al., 2008), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (AGARWAL e ALLAMANENI, 2004; FUJII et al., 2005; MORADO et al., 2009). A primeira retomada da meiose é induzida por um aumento de espécies reativas de oxigênio e inibida por agentes antioxidantes, indicando que a geração desses radicais livres pelo folículo é um importante promotor da sequência ovulatória (TAKAMI et al., 2000). No ovário, as EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são geradas dentro do microambiente folicular ao redor do oócito e das células somáticas, regulando a função ovariana através de vias de sinalização bioquímicas e moleculares (DEVINE et al., 2012)

O equilíbrio entre a produção de EROS e a ação de antioxidantes é um fator importante para maturação dos oócitos e fertilização (TAMURA, 2009). Tem sido relatado que o estresse oxidativo também pode ser um importante mecanismo envolvido nos efeitos tóxicos de procedimentos de criopreservação, podendo desencadear a cascata de apoptose que conduz a uma redução na sobrevivência e taxa de desenvolvimento de gametas e embriões (MARTINO et al., 2012). A produção de EROS é aumentada quando oócitos em maturação e embriões em estágio inicial de clivagem são expostos ao choque térmico *in vitro* (SAKATANI et al., 2004; NABENISHI et al., 2012).

Devido à produção de radicais livres ser um processo contínuo *in vivo*, as células desenvolvem mecanismos de defesa antioxidante, que têm como objetivo neutralizar as espécies reativas de oxigênio e seus efeitos. Uma forma de minimizar os efeitos deletérios da formação de radicais livres durante o cultivo *in vitro* é a suplementação de antioxidantes nos meios de cultivo (SILVA et al., 2011)

3.3.3. Antioxidantes

Um antioxidante é qualquer molécula que presente em pequenas concentrações é capaz de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato, sendo este qualquer molécula presente no ser vivo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Tendo em vista que o ambiente natural de oócitos e embriões é rico em agentes antioxidantes, e quando cultivados *in vitro* são privados do sistema de defesa existente no fluido folicular e na tuba uterina (GARDINER e REED, 1995), a adição de antioxidantes no meio de cultivo confere uma redução dos danos nas membranas celulares, promovendo proteção aos oócitos e embriões submetidos ao estresse oxidativo (ALVAREZ e MORAES, 2006).

A ação antioxidante que tem como função a remoção das espécies reativas de oxigênio, e pode ser desempenhada das formas: enzimática e não enzimática. Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes envolvem o superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase, enquanto que os não enzimáticos são as vitaminas C e E, carotenoides, antioxidantes tióis, flavonoides naturais, melatonina, entre outros (CUNHA, 2014).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a melatonina tem apresentado uma potente ação contra o estresse oxidativo gerado na produção *in vitro* de embriões, levando a melhoria na qualidade embrionária (TAMURA et al., 2008; ASGARI et al., 2012; WANG et al., 2014).

3.4. Melatonina

3.4.1. Síntese da melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, como também em outros locais: retina, glândula lacrimal extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário (HARDELAND et al., 1993; HUETHER, 1993; ITOH et al., 1999).

Foi descoberta por Aron B. Lerner no ano de 1958, em glândulas pituitárias bovinas e posteriormente identificada como um modulador de humor, sono, comportamento sexual e ritmo circadiano. É sintetizada por células parênquimais em resposta à luminosidade reconhecida pelo eixo-hipotálamo. A informação chega no núcleo supraquiasmático hipotalâmico, responsável pela organização temporal dos diversos eventos fisiológicos e comportamentais. A tradução desse sinal possibilita a sincronização das fases do relógio circadiano com o ciclo claro/escuro. A informação relacionada ao tempo passa pelo sistema nervoso central (SNC) para o gânglio cervical superior e finalmente chega a glândula pineal. Esse caminho é estimulado durante a noite e a atividade do gânglio cervical central é inibida pela luminosidade (ASSIS, 2014).

Na glândula pineal, a via biossintética da melatonina inicia com a conversão do triptofano em 5- hidroxitriptofano por intermédio da ação da triptofano-5-hidroxilase (T-5-H), seguido da enzima 5-hidroxitriptofano em serotonina, que é convertida em N- acetilserotonina através de uma reação de acetilação da enzima N- acetiltransferase (AANAT), produzindo N-acetil serotonina (NAS). Por fim, a enzima citosólica hidroxindol -O- metiltransferase,

atualmente denominada acetilserotonina O- metiltransferase (ASMT), catalisa a reação de metilação para a formação da melatonina (REITER et al., 2009).

