

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Ana Laura Silva

**Efeitos de diferentes concentrações de melatonina na
maturação oocitária e/ou cultivo embrionário sobre as
taxas de produção de embriões bovinos cultivados *in vitro***

Dracena

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Ana Laura Silva

**Efeitos de diferentes concentrações de melatonina na
maturação oocitária e/ou cultivo embrionário sobre as
taxas de produção de embriões bovinos cultivados *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia (TCZ) apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena, como parte das exigências para obtenção do título de Zootecnista.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientador: Dr. Adriano Felipe Mendes

Dracena

2024

Inserir nesta página a versão digitalizada do
certificado de aprovação.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Efeitos de diferentes concentrações de melatonina na maturação oocitária e/ou cultivo embrionário sobre as taxas de produção de embriões bovinos cultivados *in vitro*"

Modalidade: Trabalho de ... **Atividades de pesquisa.**

Autor: Ana Laura Silva

Orientador (a): Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientador(es): Dr. Adriano Felipe Mendes

Número de Créditos: 15

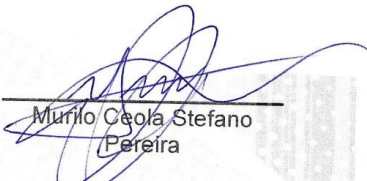
Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 11/10/24



Adriano Felipe Mendes



Ricardo da Fonseca



Murilo Ceola Stefano
Pereira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que, sob muito sol, me fizeram chegar até aqui, na sombra.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão a **Deus**. Sua orientação e bênçãos têm sido fundamentais em minha jornada. Sem sua infinita bondade e sabedoria nada disso seria possível. Sou eternamente grata pela força e inspiração que Ele proporciona a cada passo do caminho.

Agradeço aos meus pais, **Ana de Jesus Silva** e **Manoel Aparecido da Silva**, por me proporcionarem uma educação de qualidade e por sempre me apoiarem e aconselharem em relação aos meus sonhos. Também sou grata a toda a minha família pelo apoio contínuo.

Ao **Laboratório de Computação Científica Aplicada à Zootecnia – LuCCA-Z**, que contribuiu de maneira significativa para minha formação durante a graduação através da bioinformática. Em especial, sou grata ao **Prof. Dr. Ricardo da Fonseca** pelos ensinamentos e pela oportunidade de integrar o grupo, assim como aos meus colegas que também fazem parte dessa equipe.

Agradeço de forma especial à **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, minha orientadora durante este estudo, pelas oportunidades oferecidas e pelo valioso auxílio ao longo de toda a jornada.

Ao **Dr. Adriano Felipe Mendes**, meu co-orientador ao longo de toda esta trajetória, agradeço especialmente pela paciência, didática e pelos valiosos ensinamentos que me proporcionou.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular – LFEM, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, especialmente à **Dra. Isabella Rio Feltrin**, pelo auxílio nas análises de RT-qPCR e pela disposição em me auxiliar nas análises estatísticas dos dados.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, responsável pelo LFEM, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, pelo incondicional apoio científico.

A **Profa. Dra. Angela Gonella-Diaza**, da Universidade da Flórida, pela contribuição científica na avaliação dos dados obtidos.

Ao médico veterinário, **Lucas Henrique Gaspar**, que em colaboração com o frigorífico ACOVACAT e seus colaboradores, se dedicou intensamente para assegurar a disponibilidade dos ovários utilizados nas pesquisas realizadas.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião – LIFE** e a todos os seus integrantes pelo apoio e pela colaboração ao longo deste período. Expresso minha gratidão à equipe por **Lucas de Oliveira Bezerra, Valeska de Castro Lourenço e Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado** pelo suporte essencial durante o desenvolvimento de todo o experimento.

Aos meus melhores amigos da minha cidade natal – **Yasmin Brizolari de Faria, Vitor Nicola Peres, Mariana Piragino Lunardi e Eduarda Doumid Pinto** – que, mesmo à distância, sempre torceram por mim e acreditaram no meu potencial, expresso minha enorme gratidão.

Agradeço profundamente aos **meus amigos de jornada**, que compartilharam não apenas suas experiências acadêmicas, mas também suas vidas comigo, tornando o caminho muito mais leve.

A **Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT (UNESP)**, Câmpus de Dracena, pelo suporte técnico-administrativo e logístico fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

A empresa **Biocelltis Biotecnologias S.A.** pelo fornecimento de melatonina para o estudo realizado, assim como aos demais colaboradores da empresa que participaram, direta ou indiretamente, deste projeto.

Ao **Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC** pela concessão do auxílio financeiro (Processo nº2908-4/2021), que possibilitou o desenvolvimento do referido estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Processo nº 2022/01110-3), pelo auxílio financeiro ao referido projeto.

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

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche



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



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E/OU CULTIVO EMBRIONÁRIO SOBRE AS TAXAS DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO"** (EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MELATONIN ON OOCYTE MATURATION AND/OR EMBRYO CULTURE ON IN VITRO CULTURED BOVINE EMBRYO PRODUCTION RATES) registrada com o nº **06/2021 - CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **11/06/2021**.

Dracena, 14 de junho de 2021.

Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

RESUMO

A manipulação de oócitos e embriões bovinos em condições laboratoriais promove o estresse oxidativo dessas estruturas limitando o sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Diante disso, a melatonina, um hormônio com ação antioxidante, apresenta grande potencial de utilização na PIVE. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da melatonina em concentrações de 0,01, 10 e 10000 nM (Sigma Aldrich, M5250) durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV) e/ou cultivo embrionário *in vitro* (CIV) sobre a produção e qualidade embrionária. No **Experimento 1**, as concentrações de 0 (controle), 0,01, 10 e 10000 nM foram aplicadas exclusivamente durante a MIV, por 24 horas. No **Experimento 2**, as mesmas concentrações foram aplicadas exclusivamente durante o CIV, ao longo dos 9 dias. No **Experimento 3**, as concentrações foram aplicadas tanto na MIV quanto no CIV. As taxas de produção embrionária foram avaliadas nos dias 3 (taxa de clivagem), 7 (taxa de blastocisto) e 9 (taxa de eclosão), considerando a fertilização *in vitro* (FIV) como dia 0. No Experimento 1, a qualidade dos embriões (D9) foi avaliada por RT-qPCR, sendo mensurada a expressão dos genes OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*) e BAX (*BCL2 associated X*). Os dados foram submetidos a análise de variância, seguida da aplicação de contrastes entre os grupos com nível de significância de 5%. A taxa de clivagem não variou nos três experimentos. No Experimento 1, observou-se tendência para maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P = 0,0892$) no grupo com 10000 nM em comparação ao grupo com 0,01 nM. No D9, houve um aumento no número de blastocistos totais ($P = 0,0216$) e uma tendência para um maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0741$) no grupo com 10000 nM em comparação ao grupo com 0,01 nM. Não foram observadas diferenças na abundância dos transcritos dos genes avaliados. Nos Experimentos 2 e 3, não foram encontradas diferenças significativas na produção embrionária. Em conclusão, a adição de melatonina na MIV não altera a expressão dos transcritos OCT4, SOD2, GPX1 e BAX. Adicionalmente, 10000 nM melatonina exclusivamente na MIV mostra tendência para melhores taxas de produção embrionária, sendo essa concentração mais favorável que 0,01 nM.

Palavras-chave: oócito, estresse oxidativo, bovino, embrião, apoptose.

ABSTRACT

The manipulation of bovine oocytes and embryos in laboratory conditions causes oxidative stress of these structures, limiting the success of *in vitro* embryo production (IVEP). Due to it, the melatonin, a hormone with antioxidant action, has great potential for its use in IVP. The aim of this study was to evaluate the effects of melatonin at concentrations of 0,01, 10 and 10000 nM (Sigma Aldrich, M5250) during *in vitro* oocyte maturation (IVM) and/or *in vitro* embryo culture (IVC) on embryo production and quality. In **Experiment 1**, the concentrations of 0 (control), 0,01, 10 and 10000 nM were applied exclusively during the IVM, for 24 hours. In **Experiment 2**, the same concentrations were applied exclusively during the IVC throughout the 9 days. In Experiment 3, the concentrations were applied during both IVM and IVC. The Embryo production rates were assessed on days 3 (cleavage rate), 7 (blastocyst rate) and 9 (hatching rate), considering *in vitro* fertilization (IVF) as day 0. In Experiment 1, the embryo quality (D9) was assessed by RT-qPCR, measuring the expression of the genes OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1) and BAX (BCL2 associated X). The data were submitted to analysis of variance, followed by the application of contrast into the groups, with a significance level of 5%. The cleavage rate did not vary across the three experiments. In Experiment 1, a tendency towards a higher number of both hatched blastocysts ($P = 0,0686$) and total blastocysts ($P = 0,0892$) was observed in the 10000 nM group compared to the 0,01 nM group. On D9, there was an increase in the number of total blastocysts ($P = 0,0216$) and tendency towards a greater number of hatched blastocysts ($P = 0,0741$) in the 10000 nM group compared to the 0,01 nM group. No differences were observed in the abundance of the transcripts of the genes evaluated. In Experiments 2 and 3, no significant differences were found in embryo production. In conclusion, the addition of melatonin to IVM does not alter the expression of OCT4, SOD2, GPX1 and BAX transcripts. Additionally, 10000 nM melatonin exclusively in IVM shows a trend towards better embryonic production rates, and this concentration is more favorable than 0.01 nM.

Keywords: oocyte, oxidative stress, bovine, embryo, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização da biosíntese de melatonina	24
Figura 2 – Ilustração esquemática da geração de EROs e suas consequências na função celular	31
Figura 3 – Organização experimental.....	35
Figura 4 – Oócitos em diferentes estágios da maturação <i>in vitro</i>	38
Figura 5 – Esquema de fertilização <i>in vitro</i> dos oócitos.....	39
Figura 6 – Esquema de separação de sêmen a partir de diferentes densidades de Select SPERM (Botupharma®)	40
Figura 7 – Esquematização do desenvolvimento dos blastocistos	42
Figura 8 – Blastocisto eclodido (1) e blastocisto expandido (2) registrados no dia 9 de cultivo	42
Figura 9 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos bovinos sobre a taxa de clivagem dos embriões no Dia 3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média ± erro padrão	46
Figura 10 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos, eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D7 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média ± erro padrão.....	47
Figura 11 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos, eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D9 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média ± erro padrão.....	49
Figura 12 – Experimento 1. Avaliação por RT-qPCR da expressão dos transcritos OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1) e BAX (BCL2 associated X) em blastocistos eclodidos no D9 (D0 = dia da FIV) oriundos de oócitos suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0, 10 ou 1000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV). Os valores são apresentados como média ± erro padrão	50

Figura 13 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) na taxa de clivagem de embriões bovinos no D3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	51
Figura 14 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de blastocisto. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	52
Figura 15 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	54
Figura 16 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) na taxa de clivagem de embriões bovinos no D3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	55
Figura 17 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, blastocistos totais e taxa de blastocisto geral. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	56
Figura 18 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da melatonina em oócitos em diferentes espécies.....	27
Tabela 2 – Efeitos da melatonina em embriões em diferentes espécies	28
Tabela 3 – Efeitos da melatonina em oócitos e embriões em diferentes espécies ...	29
Tabela 4 – Nomenclatura, sequências forward (F) e reverse (R), função, número GenBank e artigo de referência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na avaliação de blastocistos bovinos eclodidos produzidos <i>in vitro</i> no D9 (D0 = dia da FIV) pela técnica de RT-qPCR	44
Tabela 5 – Dados de validação dos oligonucleotídeos iniciadores e da concentração das amostras dos genes alvo e de referência para RT-qPCR de embriões bovinos aos 9 dias de desenvolvimento	45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX	BCL-2 associated protein
Be	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto intermediário
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bx	Blastocisto expandido
CASP3	Caspase-3
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT1 α	DNA Methyltransferase 1
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Dissulfeto SOD
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HIOMT	Hidroxi-indol-O-metiltransferase
HO ⁻	Radical Hidroxila
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
LH	Hormônio Luteinizante
MARF1	Gene essencial regulador da progressão meiótica
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MnSOD	Superóxido Dismutase 2
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NAT	Aril-alquilamina-N-acetiltransferase
O ₂	Oxigênio molecular

O ₂ ⁻	Radical Ânion Superóxido
PHE	Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
TPH	Triptofanohidroxilase
ZnSOD	Superóxido Dismutase 1
MT1	Receptor de membrana de melatonina Tipo I
MT2	Receptor de membrana de melatonina Tipo II
MII	Meiose II
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
p53	Proteína Tumoral
BCL-2	<i>B-cell CLL</i> / Linfoma de células B2
BCL-X	<i>BCL-2 related gene</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist / killer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
MnSOD	Mangânes-SOD
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ O	Água
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione dissulfeto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
°C	Grau Celsius
G	Calibre
h	Hora
km	Quilômetro
M	Molar
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.1 Objetivos Específicos.....	22
3.1 Melatonina	23
3.1.1 Funções e produção extra-pineal da melatonina	24
3.1.2 Impactos da melatonina na qualidade reprodutiva em espécies de interesse zootécnico.....	25
3.1.3 Estresse oxidativo.....	29
3.1.4 Estresse oxidativo durante a PIVE	31
3.1.5 Impacto da melatonina em genes com ação antioxidante	32
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Em 2022, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) reconheceu o Brasil como o país com o maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 234,4 milhões de animais. Devido sua alta relevância na produção de alimentos, o país busca ferramentas para aumentar a eficiência na produção de proteína animal (MENDES, 2024). Entre elas, destaca-se a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), uma biotécnica eficaz e rentável de particular interesse nacional, que possibilita a rápida multiplicação de fêmeas bovinas com genética superior (SANTOS et al., 2019).

A PIVE permite o aumento do número de descendentes por fêmea a cada ano, assim como a possibilidade de utilizar fêmeas doadoras de oócitos em idade pré-púbere, gestantes até o terceiro mês, ou ainda no período voluntário de espera após o parto, resultando na redução do intervalo entre gerações e acelerando o progresso do melhoramento genético (YANG et al., 2013; SILVA et al., 2015). Projeta-se que uma vaca submetida à monta natural, inseminação artificial (IA) ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF) seja capaz de gerar uma prole por ano. No entanto, o número de descendentes aumenta significativamente quando a PIVE é adotada em um rebanho. Com aspirações regulares realizadas a cada 15 dias, uma fêmea pode produzir entre 50 e 100 embriões ao longo de um ano e, considerando uma taxa de prenhez de 50%, isso pode resultar em 25 a 50 bezerros ao ano, equivalente a aproximadamente uma prole por semana (VARAGO et al., 2008).

A implementação em larga escala da biotécnica impulsionou o desenvolvimento de biotecnologias que aprimoraram a produção comercial de prenhez (BUENO e BELTRAN, 2008), incluindo a criopreservação de embriões (POLGE e ROWSON, 1952) e a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (NAGAI, 2001). Em uma análise mais abrangente, a técnica tem início com a coleta de oócitos, realizada por meio de aspiração folicular, que pode ser obtida de ovários de abatedouros (*in vitro*) ou por aspiração folicular guiada por ultrassonografia em doadoras (*in vivo*). As etapas subsequentes envolvem a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), seguida da fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos maturados e do cultivo *in vitro* dos embriões (CIV). Ao final desse processo, os

embriões podem ser transferidos para o corno uterino de uma fêmea receptora, fisiologicamente sincronizada com o estágio de desenvolvimento embrionário, ou criopreservados para transferência futura (MENDES et al., 2021).

Com intuito de se aprimorar a PIVE, é fundamental levar em consideração as condições de maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos bovinos, uma vez que essa etapa é influenciada por diversos fatores, como a composição da atmosfera gasosa, o meio de cultivo, a temperatura, a suplementação proteica e fatores de crescimento (SANTOS et al., 2002). Modificações nos meios de cultivo embrionários têm proporcionado avanços significativos, aumentando a taxa de produção *in vitro* (PIV) de embriões (GUEMRA et al., 2013). Contudo, após sete dias do início do cultivo *in vitro* (CIV), apenas cerca de 20 a 40% dos oócitos inicialmente cultivados atingem o estágio de blastocisto (LIRA et al., 2020). Entre os fatores que limitam o êxito dos oócitos na geração de embriões é o estresse oxidativo, que ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CROCOMO et al., 2012).

