



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ALAN DA SILVA LIRA

Efeito da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos

São Luís – MA
2018

ALAN DA SILVA LIRA

Efeito da melatonina na produção in vitro de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução Animal

Área de Concentração: Reprodução e Conservação Animal

Orientador : Prof Drº Ricardo de Macêdo Chaves

Coorientador: Prof.Drº Felipe de Jesus Moraes Júnior

**São Luís – MA
2018**

ALAN DA SILVA LIRA

Efeito da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Prof. Drº Ricardo de Macêdo Chaves

Coorientador: Prof. Drº Felipe de Jesus Moraes Júnior

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Ricardo de Macêdo Chaves
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA
(Orientador)

Profª Dra. Rita de Cássia Savio Figueira
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo– FCMSCSP

Profº Dr. Hamilton Pereira Santos (suplente)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Dedico

À Deus, pela força de vencer a cada dia e a minha avó Neci por todo amor de sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que proporcionou todas batalhas da vida, bênçãos e vitórias, colocando todo potencial em determinação, esperança e fé.

Aos meus orientadores, Prof^o Dr. Ricardo de Macedo Chaves e Prof^o Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior por todo o trabalho de confiança, coragem e incentivo para a realização do projeto e principalmente, pelos ensinamentos de humildade e dedicação como profissionais do conhecimento e educação.

Aos meus pais e minhas irmãs pelo apoio moral, financeiro e a força inabalável de sempre acreditarem em mim.

A Sérgio Henrique Costa Junior, pelo altruísmo, paciência, contribuição de conhecimento e estudo, além de contribuir para que esse projeto fosse realizado.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Luciana Cordeiro Rosa, Hallef Mithchel Pereira Trovão, Brenda Karine Lima do Amaral e Breno Glaessner Gomes Fernandes de Souza pela contribuição, apoio e firme presença na execução do projeto.

Ao LABRA, pela disposição dos materiais e apoio logístico.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA por possibilitar a execução do presente estudo e pela concessão da bolsa em Mestrado.

Ao Matadouro Municipal, D.A. Vital, em especial ao Médico Veterinário Hélio Monteles, pela disponibilização dos materiais *post-mortem* para a produção de embriões *in vitro*.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos.

MATERIAIS E MÉTODO: O experimento foi conduzido no LABRA da UEMA. Os ovários foram coletados no matadouro municipal. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram distribuídos entre os tratamentos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 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 e a segunda, o efeito dos tratamentos com melatonina sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram utilizados 100 CCOs por tratamento, durante as duas fases. Somente os CCOs de Grau I e II, foram selecionados para maturação *in vitro*.

RESULTADOS: Na primeira fase, observou-se que não houve diferença significativa na taxa de maturação *in vitro* dos CCOs cultivados. Na segunda fase, as taxas de clivagem dos grupos: controle, 10^{-3} μM e 10^{-5} μM obtiveram taxas semelhantes e não houve diferença entre os tratamentos. O grupo 10^{-1} foi estatisticamente inferior. Nas taxas de blastocistos, o grupo 10^{-5} μM foi estatisticamente superior aos demais grupos em estudo, o restante dos grupos não houve diferença entre si. As taxas de desenvolvimento embrionário baseado no estágio de desenvolvimento *in vitro* observou-se que na proporção de mórulas, o grupo 10^{-3} μM foi superior a taxa de obtida pelo grupo 10^{-5} μM e semelhante aos grupos Controle e 10^{-1} μM . Os grupos Controle, 10^{-1} μM e 10^{-5} μM foram semelhantes entre si ($P < 0,05$).

CONCLUSÃO: A suplementação da melatonina no meio de maturação *in vitro* não evidenciou melhoras na taxa de maturação dos oócitos. A suplementação de melatonina na produção *in vitro* de embriões em diferentes concentrações não foi capaz de melhorar a fase pós fecundação *in vitro*, no entanto o grupo 10^{-5} μM apresentou maior taxa de clivagem, mórula e blastocistos durante o período de cultivo.

Palavras-chave: CCOS, Melatonina, PIV, Aspiração folicular

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the effects of melatonin on the *in vitro* bovine embryos production.

MATERIALS AND METHODS: The experiment was conducted at LABRA/UEMA. The ovaries were collected at the municipal slaughterhouse. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were distributed among treatments 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ of melatonin. The experiment was divided into two phases, which the first one was to evaluate the effect of different concentrations of melatonin (treatments) on the maturation rate of COCs and the second, the effect of melatonin treatments on the *in vitro* production of bovine embryos. 100 COCs were used per treatment during both phases of the experiment. Only the Grade I and II COCs were selected for *in vitro* maturation.

RESULTS: In the first phase, it was observed that there was no significant difference in the *in vitro* maturation rate of the cultivated COCs. In the second phase, the cleavage rates of the control groups, 10^{-3} μM and 10^{-5} μM obtained similar rates and there was no difference between these treatments. The 10^{-1} group was statistically lower. Concerning the blastocyst rates, the 10^{-5} μM treatment group was statistically superior to the other groups under study, the rest of the groups did not present significant difference among each other. Embryonic development rates based on *in vitro* developmental stage showed that in morulae ratio, the 10^{-3} μM group was higher than the rate obtained by the 10^{-5} μM group and similar to the Control and 10^{-1} μM groups. Control groups, 10^{-1} μM and 10^{-5} μM were similar to each other ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The supplementation of melatonin in the medium of *in vitro* maturation showed no improvement in oocyte maturation rate. Melatonin supplementation in the *in vitro* production of embryos at different concentrations was not able to improve the *in vitro* post-fertilization phase, however the 10^{-5} μM group presented more cleavage, morula, blastocysts rate during the culture period.

Keywords: COC, Melatonin, IVP, Follicular Aspiration

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Hormônios envolvidos na reprodução, sua origem, funções básicas (BARUSELI, 2007).....	18
Tabela 2. Taxa de clivagem de CCOs oriundos de ovários <i>post-mortem</i> coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.....	36
Tabela 3. Taxa de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> a partir de CCOs oriundos de ovários <i>post-mortem</i> coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.....	37
Tabela 4. Taxa de desenvolvimento embrionário com base no estágio de desenvolvimento <i>in vitro</i> a partir de CCOs oriundos de ovários <i>post-mortem</i> coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.....	38
Tabela 5. Taxa de desenvolvimento embrionário (%) de CCOs oriundos de ovários <i>post-mortem</i> coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.....	39
Tabela 6. Taxa de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> (%) com base na qualidade morfológica a partir de CCOs oriundos de ovários <i>post-mortem</i> coletados em abatedouro para a PIV de embriões, submetidos ou não a diferentes tratamentos com melatonina.....	40
Tabela 7. Taxa de maturação oocitária cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de melatonina e total de complexos <i>cumulus- oócitos</i> (CCOs) utilizados por tratamento.....	41

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µg	Unidade de Micrograma
µL	Unidade de Microlitro
µM	Unidade de Micromolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Monosfato cíclico de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
BR	Rodovia Federal do Brasil
CAP	Meio de capacitação
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> -oocitário
CEEA	Comissão de Ética e Experimentação Animal
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRMV	Conselho Regional de Medicina Veterinária
Dia 0	Dia Inicial da Fertilização <i>in vitro</i>
Dia 3	Terceiro dia após ao início da Fertilização <i>in vitro</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Unidade de Gramas
GSH	Glutationa
h	Unidade de horas
IA	Inseminação Artificial
Inc	Incorporação
Km	Unidade de Quilômetro
L	Unidade de Litro
LABRA	Laboratório de Reprodução Animal
LH	Hormônio Luteinizante
M	Unidade de Molar
MA	Estado do Maranhão
Mg	Unidade de Miligrama
min	Unidade de Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Unidade de Mililitro

Mol	Unidade de Mol
MPF	Fator de Maturação
N	Número
ng	Unidade de Nanograma
nm	Unidade de Nanômetro
°C	Unidade de Grau Celsius
OPU	Punção Folicular
P	Probabilidade
PBS	Tampão fosfato salino
PIV	Produção <i>in vitro</i>
pM	Unidade de Picomolar
pOSP	Proteína Específica do Oviduto
PVP	Hidrogel de poli(N-vinil-2-pirrolidona)
Redox	Reação de Oxidação e Redução
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
s	Unidade de segundos
SAS	Sistema de Análise Estatística
SNC	Sistema Nervoso Central
SNK	Teste Paramétrico de Student-Newman-Keuls
SOD	Superóxido Dismutase
SOF	Fluido Sintético do Oviduto
Sptz	Espermatozoides
TE	Transferência Embrionária
TQC	Controle de Qualidade Total
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
X ²	Teste do Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Regulação da reprodução das fêmeas.....	15
3.2. Tecnologias do embrião.....	19
3.2.1. Aspiração folicular e viabilidade oocitária em bovinos	19
3.2.2. Maturação oocitária	19
3.2.3. Fecundação <i>in vitro</i>	20
3.2.4. Cultivo <i>in vitro</i>	21
3.2.5. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	21
3.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio	23
3.4 Antioxidantes e ovário	25
3.5 Melatonina	28
3.6 Melatonina aplicada como antioxidante.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.2. Local.....	32
4.3. Grupos Experimentais	32
4.1 Comitê de ética	32
4.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	32
4.4.1. Punção folicular (OPU)	32
4.4.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	33
4.4.2.1 Efeito da melatonina na maturação oocitária	33
4.4.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	34
4.4.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	34

4.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PRIMEIRA FASE	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SEGUNDA FASE	38
7. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias são um conjunto de técnicas utilizadas para manipular organismos e/ou seus componentes, que está associada à biologia molecular, clonagem e a engenharia genética (WETHERINGTON, 2010). Os avanços da biotecnologia ocorreram em 1953, quando Watson e Crick apresentaram o modelo de dupla hélice do ADN, no entanto a descoberta do ADN Recombinante por Cohen e Boyer em 1973, foi fundamental para o aprimoramento de diversas tecnologias.

As biotécnicas reprodutivas respondem por significativas melhorias na produtividade e rentabilidade dos rebanhos. Estas proporcionaram o desenvolvimento de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida para humanos e animais (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009). A primeira geração inclui a inseminação artificial (IA), a criopreservação de gametas e embriões; a segunda geração compreende a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE); na terceira geração encontra-se a sexagem espermática e embrionária, a recuperação de oócitos e a produção in vitro (PIV), e a quarta geração envolve a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células-tronco (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; MERTON et al., 2003).