3.4.2. Ação antioxidante da melatonina

Dentre as funções de melatonina pode-se citar que é um potente antioxidante, atuando tanto por via direta ao neutralizar espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, quanto por via indireta através de receptores de membrana estimulando enzimas antioxidantes, as quais atuarão na prevenção dos danos macromoleculares em todos os órgãos e porções celulares (TAMURA et al., 2009) (HARDELAND et al., 2011). Além de atuar no sentido de aliviar o envelhecimento do oócito produzido *in vitro*, que é provocado pelo estresse oxidativo, a melatonina é capaz de retardar o início da apoptose e evitar a fragmentação celular (LORD et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da melatonina estão no fato de tratar-se de uma molécula altamente eletroreativa. Ela age primeiramente como um poderoso doador de elétrons e detoxifica espécies de oxigênio eletrodeficiente (VIJAYALAXMI et al., 2002). A atuação direta da melatonina envolve a formação de metabólitos com excelente capacidade antioxidante, podendo ser em alguns casos até mesmo superiores a ela (GALANO et al., 2013).

Conforme constatado para outras substâncias, estudos *in vitro* indicam que dependendo da concentração, a melatonina poderá apresentar atividade antioxidante ou pró-oxidante (VIJAYALAXMI et al., 2004). Em condições fisiológicas, a melatonina regula a expressão de genes de importantes enzimas antioxidantes, as quais estão envolvidas no metabolismo de derivados oxidativos prejudiciais às moléculas celulares, ou ainda induzem a síntese de outros antioxidantes endógenos como a glutathione peroxidase, a catalase e a SOD (RODRIGUEZ et al., 2004). Tais eventos mantêm a estabilidade da membrana celular promovendo a proteção do DNA mitocondrial e nuclear, dos ácidos graxos, e das proteínas contra os danos induzidos pela peroxidação lipídica (GARCIA et al., 1997; REITER et al., 2000). Além de todos esses eventos, os quais impedem que as células sofram apoptose, a melatonina enquanto antiapoptótica, ainda é capaz de reparar com alta eficiência os danos da molécula de DNA causados pela radiação de íons ou exposição de drogas tóxicas (SLIWINSKA et al., 2007).

3.4.3. Melatonina como antioxidante na produção *in vitro*

Como a melatonina tem papel antioxidante, atua sobre células da granulosa e está presente no fluido folicular, alguns estudos também avaliaram seu papel em condições de cultivo *in vitro*. Ela melhorou as condições de maturação oocitária ou apresentou um efeito positivo sobre embriões em várias espécies como camundongos (NA et al., 2005; TAMURA et

al., 2009), ovinos (ABECIA et al., 2002), suínos (CHOI et al., 2008; KANG et al., 2009), humanos (PARK et al., 2006) e búfalos (MANJUNATHA et al., 2009).

Quando a melatonina foi adicionada ao meio de maturação *in vitro* dos oócitos Tsantarliotou et al. (2007) não observaram nenhum efeito sobre a maturação nuclear ou o desenvolvimento embrionário, respectivamente. Em 2010 nos estudos feitos por Takada et al. também não foi observado o efeito da melatonina na maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação ou desenvolvimento embrionário, porém eles relataram que o uso de melatonina sem a presença de gonadotropinas durante a MIV resultou em maturação e desenvolvimento similares ao observado quando se usa apenas gonadotropina, sugerindo que a melatonina possa substituir os hormônios gonadotróficos na maturação. De qualquer forma, há poucos estudos que relatam a ação da melatonina quando adicionada aos meios de cultivo *in vitro* na produção *in vitro* na espécie bovina, devendo seu mecanismo de ação ser melhor estudado para desenvolver protocolos adequados para produção *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética

Os métodos e procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal- CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 14/2016 aprovado em 05/08/2016, para a execução da pesquisa, atendendo as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CRMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

4.2. Local do Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Os ovários foram coletados no abatedouro municipal DA Vital, localizado na BR – 135 no km 03, em São Luís - MA.

4.3. Grupos Experimentais

Os complexos *cumulus-oócito* (CCOs) viáveis foram distribuídos entre os tratamentos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} Mol/L de Melatonina. O experimento foi dividido em duas fases, onde a primeira avaliou o efeito de diferentes concentrações de melatonina (tratamentos) sobre a taxa de maturação dos CCOs, utilizando 453 complexos *cumulus- oócitos* (CCOs) viáveis no experimento e em seguida foram distribuídos 116, 101, 113 e 126 CCOs para os grupos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} μ M de Melatonina, respectivamente e a segunda o efeito dos tratamentos com melatonina sobre a produção in vitro de embriões bovino, utilizando 299 complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) viáveis do experimento e em seguida foram distribuídos 83, 77, 88 e 51 CCOs para os grupos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} μ M de Melatonina.

4.4. Produção in vitro de embriões bovinos

4.4.1. Punção folicular ou “*Ovum Pick-Up*” (OPU)

Os ovários foram transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução fisiológica 0,9% a uma temperatura de 37°C, com 10% gentamicina. No laboratório, os ovários foram lavados com solução fisiológica 0,9% a 37°C e os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos medindo entre 2 a 6 mm, utilizando agulha descartáveis 25 x 8 mm (21G), acoplado a uma seringa de 10 mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15 mL em Banho-Maria a 37°C, durante 20 minutos para sedimentação.