Embora as EROs estejam presentes em condições de homeostase nos diferentes tecidos do organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), desempenhando um papel fisiológico importante *in vitro* e contribuindo para as competências dos oócitos e o desenvolvimento embrionário (BLONDIN et al., 1997; GUERIN et al., 2001), em altas concentrações, essas moléculas podem ter efeitos prejudiciais sobre a função celular, comprometendo suas funções fisiológicas e podendo levar à morte celular programada, conhecida como apoptose (YANG et al., 1998; GUERIN et al., 2001). Uma das alternativas é o uso de antioxidantes, que visa atenuar a formação de EROs e preservar as funções fisiológicas dos oócitos (GUEMRA et al., 2013). Dessa forma, é possível conter o aumento excessivo das EROs durante a maturação *in vitro*, facilitando a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário, ao mesmo tempo que minimiza os danos causados pelo estresse oxidativo (SIES, 1993).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio com propriedades antioxidantes e antiapoptóticas, presente em diversos compartimentos do organismo devido ao seu caráter hidrofílico e hidrofóbico (QUEIROZ et al., 2022). Essa natureza anfifílica permite que ela atravesse facilmente a barreira morfofisiológica do organismo, protegendo as células contra o desequilíbrio de transferência de elétrons (redox) de uma molécula para outro reagente, tanto em ambientes celulares lipídicos

quanto aquosos (REITER, 2000). Em mamíferos, esse hormônio é secretado ritmicamente pela glândula pineal e produzido no ovário, nas células da granulosa e nos oócitos (EL-RAEY et al., 2011; SAKAGUCHI et al., 2013; ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; REITER et al., 2014), protegendo os tecidos ovarianos contra as EROs, por atenuação direta e através da elevação de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), além de retardar o início da apoptose e prevenir a fragmentação celular (TAMURA et al., 2013; CRUZ et al., 2014 a, b; ZHANG et al., 2013). Nesse contexto, esse efeito é particularmente relevante durante a MIV, quando o oócito se torna mais vulnerável ao estresse oxidativo devido à redução nas defesas antioxidantes (TAKAHASHI, 2012; ZHANG et al., 2013), podendo resultar na peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos direto ao DNA (TAMURA et al., 2013).

Baseando-se nos efeitos benéficos da melatonina em favorecer a remoção das EROs diretamente e regular a expressão das enzimas SOD e GPX, encarregadas pelo equilíbrio oxidativo (TATEMOTO et al., 2004; WANG et al., 2014a) e por sua atuação citoprotetora (antioxidante e antiapoptótica), essa molécula apresenta grande potencial em favorecer o desenvolvimento de oócitos e embriões produzidos *in vitro*. Sua inserção nos meios de maturação de oócitos e embriões potencialmente incrementaria a produção de embriões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o impacto de diferentes concentrações de melatonina na maturação de oócitos e/ou cultivo embrionário *in vitro* sobre as taxas de produção e qualidade embrionária.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da adição de melatonina em diferentes concentrações (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM; além do grupo controle não suplementado) durante a MIV

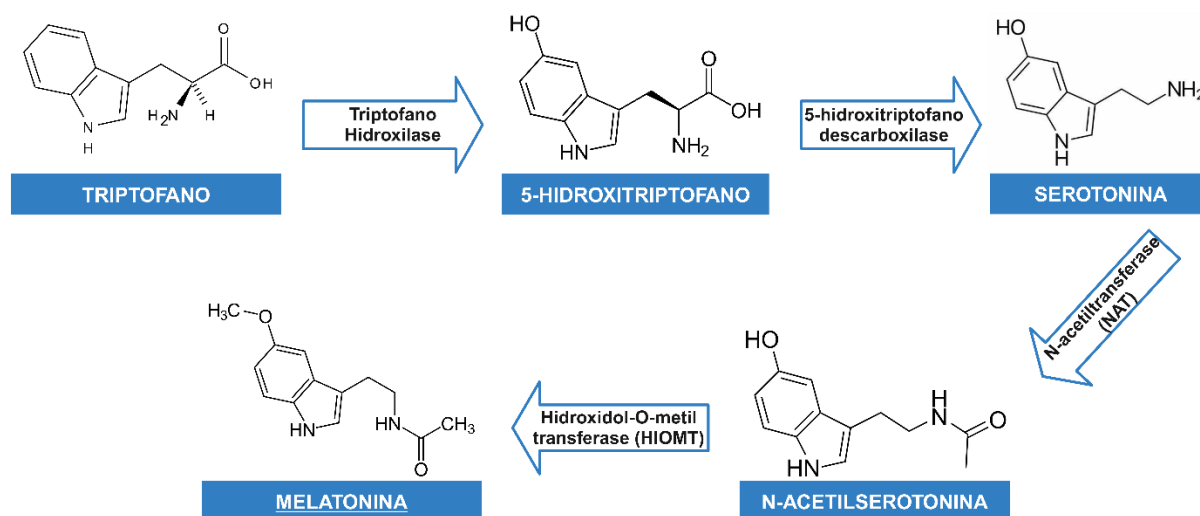
e/ou durante o CIV, na produção embrionária em D3, D7 e D9 (D0 = dia da FIV) e na qualidade dos blastocistos produzidos no D9 através da avaliação da expressão dos transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), marcador de qualidade embrionária especificamente ligado a pluripotência celular; SOD2 (*superoxide dismutase 2*), gene antioxidante mitocondrial; GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), gene antioxidante celular; e BAX (*BCL2 associated X*), gene ativador de apoptose, utilizando-se de RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*) como genes de referência.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Melatonina

A melatonina é uma indolamina cuja secreção pineal segue um ritmo circadiano, controlado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo (REITER et al., 2011; TAMURA et al., 2014). Sua principal função é transmitir informações sobre a duração do período escuro diário para os sistemas circadianos e circanuais (SERAPHIM et al., 2000), desempenhando um papel fundamental no sono, na regulação da temperatura corporal e nas mudanças reprodutivas sazonais (ARENDT, 1988; REVEL et al., 2009).

A biossíntese da melatonina (**Figura 1**) inicia-se a partir do aminoácido triptofano, que é inicialmente hidroxilado pela enzima triptofanohidroxilase (TPH) para formar 5-hidroxitriptofano. Em seguida, o 5-hidroxitriptofano é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina) por uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD). A serotonina, então, passa por um processo de acetilação catalisado pela enzima aril-alquilamina-N-acetiltransferase (NAT), seguido de metilação pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), resultando na formação de melatonina (FERNANDES, 2020).

Figura 1 – Esquemática da biosíntese de melatonina

Fonte: Adaptado de BOTAS, 2014.

3.1.1 Funções e produção extra-pineal da melatonina

Em 1958, ao isolar uma substância das glândulas pineais de bovinos, Aaron Lerner e colaboradores observaram que tal composto provocava alterações na coloração da pele de anfíbios. O nome "melatonina" foi escolhido para refletir sua ação sobre os melanóforos da pele (mela, de melanóforos) e o composto que dá início à sua via biossintética (tonina, de serotonina) (LERNER et al., 1958). Inicialmente, essa molécula foi associada principalmente à reorganização do sistema circadiano endógeno, à promoção do sono e à regulação dos ciclos reprodutivos sazonais em uma ampla gama de organismos, desde bactérias, fungos, algas e plantas até os seres humanos (ARENDRT, 2007). Com o crescimento exponencial dos estudos nos últimos 20 anos, foram descobertos efeitos dessa indolamina que não estão relacionados à ritmicidade do organismo, além de ter sido descrita a produção em locais fora da glândula pineal (MARKUS et al., 2007), como em tecidos periféricos, onde pode desempenhar um papel na regulação de processos fisiológicos locais (HE et al., 2015; REITER et al., 2014).

As funções da melatonina são bastante amplas, incluindo ações antioxidantes, antiapoptóticas e anti-inflamatórias, além de estar envolvida no controle do comportamento sexual de diferentes espécies (TAMURA et al., 2009; TAN et al., 2010) e na atividade esteroidogênica gonadal (WEBLEY; LUCK, 1986;

WOO et al., 2001). Seus locais de produção são diversos, abrangendo órgãos, tecidos e células como cérebro, testículo, ovários, trato gastrointestinal, medula espinhal, linfócitos, retina, córnea e pele (REITER et al., 2013b).

3.1.2 Impactos da melatonina na qualidade reprodutiva em espécies de interesse zootécnico

À medida que aumentam os dados sobre os efeitos da melatonina e seu potencial para aumentar a produção de blastocistos e a taxa de clivagem dessas estruturas *in vitro* (BERLINGUER et al., 2009), bem como a criopreservação de sêmen (OFOSU et al., 2021) e embriões (GUO et al., 2021), a indução ao estro e o aumento da taxa de prenhez (YILMAZER et al., 2018), essa substância tem atraído crescente atenção. Pesquisas têm mostrado que a melatonina pode aprimorar a maturação oocitária e promover efeitos positivos em embriões quando adicionada ao meio de cultivo *in vitro* em camundongos (BAHADORI et al., 2013; DEHGHANI-MOHAMMADABADI et al., 2014; OSHIZUKA et al., 2000; NA et al., 2005; TAMURA et al., 2008; WANG et al., 2013). Nesse contexto, resultados favoráveis também foram relatados em estudos com bovinos (TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014), búfalos (MANJUNATHA et al., 2009), ovinos (ABECIA; FORCADA; ZÚNIGA, 2002; CASAO et al., 2010) e suínos (CHOI et al., 2008; KANG et al., 2009; SHI et al., 2009).

De acordo com Valasi et al. (2006), a utilização de implantes vaginais de melatonina em pequenos ruminantes demonstrou ser eficaz na melhoria da qualidade dos oócitos, mesmo em animais em anestro. Para superar a barreira fisiológica do anestro estacional, implantes de melatonina podem ser empregados para induzir o estro em ovinos e caprinos (ZÚNIGA et al., 2002). Esses implantes têm sido amplamente utilizados em países europeus desde o ano de 2000, quando foram aprovados para uso comercial (GÓMEZ et al., 2006). Nesse cenário, Yilmazer et al. (2018) observaram que ovinos em anestro sazonal tratados com implante subcutâneo de melatonina combinado com implante intravaginal de progesterona, mostraram uma eficácia significativa na indução do estro e um aumento na taxa de prenhez.

Ao contrário dos estudos com ovinos, a maioria das pesquisas com suínos concentrou-se em investigar o efeito da melatonina na qualidade dos embriões em fêmeas da espécie (KANG et al., 2009; DO et al., 2015; PARK et al., 2018). Os embriões suínos submetidos aos procedimentos de PIVE possuem elevados níveis de lipídios, o que os tornam mais suscetíveis ao estresse oxidativo. Para mitigar os danos causados pelas EROs, alguns estudos investigaram a aplicação de melatonina exógena e observaram um aumento na taxa de blastocistos (GUO et al., 2021).

No que diz respeito ao congelamento, a criopreservação de sêmen e embriões a temperaturas extremamente baixas é desejável por motivos biológicos e comerciais. Diversos métodos empregam diferentes agentes crioprotetores (FONSECA; TORRES; PINTO NETO, 2002) e modificações nos meios de preservação, como a adição de melatonina. Esta substância tem demonstrado bons resultados quando adicionada ao diluente de sêmen (CRUZ et al., 2014) e durante os processos de criopreservação, devido à sua capacidade de neutralizar radicais livres e reforçar as defesas antioxidantes nos meios utilizados (OFUSU et al., 2021; ALEVRA et al., 2022).

Dessa maneira, nota-se que a melatonina apresenta grande potencial para melhorar os resultados reprodutivos, especialmente no contexto da PIVE, exercendo principalmente efeitos antioxidantes. Esses efeitos ocorrem tanto pela ação direta sobre as EROs quanto pela regulação positiva de enzimas antioxidantes (MENDES, 2021). Além disso, a melatonina atua sobre oócitos e embriões por meio da interação com os receptores MT1, MT2 e a enzima citosólica NQO2, identificados em diferentes espécies (GE et al., 2022; LEE et al., 2023; SAMPAIO et al., 2012).

As propriedades benéficas da melatonina em oócitos, relatadas por diversos autores em diferentes dosagens e etapas da PIVE, em várias espécies de interesse zootécnico, estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Efeitos da melatonina em oócitos em diferentes espécies

ESPÉCIES	CONCENTRAÇÕES	PRINCIPAIS EFEITOS	REFERÊNCIA
Bovino	0,1 pM a 1 μ M	Aumentou as taxas de clivagem e formação de blastocistos.	SAMPAIO <i>et al.</i> , 2012
Bovino	10^{-11} a 10^{-3} M	Melhorou a eficiência da maturação <i>in vitro</i> , sendo tal efeito mediado pelos receptores de melatonina. Regulou positivamente os níveis de expressão de genes relacionados à maturação, modificação epigenética e expansão do <i>cumulus</i> .	TIAN <i>et al.</i> , 2014
Bovino	10^{-9} a 10^6 M	Estimulou a retomada da meiose em oócitos tratados favorecendo o desenvolvimento embrionário subsequente, além de mostrar efeitos citoprotetores.	RODRIGUES-CUNHA <i>et al.</i> , 2016
Bovino	10^{-12} a 10^{-6} M	Melhorou a qualidade embrionária quando associada a nano cápsulas poliméricas de núcleo lipídico.	REMIÃO <i>et al.</i> , 2016
Bovino	1 μ M	Melhorou a qualidade de oócitos envelhecidos, aumentou a capacidade de desenvolvimento de embriões.	LIANG <i>et al.</i> , 2017
Bovino	10^{-7} a 10^{-4} M	Atenuou os efeitos deletérios do choque térmico na MIV, reduziu as EROs e modulou positivamente transcritos mitocondriais em blastocistos.	YAACOBI-ARTZI <i>et al.</i> , 2020
Búfalo	250 a 1000 μ M	Melhorou a taxa de fertilização.	NAGINA <i>et al.</i> , 2016
Suíno	10^{-9} a 10^6 M	Protegeu os oócitos do estresse térmico.	LI <i>et al.</i> , 2015
Suíno	10^{-9} a 10^{-3} M	Aumentou a competência de desenvolvimento de oócitos, formação de blastocistos e número de células por blastocisto.	JIN <i>et al.</i> , 2017
Suíno	1 a 10 μ g mL ⁻¹	Melhorou a maturação oocitária e a expansão das células do <i>cumulus</i> , regulou genes sinalizadores da resposta proteica de desdobramento contra o estresse do retículo endoplasmático durante a MIV.	PARK <i>et al.</i> , 2017

Em relação as propriedades benéficas da melatonina em embriões, observadas por diversos autores em diferentes dosagens e etapas da PIVE, em várias espécies de interesse zootécnico, estão resumidas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Efeitos da melatonina em embriões em diferentes espécies

ESPÉCIES	ESTRUTURA SUPLEMENTADA	CONCENTRAÇÕES	PRINCIPAIS EFEITOS	REFERÊNCIA
Bovino	Embriões	10^{-11} a 10^{-3} M	Melhorou o desenvolvimento embrionário, eliminou EROs, reduziu a lesão oxidativa, melhorou o desenvolvimento do embrião, aumentou o número médio de células/blastocisto.	WANG <i>et al.</i> , 2014B
Bovino	Embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas	10^{-11} a 10^{-2} M	Afetou a expressão de genes relacionados à apoptose, proteção antioxidante e desenvolvimento, modificou a acetilação global de histonas H3K9ac, aumentou o número total e de células da massa celular interna de blastocistos e reduziu a apoptose e EROs	SU <i>et al.</i> , 2015
Bovino	Embriões	10^{-12} a 10^{-6} M	Melhorou os efeitos antiapoptóticos e antioxidantes durante o desenvolvimento embrionário quando associada a nano cápsulas poliméricas de núcleo lipídico.	KOMNINOU <i>et al.</i> , 2016
Suíno	Células doadoras e embriões clonados	10^{-12} a 10^{-6} M	Melhorou a formação de blastocistos obtidos por transferência nuclear de células somáticas e melhorou a qualidade do embrião através da inibição da apoptose.	PANG <i>et al.</i> , 2013
Ovino	Embriões	10^{-9} a 10^{-3} M	Beneficiou a restauração das funções embrionárias após vitrificação e aquecimento, evidenciado por maiores taxas de reexpansão e eclosão, maior número total de células e menor apoptose e índice oxidativo.	SUCCU <i>et al.</i> , 2014