A PIV consiste na recuperação de oócitos imaturos de folículos ovarianos, é uma biotécnica que permite a intensificação do uso de animais de alto valor genético, obtendo resultados, comparáveis ou superiores àqueles obtidos pela tecnologia tradicional de produção in vivo de embriões (MERTON et al., 2003). Contudo, as taxas médias de embriões obtidos in vitro, ainda precisam ser estudadas visando resultados mais satisfatórios, levando em conta que a qualidade e a viabilidade dos embriões obtidos in vitro, é inferior à dos embriões obtidos in vivo (REICHENBACH, 2003).

Apesar desses fatores, em 2011 foi comunicada a produção de 350.762 embriões bovinos no Brasil, 90,7% produzidos in vitro. Isto representou um aumento de 15,7% em relação ao total de embriões produzidos em 2010 (VIANA, 2013). Em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014).

De acordo com Thompson *et al.* (2007), vários métodos de PIV são empregados para produzir embriões a partir de oócitos imaturos, levando em consideração objetivos científicos e aplicação prática. A PIV em bovinos alcança taxas médias entre 20 a 40% de desenvolvimento até estágio de blastocisto.

No contexto de biotécnicas da reprodução, a qualidade e a integridade dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) influenciam o sucesso da fertilização *in vitro*, assim como a competência do desenvolvimento até o estágio de embrião (TAKADA, 2008). Desta forma, o estresse oxidativo é um importante fator que prejudica o desenvolvimento *in vitro* dos CCOs, fertilização de embrião e cultivo embrionário. Diferentes bloqueadores de radicais livres vêm sendo estudados, visando sua proteção contra o estresse oxidativo, causado nos CCOs e nos embriões submetidos à produção *in vitro*.

Agindo como um potente antioxidante, a melatonina é um produto da secreção da glândula pineal, conhecida por modular a função ovariana em mamíferos, além das suas funções, é conhecida com uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS), evitando o estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário (TSANTARLIOTOU et al., 2007). Da mesma forma, ela pode efetivamente aliviar o envelhecimento do oócito produzido *in vitro*, provocado pelo estresse oxidativo, retardando o início da apoptose e evitando a fragmentação celular (LORD et al., 2013).

Alguns efeitos da melatonina são mediados através de receptores de membrana específicos, mas muitos deles parecem basear-se no seu potencial como um captador de radicais livres direto, em um processo que não requer nenhum receptor. A sua elevada hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade permitem a sua rápida transferência para outros órgãos e fluidos, podendo passar facilmente através das membranas celulares (TAMURA et al., 2012). A concentração de melatonina no fluido folicular humano pré-ovulatório, é três vezes maior do que no soro periférico, e aumenta dependendo do crescimento folicular (RÖNNBERG et al., 1990; NAKAMURA et al., 2003).

A presença de elevados níveis de melatonina no fluido folicular pré-ovulatório, sugere seu possível papel na aquisição de competência oocitária durante o processo de maturação. Por outro lado, como o fluido folicular durante a ovulação atinge as extremidades ampulares do oviduto, onde ocorre a fertilização, é possível que a melatonina também tenha função tanto na fertilização como no desenvolvimento embrionário (TSANTARLIOTOU et al., 2007). Rekkas et al. (2003), observou um efeito benéfico da melatonina sobre a maturação de oócitos em suínos (REKKAS et al., 2003) e na fertilização e desenvolvimento embrionário em ovinos (VALASI et al., 2006). Atualmente, a melatonina tem sido estudada principalmente devido aos seus efeitos no trato reprodutivo, nas espécies de reprodução sazonal e em humanos.

Contudo, pouco se sabe sobre seus efeitos, quando adicionadas em meios de cultivo para maturação *in vitro* de oócitos em espécies não sazonais como os bovinos.

A presente pesquisa objetivou-se avaliar os efeitos da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos sobre aspectos morfológicos da maturação dos CCOs, desenvolvimento embrionário.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos sobre aspectos morfológicos da maturação dos CCOs e desenvolvimento embrionário.

2.2. Específicos

Analisar a taxa de clivagem em diferentes concentrações de melatonina;

Analisar a taxa de blastocistos em diferentes concentrações de melatonina;

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de melatonina, sobre a maturação dos CCOs cultivados *in vitro*;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Regulação da reprodução das fêmeas

Na maior parte da vida reprodutiva de uma fêmea fértil, ela não se apresenta em atividade cíclica regular (ou seja, apresenta-se em anestro). Quando somados, os períodos de inatividade durante a pré-puberdade, gestação e lactação são muito maiores que os períodos relativamente curtos de atividade cíclica. Entretanto, os períodos em que é possível interferir no processo reprodutivo (cruzar/não cruzar; escolha do macho/sêmen; controle do estro; indução da ovulação etc.) são os mais importantes e é nesta fase que a maior parte dos problemas reprodutivos pode acontecer (BARUSELI, 2007).

Os princípios do mecanismo hormonal da reprodução são basicamente os mesmos para todas as espécies de animais domesticados, embora haja algumas diferenças entre eles. Alguns animais são poli-éstricos como os bovinos e os suínos, ciclando durante todo o ano, enquanto outros são poli-éstricos estacionais, como os eqüinos, ovinos e felinos. Já a cadela é monoéstrica (BARUSELI, 2007).

O processo reprodutivo dos mamíferos é regulado por uma complexa, e apenas parcialmente entendida, cascata de atividades combinadas do sistema nervoso central, tecidos secretórios, tecidos alvo e vários hormônios (BARUSELI, 2007).

O sistema nervoso central (SNC) recebe informações do ambiente em que o animal se encontra (estímulo visual olfatório, auditivo e tátil) e envia a informação relevante do ponto de vista reprodutivo para as gônadas via eixo Hipotálamo-Pituitária-Gonadal. O hipotálamo e a glândula pituitária estão firmemente ligados à parte ventral do cérebro. Não são apenas produtores de hormônios, mas também órgãos alvo, formando um sofisticado sistema homeostático de feedback, por meio do qual regulam sua própria taxa de secreção (BARUSELI, 2007).

A partir de um estímulo do SNC, os neurônios endócrinos no hipotálamo produzem o Hormônio Liberador de Gonadotrofi nas (GnRH). O GnRH é transportado pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário ao lobo anterior da pituitária, seu órgão alvo, estimulando as células da pituitária a secretar o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH). O GnRH, FSH e LH não são secretados em níveis constantes, mas em uma série de pulsos. O FSH estimula o desenvolvimento dos

folículos ovarianos. Na teca interna do folículo, o LH estimula a síntese de androstenediona a partir do colesterol (BARUSELI, 2007).

A androstenediona é convertida em testosterona, que é aromatizada em estradiol-17 β sob a influência do FSH, nas células da granulosa do folículo. O estradiol exerce um feedback positivo no hipotálamo e na pituitária, aumentando a frequência dos pulsos de GnRH. Quando o estradiol ultrapassa um certo nível, o hipotálamo responde com um pico de GnRH que, por sua vez, induz um pico de LH que inicia a ovulação. Assim, o FSH estimula o crescimento dos folículos ovarianos, enquanto o LH estimula sua maturação, produção de estradiol e ovulação. O LH dá suporte à formação e à função inicial do corpo lúteo. Um dos principais efeitos do estradiol é a indução dos sintomas de estro. O estro pode ser descrito como os sinais comportamentais e físicos que indicam aos outros animais que a fêmea está na fase fértil de seu ciclo, e vai permitir a cobertura pelo macho. As células da granulosa também produzem inibina. Nem todos os efeitos deste hormônio são compreendidos, mas seu nome é derivado do feedback negativo que provoca na liberação de FSH da glândula pituitária, controlando assim o desenvolvimento dos folículos. Depois da ovulação, os restos do folículo são remodelados, formando o corpo lúteo, sob a influência do LH. A cavidade folicular é preenchida com vasos sanguíneos, e as células da granulosa aumentam de tamanho. O corpo lúteo é um órgão que produz basicamente progesterona e ocitocina (BARUSELI, 2007).

A progesterona é essencial para o ciclo normal na vaca e, após a concepção, é o principal hormônio responsável pela manutenção da prenhez. Ela provoca redução da liberação dos pulsos de GnRH, e assim inibe novas ovulações. Além disso, prepara o endométrio para a nidação (na realidade, implantação) do embrião em desenvolvimento, e inibe as contrações da parede uterina que podem ser danosas para a gestação. Se o oócito liberado pelo folículo durante a ovulação não é fertilizado, não são recebidos sinais de prenhez vindos do embrião. Por volta do dia 16 pós ovulação, o endométrio do útero não gestante irá liberar prostaglandina F2 α (BARUSELI, 2007).

A PGF2 α dá início à regressão do corpo lúteo, denominada luteólise. O mecanismo luteolítico da prostaglandina ainda não foi completamente elucidado, mas envolve redução do suprimento sanguíneo para o corpo lúteo via vasoconstrição, bem como um efeito direto nas células luteínicas propriamente ditas. A ocitocina produzida no corpo lúteo também desempenha um papel importante na luteólise. Como

resultado da regressão do corpo lúteo, as concentrações de progesterona diminuem, removendo o bloqueio sobre a liberação de GnRH pelo hipotálamo. Isto provoca início de uma nova fase folicular, com desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório. A fase que envolve crescimento folicular, cio e ovulação é denominado fase folicular do ciclo. A fase dominada pela progesterona, a partir da ovulação até a luteólise, é chamada fase luteínica (BARUSELI, 2007).

Os hormônios envolvidos na reprodução estão listados na Tabela 1, ao lado de suas principais funções, origem e estrutura química. É importante notar que apenas algumas das ações de cada um dos hormônios estão incluídas, e também que nem todas as funções destes hormônios são conhecidas. Além das ações endócrinas apresentadas na tabela 1, há também várias funções parácrinas, que ainda não foram suficientemente estudadas. A reprodução na fêmea e no macho é regulada pelo ajuste fino de ações e reações de muitos destes hormônios. Embora muito progresso tenha ocorrido nas últimas décadas, ainda não se atingiu um entendimento total destes processos altamente complexos (BARUSELI, 2007).