O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x20 mm para pesquisa sob um estereomicroscópio. Os complexos *cumulus-oócito* selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção (Medium 199 (1x) com sais de Hanks'), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I,

II, III e IV (LEIDFRIED e FIRST 1979). Somente os CCOs de grau I e II, foram selecionados para maturação.

4.4.2. Maturação in vitro (MIV)

Os complexos *cumulus-oócito* (CCOs) foram lavados três vezes em gotas contendo meio de maturação in vitro (MIV) em placas de Petri de 100 x 20 mm, sendo em seguida transferidos para microgotas contendo 100 µL de meio de MIV em placas de Petri de 60 x 15 mm, enumeradas e contendo quatro gotas de MIV recobertas por óleo mineral (SIGMA-ALDRICH, EUA), à temperatura de 38,8°C, em atmosfera gasosa de 5% de CO² por 24 h. Este protocolo de maturação in vitro dos CCOS, foi utilizado na primeira e segunda fase.

4.4.2.1. Efeito da melatonina na maturação oocitária

A melatonina foi diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido), na concentração de 1mg/mL e estocada a -20°C em tubos criogênicos de 1 mL, conforme os tratamentos. Na primeira fase, a melatonina foi acrescida a microgota (de acordo com os tratamentos) contendo meio de maturação.

Após 24 horas, os complexos *cumulus-oócito* (CCOs) foram mantidos por 10 minutos em uma placa NUNCLON®, contendo 400 µL de meio de desnudamento (1 mL de TQC Holding + 10 mg/mL de hialuronidase), em seguida CCOs sofreram agitação mecânica para retirada das células do *cumulus*, avaliados em estereoscópico, para extrusão do primeiro corpúsculo polar.

4.4.3. Fecundação in vitro (FIV)

Na segunda fase, os CCOs foram maturados durante 24 horas, as estruturas passaram quatro vezes por banhos de 50 µL de meio de fecundação suplementado com 50 µL de heparina e 25 µL de solução PHE. O sêmen foi proveniente de uma única partida de touro Gir Leiteiro e foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos e depositado em um eppendorf de 1,5 mL sobre o gradiente de Percoll, submetido a uma força de centrifugação de 251xG durante 10 minutos. Um volume de 10 µL foi retirado para avaliação da motilidade e vigor inicial.

Após a centrifugação, os espermatozoides no fundo do tubo criogênico foram aspirados e colocados em 1,0 mL de meio FIV sendo submetidos novamente à centrifugação a 251xG por 5 minutos. Após a segunda centrifugação, o excesso de meio FIV foi retirado. Uma amostra de 10 µL foi utilizada para avaliação final da motilidade e vigor espermático.

Em seguida, foi removido 5,0 µL da suspensão e adicionado em 95 µL de água para a determinação da concentração espermática pela contagem das células espermáticas em câmara de Neubauer. A concentração espermática final foi ajustada para 25 x 10⁶ espermatozoides

vivos/mL. Posteriormente, os CCOs e os sptz foram coincubados em temperatura de 38,8°C por 18 a 22 h, em 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

4.4.4. Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram lavados por quatro vezes em gotas de meio SOF e depositados em gotas de 100 µL, recobertas por óleo mineral. A avaliação do desenvolvimento dos blastocistos ocorreu a partir de sete dias (**D7**) após o início da fecundação (**D0**).

4.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento ocorreu inteiramente ao acaso com quatro tratamentos (Controle, 10⁻¹, 10⁻³ e 10⁻⁵ µM de Melatonina) em 100 repetições (número de CCOs).

As variáveis estudadas (taxa de maturação, taxa de clivagem, taxa de blastocisto, proporção dos estádios de desenvolvimento e qualidade embrionária) foram submetidas ao teste de normalidade; os dados normais e os normalizados mediante transformações matemáticas (logarítmica, arco, seno) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou ao teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias, na probabilidade de 5%.

Dados qualitativos foram comparados pelo teste do χ^2 , para $p < 0,05$. As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRIMEIRA FASE: Efeito da melatonina sobre a taxa de maturação dos complexos *cumulus*- oócitos (CCOs)

Quanto a taxa de maturação dos CCOs cultivados *in vitro*, observou-se que o grupo de 0 μM de melatonina (49,14%) foi superior em relação as concentrações 10^{-1} μM (17,82%) e 10^{-5} μM (29,27%), entretanto não houve diferença ($P < 0,05$) em relação a concentração 10^{-3} μM (45,13%), conforme mostra na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de maturação oocitária cultivados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de melatonina e total de complexos *cumulus*- oócitos (CCOs) utilizados por tratamento.