Por fim, as propriedades benéficas da melatonina em oócitos e embriões, observadas por diversos autores em diferentes dosagens e etapas da PIVE, em várias espécies de interesse zootécnico, estão resumidas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Efeitos da melatonina em oócitos e embriões em diferentes espécies

ESPÉCIES	ESTRUTURAS SUPLEMENTADAS	CONCENTRAÇÕES	PRINCIPAIS EFEITOS	REFÊRENCIA
Bovino	Oócitos e embriões	10^{-12} a 10^{-3} M	Atenuou efeitos nocivos do estresse térmico e melhorou o desenvolvimento embrionário.	CEBRIAN-SERRANO <i>et al.</i> , 2013
Suíno	Oócitos e embriões	10 a 50 ng/ml	Melhorou a competência de desenvolvimento e a qualidade embrionária.	DO <i>et al.</i> , 2015
Suíno	Oócitos e embriões derivados de ativação partenogenética	10^{-5} M	Melhora a qualidade e o desenvolvimento <i>in vitro</i> de oócitos.	YANG <i>et al.</i> , 2020

3.1.3 Estresse oxidativo

Os radicais livres são constantemente gerados no organismo e consistem em átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, conferindo-lhes uma alta reatividade (KUMAR; PANDEY, 2015; RADI, 2018). Entre esses radicais, encontram-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) que se destacam por sua instabilidade e reatividade. As EROs originam-se do metabolismo aeróbico normal, podendo ser prejudiciais quando estão presentes em níveis elevados (VELOSSA *et al.*, 2021). Esse fenômeno é conhecido como estresse oxidativo, que, na definição mais recente, refere-se a um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (SIES *et al.*, 2007), podendo levar à degradação de estruturas biológicas essenciais para o funcionamento celular (ABDALLA *et al.*, 2001)

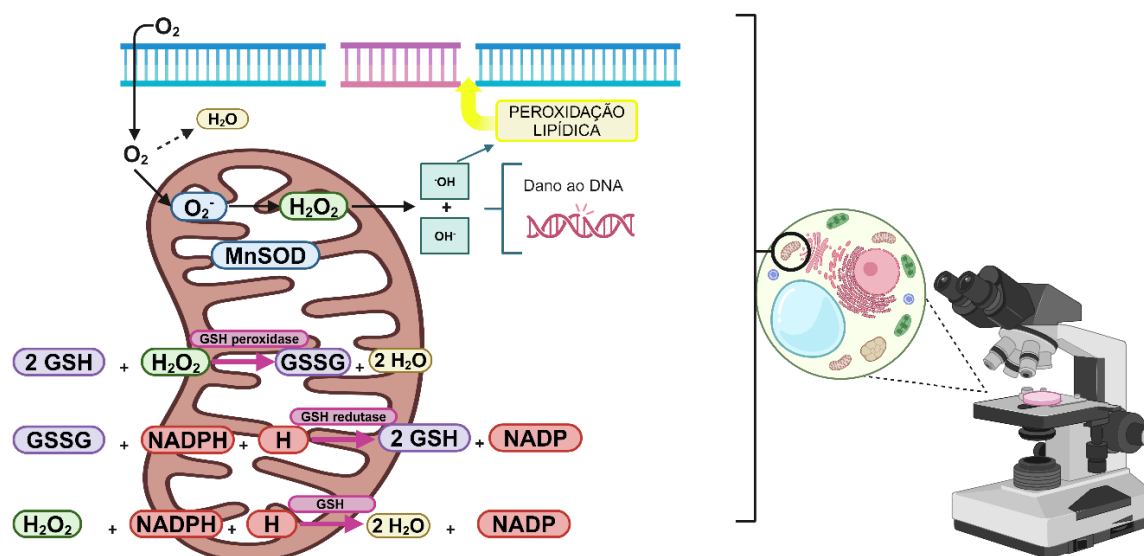
Em geral, as EROs referem-se a uma gama de subprodutos derivados do oxigênio diatômico (O_2), incluindo tanto radicais livres quanto outras espécies, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (HO^-) (SOUSA *et al.*, 2007). Elas surgem a partir da oxidação ou redução incompleta do oxigênio (GECHEV *et al.*, 2006), e sua estrutura eletrônica favorece a formação de radicais livres (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Essas espécies podem

ser produzidas de forma endógena, a partir de fontes como NADPH oxidase, peroxissomos e mitocôndrias, ou estimuladas externamente por fatores como radiação UV, poluentes e outros oxidantes (VELOSSA et al., 2021)

Durante a respiração celular, o oxigênio molecular (O_2) é completamente reduzido, resultando na formação de duas moléculas de água (H_2O). No entanto, quando o oxigênio é parcialmente reduzido, a concessão de apenas um elétron ao invés de quatro, resulta na formação do radical ânion superóxido (O_2^-). Esse radical é posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio, nessa etapa a degradação dessas moléculas é catalisada pela presença de elementos metálicos, como o manganês (MnSOD). Contudo, a alta probabilidade de interação entre o H_2O_2 e o O_2^- , resulta na formação do radical hidroxila (OH^-), considerado altamente reativo e nocivo, responsável por causar danos no DNA e desencadear a peroxidação lipídica, uma ocorrência em cadeia que afeta os ácidos graxos poliinsaturados, levando a alterações celulares permanentes (FERREIRA & MASTSUBARA., 1997; GATE et al., 1999; CHELIKANI et al., 2004; AGARWAL et al., 2005; GUÉRIN et al., 2001).

Para proteger o organismo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são neutralizadas pela glutathione. Nesse processo, a enzima glutathione peroxidase catalisa a dismutação do H_2O_2 em água, utilizando a glutathione reduzida (GSH), que a partir da oxidação transforma-se em glutathione oxidada (GSSG). A conversão da GSH em GSSG é mediada pela presença de NADPH, mantendo o equilíbrio redox celular e protegendo as funções biológicas (**Figura 2**) (AGARWAL et al., 2005; MEISTER & ANDERSON, 1983; HALL, 1999).

Figura 2 – Ilustração esquemática da geração de EROs e suas consequências na função celular



Fonte: Adaptado de VELEZ-PARDO et al. (2007).

3.1.4 Estresse oxidativo durante a PIVE

Na PIVE, as condições de cultivo e os processos de manipulação celular podem gerar estresse oxidativo, resultando em um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio pode desencadear diversos danos aos oócitos e embriões por meio das EROs (TAMURA et al., 2013). Para equilibrar o potencial danoso, as células contam com um sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo, que inclui glutathiona, superóxido dismutase, catalase e tioredoxina — moléculas associadas à melhoria na conversão de oócitos em blastocistos em diversas espécies (TAKAHASHI, 2012). A glutathiona, em particular, tem sido associada ao aumento na taxa de blastocistos quando embriões bovinos são cultivados em uma atmosfera não controlada, devido à redução do estresse do retículo endoplasmático (YOON et al., 2014).

Sabe-se que as células possuem um sistema de defesa antioxidante, dividido em duas categorias: enzimático e não enzimático. O sistema enzimático tem origem endógena, ou seja, é produzido pelo próprio organismo, enquanto o sistema não enzimático é obtido de forma exógena (HALLIWELL; CROSS, 1994). Quando a produção de EROs excede a capacidade dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos de neutralizá-las, ocorre um desequilíbrio que leva ao estresse

oxidativo, causando danos celulares e estimulando mecanismos de apoptose nas células (WANG et al., 2012). Em embriões, os danos causados por esse fenômeno incluem peroxidação lipídica da membrana, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, e danos diretos ao DNA (TAMURA et al., 2013). Esses efeitos resultam em bloqueios na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNEZ, 2001; JUKNAT et al., 2005; MATSUZUKA et al., 2005; WANG et al., 2012).

3.1.5 Impacto da melatonina sobre genes de vias antioxidantes, apoptóticas e de desenvolvimento

Entende-se que a adição de melatonina nas etapas da PIVE traz benefícios às estruturas cultivadas, principalmente devido ao seu papel direto e indireto como antioxidante. Além disso, esse hormônio também contribui para a regulação positiva das enzimas superóxido dismutase 1 (ZnSOD) e 2 (MnSOD) em células do *cumulus*, o que reduz a fragmentação nuclear e diminui a produção de EROs em oócitos durante a MIV (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). Tatemoto (2000, 2001) documentou que o conteúdo de glutatona peroxidase (GPX1) de oócitos desnudos foi significativamente reduzido após a MIV, e a exposição a EROs resultou em aumento da morte celular programada (apoptose) em comparação a oócitos não desnudos. Esses dados mostram que a proteção dos oócitos pelas células do *cumulus* contra o estresse oxidativo durante a MIV melhorou de forma eficaz a aquisição da competência necessária para o desenvolvimento pós-fertilização, justamente devido ao aumento significativo das concentrações de GPX1.

A suplementação de oócitos com melatonina inserida em nanocápsulas de núcleo lipídico aumenta a expressão de glutatona peroxidase (GPX1) e SOD2, enquanto reduz a expressão de CASP3 (*caspase-3*) e BAX (*BCL-2 associated protein X*). Essa abordagem não só eleva a PIVE, como também reduz os níveis de EROs e núcleos apoptóticos (REMIÃO et al., 2016). Em adição, constatou-se que a melatonina reduz a organização aberrante do fuso, aumenta a produção de adenosina trifosfato, melhora o desenvolvimento dos oócitos, diminui a taxa de apoptose e regula negativamente BAX e CASP3, além de regular positivamente BCL2 (LIANG et al., 2017). Quando oócitos em fase de vesícula germinativa foram

suplementados com melatonina durante a MIV, houve uma melhoria no desenvolvimento embrionário e no número total de células após a FIV, além de uma regulação positiva de GDF9, MARF1 e DNMT1 α (TIAN et al., 2014). Por fim, também foi relatado que a melatonina, quando adicionada durante o CIV, aumentou a qualidade e a taxa de desenvolvimento embrionário, prevenindo a apoptose (NIKNAFS; MEHDIPOUR; ROUSHANDEH, 2014). Além de demonstrar aumento nas proteínas SOD e BCL2, enquanto reduz CASP3 e p53, favorecendo o desenvolvimento de embriões gerados por transferência nuclear de células somáticas (SALEHI; KATO; TSUNODA, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

A PIVE foi realizada no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Dracena, estado de São Paulo, Brasil. As análises por RT-qPCR e a estatística foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), situado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), cidade de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos realizados no referido estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAT, UNESP, Certificado nº 06/2021.

4.2 Obtenção e seleção dos oócitos

Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) provenientes do Frigorífico ACOVACAT, sediado na cidade de Tupã, estado de São Paulo, localizada a aproximadamente 100km de Dracena. Os ovários foram colhidos imediatamente após o abate e acondicionados em garrafa térmica contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) a uma temperatura de 37°C e transportados ao laboratório (LIFE). No laboratório, os ovários foram desinfetados com álcool etílico hidratado 70% e enxaguados três vezes em solução

salina (NaCl 0,9%) a 37°C. Com o uso de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha 40 × 1,2 mm (18G), folículos com o diâmetro de 2 a 8 mm foram aspirados e o fluido folicular obtido foi depositado em tubos cônicos estéreis de 15 mL mantidos a 37°C em banho-maria.

A fração sedimentada dos oócitos no fundo de cada tubo, foi transferida para placas de poliestireno 100 × 20 mm de diâmetro juntamente com 2 mL de fluido folicular. Utilizando um estereomicroscópico (Nikon SMZ800N, Tokyo, Japão), os oócitos foram rastreados, avaliados e categorizados em graus I, II ou III (STOJKOVIC et al., 2001). Foram utilizados somente estruturas classificadas como grau I (oócito com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células cumulus compactas) e II (heterogeneidade discreta no citoplasma oocitário e mais de 5 camadas compactas de células do cumulus).

Os oócitos selecionados foram acondicionados em placa de Petri de 35 mm, contendo 1 mL de meio de lavagem [Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035 com bicarbonato, albumina sérica bovina (5mg/mL), piruvato (2 µL/ml de solução a 100 mM) e amicacina (75 µL/mL)]. Em seguida, foram distribuídos de forma equitativa entre os diferentes grupos experimentais, onde cada repetição experimental utilizou-se de 14 a 25 oócitos por tratamento.

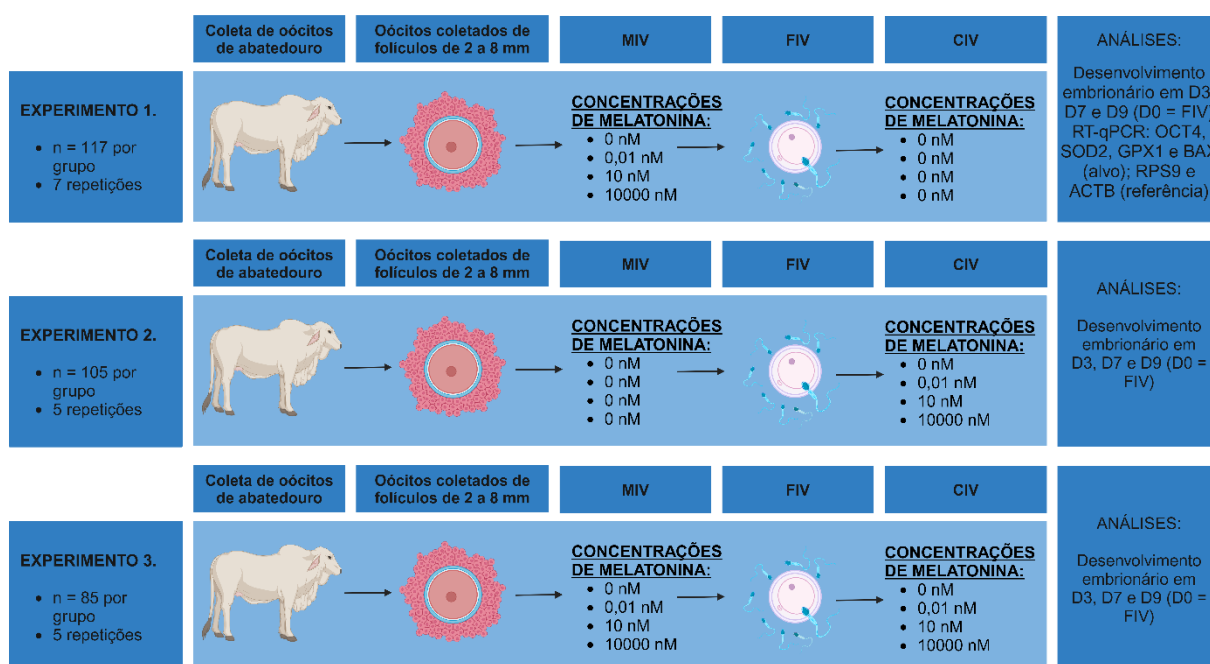
4.3 Preparo da Melatonina

A melatonina (M5250, Sigma Aldrich) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, D2650, Sigma Aldrich) em uma solução base de 0,2 M, que foi diluída em série em meio de maturação oocitária (quando utilizada na MIV) e/ou cultivo embrionário (quando utilizada no CIV) de forma que atingisse as concentrações de 0,01 nM (10^{-11} M), 10 nM (10^{-8} M) e 10000 nM (10^{-5} M). A concentração intermediária (10^{-8} M), utilizada no referido estudo, foi escolhida com base na literatura, que indicava valores entre 10^{-7} e 10^{-9} M como ideais (WANG et al., 2014a; TIAN et al., 2014). Independente da concentração de melatonina utilizada, padronizou-se a concentração de 0,01% de DMSO (diluente da melatonina) no meio de cultivo, para todos os grupos de tratamento. A manipulação da melatonina foi realizada em ambiente com baixa luminosidade e as alíquotas, acondicionadas em tubos de 1,5 mL foram envolvidas por folhas de alumínio para proteção contra a luz.