Tabela 1. Hormônios envolvidos na reprodução, sua origem, funções básicas (BARUSELI, 2007)

Nome	Origem	Função Básica	Estrutura Química
Melatonina	Glândula Pineal	Indicador da extensão do dia e da noite	Indoleamina
FSH	Glândula pituitária anterior	Fêmea: Estimula o desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos Macho: Estimula a espermatogênese	Glicoproteína (> 200 aminoácidos)
LH	Glândula pituitária anterior	Fêmea: Estimula maturação dos folículos ovarianos, formação e manutenção do corpo lúteo Macho: Estimula a produção de testosterona	Glicoproteína (> 200 aminoácidos)
Estrógenos (Estradiol-17 β)	Ovário (células da granulosa do folículo)	Induz comportamento de estro. Estimula o pico pré-ovulatório de GnRH	Esteróide
Inibina	Ovário (células da granulosa do folículo)	Fêmea: inibe a liberação de FSH pela glândula pituitária (mecanismo de feedback)	Peptídeo
Progesterona	Ovário (corpo lúteo)	Prepara o endométrio para a nidadação de um embrião Mantém a prenhez Diminui a liberação de GnRH, inibindo novas ovulações	Esteróide
Prostaglandina F _{2α}	Útero	Regressão do corpo lúteo	Ácido lipossolúvel

3.2. Tecnologias do embrião

3.2.1. Aspiração folicular e viabilidade oocitária em bovinos

Apesar dos avanços tecnológicos em reprodução assistida, principalmente no campo da transferência de embriões, ainda não se obtém uma elevada produção de embriões *in vivo*, o que dificulta a utilização de todo o potencial reprodutivo de fêmeas de alto valor genético. Com a evolução da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), esse objetivo torna-se mais próximo, pois é possível contornar as perdas dos gametas femininos, determinadas pela dinâmica folicular. Essas estruturas são obtidas por punção folicular dos ovários em laboratório ou *in vivo*, principalmente por meio de OPU (punção folicular) com auxílio do ultra-som. Em ambas as metodologias, as principais limitações são a ativação espontânea do ciclo meiótico assim que o oócito é removido do folículo (PINCUS & ENZMANN, 1935) e sua sensibilidade a variações de pH e temperatura. Essas limitações geram um problema logístico que limita a aplicação da técnica a locais próximos aos centros equipados para PIV. Assim, a adequação de meios que possibilitem a manutenção da viabilidade dos oócitos e que dispensem o controle de atmosfera durante o transporte, é uma condição importante para o aproveitamento do potencial desses animais. Estudos realizados por vários autores (SUSS et al., 1988; YANG et al., 1990; AZAMBUJA et al., 1998) determinaram que a viabilidade dos oócitos é preservada no ambiente folicular de ovários mantidos em solução fisiológica ou PBS, durante períodos que podem variar de acordo com a temperatura de manutenção.

3.2.2. Maturação oocitária

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Neste sentido, é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (FIV e CIV). Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do

primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA et al., 2004; DEKEL, 2005; DUMONT et al., 2005).

Apesar de sua complexidade, a maturação oocitária pode ser realizada *in vitro* após a remoção do oócito imaturo do folículo e do cultivo em meio e ambiente adequados (EDWARDS, 1965). No procedimento *in vitro*, os oócitos retornam à maturação meiótica quando são removidos do folículo e cultivados em meio adequado (GORDON, 1994). Por outro lado, *in vivo*, é durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para o posterior desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU E BRACKET, 1988).

3.2.3. Fecundação *in vitro*

A fecundação propriamente dita é, na verdade uma reação em cascata, desencadeada pela passagem do espermatozoide pela zona pelúcida, penetração na membrana plasmática e seu alojamento no interior do citoplasma ovocitário. Essa fusão envolve todo o espermatozoide, de maneira que a cauda também se integra ao citoplasma, fato esse fundamental para a estruturação do cito-esqueleto do primeiro ciclo celular (LONG et al., 1993).

A fusão do espermatozoide induz a ativação do oócito, representada inicialmente por mudanças do potencial transmembranário e uma mobilização maciça do Ca^{++} . Na sequência, é observada a exocitose dos grânulos corticais e consequente impermeabilização da membrana pelúcida; queda do MPF (Fator de maturação); conclusão da segunda divisão meiótica e expulsão do segundo corpúsculo polar; e modificações das propriedades corticais do ovo (CROZET, 1991). Com a queda do MPF dá-se início a descondensação da cromatina do

espermatozoide e dos cromossomos femininos, formando-se, assim, ambos os pró-núcleos, masculino e feminino. Os pró-núcleos migram para o centro do ovo, onde, após a quebra dos envelopes nucleares, os cromossomos se pareiam em um único fuso, ocorrendo assim a singamia (LONG et al., 1993).

3.2.4. Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocle (HOSHI, 2003).

3.2.5. Produção *in vitro* de embriões bovinos

É possível produzir embriões, com a PIV, de embriões na espécie bovina sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo-se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados (VARAGO et al., 2008).

Bueno e Beltran (2008) ressaltam que um dos objetivos da PIV comercial é a obtenção de embriões viáveis de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, seja por infertilidade ou distúrbios patológicos do aparelho reprodutor feminino.

Além disso, a PIV, associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom, tem sido utilizada, de forma geral, como instrumento importante para maximização do potencial reprodutivo dos rebanhos, aumentando o número de descendentes, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (VARAGO et al., 2008).

Apesar dos avanços obtidos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações tais como os baixos índices de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e o custo do embrião que é mais alto do que um

embrião de TE. Além disso, bezerros com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumento na incidência de abortos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas tem sido associados a prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (WAGTENDONK DE LEEW *et al.*, 2000).

De acordo com RUMPF (2017), a PIV trouxe algumas vantagens nos programas de reprodução:

- Com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais, ocorreu um grande avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção.
- A transferência de embriões (TE) proporciona um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genérico, podendo aumentar, em média, 10 vezes o número de crias por ano. Com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV) esse potencial de multiplicação se torna ainda maior.
- A aspiração de oócitos imaturos por punções foliculares, associadas à maturação e fecundação *in vitro* dos mesmos, e ao cultivo *in vitro* dos embriões, permite que sejam produzidas, em média, 36 crias por ano de uma única fêmea.
- Com o estabelecimento da PIV de embriões, técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a transgenia podem ser aprimoradas e utilizadas.
- Além de proporcionar, como nova opção, a multiplicação animal, possibilita a utilização de bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

Impactos:

- Por se tratar de uma técnica relativa nova o monitoramento rigoroso das doadoras de oócitos, dos embriões e das crias nascidas é de fundamental importância para que a mesma possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais recomendadas.

- A utilização comercial da PIV ainda está limitada ao seu elevado custo, e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (bezerro) e o custo de sua produção.
- Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos nessa biotécnica, várias questões relacionadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo precisam ser esclarecidas. Estudos básicos que estão sendo conduzidos a nível mundial poderão esclarecer aspectos relativos à maior susceptibilidade dos embriões PIV a criopreservação, a menor viabilidade dos oócitos de bezerras quando comparados aos de vacas e as baixas taxas de prenhez.
- A PIV está sendo gradualmente integrada a programas de melhoramento genético, como uma ferramenta complementar à inseminação artificial e a transferência de embriões.
- O maior impacto da PIV, todavia, será a sua aplicação associada a sexagem de espermatozoides. Isso porque, com uma dose inseminante sexada será possível produzir em torno de 30 gestações.

3.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre eles, pode-se citar, como exemplo, a nutrição inadequada e a permanência dos animais em condições de estresse (ANDRADE et al., 2010).

O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio são radicais livres, e estes nem sempre são oxidantes (Maia, 2006). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA E FERREIRA, 2007).

As espécies reativas de oxigênio incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), sendo este último extremamente reativo. Radicais superóxido são rapidamente dismutados pela ação

das enzimas superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), citoplasmática (Cu, Zn-SOD) ou extracelular (EC-SOD), produzindo peróxido de hidrogênio, que possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (NORDBERG E ARNER, 2001).

O radical hidroxila (OH) é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metálicos. Este radical reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares a partir da separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados ali presentes. Esse processo leva à formação de radicais lipídicos, os peróxidos de lipídios, que, na sequência, combinam-se com o oxigênio molecular, propagando, assim, a cadeia de reações da peroxidação lipídica. A maioria dos fosfolipídios presentes na membrana celular é rica em ácidos graxos poli-insaturados; por esta razão, esses lipídios são susceptíveis ao ataque do radical hidroxila (NORDBERG E ARNER, 2001).

Por outro lado, os radicais livres são importantes para a defesa do organismo contra agentes estranhos, pois auxiliam a atividade dos neutrófilos e macrófagos, desencadeando uma atividade bactericida pela degradação oxidativa dos lipídios, das proteínas e do ADN microbianos. O uso fisiológico de espécies reativas de oxigênio, como segundo mensageiro, também começa a ser demonstrado em áreas como a sinalização intracelular e a regulação redox. O radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos de lipídios podem regular a atividade de várias quinases, citocininas, fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, fatores de transcrição, bem como o mecanismo de morte celular. No ovário, sabe-se que um grande nível de espécies reativas de oxigênio é produzido em tecidos esteroideogênicos, uma vez que a reação de conversão de colesterol em pregnenolona, catalisada pela enzima desmolase do complexo enzimático citocromo P450, produz um elevado número de elétrons (STRAUSS E MILLER, 1991). Tais relações sugerem um complexo papel das espécies reativas de oxigênio no ambiente ovariano. Além disso, essas moléculas podem contribuir para o envelhecimento e para a ocorrência de muitas doenças humanas, como câncer, derrame cerebral, doenças neurodegenerativas e diabetes (IMAI E NAKAGAWA, 2003).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo o ADN, as proteínas e os lipídios (peroxidação dos lipídios). A peroxidação de lipídios é definida como “a deteriorização oxidativa de lipídios poli-insaturados”. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais

duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$) e, devido às suas múltiplas ligações, são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (NORDBERG E ARNÉR, 2001). A membrana que rodeia as células e as organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais atingidos por essas moléculas reativas em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, havendo perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). É importante ressaltar ainda que o alvo celular primário pode variar, dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e de quão severo é esse estresse. Desta forma, os danos podem conduzir às mais diversas situações, desde apoptose a carcinogênese (NORDBERG E ARNÉR, 2001).