	0 μM	10^{-1} μM	10^{-3} μM	10^{-5} μM
TAXA DE MATURAÇÃO	49,14%(116/57) ^A	17,82%(101/18) ^B	45,13%(113/51) ^A	29,27%(126/36) ^B

Números seguidos de letras maiúsculas desiguais na linha diferem pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Estes resultados são semelhantes aos resultados de Cunha (2014), que após 24h depois da maturação *in vitro*, obteve taxa de maturação 69,3% no grupo controle, utilizando 56 oócitos, já nos grupos utilizando a melatonina na concentração de 10^{-9} M e 10^{-6} M, obteve taxa de maturação de 50,7% (33 oócitos) e 66,6% (41 oócitos), respectivamente. Observando que o efeito da melatonina na maior concentração foi similar aos grupos controle ($P > 0,05$), visto que no presente estudo observou-se que não houve diferença significativa do grupo controle com o grupo tratado com maior concentração de melatonina ($P > 0,05$).

Semelhantes também aos os estudos de Ascari (2016), utilizando 0, 10^{-6} e 10^{-4} M de melatonina, obtendo taxa de maturação de 65,5%, 62,2% e 67,6%, respectivamente, observando que não teve diferença entre os tratamentos após 24h de maturação *in vitro* ($P > 0,05$). Takada (2008) após 24h de maturação *in vitro*, utilizando 0 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de melatonina, obteve taxa de maturação de 66%, 18% e 66,46% respectivamente, e também relatou que não teve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$).

De acordo com Manjunatha et al. (2009) utilizaram 20 μM e 50 μM de melatonina no meio de maturação de oócitos bubalinos, obtiveram maiores percentuais de maturação oocitária (90,3% e 88,8%, respectivamente), relatando um efeito estimulatório da melatonina sobre a maturação *in vitro*, diferindo do presente estudo.

Nos poucos estudos em bovinos, a melatonina adicionada durante a MIV não apresentou efeito evidente sobre a maturação como relatado por Takada et al. (2010), o que está de acordo

com nossos resultados. Entretanto diferem de EL- Raey et al. (2011) que utilizaram a melatonina e houve um estímulo a maturação.

5.2. SEGUNDA FASE: Efeito da melatonina sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

As taxas de clivagem dos grupos em estudo são representadas na Tabela 2. Os grupos controle, 10^{-3} μ M e 10^{-5} μ M obtiveram respectivamente 38,6%, 40,9% e 40,0% na taxa de clivagem *in vitro* no D3 não havendo diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O grupo 10^{-1} (19,5%) diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) dos demais grupos.

Tabela 2. Taxa de clivagem de CCOs oriundos de ovários *post-mortem* coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.

	Número de CCOs	Taxa de Clivagem	
		N	%
0 μ M	83	32	38,6 ^a
10^{-1} μ M	77	15	19,5 ^b
10^{-3} μ M	88	36	40,9 ^a
10^{-5} μ M	51	25	40,0 ^a

Números seguidos de letras minúsculas desiguais na coluna diferem pelo teste do χ^2 ($P < 0,05$).

Estes resultados corroboram com Mota et al., 2014, que relataram que não houve diferença na taxa de clivagem ($p < 0,05$), utilizando 0 μ M e 100 μ M de melatonina no meio MIV, onde obtiveram 36,44 % para o primeiro tratamento e 32,93 % para o segundo tratamento. Entretanto diferem de Marques (2016), que adicionou melatonina ao meio de maturação nas concentrações de 0, 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11} M, obtendo 75,6%, 74,6%, 88,9% e 83,1% respectivamente, relatando ainda que houve aumento significativo na taxa de clivagem nas concentrações de 10^{-9} com 17,6% e 10^{-11} com 9,9%. Similarmente a Tian et al. 2014, que encontraram melhores resultados na maturação de oócitos bovinos nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-9} M, assim como o aumento na expressão de genes relacionados à maturação ovocitária (GDF9, MARF1, DNMT1a) e à expansão das células do cumulus (PTX3, HAS1/2) devido a presença de receptores para melatonina encontrados nos ovócitos, células do *cumulus* e células da granulosa.

Os resultados observados no presente trabalho corroboram com alguns autores que utilizaram melatonina durante a MIV de oócitos bovinos maturados em condições convencionais e não observaram diferença na clivagem (TAKADA et al., 2010; TAKADA et al., 2012). Esse fato talvez não esteja relacionado à ação ineficiente do hormônio em si, mas sim à curta exposição dos oócitos durante a MIV, já que os trabalhos em que o hormônio foi

adicionado ao meio CIV de embriões bovinos (WANG et al., 2014), bubalinos (MANJUNATHA et al., 2009) ou suínos (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007) resultaram em maiores percentuais de produção embrionária.