4.4 Organização experimental

O estudo foi dividido em três experimentos, onde as concentrações de 0,01 nM (10^{-11} M), 10 nM (10^{-8} M) e 10000 nM (10^{-5} M) de melatonina (M5250, Sigma Aldrich) foram utilizadas no meio de cultivo exclusivamente na MIV (Experimento 1), exclusivamente no CIV (Experimento 2) e na MIV e CIV (Experimento 3). Em todos os experimentos a produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 [blastocistos totais e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de blastocisto] e D9 [blastocistos totais, blastocistos por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. No Experimento 1, foram avaliados os transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), marcador de qualidade embrionária especificamente ligado a pluripotência celular; SOD2 (*superoxide dismutase 2*), gene protetor contra o estresse oxidativo mitocondrial; GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), gene protetor do estresse oxidativo celular; BAX (*BCL2 associated X*), gene ativador de apoptose, utilizando-se do RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*) como genes de referência, conforme apresentado na **Figura 3**.

Figura 3 – Organização experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.1 Experimento 1. Foram avaliados os efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos nos dias D3 (taxa de clivagem), D7 [número de blastocistos totais e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de blastocisto] e no D9 [número de blastocistos totais, blastocistos por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. Os oócitos (15 a 25 estruturas) foram distribuídos em 4 grupos experimentais: meio base de MIV acrescido com 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) igual a concentração presente nos demais tratamentos (Grupo controle); meio base de MIV acrescido de 10000 nM de melatonina; meio base de MIV acrescido de 10 nM de melatonina e meio base de MIV acrescido de 0,01 nM de melatonina. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados em meio de FIV e, posteriormente, foram cultivados em meio de CIV. Foram realizadas 7 repetições, que totalizaram 117 oócitos por grupo de tratamento. Para o RT-qPCR foram utilizados *pools* compostos de 3 embriões, sendo avaliados 6 *pools* (18 embriões) no grupo controle, 5 *pools* no grupo 10 nM (15 embriões) e 4 *pools* no grupo (12 embriões) no grupo 10000 nM. O grupo suplementado com 0,01 nM de melatonina não produziu um número de embriões suficientes que gerasse a quantidade mínima de RNA, para que se procedesse com a RT-qPCR.

4.4.2 Experimento 2. Foram avaliados os efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina ao meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos nos dias D3 (taxa de clivagem), D7 [número de blastocistos totais e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de blastocisto] e no D9 [número de blastocistos totais, blastocistos por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. Os oócitos (15 a 25 estruturas) foram maturados em meio base de MIV. Após a fertilização, os possíveis embriões foram distribuídos em 4 grupos experimentais: meio base de CIV acrescido com 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) igual a concentração presente nos demais tratamentos (Grupo controle); meio base de CIV acrescido de 10000 nM de melatonina; meio base de CIV acrescido de 10 nM de melatonina e meio base de CIV acrescido de 0,01 nM de melatonina. Foram realizadas 5 repetições, que totalizaram 105 oócitos por grupo. No experimento 2 não houve produção suficiente de embriões para que

se pudesse proceder com as análises por RT-qPCR, assim foi possível avaliar apenas a produção embrionária e não a qualidade embrionária.

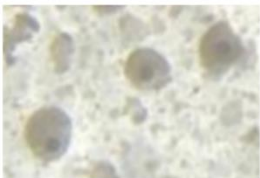
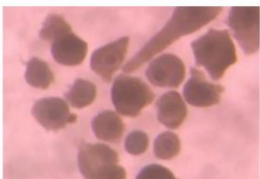
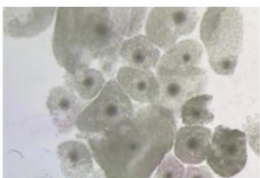
4.4.3 Experimento 3. Foram avaliados os efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina ao meio de maturação *in vitro* oócitos e cultivo *in vitro* de embriões bovinos nos dias D3 (taxa de clivagem), D7 [número de blastocistos totais e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de blastocisto] e no D9 [número de blastocistos totais, blastocistos por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. Os oócitos (10 a 17 estruturas) e embriões foram cultivados em 4 grupos experimentais: meio base de MIV para oócitos e CIV para embriões acrescido com 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) igual a concentração presente nos demais tratamentos (Grupo controle); meio base de MIV para oócitos e CIV para embriões acrescido de 10000 nM de melatonina (Grupo 10000); meio base de MIV para oócitos e CIV para embriões acrescido de 10 nM de melatonina (Grupo 10) e meio base de MIV para oócitos e CIV para embriões acrescido de 0,01 nM de melatonina (Grupo 0,01). Foram realizadas 5 repetições, que totalizaram 85 oócitos por grupo. No experimento 3 não houve uma produção suficiente de embriões para que se pudesse proceder com as análises por RT-qPCR, assim foi possível avaliar apenas a produção embrionária e não a qualidade embrionária.

4.5 Maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos

Os oócitos selecionados foram lavados três vezes em meio de lavagem [Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035 com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/mL), piruvato (2 µL/ml de solução a 100 mM), amicacina (75 µL/mL)], sendo que para cada uma das lavagens foi utilizado 50 µL de meio. Em seguida, foram lavados por mais três vezes, onde em cada lavagem utilizou-se 50 µL do meio específico do tratamento aplicado na MIV. Os oócitos de cada grupo foram maturados em meio base para MIV [Gibco™ Medium 199 com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/ml), piruvato (2 µL/ml de solução a 100 mM), amicacina (75 µL/mL), hormônio folículo estimulante (20 µL/mL) e hormônio luteinizante (2µL/mL)] acrescido de soro fetal bovino (10%) contendo ou não

melatonina nas diferentes concentrações (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM, além do grupo controle acrescido com 0,01% de DMSO). Os oócitos foram cultivados em placas de Petri 35 mm, livres de nucleases, em gotas com 100 µL de meio onde foram alocadas de 14 até 25 estruturas/gota, dependendo da repetição. As gotas contendo o meio de cultivo e os oócitos foram submersas em óleo mineral específico para cultivo (BotuFIV® Óleo para Cultivo). O cultivo foi realizado em incubadora de alta tensão de O₂, atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 38,5°C; durante 24 horas (Figura 4).

Figura 4 – Oócitos em diferentes estágios da maturação *in vitro*

1.		Oócitos sendo selecionados após aspiração folicular
2.		Oócitos selecionados e transferidos para o meio de maturação (MIV)
3.		Oócitos maturados depois de 24 horas em incubadora com atmosfera úmida contendo 5% de CO ₂ a uma temperatura de 38,5°C

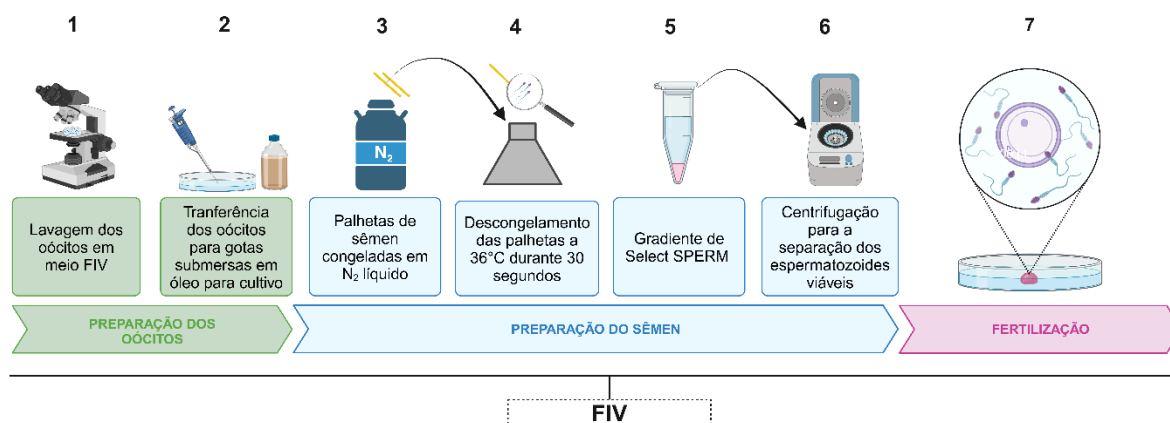
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos

Após os oócitos terem sido maturados por 24 horas, foram lavados em uma gota contendo 50 µL de meio de lavagem [Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035 com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/ml), piruvato (2 µL/ml de solução a 100 mM), amicacina (75 µL/mL)]. Em seguida, os oócitos foram lavados por três vezes, onde em cada lavagem foi utilizado 50 µL de meio base para a fertilização [TL Stock acrescido de albumina sérica bovina (6 mg/mL), piruvato (2 µL/mL de solução a 100 mM), gentamicina (75 µg/mL), heparina (3 µg/mL) e solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (44 µL/mL)]. Em seguida, os oócitos foram transferidos para gotas com 100 µL de meio base para fertilização contidas em

placas de Petri 35 mm livres de nucleases (**Figura 5**), onde cada gota acomodou até 25 estruturas.

Figura 5 – Esquema de fertilização *in vitro* dos oócitos



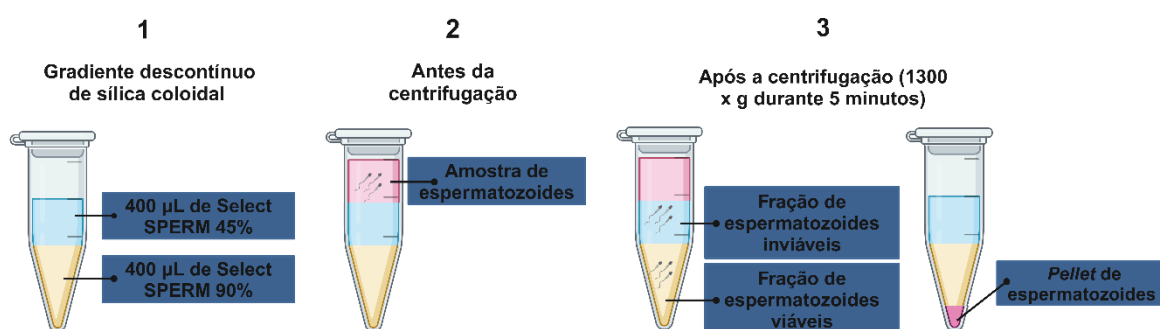
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Preparo do sêmen para a fertilização *in vitro* (FIV)

Palhetas de sêmen derivadas de um único touro da raça Nelore e de uma única partida, foram utilizadas nos três experimentos, onde uma palheta foi utilizada a cada repetição. A palheta armazenada em nitrogênio líquido, foi descongelada a 36°C em descongelador automático de sêmen e embriões (WTA, Watanabe Biotecnologia Aplicada Ltda. Brasil) durante 30 segundos. Posteriormente, o conteúdo da palheta foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo um gradiente descontínuo de sílica coloidal [Meio BotuFIV® Sperm Select (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) partículas de sílica coloidal], onde foram utilizados 400 µL a 90% abaixo e 400 µL a 45% acima, sendo o gradiente superior resultante da diluição de 200 µL de sílica coloidal em 200 µL de TL sêmen [TL Stock, piruvato (2 µL/mL de solução a 100 mM), gentamicina (75 µg/ml)]. O microtubo foi centrifugado a 1300 × *g* durante cinco minutos em temperatura ambiente (**Figura 6**). O *pellet* resultante (50 µL) foi reservado; 5 µL do *pellet* foi transferido para um microtubo contendo 195 µL de água deionizada. Em seguida, 10 µL dessa diluição foi depositada em uma Câmara de Neubauer para avaliação da concentração espermática e motilidade (%). Outros 5 µL do *pellet* foram transferidos para um microtubo contendo 50 µL de meio base para fertilização [TL Stock acrescido de

albumina sérica bovina (6 mg/mL), piruvato (2 μ L/mL de solução a 100 mM), gentamicina (75 μ g/mL), heparina (3 μ g/mL) e solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (44 μ L/mL)]. Após a avaliação da concentração e motilidade, a para obtenção do volume de meio base (μ L) para fertilização *in vitro* necessário para diluição do *pellet* remanescente foi utilizada a seguinte fórmula [(volume do *pellet* $\times$ motilidade $\times$ concentração espermática) / 100 - volume do *pellet*].

Figura 6 – Esquema de separação de sêmen a partir de diferentes densidades de Select SPERM (Botupharma®)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Fertilização *in vitro* (FIV)

Após a diluição do *pellet*, 6 μ L foram utilizados para cada gota de forma que fosse obtida a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL, de maneira que o volume final de cada gota fosse de 100 μ L. As gotas foram submersas em BotuFIV® óleo para cultivo. A fertilização *in vitro* foi realizada em incubadora de alta tensão de O₂, atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 38,5°C; durante 18 horas.

4.9 Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões

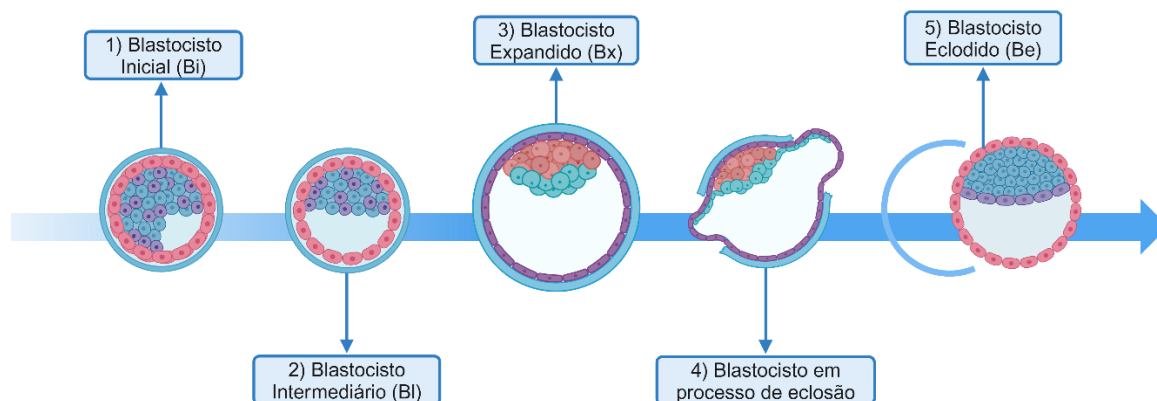
Após as 18 horas de FIV, os possíveis embriões foram desnudados por sucessivas "pipetagens" com o objetivo de remoção das células do *cumulus* excedentes. Para tal procedimento, foram utilizados 50 μ L de meio de lavagem [Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035 com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/mL), piruvato (2 μ L/ml de solução a 100 mM), amicacina (75 μ L/mL)] suplementado com 10% de SFB. Em seguida, os presumíveis embriões foram

lavados três vezes em meio de lavagem. Para cada uma das lavagens foi utilizado 50 µL de meio de lavagem. Logo após, os embriões foram lavados por mais três vezes, onde para cada uma das lavagens foi utilizado 50 µL do meio específico de tratamento a ser aplicado no CIV. Os embriões foram cultivados em meio base [fluido sintético de oviduto, acrescido de soro fetal bovino (2,5%) e piruvato (2 µL/mL de solução a 100 mM)] acrescido de 2,5% de SFB, contendo ou não melatonina nas diferentes concentrações (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM, além do grupo controle acrescido com 0,01% de DMSO). As gotas foram submersas em BotuFIV® óleo para cultivo. Os prováveis zigotos foram cultivados em incubadora de alta tensão de O₂, atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 38,5°C; durante nove dias, onde o dia da FIV foi estabelecida como o dia zero (D0).

4.10 Avaliação do desenvolvimento embrionário

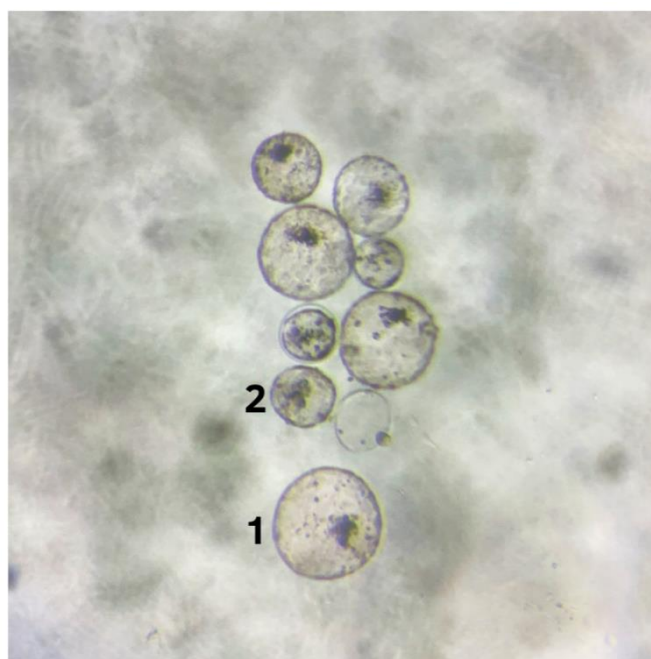
A taxa de clivagem foi avaliada no D3 do CIV, onde as estruturas foram classificadas em clivadas ou não clivadas. No D7 e D9 os blastocistos foram classificados morfológicamente em blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (**Figura 7**). No D7 a taxa de blastocisto foi determinada pelo [(número de blastocistos observados/número de presumíveis embriões cultivados) × 100]. No D9, a taxa de eclosão foi determinada pelo [(número de blastocistos eclodidos / número de presumíveis embriões cultivados) × 100] (**Figura 8**).