3.4 Antioxidantes e ovário

Sabe-se que o metabolismo oxidativo é essencial para produção da energia celular que regula os processos fisiológicos, entretanto está inevitavelmente associado à geração de espécies reativas de oxigênio e ocorrência do estresse oxidativo. Segundo Arechiga et al. (1998), a produção em excesso de radicais livres pode resultar em infertilidade, em razão de o tecido ovariano, o espermatozoide e o embrião pré-implantacional serem sensíveis a danos provocados por esses agentes oxidantes. Além disso, tem sido sugerido que a produção de radicais livres no meio de cultivo de embriões bloqueia o seu desenvolvimento (LEGGE E SELLENS, 1991). Há relatos do envolvimento das espécies reativas de oxigênio em concentrações fisiológicas na proliferação celular (RAHIMI et al., 2003), maturação oocitária (HAMMADEH et al., 2008), luteólise (RILEY E BEHRMAN, 1991; SUGINO et al., 2000), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (MORADO et al., 2009).

A primeira retomada da meiose é induzida por um aumento de espécies reativas de oxigênio e inibida por agentes antioxidantes (TAKAMI et al., 2000; KODAMAN E BEHRMAN, 2001), indicando que a geração desses radicais livres pelo folículo é um importante promotor da sequência ovulatória. No entanto, sugere-se que a produção cíclica dessas moléculas reativas pode, ao longo do tempo, contribuir para

uma insuficiência ovariana prematura autoimune (BEHRMAN et al., 2001). Estudos anteriores têm mostrado que essas moléculas afetam negativamente a progressão da metáfase II na segunda parada da meiose, pois estão associadas à diminuição de gonadotrofinas, a danos no ADN e à inibição na produção de ATP (BEHRMAN et al., 2001). Além disso, MARGOLIN et al. (1990) observaram que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na perda da sensibilidade de células da granulosa a hormônios gonadotróficos e na perda da função esteroidogênica, as quais são características de atresia folicular. Sabe-se que os cultivos in vitro de tecido ovariano (HOVATTA et al., 1997) ou de folículos isolados (TILLY E TILLY, 1995) são geralmente submetidos a maiores concentrações de oxigênio em relação às condições in vivo, podendo o estresse oxidativo contribuir para as altas taxas de atresia observadas nos cultivos. Além disso, o excesso de espécies reativas de oxigênio vem sendo correlacionado com apoptose celular. Embora a indução de apoptose causada por estas moléculas ainda seja pouco investigada em folículos ovarianos, observou-se que o tratamento com peróxido de hidrogênio é tóxico para células da granulosa, uma vez que inibe o acúmulo do AMPc estimulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e a produção de progesterona (MARGOLIN et al., 1990).

Há evidências de que as espécies reativas de oxigênio induzem vias de apoptose mitocondrial por meio da ativação de receptores de morte celular na membrana (CHANDRA et al., 2000), havendo, então, indução da proteína quinase ativadora de mitógenos e da via das caspases (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1998). Além disso, o estresse oxidativo induz a fragmentação do ADN nas células (HALLIWELL E ARUOMA, 1991; HENLE E LINN, 1997). Essa quebra pode ocorrer devido à ação direta da $\text{OH}\cdot$ ou ainda pela ativação de endonucleases, devido ao acúmulo de cálcio intracelular livre estimulado pelos radicais livres. A existência de quebras unilaterais no momento da replicação do ADN induz quebras irreversíveis da cadeia dupla (COX et al., 2000), prejudicando a polimerização do ADN. Essas alterações são características de apoptose, culminando com a degeneração e a morte celular. Evidências indiretas do papel pró-apoptótico das espécies reativas de oxigênio em folículos ovarianos foram observadas por Jozwik et al. (1999), em que o tratamento com antioxidantes preveniu a apoptose de folículos cultivados in vitro. Foi recentemente demonstrado que a supressão da síntese de glutatona aumenta a atresia de folículos antrais em ratas (LOPEZ E LUDERER, 2004). Outros estudos têm

demonstrado que tratamentos que aumentam as concentrações celulares dessa enzima protegem vários tipos celulares contra estímulos apoptóticos (EKSHYYAN E AW, 2005; XIA et al., 2005).

Tsai-Turton e Opposing (2006) mostraram que tratamentos com FSH aumentaram as concentrações celulares de glutathione em cultivo de folículos pré-antrais de ratas por 2 - 48 horas e suprimiram as espécies reativas de oxigênio foliculares. Usando-se um inibidor específico da síntese dessa enzima, foi demonstrado que a depleção da glutathione reverte parcialmente a supressão dos radicais livres e a inibição de apoptose nas células da granulosa pelo FSH. Evidencia-se, dessa forma, uma regulação entre antioxidantes e esse hormônio, bem como a importância do balanço entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio no ovário. Vários métodos têm sido utilizados para contornar problemas inerentes aos radicais livres. Um deles é a redução da concentração de oxigênio no ambiente de cultivo (UMAOKA et al., 1992), ou, ainda, a adição de antioxidantes aos meios de cultivo, tais como a glutathione (YOSHIHARA et al., 2009), o EDTA (NASRESFAHANI et al., 1992), a catalase (NASR-ESFAHANI E JOHNSON, 1992) e as vitaminas C e E (LIMA-VERDE et al., 2009; ROSSETTO et al., 2009). A proteção contra as espécies reativas de oxigênio é fornecida por degradação enzimática (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase), remoção pelos antioxidantes e reparação molecular. Essas enzimas citadas podem reduzir as proteínas e o ADN oxidados e destruir os lipídios oxidados, impedindo, dessa forma, a propagação da peroxidação lipídica. Tanto a catalase quanto a superóxido dismutase estão presentes no ovário e podem ser reguladas hormonalmente (LALORAVA et al., 1988).

Estudos têm demonstrado que o cultivo in vitro de células da granulosa foliculares em meio suplementado com FSH estimula a atividade da catalase (BEHL E PANDEY, 2002). Estas enzimas aumentam o desenvolvimento de embriões murinos por meio da regulação positiva com a glutathione, controlando o balanço entre oxidação e redução intracelular (ORSI E LEESE, 2001). De acordo com Eppig (1996) e Krisher e Bavister (1998), a glutathione peroxidase tem se revelado importante no processo de maturação de oócitos envolvendo a síntese de componentes bioquímicos, a fosforilação de proteínas e a ativação de caminhos metabólicos específicos. Também age diretamente no metabolismo da progesterona. No útero, sua função antioxidante é fundamental para manter o ambiente mais sadio possível, tanto para o transporte espermático na época do estro quanto para a implantação do embrião. Essa enzima

é estratégica na eliminação dos radicais livres (peróxido de hidrogênio) originados dos processos metabólicos e vital para a proteção da membrana lipídica dos oócitos, para que esta não sofra peroxidação pelos radicais livres.

Essa peroxidação causaria a ruptura da membrana e ainda danos graves irreversíveis. As vitaminas antioxidantes têm sido há muito tempo correlacionadas com o ovário. Machlin e Gabriel (1980), em estudos com ratos deficientes de vitamina E, verificaram a sua importância na manutenção da função dos gametas. Essa vitamina tem sido correlacionada com a supressão de injúrias causadas nas membranas celulares e com efeitos benéficos ao desenvolvimento in vitro de embriões bovinos (OLSON E SEIDEL JR., 2000). Outros antioxidantes, como a luteína e outros carotenoides, como, por exemplo, a vitamina A, também são conhecidos por serem constituintes do ovário (CHEW et al., 1984). O ácido ascórbico é um antioxidante largamente distribuído no ovário mamífero, onde pode ser encontrado nas células da granulosa, da teca interna e luteínicas, bem como no oócito (DEANE, 1952).

A presença de altas concentrações deste antioxidante em tecidos endócrinos tem se mostrado importante para produção de hormônios esteroides (TSUJI et al., 1989) e inibição da apoptose em células da granulosa em bovinos (TILLY E TILLY, 1995) e em complexos cumulus-oócito de camundongas (EPPIG et al., 2000; MURRAY et al., 2001). Além disso, Tatemoto et al. (2001) verificaram que o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 250µM no meio de maturação protegeu os oócitos suínos do estresse oxidativo e ainda aumentou a formação de pró-núcleos com subseqüentes clivagens e desenvolvimento de blastocistos.

3.5 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-medroxytryptamina) é o produto da secreção da glândula Pineal, possui função importante e bem estabelecida quanto ao controle dos ritmos circadianos e regulação na função reprodutiva com animais com sazonalidade (como ovinos, caprinos, equinos e bubalinos). O seu pico de produção ocorre durante o período escuro do dia e a duração da sua secreção reflete a duração da noite (ARENDT, 1998).

O ritmo circadiano da melatonina é gerado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo e sincronizado pelo ciclo claro-escuro através do trato retino-hipotalâmico.

No entanto, mudanças circadianas das concentrações no sangue de melatonina em função do ciclo claro-escuro transmitem a informação do fotoperíodo para organização dos ritmos circadianos e sazonais em mamíferos (ARENDT, 1998).

A melatonina está presente no fluido cérebro-espinhal, plasma seminal, fluido folicular, líquido amniótico e saliva. Além da glândula pineal, esse hormônio possui outros sítios de produção, como: a retina, glândula harderiana e as plaquetas (REITER et al., 1991; ARENDT et al., 1995).

A presença de receptores de melatonina nos CCOs de bovinos, animais poliétricos, já foi descrito na literatura e este hormônio pode desempenhar um papel fisiológico na maturação *in vitro* nesta espécie (EL-RAEY et al., 2011).

Efeitos benéficos da adição de melatonina aos sistemas de PIV já foram descritos nos processos de maturação *in vitro* (EL-REY et al., 2011; KANG et al., 2009; TAKADA et al., 2008; TAMURA et al., 2012), fecundação *in vitro* (ISHIZUKA et al., 2000) e cultivo *in vitro* (ISHIZUKA et al., 2000; PAPIS et al., 2007).

A capacidade da melatonina para promover o desenvolvimento de embriões em diferentes espécies foi observada, quando oócitos de camundongos inseminados foram cultivados em diferentes concentrações de melatonina (10^{-8} e 10^{-4} M) e foi observado aumento das taxas de fertilização e de blastocisto (ISHIZUKA et al., 2000).

A suplementação com melatonina (10^{-9} M) teve um efeito positivo sobre as taxas de fertilização de embriões suínos. No entanto, a melatonina não influenciou a qualidade do oócito em gatos e não foi capaz de melhorar a taxa de quebra da vesícula germinativa em peixes (CHATTORAJ et al., 2005; GRAHAM et al., 2004).