Embora Ishizuka et al. (2000) informaram um efeito positivo da melatonina em embriões de camundongos em desenvolvimento, os resultados descritos por Rodriguez- Osório, Kim e Wang (2007) não mostraram diferença estatística significativa na taxa de clivagem.

As taxas de blastocistos são representadas na Tabela 3, o grupo 10^{-5} μM (35,3%) foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) aos demais grupos em estudo. Foi obtida taxas de 18,1%, 7,8% e 9,1% dos grupos Controle, 10^{-1} μM e 10^{-3} μM respectivamente, não diferindo entre si ($P < 0,05$).

Tabela 3. Taxa de blastocistos produzidos *in vitro* a partir de CCOs oriundos de ovários *post-mortem* coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.

	Número de CCOs	Taxa de blastocistos	
		N	%
0 μM	83	15	18,1 ^b
10^{-1} μM	77	6	7,8 ^b
10^{-3} μM	88	8	9,1 ^b
10^{-5} μM	51	18	35,3 ^a

Números seguidos de letras minúsculas desiguais na coluna diferem pelo teste do χ^2 ($P < 0,05$).

Diferindo de Marques (2016), que ao adicionar a melatonina no meio de maturação não observou diferença estatística sobre a produção de blastocistos, utilizando melatonina nas concentrações de 0, 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11} M, porém foi observado que na concentração de 10^{-9} M obteve-se maior taxa de blastocisto. O presente estudo também difere de Ascari (2016) que relatou que não houve influência da adição da melatonina em meio MIV sobre a taxa de blastocistos no D7 e D8 em relação ao número total de oócitos, onde relatou que esse resultado provavelmente se deve ao fato de que a melatonina quando adicionada ao meio MIV não possui capacidade suficiente para ocasionar alterações no oócito, que sejam capazes de influenciar na produção de blastocistos.

Assis (2014) ao utilizar 0, 25, 50 e 100 ng/mL de melatonina, observou a taxa de blastocisto no D8 e identificou um efeito quadrático da dose de melatonina, onde a dose de 50 ng/mL apresentou taxa de blastocisto mais alta do que o grupo controle. Tian et al, 2017, avaliando taxa de blastocisto em pequenos ruminantes com suplementação de melatonina no meio MIV nas concentrações de 0, 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11} M, relataram que os oócitos

tratados com 10^{-7} M tiveram maior taxa de blastocisto (15,0% versus 4,5%) do que os oócitos do grupo controle ($P < 0,05$). E oócitos tratados com 10^{-5} e 10^{-11} M de melatonina desenvolveu taxa de blastocisto maior do que grupo controle e grupo tratado com 10^{-3} M ($P < 0,05$).

A qualidade dos oócitos e do embrião é crítica para a PIV, o aumento do número médio de células/blastocistos representa uma melhoria na mitose e na implantação embrionária, sendo que a qualidade oocitária/embrionária reduzida está diretamente associada ao baixo potencial de desenvolvimento do embrião (TIAN et al., 2014).

As taxas de desenvolvimento embrionário baseado no estágio de desenvolvimento *in vitro* são representadas na Tabela 4. Na proporção de mórulas, o grupo 10^{-3} μ M foi superior a taxa de obtida pelo grupo 10^{-5} μ M e semelhante aos grupos Controle e 10^{-1} μ M ($P < 0,05$). Os grupos Controle, 10^{-1} μ M e 10^{-5} μ M foram semelhantes entre si ($P < 0,05$).

Tabela 4. Taxa de desenvolvimento embrionário com base no estágio de desenvolvimento *in vitro* a partir de CCOs oriundos de ovários *post-mortem* coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.

	Mórula	Blastocisto Inicial	Blastocisto	Blastocisto Expandido	TOTAL
0 μM	15(50,0%) ^{ab}	7 (23,3%) ^{ab}	6 (20,0%) ^a	2 (6,7%) ^a	30
10^{-1} μM	9 (60,0%) ^{ab}	4 (26,7%) ^{ab}	1 (6,7%) ^a	1 (6,7%) ^a	15
10^{-3} μM	23 (74,2%) ^a	3 (9,7%) ^b	4 (12,9%) ^a	1 (3,2%) ^a	31
10^{-5} μM	9 (33,3%) ^b	12 (44,4%) ^a	4 (14,8%) ^a	2 (7,4%) ^a	27
TOTAL	56	26	15	6	

Números seguidos de letras minúsculas desiguais na coluna diferem pelo teste do χ^2 ($P < 0,05$).

Na proporção de blastocistos iniciais, os grupos 10^{-5} μ M, Controle e 10^{-1} μ M não apresentaram diferença entre si ($P < 0,05$), porém o grupo 10^{-5} μ M apresentou superioridade ao grupo 10^{-3} μ M ($P < 0,05$). Os grupos Controle, 10^{-1} μ M e 10^{-3} μ M foram semelhantes entre si ($P < 0,05$).