Figura 7 – Esquematisação do desenvolvimento dos blastocistos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Blastocisto eclodido (1) e blastocisto expandido (2) registrados no dia 9 de cultivo



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11 Armazenamento dos embriões para análise por RT-qPCR

Após a avaliação da taxa de eclosão no D9, os blastocistos eclodidos foram lavados em três gotas de 50 µL de solução salina tamponada com fosfato [PBS 1X, pH 7.4 (Nova Biotecnologia, Brasil)], suplementado com 4% de albumina sérica bovina (A9647, Sigma Aldrich). Os blastocistos foram armazenados individualmente

ou reunidos em *pools* de três embriões com aproximadamente 3 µL do meio da última gota de lavagem em microtubo de 500 µL que foi acondicionado em tubo criogênico de 2 mL (43012, SPL Life Sciences). Os embriões foram armazenados em nitrogênio líquido o para posterior análise por RT-qPCR.

4.12 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído usando PicoPure RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific KIT0204/KIT0214), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA total extraído das amostras foi determinada usando espectrofotometria (NanoVue; GE Healthcare), onde os valores das razões de absorbância (A260/280) variaram entre 1,7 e 2. Amostras de RNA (300 ng) de embriões foram tratadas com DNase I (Invitrogen, DNase I Amplification Grade, Ref. 18068-015, CA, USA) e reações de transcrição reversa de cDNA (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Ref. 4368814, Foster City, CA). A RT-qPCR foi realizada usando corante SYBR Green (Applied Biosystems Inc.). As reações de RT-qPCR e a detecção de fluorescência foram realizadas no termociclador Step One Plus Real-Time PCR System programado para iniciar com estágio de espera (95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento e extensão (60°C por 1 minuto). A curva de dissociação (*melting*) foi obtida imediatamente após a amplificação permanecendo a 95°C por 15 minutos, passando a 60°C por 1 minuto e voltando a 95°C por 15 minutos. Para cada gene, diferentes concentrações de primers foram testadas (150 nM, 300 nM, 450 nM ou 600 nM). Para o referido teste de concentração utilizou-se um *pool* de amostras de cDNA diluído em 1:20. Para todas as concentrações testadas avaliou-se a eficiência da amplificação, falta de amplificação no controle negativo e análise da curva de *melting*. Depois de eleita a melhor concentração para cada primer, elaborou-se uma curva padrão composta por cinco pontos de pool de cDNA diluído em série de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Cada ponto da curva foi testado em duplicata. A eficiência de amplificação foi calculada pela equação: Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 70 e 100% e coeficiente de determinação da equação de regressão (R^2) $\geq 0,88$. Os genes de referência foram validados e utilizados como

housekeeping após determinação da estabilidade de expressão por meio do software geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Após a validação, os genes RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*) foram utilizados como referência. A média geométrica da abundância desses dois genes foi usada para a normalização da abundância dos genes alvo. No Experimento 1, os transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), marcador de qualidade embrionária especificamente de pluripotência celular; SOD2 (*superoxide dismutase 2*), antioxidante mitocondrial; GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), antioxidante celular; e BAX (*BCL2 associated X*), ativador de apoptose; além dos genes de referência RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*). Também foram testados, mas não validados, os genes CDX2 (*caudal type homeobox 2*), TP53 (*tumor protein p53*), BCL2 (*BCL2 apoptosis regulator*) e CASP3 (*caspase 3*). As características dos primers validados estão apresentadas na **Tabela 4**. A **Tabela 5** apresenta os dados de validação dos oligonucleotídeos iniciadores e da concentração das amostras dos genes alvo e de referência para RT-qPCR de embriões bovinos no D9.

Tabela 4 – Nomenclatura, sequências forward (F) e reverse (R), função, número GenBank e artigo de referência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na avaliação de blastocistos bovinos eclodidos produzidos *in vitro* no D9 (D0 = dia da FIV) pela técnica de RT-qPCR

Nomenclatura	Sequência forward (F) e reverse (R)	Função	GenBank	Referência
OCT4 (<i>POU class 5 homeobox 1</i>)	F. TGGAGGAAGCTGACAACA R. ATGTGGCTAATTTGCTGCA	Pluripotência celular	-	CINTRA et al., 2022
SOD2 (<i>superoxide dismutase 2</i>)	F. AGCACGAGCAGGAGACTGGT R. GACGTTGAGGTTGTTACGCTAG	Antioxidante mitocondrial	-	CINTRA et al., 2022
GPX1 (<i>glutathione peroxidase 1</i>)	F. GCAACCAGTTTGGGCATCA R. CTCGCACTTTTCTGAAGAGCATA	Antioxidante celular	NM_174076	CAÑÓN-BELTRÁN et al., 2020
BAX (<i>BCL2 associated X</i>)	F. TGTTTTCTGACGGCAACTTCA R. CGAAGGAAGTCCAATGTCCAG	Pró-apoptótico	-	CINTRA et al., 2022
RPS9 (<i>Ribosomal protein S9</i>)	F. GAGCTGGGTTTGTGCGAAA R. GGTCTGAGGCGGGACTTCT	Gene de referência	DT860044	HUGHES et al., 2017
ACTB (<i>beta-actin</i>)	F. GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R. TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	Gene de referência	NM_173979.3	BETTEGOWDA et al., 2006

Fonte: Mendes (2024)

Tabela 5 – Dados de validação dos oligonucleotídeos iniciadores e da concentração das amostras dos genes alvo e de referência para RT-qPCR de embriões bovinos aos 9 dias de desenvolvimento

Nomenclatura	OCT4	SOD2	GPX1	BAX	RPS9	ACTB
Classificação do gene	Gene alvo	Gene alvo	Gene alvo	Gene alvo	Gene de referência	Gene de referência
Concentração do primer (nM)	150	300	300	150	300	300
Diluição da amostra	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Eficiência de amplificação (%)	102,43	98,14	96,03	106,70	103,70	99,42

Fonte: Mendes (2024)

4.13 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando o software SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando a gota de cultivo como unidade experimental. As taxas de desenvolvimento embrionário foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida de contrastes para comparar os grupos: grupo controle vs. todas as concentrações de melatonina, grupo controle vs. 10000 nM de melatonina, e 0,01 nM vs. 10000 nM de melatonina. Os resultados das taxas de desenvolvimento embrionário são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

A abundância dos transcritos foi analisada por ANOVA utilizando o efeito fixo do tratamento, empregando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), com o *pool* de embriões como unidade experimental. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Em todas as análises, a significância foi considerada para valores de $P \leq 0,05$, enquanto $P > 0,05$ e $< 0,1$ foi interpretado como tendência.

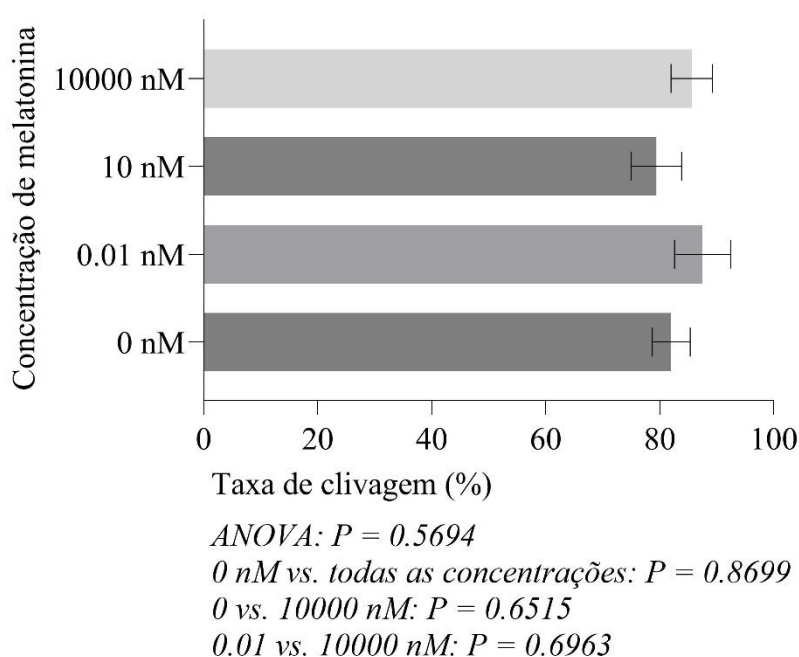
5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

5.1.1 Taxa de clivagem em D3

Como mostrado na **Figura 9**, a adição de melatonina na MIV não teve efeito sobre a taxa de clivagem ($P = 0,5694$), tanto na comparação entre os diferentes grupos de tratamento quanto na análise dos contrastes.

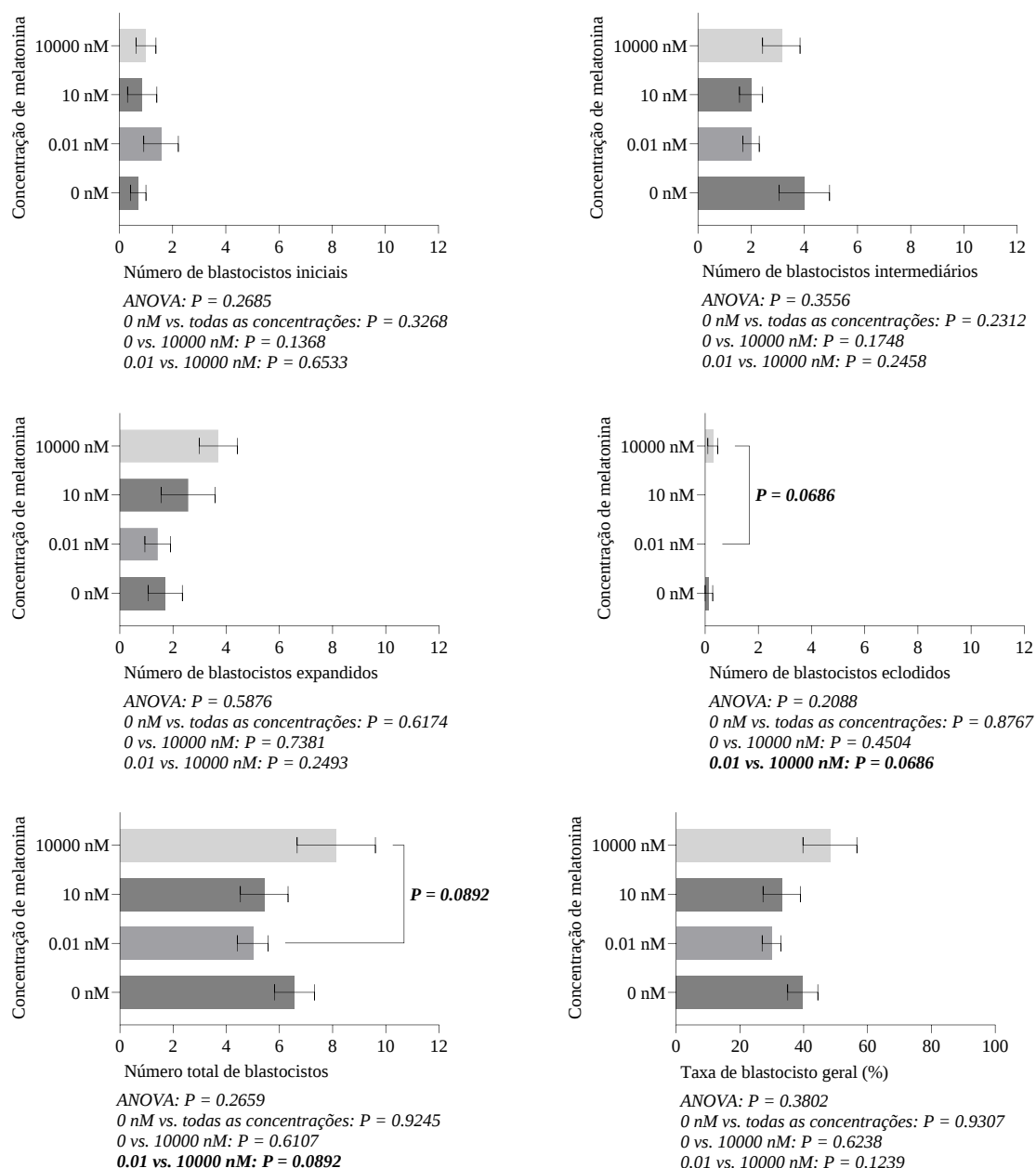
Figura 9 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos sobre a taxa de clivagem dos embriões no Dia 3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão



5.1.2 Produção de embriões em D7

Como mostrado na **Figura 10**, a adição de melatonina para todas as concentrações avaliadas não aumentou o número de blastocistos iniciais ($P = 0,2685$), blastocistos intermediários ($P = 0,3556$), blastocistos expandidos ($P = 0,5876$), blastocistos eclodidos ($P = 0,2088$), blastocistos totais ($P = 0,2659$) e taxa de blastocisto ($P = 0,3802$). Na comparação por contrastes, observou-se uma tendência para um maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P = 0,0892$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM.

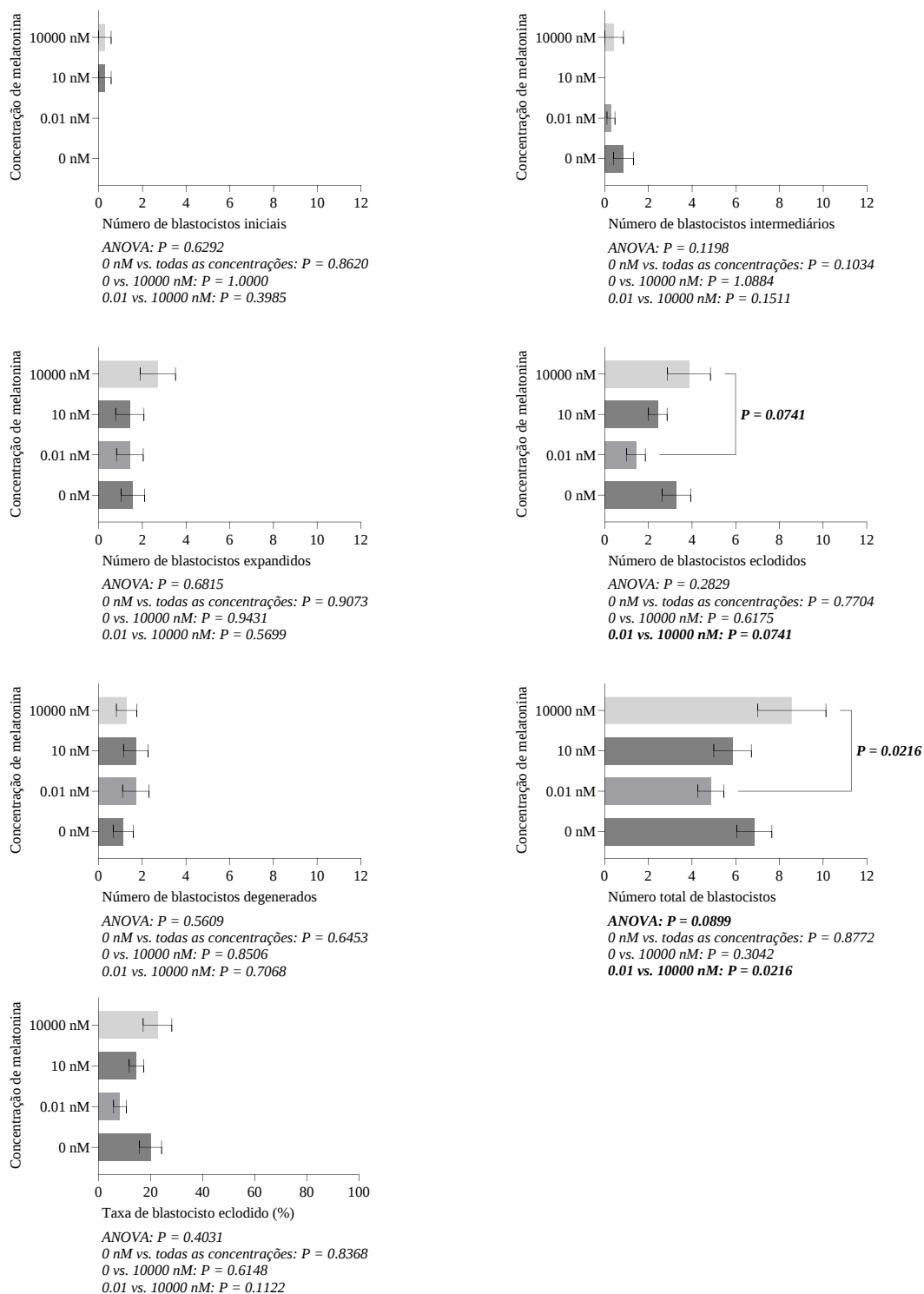
Figura 10 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos, eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D7 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão



5.1.3 Produção de embriões em D9

Como mostrado na **Figura 11**, a adição de melatonina para todas as concentrações avaliadas não aumentou o número de blastocistos iniciais ($P = 0,6292$), blastocistos intermediários ($P = 0,1198$), blastocistos expandidos ($P = 0,6815$), blastocistos eclodidos ($P = 0,2829$), blastocistos totais ($P = 0,0899$) e taxa de blastocisto ($P = 0,4031$). Na comparação por contrastes, observou-se uma tendência para um menor número de blastocistos intermediários ($P = 0,0884$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0 nM. Observou-se também um maior número de blastocistos totais ($P = 0,0216$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM e uma tendência ($P = 0,741$) de maior número de blastocistos eclodidos no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM.