3.6 Melatonina aplicada como antioxidante

Quando uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) é produzida e a célula não consegue se adaptar, ocorre um desequilíbrio entre ROS e os agentes antioxidantes, esse fenômeno é denominado estresse oxidativo ou desequilíbrio redox (ZHANG et al., 2013).

O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica de membrana, oxidação de proteínas, danos ao ADN e indução da apoptose (TAMURA et al., 2013; CRUZ et al., 2014 a, b; ZHANG et al., 2013). Durante a MIV, o oócito é muito mais suscetível ao estresse oxidativo, em razão da

sua reduzida defesa antioxidante, o que prejudica o subsequente desenvolvimento embrionário (DU PLESSIS et al., 2008; TAKAHASHI, 2012; ZHANG et al., 2013).

Diversos sistemas de produção *in vitro* de embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de radicais livres, por meio do uso de antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione (GSH), responsáveis pela defesa natural e presentes dentro dos folículos, encarregam-se do equilíbrio entre as ROS e os antioxidantes (TAMURA et al., 2012; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014; CHEUQUEMÁN et al., 2015). 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 participa de muitas funções fisiológicas. Além do controle da reprodução sazonal, atua na preservação mitocondrial, como hormônio imunoestimulador, citoprotetor e antiapoptótico pela inibição da ativação das caspases -9 e -3 (ASHRAFI et al., 2013; JOU et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2005; BAYDAS et al., 2005). A melatonina é uma molécula altamente eletroreativa, que age detoxificando espécies reativas de oxigênio eletrodeficientes, além de estimular a atividade de outras enzimas antioxidantes (VIJAYALAXMI et al., 2004; TAMURA et al., 2008; KUMAR 2015).

A inibição de apoptose, por meio da utilização de antioxidantes, tais como a melatonina pode ser uma ferramenta útil para diminuir os efeitos negativos do estresse térmico na competência de desenvolvimento oocitária, além disso, o uso de ensaios *in vitro* podem auxiliar na compreensão da atuação desse hormônio durante a MIV (ZHANDI et al., 2009).

A melatonina é conhecida por ser uma eliminadora de espécies reativas de oxigênio (ROS), agindo como um potente antioxidante (TSANTARLIOTOU et al., 2007). A melatonina e seus metabólitos neutralizam reações tóxicas, estimulam enzimas antioxidativas e também pode ajudar a reconstruir algumas moléculas que tinham sido oxidadas.

Da mesma forma, ela pode efetivamente aliviar o envelhecimento do oócito produzido *in vitro* provocado pelo estresse oxidativo, retardando o início da apoptose e evitando a fragmentação celular.

A melatonina tem efeitos antioxidantes e radioprotetores, ela e seus metabólitos neutralizam reações tóxicas, estimulam enzimas antioxidativas, reconstituem algumas moléculas oxidadas (REITER et al., 2004). A melatonina ainda possui um potente efeito contra a apoptose celular em diferentes tipos de células (YU et al., 2000) e age na mitocôndria celular reduzindo o estresse oxidativo, isto se deve à característica lipofílica que a melatonina possui.

A melatonina age independente de receptores e protege as células contra peroxidação da membrana celular, ao contrário de outros antioxidantes, ela é solúvel em água assim como em lipídeos (SHIDA et al., 1994).

A melatonina e seus metabolitos são poderosos agentes antioxidantes, e quando adicionados aos sistemas *in vitro* de produção, protegem os oócitos humanos, murinos, (TAMURA et al., 2008), suínos (KANG et al., 2009) e bovinos (EL-RAEY et al., 2011; PAPIS et al. 2007; TAKADA et al., 2012) dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio. Também possui ação reparadora em moléculas oxidadas, não possuindo efeitos tóxicos, mesmo em doses elevadas, além de ser eficiente contra o envelhecimento de mitocôndrias (CARRETERO et al., 2009).

Na PIV de embriões bovinos, o uso da melatonina foi descrito na MIV com efeitos benéficos tanto na maturação nuclear, quanto na dispersão das mitocôndrias no citoplasma (EL-RAEY et al., 2011), efeitos na redução da fragmentação do ADN das células do *cumulus* (TAKADA et al., 2012) e na CIV dos embriões (PAPIS et al., 2007).

Atualmente, a melatonina tem sido estudada principalmente devido aos seus efeitos no trato reprodutivo nas espécies de reprodução sazonal e em humanos. Contudo, pouco se sabe sobre seus efeitos quando adicionadas em meios de cultivo para maturação *in vitro* de oócitos em espécies não sazonais como os bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2. Local

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

4.3. Grupos Experimentais

Os CCOs viáveis foram distribuídos entre os tratamentos 0, 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} $\mu\text{Mol/L}$ de Melatonina. O experimento foi dividido em duas fases, onde a primeira avaliará o efeito de diferentes concentrações de melatonina (tratamentos) sobre a taxa de maturação dos CCOs e a segunda, o efeito dos tratamentos com melatonina sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram utilizados 100 CCOs por tratamento, durante as duas fases.

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.

4.4. Produção *in vitro* de embriões bovinos

4.4.1. Punção folicular (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 (21 g), 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 x 20 mm para pesquisa sob um estereomicroscópio (equipamento a ser adquirido). Os CCOs selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção (TQC Holding Plus), 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 CCOs foram lavados três vezes em gotas contendo meio de MIV em placas de Petri de 100 x 20 mm, sendo em seguida transferidos para microgotas contendo 100 µL de meio MIV em placas de Petri de 60 x 15 mm, enumeradas e contendo oito 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 horas. Este protocolo de maturação *in vitro* dos CCOS, foi utilizado na primeira e segunda fase. Os tratamentos foram aplicados nessa 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 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 conforme o item 5.3.2 e após 24 horas de maturação, foram lavados três vezes em 900 µL de meio de fecundação suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de solução PHE. O sêmen foi proveniente de uma única partida de touro e foi descongelado em água a 37°C por 30 s, sendo em seguida depositado em um tubo criogênico de 15 mL, sobre 1,0 mL gradiente de Percoll de 90% e 1,0 mL de Percoll 45%, e submetido a uma força de centrifugação de 251 g durante 10 min. Após a centrifugação, os espermatozoides (sptz) no fundo do tubo criogênico foram aspirados e colocados em 1,0 mL de meio de capacitação, sendo submetidos novamente à centrifugação a 251 g por 5 min. Após a segunda centrifugação, o excesso de meio CAP foi retirado sendo adicionada do mesmo volume de meio FIV. Em seguida, foi removido 5,0 µL da suspensão e adicionará 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 25×10^6 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 três vezes em gotas de meio SOF e depositados em gotas de 100 µL, recobertas por óleo mineral. A taxa de clivagem foi avaliada aos três dias após o início da fecundação (Dia 0). O desenvolvimento embrionário (taxa de mórula, blastocisto inicial, blastocisto completo e blastocisto expandido) foi avaliado aos cinco a sete dias (dia 5 a 7) após o início da fecundação. Em Anexo, está a composição, concentração, fabricante de todos os meios utilizados para a produção *in vitro* de embriões bovinos, além disso, imagens dos estágios e classificação do embrião, de acordo com IETS, 2014.

4.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos (0, 10⁻¹, 10⁻³ e 10⁻⁵ Mol/L de Melatonina) em 100 repetições (número de CCOs). Na primeira fase, será avaliada o efeito da melatonina sobre a maturação dos oócitos e na segunda, foram avaliados o efeito da melatonina sobre a produção *in vitro*. Os variáveis estudadas na primeira fase (taxa de maturação) e na segunda fase (taxa de clivagem, taxa de blastocisto, total e proporção de embriões viáveis, 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, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PRIMEIRA FASE

Foram utilizados 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, conforme mostra na Tabela 7.

Tabela 7. 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

TAXA DE	0	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
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 do χ^2 ($P < 0,05$).

Quanto a taxa de maturação dos CCOs cultivados *in vitro*, observou-se que houve diferença significativa do 0 μ M de melatonina (49,14%) em relação as concentrações 10^{-1} μ M (17,82%) e 10^{-5} μ M (29,27%), entretanto não houve diferença significativa em relação a concentração 10^{-3} μ M (45,13%).

Esses resultados corroboram com ADONA et al., (2008), onde a adição de 100 μ M de melatonina no meio de maturação *in vitro*, não interferiu na taxa de maturação e nos diversos estágios de desenvolvimento embrionário. No entanto, esses resultados diferem com estudos em que a concentração de melatonina de 1 μ M e 100 μ M aumentou o desenvolvimento embrionário em bovinos (TAN et al., 1993).

Difere também de Barçante et al., (2014), que adicionou 100 μ M de melatonina no meio de maturação *in vitro* e não teve diferença na taxa de maturação, obtendo 36,44% para 0 μ M de melatonina no meio de MIV e 32,93% para 100 μ M de melatonina no meio de MIV ($p < 0,05$).

De acordo com Manjunatha et al. (2009) utilizando 20 e 50 μ M de melatonina no meio de maturação de oócitos bubalinos, obteve-se 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.

Estes resultados diferem de Cunha (2014), que após 24h após a 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 ($P>0,05$).

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 utilizou a melatonina e houve um estímulo a maturação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SEGUNDA FASE

As taxas de clivagem dos grupos em estudo são representadas na Tabela 2. Os grupos controle, 10^{-1} μ M e 10^{-3} μ M obtiveram, respectivamente, 38,6%, 19,5% e 40,9% na taxa de clivagem *in vitro* no dia 3 não havendo diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O grupo 10^{-5} (52,9%) diferiu estatisticamente positivo ($P < 0,05$) dos demais grupos.

Tabela 2. Taxa de clivagem do embrião após FIV, dia 3 contendo de 8 a 12 células 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 Clivagem	
		N	%
Controle	83	32	38,6 ^a
10^{-1} μM	77	15	19,5 ^b
10^{-3} μM	88	36	40,9 ^a
10^{-5} μM	51	27	52,9 ^a

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

NICOLAU (2012) não observou diferença no percentual de clivagem entre o grupo tratado ou não com melatonina corroborando com os resultados do presente experimento. KAWAMOTO *et al.* (2016) também não observaram melhora na clivagem entre os grupos suplementados com melatonina e proteína específica do oviduto (pOSP) ou não em embriões suínos.