Na obtenção de blastocistos e blastocistos expandidos não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre todos os grupos experimentais.

Estes estudos corroboram com Takada (2008), avaliando o desenvolvimento embrionário no D7 (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) relatou que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos com melatonina comparado ao grupo controle. Ascari (2016), em seus estudos, também relatou que não houve diferença estatística

quanto ao desenvolvimento embrionário ($P>0,05$) entre os grupos tratados com melatonina e o grupo não-tratado com melatonina.

Estes resultados, além de confirmar o que foi postulado em pesquisas as quais demonstraram que a expansão das células do *cumulus* não constitui um fator condicionador do desenvolvimento embrionário *in vitro* (LUCIANO et al., 1999; ALI; SIRARD, 2002), também mostra que a melatonina quando adicionada ao meio de maturação pode suportar o desenvolvimento embrionário produzindo taxas de blastocistos equivalentes ao sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos.

O efeito da melatonina no desenvolvimento de embriões pode ser provocado pela sua ação como um antioxidante. Papis et al. (2007) demonstraram que os efeitos benéficos da melatonina no desenvolvimento embrionário bovino não foram observados em um ambiente de baixo teor de oxigênio, mas sim em um ambiente com elevada tensão de oxigênio, em que os radicais livres são produzidos facilmente. Em alguns estudos realizados *in vitro* ou *in vivo*, não foi observado efeito prejudicial da melatonina no desenvolvimento embrionário e nem quanto à toxicidade analisada (McELHINNY; DAVIS; WARNER, 1996; JAHNKE et al., 1999).

6. CONCLUSÃO

Dessa forma, a melatonina suplementada no meio de maturação *in vitro* não evidenciou melhoras na taxa de maturação dos complexos *cumulus*-*oócitos* (CCOs) cultivados *in vitro*. Assim como não evidenciou melhoras na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário, porém mostrou-se eficiente na produção de blastocistos de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ, F.; XU, J.; GOLDBERG, J.; DESAI, N. Vitrification in open and closed carriers at diferente cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. **BMC Biotechnology**, p. 11-29, 2011.
- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonina on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 151-158, 2002.
- ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARDZ, K. R., LEAL, C. L. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Science Reproduction**, v. 104, p. 389-397, 2008.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S.R. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive Biomedicine Online**, v.9, p. 338-347, 2004.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**; v.66, p. 901-905, 2002.
- ALMEIDA, C. D. Ultrassonografia ovariana e concentrações séricas de progesterona em novilhas holandesas, Gir e mestiças holandesas – Gir. **Tese de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa – MG, 1998.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.1, p. 42-51, 2006.
- ASCARI, I. J. Adição do fator de crescimento semelhante à insulina-I ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2016.
- ASGARI, Z.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; BAHADORI, M. H. The effect of melatonina on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. **Cell Journal**, v. 14, n. 3, p. 203-208, 2012.

ASSIS, P. M. Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e a ação antioxidante. **Dissertação (Mestrado)**- Universidade de São Paulo, 2014.

ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; HAIPECK, K.; LIMA, A. L.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.149-156, 2002.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.

BORGES, A. M. Dinâmica folicular e superovulação em novilhas mestiças tratadas com somatotropina bovina (rBST) e efeito da temperatura na qualidade dos embriões. **Dissertação**- Universidade Federal de Viçosa, 1999.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

BRACKETT, R. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Systems *in vitro* development of immature oocytes of mammals. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n.1, p.37-49, 2010.

CHOI, J.; PARK, S. M.; LEE, E.; KIM, J. H.; JEONG, Y. I.; LEE, J. Y.; PARK, S. W.; KIM, H. S.; HOSSEIN, M. S.; WOO, J. Y. W.; KIM, S.; HYUN, S. H.; HWANG, W. S. Anti-apoptotic effect of melatonina on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1127-1135, 2008.

CRUZ, M. H. C.; LEAL, C. L.; CRUZ, J. F.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. **Theriogenology** 82:925-932. 2014 a.

CRUZ, M. H. C.; LEAL, C. L.; CRUZ, J. F.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. **Animal Reproduction Science**. 45: 150-160. 2014 b.

CUNHA, M. C. R. V. A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Dissertação (mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia De Alimentos- Universidade de São Paulo, 2014.

DAYAN, A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. 56f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, V.81, P. 155-162, 2007.

DE LOOS, F.; KASTROF, P.; VAN BENEDEN, T. H.; KRUIPT, T. A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine *cumulus oocyte* complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, p.255-259, 1991.

DEVINE, P. J.; PEREEAULT, S. D.; LUDERER, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. **Biology of Reproduction**, v.86 (2), p. 1-10. 2012.