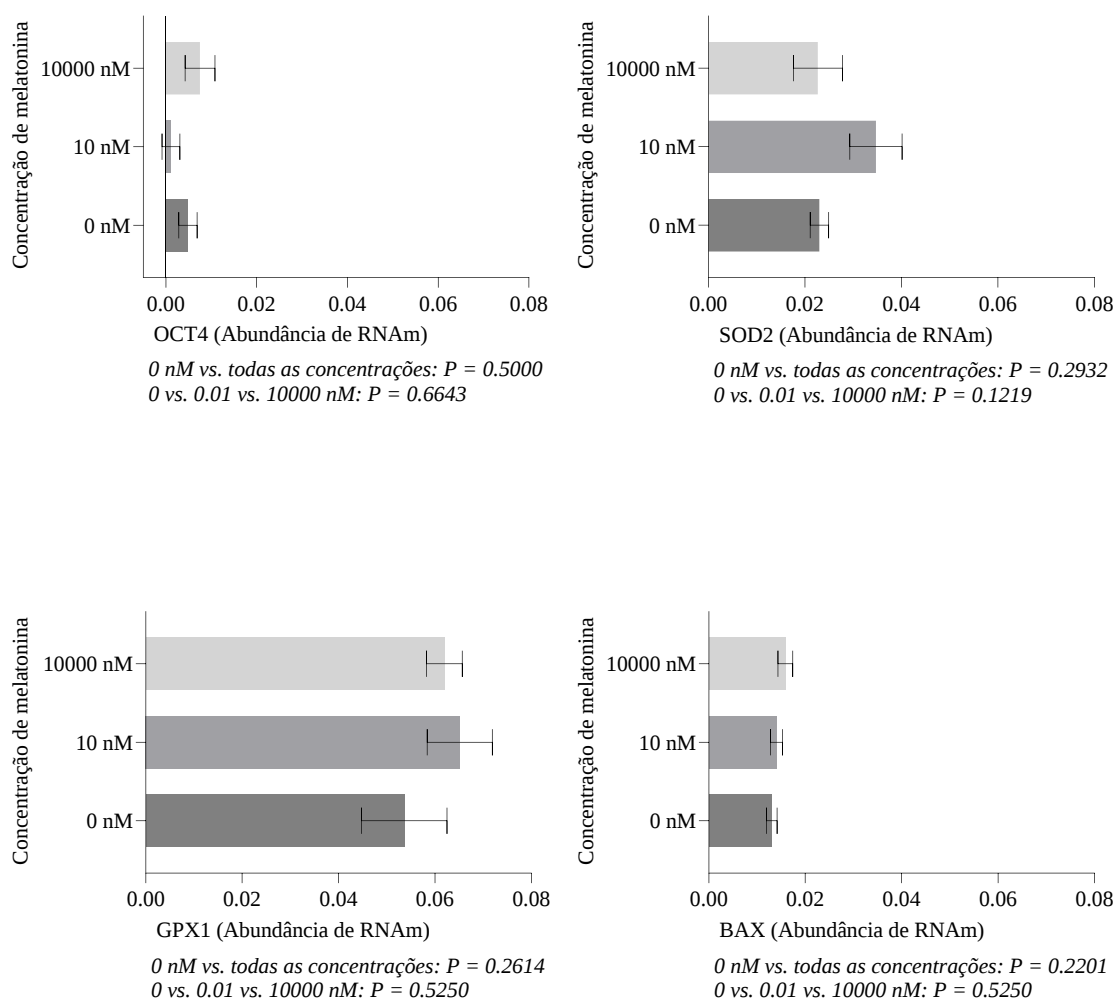
Figura 11 – Experimento 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos, eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D9 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão



5.1.4 Expressão gênica de blastocistos eclodidos em D9

Como mostrado na **Figura 12**, a adição de melatonina nas concentrações de 10 e 10000 nM não aumentou a abundância dos transcritos dos genes OCT4, SOD2, GPX1 e BAX, tanto na comparação entre os diferentes grupos de tratamento quanto na análise dos contrastes.

Figura 12 – Experimento 1. Avaliação por RT-qPCR da expressão dos transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*) e BAX (*BCL2 associated X*) em blastocistos eclodidos no D9 (D0 = dia da FIV) oriundos de oócitos suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0, 10 ou 1000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV). Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão

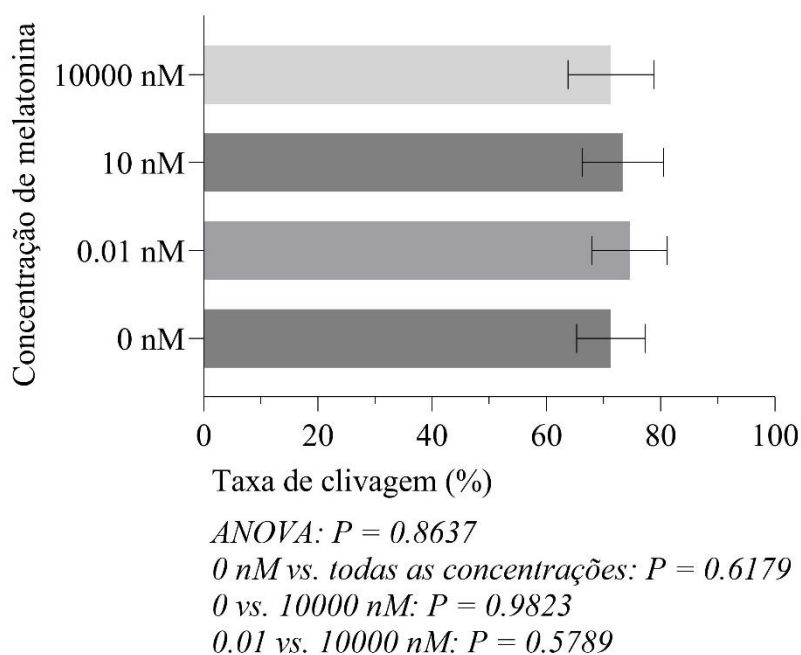


5.2 Experimento 2

3.2.1 Taxa de clivagem em D3

Como mostrado na **Figura 13**, a adição de melatonina no CIV não teve efeito sobre a taxa de clivagem ($P = 0,8637$), tanto na comparação entre os diferentes grupos de tratamento quanto na análise dos contrastes.

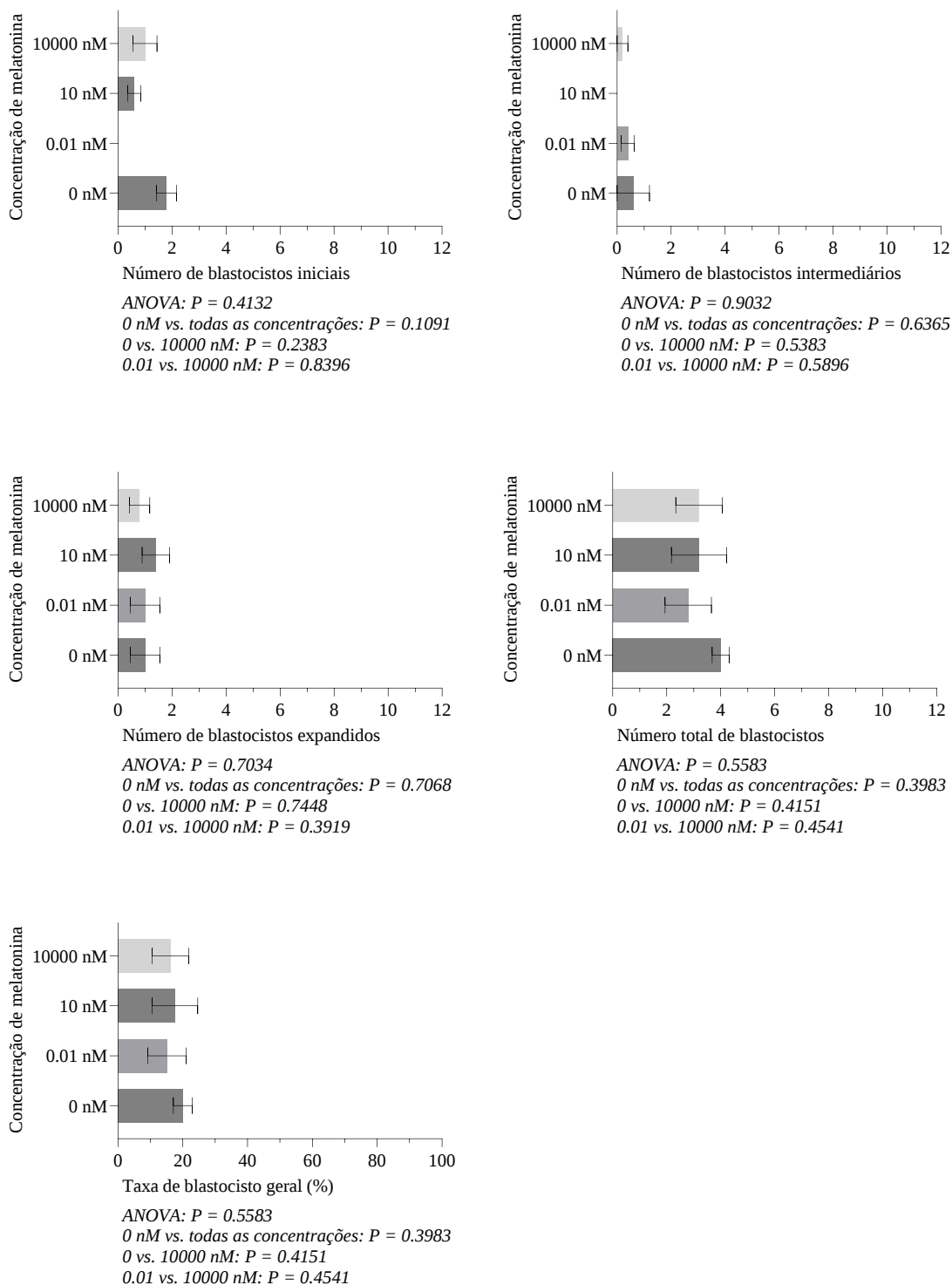
Figura 13 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo *in vitro* (CIV) na taxa de clivagem de embriões bovinos no D3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão



5.2.2 Produção de embriões em D7

Como mostrado na **Figura 14**, a adição de melatonina durante o CIV, para todas as concentrações avaliadas, não afetou a produção de blastocisto inicial, intermediário, expandido, blastocistos totais e taxa de blastocisto.

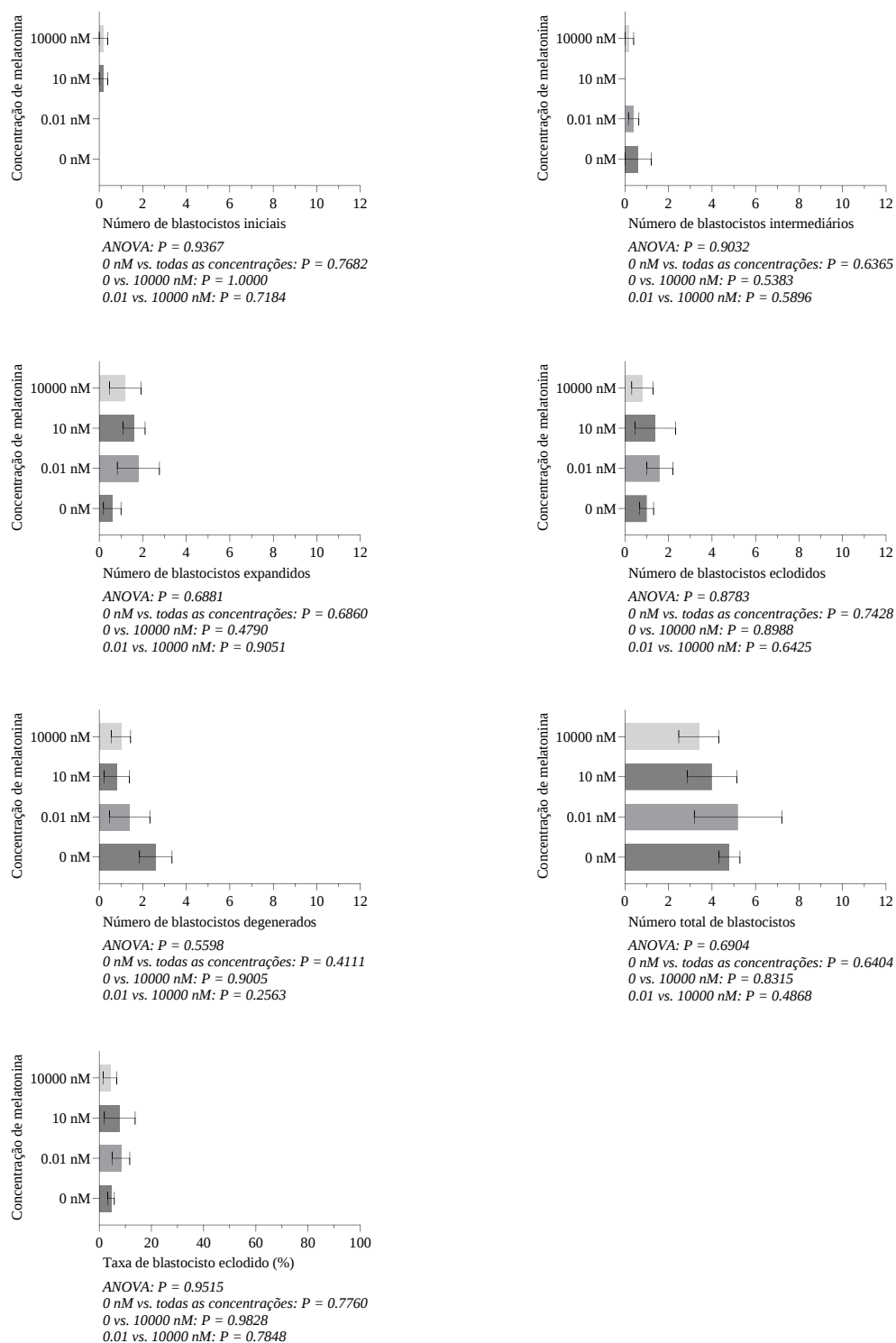
Figura 14 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo *in vitro* (CIV) no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de blastocisto. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão



5.2.3 Produção de embriões em D9

Como mostrado na **Figura 15**, a adição de melatonina durante o CIV, para todas as concentrações avaliadas, não afetou a produção de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão.