MARQUES (2016) obteve aumento significativo na taxa de clivagem embrionária com adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* nas concentrações 10^{-9} e 10^{-11} M, assim, sugere-se que concentrações menores no presente estudo poderiam aumentar a taxa de clivagem dos embriões *in vitro* da mesma maneira que o tratamento 10^{-5} μ M teve uma diferença estatística superior em relação a outros tratamentos.

Embora a melatonina não tenha influenciado significativamente na taxa de clivagem no presente estudo, com exceção do tratamento 10^{-5} μ Mol/L, nos meios *in vitro* a associação de diversos componentes é utilizada para aumentar a viabilidade embrionária. No entanto, TAKADA (2008) não observou diferença na taxa de clivagem no dia 3 durante o desenvolvimento embrionário entre os grupos Controle,

suplementado com 1 µg/mL de melatonina e 1 µg/mL de melatonina, 0,5 µg/mL de FSH e 5,0 µg/mL de LH.

Em comparação entre os tratamentos com melatonina, o grupo com maior dose, 10^{-5} µMol/L, apresentou uma taxa de clivagem inferior aos grupos submetidos a doses menores de melatonina. O que difere da literatura que foi observada a suplementação de melatonina ao meio de cultura do embrião numa uma concentração de 10^{-9} µM, teve um efeito positivo na taxa de clivagem e nos números de células dos blastocistos de suínos (RODRIGUEZ-OSÓRIO; WANG 2007).

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	%
Controle	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 ($P < 0,05$).

A PIV em bovinos alcança taxas médias entre 20 a 40% de desenvolvimento até estágio de blastocisto. (THOMPSON *et al.* 2007).

Resultados obtidos por MARQUES (2016) evidenciaram que não houve diferença entre os grupos tratados ou não com melatonina no meio de maturação *in vitro* na taxa de blastocistos não corroborando com os dados obtidos no presente estudo que a maior concentração proporcionou uma maior taxa de estruturas.

ASSIS (2014) suplementou melatonina em grupos a 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e Controle não havendo diferença na taxa de blastocistos entre os grupos.

Contudo, a dose de melatonina a ser utilizada no CIV de embriões bovinos ainda é questionável, variando de doses de 10^{-4} a 10^{-7} M de melatonina no meio (PAPIS *et al.*, 2007).

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} μM foi superior a taxa de obtida pelo grupo 10^{-5} μM e semelhante aos grupos Controle e 10^{-1} μM ($P < 0,05$). Os grupos Controle, 10^{-1} μM e 10^{-5} μM 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, avaliados no dia 5 a 7 após o dia 0.

	Mórula	Blastocisto Inicial	Blastocisto	Blastocisto Expandido	TOTAL
Controle	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 designais na coluna diferem pelo teste do χ^2 ($P < 0,05$).

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

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

TAKADA (2008) não obteve diferença em nenhuma das variáveis estudadas, corroborando no presente estudo. No entanto, CHAYA (2016) analisou a influência da melatonina em quatro grupos experimentais: MIV e CIV sem melatonina, MIV sem melatonina e CIV com melatonina, MIV com melatonina e CIV sem melatonina e, por fim, MIV e CIV com melatonina. Na proporção de blastocistos iniciais e expandidos, não houve diferença entre todos os tratamentos. Os grupos sem melatonina foram semelhantes ao grupo MIV com melatonina e CIV sem melatonina, assim como os grupos MIV sem melatonina e CIV com melatonina e grupos tratados com melatonina.

As taxas de desenvolvimento embrionário (%) são demonstradas na Tabela 5, o grupo 10^{-5} μM e Controle foram semelhantes entre si ($P < 0,05$). O grupo 10^{-5} μM foi superior ao grupo 10^{-3} e 10^{-1} μM .

Tabela 5. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), embriões avaliados no dia 5, 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 desenvolvimento embrionário	
		N	%
Controle	83	30	36,1 ^{ab}
10^{-1} μM	77	15	19,5 ^c
10^{-3} μM	88	31	35,2 ^b
10^{-5} μM	51	27	52,9 ^a

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

As taxas de desenvolvimento embrionário são os embriões que clivaram e chegaram ao estágio de mórula, e conseqüentemente alguns deles chegaram ao estágio de blastocisto (inicial, completo ou expandido).

O grupo Controle não diferiu dos resultados obtidos pelo grupo 10^{-3} μM ($P < 0,05$), mas apresentou maior taxa de desenvolvimento embrionário que o grupo 10^{-1} μM de melatonina.

Estes resultados previamente concordam com estudos em que a concentração de melatonina de 10^{-4} a 10^{-9} M aumentou o desenvolvimento embrionário de murinos e bovinos (TAN *et al.*, 1993; SIU *et al.*, 2006).

Segundo POCAR *et al.* (2005) a qualidade das células do *cumulus* é considerada um fator crucial que influencia no resultado da maturação dos oócitos e na sua competência de desenvolvimento subsequente.

MOTA *et al.* (2013) não observaram superioridade dos tratamentos com sêmen suplementado com 10, 100 e 200 μM de melatonina, obtendo 4.25% de embriões viáveis do grupo Controle, apresentando, também, taxa de clivagem superior (56,5%) aos demais grupos.

No entanto, esses resultados discordam com estudos de TAN *et al.*, (1993), onde a concentração de melatonina de 1 pM e 100 μM aumentou o desenvolvimento embrionário em bovinos.

Taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* (%) com base na qualidade morfológica, estão discriminados na Tabela 6. A proporção de Grau I foi semelhante ($P < 0,05$) entre os grupos Controle e 10^{-3} μM , os demais grupos não apresentaram taxas. Na proporção de Grau 2, todos os tratamentos foram semelhantes entre si ($P < 0,05$), porém o grupo 10^{-5} μM não apresentou estruturas.

Tabela 6. Taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* (%) com base na qualidade morfológica (IETS, 2014) 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.

	GRAU I	GRAU II	GRAU III	TOTAL
Controle	1 (3,3%) ^a	5 (16,7%) ^a	24 (80,0%) ^b	30
10^{-1} μM	0	1 (6,7%) ^a	14 (93,3%) ^{ab}	15
10^{-3} μM	1 (3,2%) ^a	4 (12,9%) ^a	26 (83,9%) ^b	31
10^{-5} μM	0	0	27 (100%) ^a	27
TOTAL	2	10	91	

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

Em relação a qualidade de Grau 3, os grupos 10^{-5} μM e 10^{-1} μM foram semelhantes, mas o 10^{-5} μM foi superior ($P > 0,05$) ao controle e 10^{-3} μM . Os grupos Controle, 10^{-1} μM e 10^{-3} μM foram semelhantes entre si ($P < 0,05$).

MOTA *et al.*, (2014) obtiveram médias semelhantes na obtenção de estruturas dos grupos Controle e 100 μM de melatonina, 1,50, 2,62, 1,68 e 1,37, 2,31, 1,56, respectivamente, de Grau I, II e III. Esses resultados corroboram com o presente estudo na proporção de estruturas GI e GII e diferem da proporção de GIII.

ADONA *et al.*, (2008), onde a adição de 100 μM de melatonina no meio de maturação *in vitro*, não interferiu na taxa de clivagem e nos diversos estágios de desenvolvimento embrionário.

Ao avaliar a qualidade embrionária pelo número total de blastômeros por blastocisto expandido, ASSIS (2014) observou um aumento no número de células/embrião no grupo tratado com 50 ng/ml (143 ± 24.83 blastômeros/embrião) em comparação aos grupos Controle e tratados com a 25 ng/mL, 100 ng/mL de melatonina, no presente estudo não foi contabilizado o total de blastômeros.

7. CONCLUSÃO

Nos resultados da primeira fase, a suplementação da melatonina no meio de maturação *in vitro* não evidenciou melhoras na taxa de maturação dos oócitos.

Na segunda fase, a suplementação de melatonina na produção *in vitro* de embriões em diferentes concentrações não foi capaz de melhorar a fase pós fecundação *in vitro*, no entanto o grupo 10^{-5} μM apresentou no tratamento maior taxa de clivagem, taxa de mórula e taxa de blastocistos durante o período de cultivo, assim, sugere-se que possui efeitos positivos na produção *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 2007.
- ANDRADE, E.R. MELO-STERZA, F.A. SENEDA, M.M. ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010
- ARECHIGA, C.G.; FLORES, S.V.; ORTIZ, O.; CÉRON, J.H.; PORRAS, A.; MCDOWELL, L.R.; HANSEN, P.J. Effect of injection of β carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*,v.50, p.65-76, 1998.
- ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman Hall, p. 331, 1995.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction journal**. v.3, p. 13–22, 1998.
- ASSIS, P. M. **Melatonina no cultivo in vitro de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.
- BARUSELI, P. **Compêndio de Reprodução Animal**. Intervet. 2007; cap 1.
- BEHL, R.; PANDEY, R.S. FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro. **Anim Reprod Sci**, v.70, p.215-221, 2002.
- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig**, v.8, p.40-42, 2001.
- BUENO AP, BELTRAN MP. Produção in vitro de embriões bovinos. **Rev Cient Eletron Med Vet**, v.6, n.11, 2008.
- CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.29, p.323-333, 2000.
- CHATTORAJ, A., et al., Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**; v. 140, p. 145–155, 2005.

CHAYA, A. Y. **Produção *in vitro* de embriões caprinos pré-púberes: efeito da melatonina nos meios de maturação *in vitro* e cultivo *in vitro* embrionário.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Orientador: José Domingos Guimarães. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Viçosa, MG, 2016.

CHEW, B.P.; HOLPUCH, D.M., O'FAILON JV. Vitamin A and 3-carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid. **J Dairy Sci**, v.67, p.1316- 1322, 1984.

CROZET, N.; HUNEAU, D.; DESMEDT, V.; THERON 'M, C.; SZLOLLOSI, D. TORRES, S.; SEVELLEC, C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. **Gamete Res.** 16. 1987. p. 159-170.

DE SOUSA, P.A.; SILVA, S.J.M.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular toti-potency. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.375-385, 2004.

DEANE, H.W. Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. **Am. J. Anat**, v. 91, p. 363-393, 1952.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.234, p.19-25, 2005.

DUMONT, J.; UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; HANAUER, A.; VERLHAC, M.H. p90Rsk is not involved in cytotstatic factor arrest in mouse oocytes. **J Cell Biol**, v.169, p.227-231, 2005.

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey an human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-51, 1965.