DURANTHON, V.; WATSON, J. A.; LONERGAN, P. Pre implantation embryo programming: transcription epigenetics and culture environment. **Reproduction**, 135: 141-150, 2008.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E.; NAGAI, T. Evidence of melatonina synthesis in the *cumulus oocyte* complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, p.250-62, 2011.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live Young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.41, p. 268-276, 1989.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, 2001.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERST, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of *cumulus cells* during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, p.177-185, 2005.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, R. A. N.; AMORIM C. A. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais MOIFOPA **Biotécnicas Aplicada a Reprodução Animal** v.1; cap. 11, p. 227-260, 2002.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p. 43, 2005.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 245-257, 2013.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHNER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, p.395-401, 2000.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: **I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, PR. Anais... SIRAA: Londrina, p.223-230, 2004.

GARCIA, J. J.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M.; ESCAMES, G.; YU, B. P.; OH, C. S.; MUNOZ-HOYOS, H. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 408, p. 297-300, 1997.

GARDINER, C. S.; REED, D. J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 30-36, 1995.

GUERIN, P. E. L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against re active oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v.7, p.175-189, 2001.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405-419, 1994.

GILCHRIST, R. B.; LAN, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus cell* function and oocyte quality. **Human Reproduction**, v.14, p. 159-177, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. B.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, p. 395, 2008.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1 ed. **Cambridge: University Press**, p. 639, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. Ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2007.

HAMMADEH, N.; COOMARASAMY, A.; OLA, B.; PAPAIOANNOU, S.; AFNAN, M.; SHARIF, K. Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves outcome in IVF: a randomized controlled trial. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1113-1117, 2008.

HARDELAND, R.; REITER, R.; POEGGELER, B. & TAN, D. X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 17 (3): 347–357, 1993.

HARDELAND, R. R. et al. Melatonin- a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93 (3), p. 350-84, 2011.

HESS, K. A.; CHEN, L.; LARSEN, W. J. Inter- alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the *cumulus* extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v.6, p. 436-443, 1999.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**. v. 124, p. 43-101, 1991.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 23-32, 1997.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal site of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia**. 49: 665–670, 1993.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p.119-121, 1977.

ISHIZUKA, B., et al., M. The effect of melatonina on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**; v. 28, p. 48-51, 2000.

ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A. & SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**. 5 (5): 402–408, 1999.

JAHNKE, G., et al. Maternal and development toxicity evaluation of melatonina administered melatonin affects bovine embryo development 325 orally to pregnant Sprague- Dawley rats. **Toxicological Sciences**; v. 50: p. 271-279, 1999.

KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Effects of melatonina on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonina receptor RNA in *cumulus* and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v. 46, p. 22-28, 2009.

KUMAR, A.; MEHROTRA, S.; NARAYANAN, K.; DAS, G. K., SONI, Y. K.; SINGH, M.; MAHLA, A. S.; SRIVASTAVA, N.; VERMA, M. R. Sustained delivery of exogenous

melatonin influences biomarkers of oxidative stress and total antioxidant capacity in summer-stressed anestrus water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology** 83:1402-1407. 2015.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p.76-86, 1979.

LOIOLA, M.V.G. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal** (Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade Federal da Bahia- Salvador, 2013.

LORD, T.; AITKEN, R. J. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. **Reproduction**, v. 146, p. R217- R227, 2013.

LONERGAN P.; MONAGHAN P.; RIZOS D.; BOLAND M. P.; GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259-267, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*- produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, n.1, p. 17-22, 2008.

LUCIANO, A. M., et al., Effect of diferente levels of intracelular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subseguente development following *in vitro* fertilization. **Molecular Reproduction and Development**; v. 54, p. 86-91, 1999.

MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S. S; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on Buffalo *in vitro* embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 12-16, 2009.

MARQUES, T. C. Alternativas para melhorar o desenvolvimento e a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Tese (Doutorado)**- Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2016.

MARTINO, N. A. et al. Oocyte mitochondrial bioenergy potential and oxidative stress: within-/between-subject, *in vivo* versus *in vitro* maturation, and age-related variations in a sheep model. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 97, n. 3, p. 720-728, 2012.

MATZUK, M. M; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p. 2178-2190, 2002.

MCELHINNY, A. S., DAVIS, F. C.; WARNER, C. M. The effect of melatonin on cleavage rate of C57BL/6 and CBA/Ca preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Journal Pineal Research**; v. 21: p. 44-48, 1996.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; HELCIMAR BARBOSA PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M.D.; CHITWOOD, J.L.; ANNES, K.; SOARES, C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E.; ROSS, P. J. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v83, p324-36, 2016.

MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. **Animal Science Reproduction**, v.42, p.361-369, 1996.

MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p. 608-614, 2009.

MOTA, L. H. C. M.; BARÇANTE, F. P. S.; SOUZA, I. O. T.; CARVALHO, Y. N. T.; SOUSA, S. R. S.; SOUZA, J. A. T. Avaliação do efeito da melatonina sobre o grau de qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, 2014.