Figura 15 – Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o cultivo *in vitro* (CIV) no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão

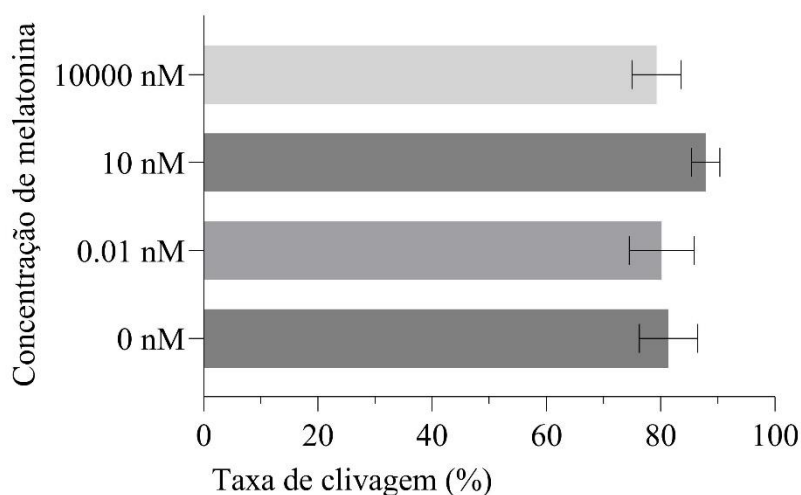


5.3 Experimento 3

5.3.1 Taxa de clivagem em D3

Como mostrado na **Figura 16**, a adição de melatonina na MIV e CIV não teve efeito sobre a taxa de clivagem ($P = 0,6685$), tanto na comparação entre os diferentes grupos de tratamento quanto na análise dos contrastes.

Figura 16 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) na taxa de clivagem de embriões bovinos no D3 (D0 = dia da FIV). Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão



ANOVA: $P = 0.6685$

0 nM vs. todas as concentrações: $P = 0.4221$

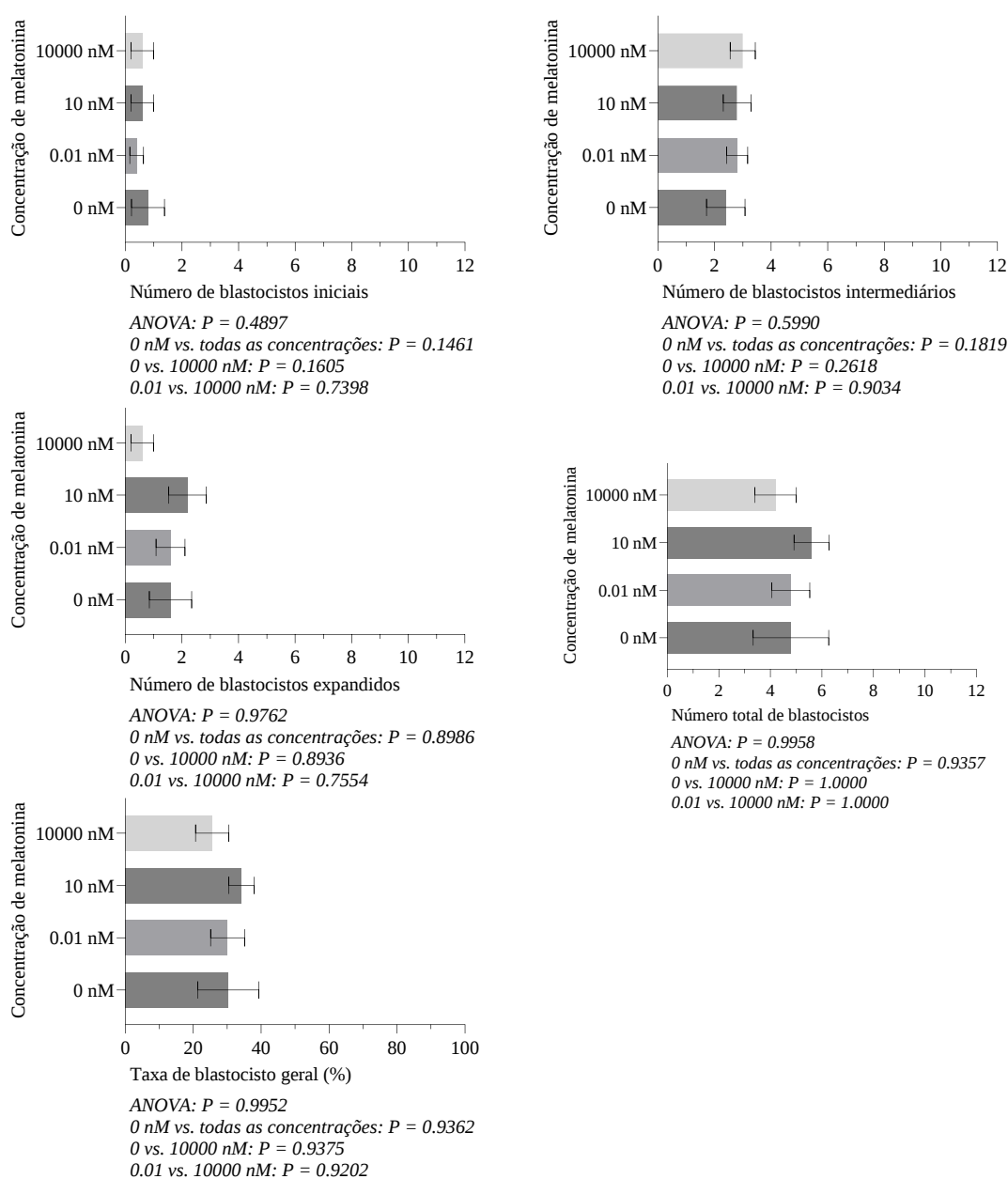
0 vs. 10000 nM: $P = 0.8280$

0.01 vs. 10000 nM: $P = 0.6822$

5.3.2 Produção de embriões em D7

Como mostrado na **Figura 17**, a adição de melatonina durante a MIV e CIV, para todas as concentrações avaliadas, não afetou a produção de blastocisto inicial, intermediário, blastocisto expandido, blastocisto eclodido, blastocistos totais e taxa de blastocisto.

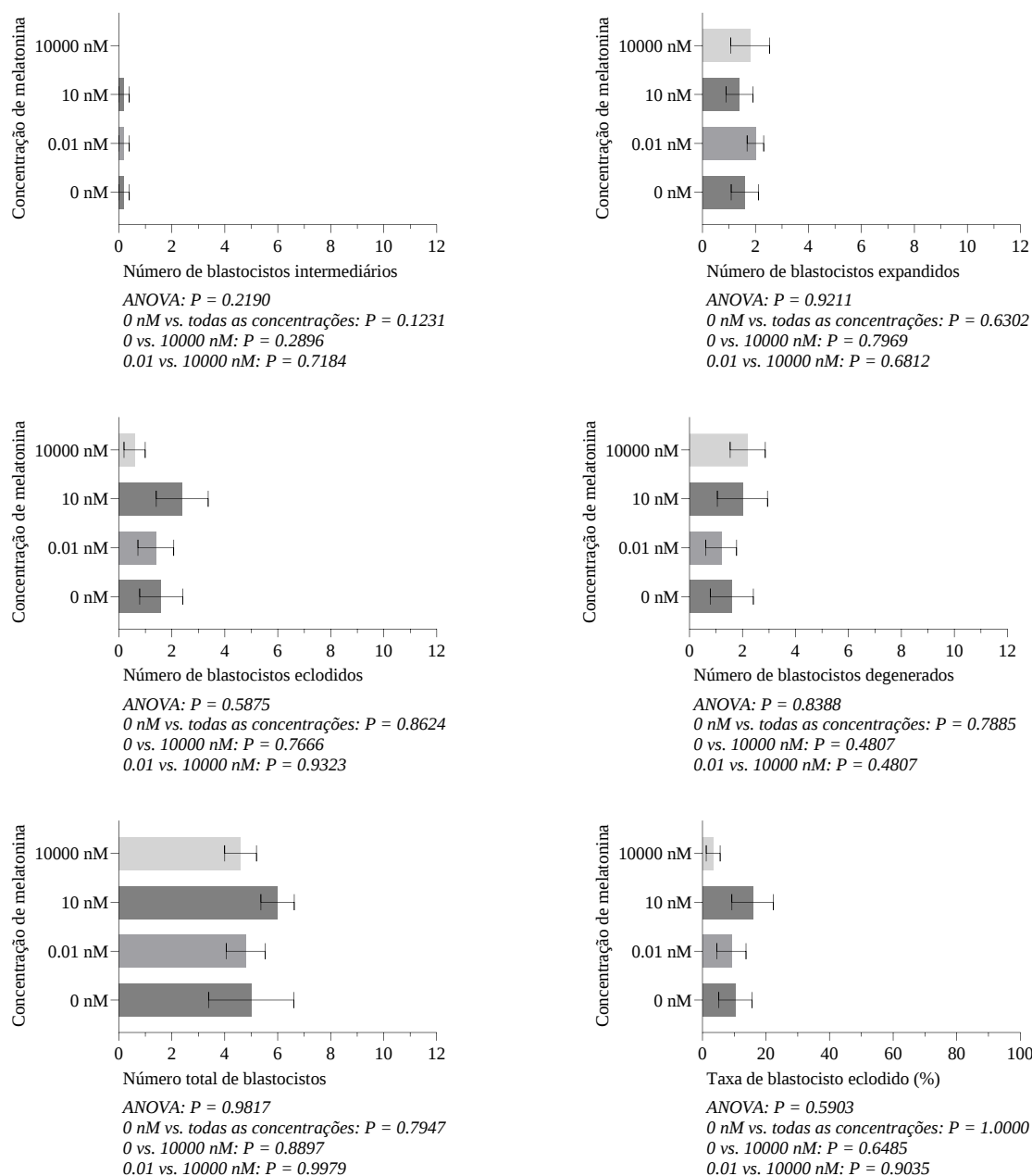
Figura 17 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, blastocistos totais e taxa de blastocisto geral. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão



5.3.3 Produção de embriões em D9

Como mostrado na **Figura 18**, a adição de melatonina durante o CIV, para todas as concentrações avaliadas, não afetou a produção de blastocistos intermediários, expandidos, eclodidos, totais e taxa de eclosão.

Figura 18 – Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão



6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da melatonina em oócitos e/ou embriões bovinos da raça Nelore utilizando três concentrações diferentes: 0,01 nM (10^{-11} M), 10 nM (10^{-8} M) e 10000 nM (10^{-5} M). O trabalho focou na comparação entre os grupos de tratamento, avaliando como a concentração de melatonina e a etapa de adição influenciaram no desenvolvimento embrionário. Na MIV, a concentração de 10000 nM (10^{-5} M) mostrou-se promissora para a produção embrionária quando comparada à concentração de 0,01 nM (10^{-11} M).

Embora a qualidade intrínseca do oócito seja fundamental para determinar a taxa de desenvolvimento desse gameta em blastocisto, o ambiente de cultivo também desempenha um papel crítico nesse processo (YANG et al., 1998; LUBERDA, 2005; SUGINO, 2005). Curiosamente, apesar da melatonina estar presente no fluido folicular em concentrações fisiológicas de aproximadamente 1,1 a $1,3 \times 10^{-10}$ M durante o desenvolvimento do oócito, os meios de maturação *in vitro* comumente utilizados para essas estruturas não incluem esse hormônio em sua composição (TAMURA et al., 2009). Os protocolos mais comuns empregados durante a PIVE utilizam de meio base comercial para maturação *in vitro* (WALLS et al., 2018), que contém em sua composição o hormônio FSH, responsável por promover a maturação oócitaria (BURATINI et al., 2021). Embora o FSH seja amplamente utilizado, estudos sugerem que a melatonina isolada, em uma concentração de 10^{-9} M, resulta na retomada da meiose em oócitos bovinos após a maturação, alcançando resultados similares aos obtidos com o uso de FSH (FERNANDES, 2020). A interação entre os diferentes fatores e as alterações na demanda metabólica dos oócitos durante a MIV, tornaram o desenvolvimento de um meio de cultivo fisiologicamente eficaz bastante complexo (TUTT et al., 2023). Com base nessas dificuldades, levantou-se questões referentes ao possível potencial da melatonina no desenvolvimento embrionário quando adicionada ao ambiente de cultivo.

A administração dessa molécula tem sido bastante relacionada à melhora na qualidade dos oócitos (NAKAMURA et al., 2003). Esse efeito não se deve apenas à sua ação antioxidante contra as EROs (REITER et al., 2008), mas também à sua capacidade de reduzir a apoptose (SUCCU et al., 2014), ativar outras enzimas antioxidantes (MEHAISEN et al., 2014) e melhorar a maturação nuclear e

citoplasmática dos oócitos em diferentes espécies (YANG et al., 2020; BARROS et al., 2020; EL-RAEY et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2021; MANJUNATHA et al., 2009).

Neste estudo, embora as concentrações de melatonina testadas não tenham mostrado efeito positivo significativo na produção embrionária em relação ao grupo controle, o experimento 1 demonstrou uma tendência favorável para a concentração de 10000 nM (10^{-5} M). Essa concentração mais elevada mostrou tendência para um número superior de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P = 0,0892$), em comparação à concentração mais baixa de 0,01 nM (10^{-11} M) quando adicionada à MIV. Em consonância com essa observação, a concentração de 10000 nM destacou-se por atingir uma taxa de blastocistos de 48,2% no D7, sugerindo um impacto mais expressivo no desenvolvimento embrionário em comparação às demais concentrações analisadas.

De acordo com Silva et al. (2020), as taxas de produtividade embrionária durante a PIVE quando relacionadas à adição de melatonina (10^{-5} μ M) no meio de cultivo durante a MIV, resultaram em taxas superiores de clivagem (52,9%), mórula (52,9%) e blastocisto (35,3%) em comparação ao grupo controle, que apresentou taxas de 38,6%, 36,1% e 18,1%, respectivamente. Outros autores também relataram que a qualidade dos blastocistos avaliados no D7 em grupos tratados com dose de 50 ng/mL de melatonina foi significativamente maior em comparação ao grupo controle, podendo-se afirmar que a molécula melhora suficientemente o meio de cultivo e conseqüentemente, a qualidade das estruturas cultivadas (CÓRDOBA et al., 2023). Em outras espécies, o tratamento de células doadoras de núcleo com melatonina na concentração de 10^{-10} M não apenas aumentou a eficiência na reconstrução de embriões clonados, mas também a incubação desses embriões nas concentrações de 10^{-9} M ou 10^{-12} M resultou em um desenvolvimento significativamente melhorado em embriões suínos (PANG et al., 2012).

Durante a PIVE, os oócitos e embriões são submetidos a concentrações de oxigênio mais elevadas em comparação aos produzidos *in vivo* (20% concentração atmosférica vs. 2-8% concentração intrauterina) (GUEMRA et al., 2013). A maior exposição ao oxigênio leva a um aumento na produção de radicais livres, como superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila (AGARWAL et al., 2006). Esses radicais reagem com proteínas celulares, lipídeos e DNA, causando inativação enzimática, peroxidação lipídica da membrana e alterações no DNA (KEANE et al.,

2024). Reconhecendo que condições adversas podem aumentar o estresse oxidativo durante a MIV, Cavallari et al. (2019) avaliaram o efeito da melatonina na concentração de 1 μ M sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em oócitos bovinos expostos a altas temperaturas (41°C). Os resultados mostraram que a melatonina reduziu a produção de EROs nos oócitos submetidos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*. Diante disso, acredita-se que os oócitos possivelmente enfrentem um grande desafio fisiológico durante os procedimentos que antecedem o cultivo *in vitro*, como o transporte e a aspiração folicular. Dessa forma, o estresse oxidativo, tende a ser mais acentuado antes da MIV do que durante o CIV.