EKSHYYAN, O.; AW, T.Y. Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox status and expression of apoptotic protease activating factor-1. **Cell Death Differ** v.12, p.1066- 1077, 2005.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enchancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 78, n. 4, p. 250-62, 2011.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in utheriau mamals. **Reprod Fertil Dev**, v.8, p.485-489, 1996.

EPPIG, J.J.; HOSOE, M.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.M.; REQUENA, A.; WATANABE, S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by

- mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Mol Cell Endocrinol**, v.163, p.109-116, 2000.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: **CABI International**, 1994, 640p.
- GRAHAM, L.H., et al., Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 61, p. 1061-1076, 2004.
- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett**, v.281, p.9-19, 1991.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Clarendon, UK: Oxford University Press, 1999. 936p.
- 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. **Hum Reprod**, v.23, p.1113-1117, 2008.
- HENLE, E.S.; LINN, S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, v.272, p.19095-19098, 1997.
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.
- HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R.M.L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. **Hum Reprod**, v.12, p.1032-1036, 1997.
- IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radic Biol Med**, v.34, p.145-169, 2003.
- ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, H. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **J Pineal Res**, v.28, p.48-51, 2000.
- JOZWIK, M.; WOLCZYNSKI, S.; SZAMATOWICZ, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. **Mol Hum Reprod**, v.5, p.409-413, 1999.
- KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of

melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.22-28, 2009.

KAWAMOTO, T. S.; AMORIM, L.S.; OLIVEIRA, L. L.; SHIOMI, H. H.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Adição da proteína específica do oviduto de porcas (pOSP) e da melatonina em meios de maturação e o efeito na clivagem in vitro de embriões suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.6, p.1497-1504, 2016.

KODAMAN, P.H.; BEHRMAN, H.R. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. **Endocrinology**, v.142, p.687-693, 2001

KRISHER, R.L.; BAVISTAR, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, p.103-114, 1998

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, p.292-302, 2000.

LALORAVA, M.; KUMAR, G.P.; LALORAVA, M.M. Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *Rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. **Biochem Biophys Res Comm**, v.157, p.146-153, 1988

LEGGE, M.; SELLENS, M.H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. **Hum Reprod**, v.6, p.867-871, 1991.

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.

LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; MARTINS, F.S.; SANTOS, R.R.; BÁO, S.N.; LUQUE, M.C.A.; VIEIRA, G.A.B.; SILVEIRA, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Effects of α -tocopherol and tertatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles in vitro cultured. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.61, p.57-65, 2009.

LOPEZ, S.G.; LUDERER, U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v.36, p.1366-1377, 2004.

MACHLIN, L.J.; GABRIEL, E. Interactions of vitamin E with vitamin C, vitamin B12, and zinc. **Ann NY Acad Sci** v. 355, p. 98-108, 1980.

- MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. **tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- MARGOLIN, Y.; ATEN, R.F.; BEHRMAN, H.R. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.127, p.245-250, 1990.
- 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 (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2016.
- MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.183-188, 2001.
- MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.
- MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v.21, p.608-614, 2009.
- MOTA, L. H. C. *et al.* Avaliação do efeito da melatonina sobre o grau de qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Anais do VII CONERA – Bovinos Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, 2014.
- MOTA, L. H. C. M. *et al.* Efeito da melatonina sobre a maturação oocitária e total de embriões viáveis na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Anais 40º CONBRAVET**. v. 40, p.369, 2013.
- MURRAY, A.A.; MOLINEK, M.D.; BAKER, S.J.; KOJIMA, F.N.; SMITH, M.F.; HILLIER, S.G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. **Reproduction**, v.121, p.89-96, 2001.
- NASR-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. Quantitative analysis of cellular glutathione in early preimplantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. **Hum Reprod**, v.7, p.1281-1290, 1992.

- NASR-ESFAHANI, M.H.; WINSTON, N.J.; JOHNSON, M.H. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. **J Reprod Fertil**, v.96, p.219-231, 1992.
- NICOLAU, S. S. **Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.
- NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- OLSON, S.E.; SEIDEL JÚNIOR, G.E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biol Reprod**, v.62, p.248-252, 2000.
- ORSI, N.M.; LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase, and pyruvate. **Mol Reprod Dev**, v.59, p.44-53, 2001.
- 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, p. 321-236, 2007.
- POCAR P., *et al* Apoptosis in bovine cumulus–oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during in vitro maturation. **Reproduction**; v. 130, p. 857-868, 2005.
- RAHIMI, G.; ISACHENKO, E.; SAUER, H.; ISACHENKO, V.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J.; MALLMANN, P.; NAWROTH, F. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. **Reprod Fertil Dev**, v.15, p.343-349, 2003.
- REICHENBACH, H-D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31: p. 28-50. 2003.
- REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrinology Review**. v.12, p.151-180, 1991.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; GITTO, E.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; LEON, J.; MANCHESTER, L. C.; Vijayalaxmi; Kilic, E.; Kilic, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. **Polish Journal of Pharmacology**. v. 56, n. 2, p. 159-170, 2004.

- RILEY, J.C.; BEHRMAN, H.R. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. **Endocrinology**, v.128, p.1749-1753, 1991.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocysts yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.
- RODRIGUEZ-OSÓRIO, N., KIM, I. J.; WANG, H., *et al.* Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal Pineal Research**. v. 43: p. 283–288, 2007.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **R. Bras. Zootec.** vol.36 suppl.0 Viçosa July 2007
- SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. *et al.* Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary: **Statistical Analysis System Institute**, 2015.
- SCHULZE-OSTHOFF, K.; FERRARI, D.; LOS, M.; WESSELBORG, S.; PETER, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem**, v.254, p.439-459, 1998
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SIU AW, *et al.* Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. **Journal Pineal Research**. v. 40, p. 101-109, 2006.
- SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Rev Eletr Nutr**, v.4, p.456-461, 2007.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909, 2001.
- STRAUSS, J.F.; MILLER, W.L. Molecular basis of ovarian steroid synthesis. In: Hillier SG (Ed.). **Ovarian endocrinology**. Oxford: Blackwell, 1991. p. 25-72.

- SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; KARUBE, A.; NAKAMURA, Y.; KATO, H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Mol Hum Reprod**, v.6, p.19-25, 2000.
- TAKADA, L. **Efeito da melatonina sobre a maturação dos oócitos em sistemas tradicionais de produção *in vitro* de embriões**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- TAKADA, L.; MARTINS-JUNIOR, A.; MINGOTI GZ, BALEIRO, J. C. C.; COELHO, L. A. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovinos embryos. **Scientia Agricola**, v.67, p.393-398, 2012.
- TAKAMI, M.; PRESTON, S.L.; BEHRMAN, H.R. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.278, p.C646-C650, 2000
- TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, 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.
- TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L. C. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology**, v. 1, p. 57-60, 1993.
- TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. **Biol Reprod**, v.65, p.1800-1806, 2001.
- THOMPSON J.G.; MITCHEL M.; KINO K. Embryo culture and long – term consequences. **Reprod. Fert. And Dev.**, v. 19, p. 43-52, 2007
- TILLY, J.L.; TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v.136, p.242-252, 1995.
- TSAI-TURTON, M.; OPPOSING, U.L. Effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. **Endocrinology**, v.147, p.1224-1236, 2006.

- TSANTARLIOTOU, M. P.; ATTANASIO, L.; DE ROSA, A.; BOCCIA, L.; PELLERANO, G.; GASPARRINI, B. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal Animals Sciencie**. VOL. 6 (SUPPL. 1), 488-489, 2007.
- TSUJI, M.; ITO, Y.; TERAD, N.; MORI, H. Ovarian aromatase action in scorbutic mutant rats unable to synthesize ascorbic acid. **Acta Endocrinol**, v.121, p.595-602, 1989.
- UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; MORI, T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Mol Reprod Dev**, v.31, p.28-33, 1992.
- VARAGO FC, MENDONÇA LF, LAGARES MA. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.100-109, 2008
- VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.
- WAGTENDONK-DELEEUW, A.M.; MULAART, E.; DE ROOS, J.S. *et al*. Effects of different reproduction techniques: al, MOET or IVP, on health and welfare of bovineoffspring. **Theriogenology**, v.53, n.2, p.575-597, 2000.
- WANG, W. H., *et al*. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. **Biology Reproduction**, v. 56, p.1376–1382, 1997.
- WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microsc Res Tech**, v.61, p.335-341, 2003.
- YOSHIHARA, D.; FUJIWARA, N.; OOKAWARA, T.; KATO, S.; SAKIYAMA, H.; YOKOE, S.; EGUCHI, H.; SUZUKI, K. Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. **Free Radic Biol Med**, v.47, p.559-567, 2009.
- YU, Q.; MILLER; SCOSMOND, D. G. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. **Journal of Pineal Research**. v. 29, p. 86-93, 2000.

ANEXOS

PROTOCOLO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS NO LABRA

LABRA - LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

UEMA- UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

MIV

REAGENTES	[] final	100 ML	CIA	Ref	Nº Lab
SFB	10%	10,0 ml	Gibco	12657-029	
AMICACINA (250 mg/ml – cong)	0,075 mg/ml	30 µl	Nutric		
LH (1000 µl/ml – cong)	12 µl/ml	1,2 ml	Sigma	L-9773	
FSH (1 µl/ml – cong) 1 mg/ml	0,01 µl/ml 10 µg/ml	1,0 ml	Sigma	F-2293	
L-Glutamina MIV (10 mg/ml)	0,1 mg/ml	1,0 ml	Sigma	G-8540	490
Cysteamina Sol. Conc. 0,01 M	0,01 mM	1,0 ml	Sigma	C-8397	
TCM 199 Earle's salt (qsp)			Gibco	11150-059	

OBS: (validade 15 dias)

Ajustar o pH para 7,2

Filtrar 0,22 µm

Verificar osmolaridade: 280 – 300 mOms

FEC

REAGENTES	[] final	100 ML	CIA	PMol	Ref	Nº Lab

NaCl	0,114 M	0,666 g	Sigma	58,44	S-5886	380
KCl	3,241 mM	0,024 g	Sigma	74,05	P-5405	243
NaHCO ₃	0,025 M	0,210 g	Sigma	84,01	S-5761	132
NaH ₂ PO ₄	0,333 mM	0,004 g	Sigma	120,0	S-5011	297
Fenol Red – Sc 100 mg/ml	0,02 mg/ml	20,0 µl	Sigma	376,4	P-5530	485
Lactato de Sódio 60% sirup	0,0128 M	143,7 µl	Sigma	112,1	L-7900	395
*MgCl ₂ 6H ₂ O	0,5 mM	0,010 g	Sigma	203,31	M-2393	97
*CaCl ₂ 2H ₂ O	2,7 mM	0,0397 g	Sigma	147,0	C-7902	239
Amicacina (Sc 250 mg/ml)	0,075 mg/ml	30 µl				
Piruvato de Sódio	0,2 mM	0,0022 g	Sigma	110,04	P-5280	394
H ₂ O Ultra Pura		Qsp				
BSA Fr.V FAF		0,600 g	Sigma		A-6003	18
** Penic/Estrep Estoque		100,0 µl				

OBS: (Validade em 15 dias)

* Adicionar por último.