NA, K.; KIM, J.; LEE, J.; YOON, T.; CHA, K.; LEE, D. Effect of melatonina on the maturation of mouse GV oocyte and apoptosis of *cumulus* cells *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 84, 103p., 2005.

NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 79, n. 1, p. 31-40, 2012.

- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in pre implantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequeute development. **Theriogenology**, 53: 21-34. 2000.
- PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J.A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 321-326, 2007.
- PARK, E.; LEE, D.; CHO, J.; HAN, J.; CHA, K.; YOON, T. Addition of melatonina *in vitro* maturation (IVM) medium icreases maturation and fertilization of immature human oocyte. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 168, 2006.
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 5, p. 193-210, 2001.
- OLIVEIRA, M. M. N. F. Dinâmica folicular ovariana e características reprodutivas de vacas leiteiras no pós -parto após tratamentos com busarelina e cloprostenol. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 87p. **Dissertação** - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- REIS, A. R. S.; REYES, A.; GAMBARINI, M. L.; RUMPF, R. Dinâmica folicular por ultrasonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 13 (2), p. 51-55, 2005.
- REITER, R. J. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. **News in Physiological Sciences**. v. 15, p. 246-250, 2000.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 445-456, 2009.
- RICHARDS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on folicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.
- RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLIN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidante enzymes: A significant role for melatonina. **Journal of Pineal Research**. V. 36, p. 1-9, 2004.

RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KIM, I. J.; WANG, H., et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 283-288, 2007.

SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 67, n. 1, p. 77-82, 2004.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERVNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal *Ovum Pick-Up* (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Patter of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction And Fertility**, v.83, p.71-663, 1988.

SILVA, L. K. X.; REIS, A. N.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; SOUZA, A. J. O.; VALE, W. G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63 (1), p. 74-80, 2011.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308 317, 1988.

SLIWINSKA- KOWALSKA, M.; PRASHER, D.; RODRIGUES, C.A. Ototoxicity of organic solvents- from scientific evidence to health policy. **Occupational Medicine and Environmental Health**. 20 (2): 215-222. 2007.

SMETANINA, I.G.; TATARINOVA, L.V.; KRIVOKHARDCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Ontogenez**, v.31, p.139-143, 2000.

TAKADA, L. Efeito da melatonina sobre a maturação de ovócitos em sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo, 2008.

TAKADA, L.; MARTINS JUN, R. A.; MINGOT, G. Z.; BALIEIRO, J. C. B; COELHO, L. A. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates

and DNA damage of bovine embryos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 393-398, 2010.

TAKADA, L. et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine *cumulus* cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. **Research in Veterinary Science**, London, v. 92, n. 1, p. 124-127, 2012.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**. 58:1-9. 2012.

TAKAMI, M.; PRESTON, S.; BEHRMAN, H. R. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**, v.278, p.646-650, 2000.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p. 280-287, 2008.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 328-343, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v.5, p.1757-2215, 2012.

TAMURA, H.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, 60: 1-13. 2013.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; HEL, C. J.; ZHANG, L.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; XU, J. I. N.; JI, Y.; LIU, G. S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal Pineal Research**, 57:239-247. 2014.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LV, D.; ABULIZI, W.; WANG, X.; LIAN, Z.; LIU, G. Beneficial Effects of Melatonin on the *In Vitro*

Maturation of Sheep Oocytes and Its Relation to Melatonin Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**. 2017.

TSANTARLIOTOU, ATTANASIO, L.; DE ROSA, A.; BOCCIA, L.; PELLERANO, G.; GASPARRINI, B. The effect of melatonina on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 488-489, 2007.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J. F. *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p. 73-82, 1997.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VIJAYALAXMI; REITER R. J.; TAN, D. X.; HERMAN, T. S. & THOMAS, C. R. J. R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 59 (3): 639–653. 2004.

VIJAYALAXMI, THOMAS, C. R. J. R.; REITER, R. J. & HERMAN, T. S. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. **Journal of Clinical Oncology**. 20: 2575-2601. 2002.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, p.94-100, 1993.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHOU, Y.; TAN, D.; ZHU, S.; DAI, Y.; LIU, G. Melatonin Improves the quality of *in vitro* produced (IVP) bovine embryo: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. **PloS One**, v. 9, n.4, p. e93641, 1-7, 2014.

WEBB, R, et al., Molecular mechanisms regulation follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 54, p. 33-48, 1999.

ZHANG, H.; WU, B.; LIU, H.; QIU, M.; LIU, J.; ZHANG, Y.; QUAN, F. Improving development of cloned goat embryos by supplementing a-lipoic acid to oocyte *in vitro* maturation médium. **Theriogenology** 80:228-233. 2013.