** Usar opcionalmente

Ajustar o pH para 7,2 – 7,4

Verificar osmolaridade: 280-300 mOms

Filtrar com filtro 0,22 µm e manter em geladeira (4°C)

CAP

REAGENTES	[] final	100 ML	CIA	PMol	Ref	Nº Lab
NaCl	0,1 M	0,584 g	Sigma	58,44	S- 5886	380
KCl	3,1 mM	0,023 g	Sigma	74,05	P- 5405	243
NaHCO ₃	25 mM	0,210 g	Sigma	84,01	S- 5761	132
NaH ₂ PO ₄	0,333 mM	0,004 g	Sigma	120,0	S- 5011	297
Hepes	10 mM	0,238 g	Sigma	238,31	H- 4034	492
Fenol Red – Sc 100 mg/ml	0,02 mg/ml	20,0 µl	Sigma	376,4	P- 5530	485
Lactato de Sódio 60% sirup	0,028 M	310 µl	Sigma	112,1	L- 7900	395
*MgCl ₂ 6H ₂ O	0,39 mM	0,008 g	Sigma	203,31	M- 2393	97
*CaCl ₂ 2H ₂ O	2,1 mM	0,031 g	Sigma	147,0	C- 7902	239
Amicacina (Sc 250 mg/ml)	0,075 mg/ml	30 µl	Nutricell			
Piruvato de Sódio	1 mM	0,011 g	Sigma	110,04	P- 5280	394
H ₂ O Ultra Pura		Qsp				
BSA Fr.V FAF		0,600 g	Sigma		A- 6003	18
** Penic/Estrep Estoque		100,0 µl				

OBS: (Validade em 15 dias)

* Adicionar por último.

** Usar opcionalmente

Ajustar o pH para 7,2 – 7,4

Verificar osmolaridade: 280-300 mOms

Filtrar com filtro 0,22 µm e manter em geladeira (4°C)

PERCOLL 90%

REAGENTES	5 ML	200 ml	25	35	40	45	50
PERCOLL COMERCIAL	4,5 ml	18	22,5	31,5	36	40,5	45
SP – TALP 10X	500 µl	2	2,5	3,5	4	4,5	5

OBS: Validade de 15 dias

Filtrar com 0,22 µm

Manter em geladeira (4°C)

PERCOLL 45%

REAGENTES	2 ML
PERCOLL 90%	1 ML
CAP	1 ML

OBS: Validade em 15 dias

Manter em geladeira (4°C)

PHE

REAGENTES	[] final	1 ML	10 ML
NaCl 0,9%		400 µl	4,0 ml
Penicilamina (Sc 2 mM)	0,5 mM	250 µl	2,5 ml
Hipotaurina (Sc 1 mM)	0,25 mM	250 µl	2,5 ml
Epinefrina Sc (250 µM)	25 µM	100 µl	1,0 ml

OBS:

Filtrar com filtro 0,22 µm

Manter em geladeira (4°C) por até 2 semanas

Proteger da luz

FIV

REAGENTES	[] final	475 µL
FEC		450 µl
PHE		20 µl
HEPARINA (Sc 1 mg/ml)	10 µg/ml	5 µl

SOF

REAGENTES	[] final	50 ML	100 ML	CIA	PMol	Ref	Nº Lab
Sodio Tri-Citrato	0,35 mM	0,005 g	0,010 g	Sigma	294,1	S-4641	209
Myo-Inositol	2,8 mM	0,025 g	0,050 g	Sigma	180,2	I-7508	411
SOF – ESTOQUE “A”		5 ml	10 ml				
SOF – ESTOQUE “B”		5 ml	10 ml				
SOF – ESTOQUE “C” (Piruvato – Sc 8 mg/ml)	8 mg	0,5 ml	1 ml				394
SOF – ESTOQUE “D” (CaCl ₂ – Sc 26,2 mg/ml)	26,2 mg	0,5 ml	1 ml				239
BME 50X		1,5 ml	3 ml	Sigma		B-6766	
MEM 100X		500 µl	1 ml	Sigma		M-7145	

L-Glutamina SOF Sc 29,3 mg/ml	0,0293 mg/ml	50 µl	100 µl	Sigma	146,15	G-8540	490
Amicacina (Sc 250 mg/ml)	0,075 mg/ml	15 µl	30 µl	Nutricell			
Soro Fetal Bovino	5%	2,5 ml	5 ml	Gibco		12657- 029	
H ₂ O Ultra Pura		Qsp	Qsp				
Sulfato de Gentamicina (opcional)	(10 mg/ml)	0,250 ml	500 µl				

OBS: Validade de 15 dias

Ajustar pH para 7.0 – 7.2

Verificar osmolaridade: 275 – 285 mOms

Filtrar com filtro 0,22 µm e manter em geladeira (4°C) por até 1 semana

HEPARINA – Sol. Concentrada: 1 mg/ml

REAGENTES	10 ML	Cia	PMol	Ref	Nº Lab
Heparina	10 mg	Sigma	181 µl/mg	H-3149	80
Sol. NaCl 0,9%	10 ml				

OBS: Validade de 120 dias

Fazer alíquotas de 50 µl

Manter congelada a -20°C em freezer

HIPOTOURINA (1mM) Sigma H-1384

REAGENTES	10 ML	50 ML	Cia	PMol	Ref	Nº Lab
Hipotaurina	0,00109 g	0,00545 g	Sigma	109,1	H-1384	92
Solução fisiológica	10 ml	50 ml				

OBS: validade de 180 dias

Fazer alíquota de 300 µl

Manter congelada a -20°C em freezer

EPINEFRINA (250 µM) Sigma E-4250

REAGENTES	50 ML	CIA	PMol	Ref	Nº Lab
H ₂ O Ultra Pura	50 ml				
Ác. Láctico 60% Syrup	126 µl	Sigma	112,1	L-7900	395
Sódio Metabisulfito (Na ₂ S ₂ O ₅)	0,050 g	Sigma	190,1	S-1516	134

Corrigir pH para 4,0 com HCl 1N

Epinefrina	0,00228 g	Sigma	183,2	E-4250	58
------------	-----------	-------	-------	--------	----

OBS: Validade de 180 dias

Fazer alíquotas de 120 µl

Manter congelada a -20°C em freezer

PENICILAMINA (2 mM) Sigma P-4875

REAGENTES	50 ML	Cia	PMol	Ref	Nº Lab
Penicilamina	0,015 g	Sigma	149,2	P-4875	49
NaCl 0,9%	50 ml				

OBS: Validade de 180 dias

Proteger da luz

Fazer alíquotas de 300 ml

Manter congelada a -20°C em freezer

SOLUÇÃO SALINA 0,9%

REAGENTES	100 ML	Cia	PMol	Ref	Nº Lab
-----------	--------	-----	------	-----	--------

NaCl	0,9 g	QM	5,4	58,44	145770
H ₂ O (qsp)	100 ml				

OBS: Validade de 90 dias

Manter em geladeira

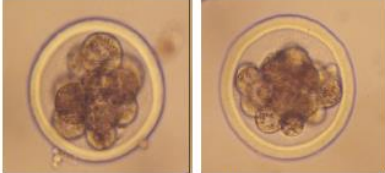
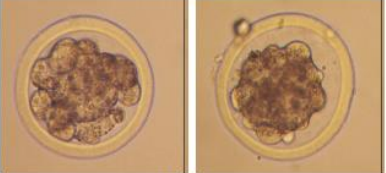
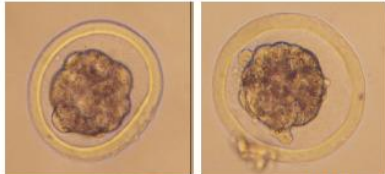
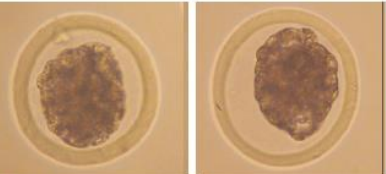
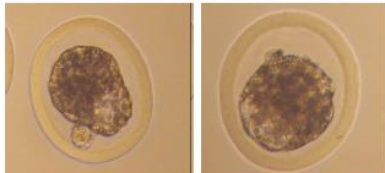
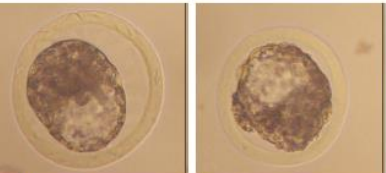
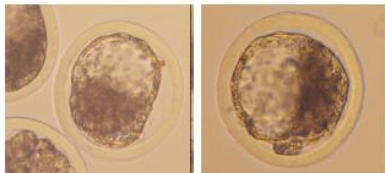
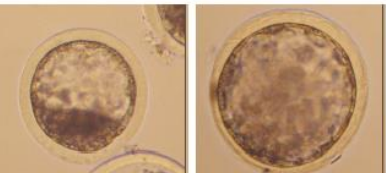
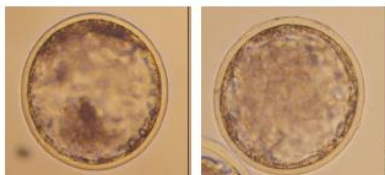
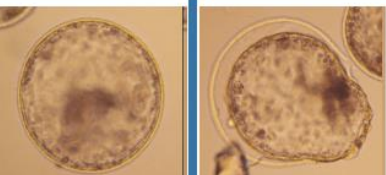
 <p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>				 <p>Mórula Código IETS: 3</p>				<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>				 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>				<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>				 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>				<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocela. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocela, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>				 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>				<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocela aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>				 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>				<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocela causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>

Figura 1 Classificação de embriões produzidos *in vitro* de acordo com o estágio de desenvolvimento (IETS, 1998)