Considerando a definição presente na literatura, um antioxidante é uma molécula que mesmo em baixas concentrações tem a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas SOD2 e GPX1, que atuam prevenindo e controlando a formação de EROs, as quais estão envolvidas na iniciação das reações em cadeia que culminam na morte celular programada (FERREIRA et al., 1997; GREEN et al., 2004). Diante da potencialidade dos danos causados pelas EROs, é de extrema importância a manutenção do equilíbrio entre as enzimas antioxidantes e as espécies pró-apoptóticas, a fim de promover a integridade celular (FERREIRA et al., 1997; SCHNEIDER et al., 2004). Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar o efeito da melatonina na expressão dos transcritos das enzimas SOD2 e GPX1. Uma vez que, pesquisas anteriores apontaram que a melatonina pode induzir um aumento na expressão das enzimas antioxidantes citadas, como foi observado em estudo com hamsters (ANTOLÍN et al., 1996). Da mesma forma, experimentos *in vitro* indicaram que a melatonina eleva a produção de embriões, diminuindo tanto os níveis de EROs quanto o número de núcleos apoptóticos, regulando positivamente as enzimas GPX1 e SOD2 (REMIÃO et al., 2016). Contudo, no contexto da maturação *in vitro* (MIV), o experimento 1 revelou que a adição de melatonina não resultou em alterações significativas na expressão dessas enzimas.

Como já discutido, as condições durante a MIV podem influenciar em diversas funções fisiológicas nas estruturas, incluindo os níveis de poliadenilação de mRNA, afetando assim a qualidade embrionária (BILODEAU-GOESEELS et al., 2002). Isso revela que as deficiências na competência de desenvolvimento observadas em

grande parte dos oócitos maturados *in vitro* refletem na composição e na abundância de transcritos de RNA específicos no oócito, como mRNA, rRNA e tRNA (TORRES-OSORIO et al., 2019). Considerando esses aspectos, foi investigado os efeitos da melatonina no marcador de qualidade embrionária OCT4, responsável por desempenhar um papel crucial na reprogramação epigenética, manutenção da pluripotência e no desenvolvimento embrionário adequado (HABERMANN et al., 2007). No entanto, a expressão diferencial do OCT4 nos blastocistos eclodidos no D9 não foi detectada nos grupos avaliados (controle; 10 e 10000 nM de melatonina), contrastando com relatos científicos de que a melatonina melhora a qualidade do oócito e acelera o desenvolvimento embrionário pós fertilização *in vitro* (BARRETT et al., 2012; XU et al., 2019; PANG et al., 2019).

Além da investigação sobre o efeito da melatonina em relação aos transcritos responsáveis pela proteção contra as EROs e à qualidade embrionária, também foi avaliado a expressão de genes associados à apoptose. As proteínas da família BCL-2, como BCL-XL, BAX e BAK, desempenham papéis cruciais como reguladores do processo de morte celular, funcionando como pontos de controle intracelulares na via comum da apoptose (GRILLO et al., 2019; KRAMPE et al., 2010). No entanto neste estudo, as análises de RT-qPCR não revelaram diferenças significativas na expressão dos genes sensíveis à melatonina, diferindo da literatura.

Os efeitos da melatonina podem variar conforme as etapas da PIVE e o estágio de desenvolvimento das estruturas cultivadas. No cultivo *in vitro* (CIV), apesar de diversos relatos na literatura apontarem os benefícios da melatonina quando adicionada ao meio de CIV, os resultados do experimento 2 não revelaram efeitos significativos da molécula durante a etapa, independentemente da concentração utilizada. Autores como Assis et al. (2014), relataram que a melatonina atuou como antioxidante eficaz quando administrada na dose de 50 ng/mL no CIV, mesmo na presença de óleo mineral, contribuindo para a melhoria da qualidade embrionária. No entanto, outros pesquisadores observaram que a melatonina adicionada na concentração de 10^{-4} M na etapa de cultivo diminuiu as taxas de blastocistos no grupo tratado, mesmo em atmosfera controlada (7% de O₂) (PAPIS et al., 2007). Uma possível explicação para esses resultados é que, em doses mais altas, a melatonina pode ter efeitos prejudiciais, comprometendo sua eficácia antioxidante (PAIVA PAULA., 2017). A ação protetora e reguladora do hormônio no organismo, tanto direta quanto indireta, não se restringem apenas à presença de um

receptor específico no tecido, mas também são influenciadas pelo tipo de receptor presente (RODRIGUES, 2023). O hormônio interage por meio de dois tipos de receptores de membrana, MT1 e MT2 (HILL et al., 2015), que são mais comumente encontrados em tecidos reprodutivos, como nos oócitos e úteros de fêmeas bovinas (DUAN et al., 2022; DIRANDEH et al., 2022), ovários de ratos (PAL et al., 2022) e em testículos de carneiros (GONZÁLEZ-ARTO et al., 2017). Parte do insucesso dos efeitos da melatonina no experimento 2, podem estar relacionados aos receptores citados. Uma vez que, o receptor MT1 é responsável pelo controle da meiose durante a maturação do oócito (WANG et al., 2021) e pela modulação do desenvolvimento embrionário (WANG et al. 2014), enquanto o receptor MT2 regula a apoptose e a proliferação das células da granulosa em bovinos (HE et al., 2016).

Uma outra abordagem interessante sobre a adição da melatonina é sua inclusão no meio de cultivo durante ambas as etapas mencionadas nos experimentos 1 e 2, a fim de avaliar possíveis efeitos complementares. Contudo, no experimento 3, que envolveu a adição de melatonina na MIV+CIV, não foram observados efeitos positivos significativos da molécula em comparação ao grupo controle. Essa adição despertou interesse, uma vez que oócitos e blastocistos não compartilham o mesmo sítio de ligação, dado que os receptores MT1 e MT2 exercem funções distintas, mais adequadas a cada fase de desenvolvimento das estruturas como citado anteriormente. De acordo com Chaya (2016), a adição de melatonina durante a MIV não melhorou a maturação dos oócitos nem o desenvolvimento dos possíveis embriões durante o CIV, evidenciando que sua adição simultaneamente nas etapas não influenciou nas taxas de clivagem embrionária e na formação de blastocistos.

Por fim, este estudo destaca a importância de considerar a composição genética dos oócitos e embriões ao avaliar a eficácia de diferentes abordagens na PIVE. A escolha de bovinos da raça Nelore como modelo de estudo, pode influenciar significativamente os resultados obtidos. A compreensão das características genéticas específicas desta raça é essencial para interpretar adequadamente os efeitos das intervenções, como a suplementação com melatonina, e para otimizar as estratégias de cultivo *in vitro*. Futuras pesquisas devem continuar a explorar como as variações genéticas afetam a resposta ao tratamento, a fim de aprimorar os resultados da PIVE e avançar o conhecimento nesta área.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a adição de melatonina na MIV não influenciou a expressão dos genes OCT4, SOD2, GPX1 e BAX. Adicionalmente, demonstrou tendência para melhores taxas de produção embrionária em comparação à concentração de 0,01 nM.

REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZÚÑIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 151-158, 2002.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L. C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1-21, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, **Philadelphia**, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2006.
- ALEVRA, A.; EXADACTYLOS, A.; MENTE, E.; PAPADOPOULOS, S. The Protective Role of Melatonin in Sperem Cryopreservation of Farm Animals and Human: Lessons for Male Fish Cryopreservation. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 791, 2022.
- ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SAÍNZ, R. M.; MAYO, J. C.; URÍA, H.; KOTLER, M. L.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J.; TOLIVIA, D.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **FASEB JOURNAL: oficial publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 8, p. 882-90, 1996.
- ARDEN N, BETENBAUGH MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 174-180, 2004.
- ARENDT, J. Aaron Lerner, who discovered melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 1, p. 106-7, 2007.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 1998.
- ARK, J.-Y.; PARK, H.-J.; KIM, J.-W.; PARK, S.-Y.; YANG, S.-G.; JUNG, J.-M.; KIM, M.-J.; KOO, D.-B. 173 Melatonin alleviates the endoplasmic reticulum stress through the regulating of unfolding protein response signaling during porcine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 195-195, 2017.
- ASSIS, P. M. Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BAHADORI, M. H.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; ASGARI, ZAKIEH. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo

development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2013.

BARRETT, P.; BOLBOREA, M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p. 376-388, 2012.

BARROS, V. R. P.; MONTE, A. P. O.; SANTOS, J. M. S.; LINS, T. L. G.; CAVALCANTE, A. Y. P.; GOUVEIA, B. B.; MULLER, M. C.; OLIVEIRA JUNIOR, J. L.; BARBERINO, R. S.; DONFACK, N. J.; ARAÚJO, V. R.; MATOS, M. H. T. Efeitos da melatonina no crescimento *in vitro* de folículos antrais precoces e na maturação de ovócitos ovinos. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 71, 2020.

BERLINGUER, F.; LEONI, G. G.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 4, p. 383-391, 2009.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 267-278, 2006.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 71, n. 3-4, p. 143-155, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 454-460, 1997.

BOTAS, F. M. C. O papel da melatonina. 2014. 68 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, 2014.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.

BURATINI, J.; SOARES, A. C. S.; BARROS, R. G.; DELLAQUA, T. T.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M. M.; LUCIANO, A. M. Physiological parameters related to oocyte nuclear differentiation for the improvement of IVM/IVF outcomes in women and cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 34, n. 2, p. 27-35, 2021.

CAÑÓN-BELTRÁN, K.; GIRALDO-GIRALDO, J.; CAJAS, Y. N.; BELTRÁN-BREÑA, P.; HIDALGO, C. O.; VÁSQUEZ, N.; LEAL, C. L. V.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; GONZÁLEZ, E. M.; RIZOS, D. Inhibiting diacylglycerol acyltransferase-1 reduces lipid biosynthesis in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], v. 158, p. 267-276, 2020.

CASAO, A.; ABECIA, J. A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. The effects of melatonin on *in vitro* oocyte competence and embryo development in sheep. **Spanish Journal of Agricultura Research**, v. 2, n.1, p. 35, 2010.

CAVALARRI, F. C.; LEAL, C. L. V.; ZVI, R.; HANSEN, P. J. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 180-186, 2019.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M. A. Beneficial Effect of Melatonin on Blastocyst *In vitro* Production from Heat-Stressed Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 738-746, 2013.

CHAYA, Y. A. Produção *in vitro* de embriões caprinos pré-púberes: efeito da melatonina nos meios de maturação *in vitro* e cultivo *in vitro* embrionário. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2016.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHOI, J.; PARK, S.; LEE, E.; KIM, J. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 7, p. 1127-1135, 2008.

CINTRA, L.; RECALDE, E. C.; SUDANO, M.; FRANCHI, F.; CASTILHO, A.; ALVARENGA, F. L. Effect of bovine endometrial mesenchymal cell conditioned medium on bovine embryo development. **Studies in Environmental and Animal Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 131-148, 2022.

CÓRDOBA, A.; MIRANDA, M. S.; KING, W. A.; MASTROMONACO, G. F. Effects of EGF and melatonina on gene expression of *cumulus* cells and further *in vitro* embryo development in bovines. **Zygote**, v. 30, n. 5, p. 600-610, 2022.

CROCOMO, L. F.; CAMARGO, M. F. W.; ALVARENGA, F. C. L.; BICUDO., S. D. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470-479, 2012.

CRUZ, M. H. C. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro***. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.

CRUZ, M. H. C.; LEAL, C. L. V.; CRUZ, J. F.; TAN, D.; REITER, R. J. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. **Animal Reproduction Science**, v. 145, n. 3-4, p. 150-160, 2014.

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

DEHGHANI-MOHAMMADABADI, M.; SALEHI, M.; FARIFTEH, F. Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 4, p. 453-462, 2014.

DIRANDEH, E.; ANSARI-PIRSARAEI, Z.; THATCHER, W. Melatonin as a Smart Protector of Pregnancy in Dairy Cows. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2022.

DO, L. T. K.; SHIBATA, Y.; TANIGUCHI, M.; NII, M.; NGUYEN, T. V.; TANIHARA, F.; TAKAGI, M.; OTOI, T. Melatonin Supplementation During *In vitro* Maturation and Development Supports the Development of Porcine Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 1054–1058, 2015.

DOS SANTOS, E. C.; VARCHETTA, R.; LIMA, C. B.; ISPADA, J.; MARTINHO, H. S.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; GASPARRINI, B.; MILAZZOTTO, M. P. The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology Animal Reproduction**, v. 123, p. 30-36, 2019.

DUAN, H.; HU, J.; XIAO, L.; LV, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, X. β -Estradiol inhibits melatonin synthesis and melatonin receptor expression in sheep granulosa cells. **Gene**, v. 814, p. 146128, 2022.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA G. A.; EL- ROOS, M. E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the *cumulus* oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 4, p. 250-262, 2011.

FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito na retomada da meiose e desenvolvimento embrionário em bovinos**. 202. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2020.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.

FONSECA, J. F.; TORRES, A. A. A.; PINTO, A. N. Criopreservação de embriões bovinos. **Veterinary News**, v. 8, p. 115-123, 2002.

GECHEV, T. S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.

GÓMEZ, J. D.; BALASCH, S.; GÓMEZ, L. D.; MARTINO, A.; FERNÁNDEZ, N. A comparasion between intravaginal progestagen and melatonin implant treatments on the reproductive efficiency of ewes. **Small Ruminants Research**, v. 66, p. 156-163, 2006.

GONZÁLEZ-ARTO, M.; AGUILAR, D.; GASPAR-TORRUBIA, E.; GALLEGU, M.; CARVAJAL-SERNA, M.; HERRERA-MARCOS, L. V.; SERRANO-BLESA, E.; HAMILTON, T. R. S.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; CASAO, A. Melatonin MT1 and MT2 receptors in the ram reproductive tract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-15, 2017.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 110-8, 2004.

GRILLO, A. L.; MANTALARIS, A. Apoptose: Uma perspectiva de bioprocessamento de células de mamíferos. **Biotechnology Advances**, n. 37, v. 3, p. 459-47, 2019.

GROßE, L.; WURM, C. A.; BRÜSER, C.; NEUMANN, D.; JANS, D. C.; JAKOBS, S. BAX se reúne em grandes estruturas semelhantes a anéis remodelando a membrana externa mitocondrial em apoptose. **The EMBO Journal**, v. 35 n. 4, p. 402-413, 2016.

GUEMRA, S.; MONZANI, P. S.; ZANIN, R.; OHASHI, O. M. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection Against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

GUO, Z.; CHEN, W.; L.V, L.; LIU, D. Meta-analysis of melatonin treatment and porcine somatic cell nuclear transfer embryo development. **Animal Reproduction**, v. 18, v. 3, p. e20210031-e20210031, 2021.

GUPTA, R. K.; MILLER, K. P.; BABUS, J. K.; FLAWS, J. A. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through na oxidative stress pathway. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 382-389, 2006.

HABERMANN, F. A.; WUENSCH, A.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. 116-124, 2007.

HALL, A. G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, n. 3, p. 238-45, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental **Environ Health Perspectives**, v. 102, n. 2, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **New York: Oxford University Press**, ed. 4, 2007.

HE, C.; WNAG, J.; LI, Y.; ZHU, L.; XU, Z.; SONG, Y.; SONG, Y.; LIU, G. Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 3, p. 300-309, 2015.

HE, Y.; DENG, H.; JIANG, Z.; LI, Q.; SHI, M.; CHEN, H.; HAN, Z. Effects of melatonin on follicular atresia and granulosa cell apoptosis in the porcine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 8, p. 692-700, 2016.

HILL, S. M.; BELANCIO, V. P.; DAUCHY, R.; XIANG, S.; BRIMER, S.; MAO, L.; HAUCH, A.; LUNDBERG, P. W.; SUMMERS, W.; YUAN, L.; FRASCH, T.; BLASK, D. E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. R183-R204, 2015.

HUGHES, C. K.; XIE, M. M.; MCCOSKI, S. R.; EALY, A. D. Activities for leptin in bovine trophoblast cells. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 58, p. 84-89, 2017.

IGHODARO, O. M., AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITHOH, M. T. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 1, p. 48-51, 2000.

JIN, J. X.; LEE, S.; TAWEECHAIPASANKUL, A.; KIM, G. A.; LEE, B. C. Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. e12388, 2017.

JUKNAT, A. A.; DEL VALLE ARMANINO MÉNDEZ, M.; QUAGLINO, A.; FAMELI, C. I.; MENA, M.; KOTLER, M. L. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 84-92, 2005.

KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; KANG, S. H.; 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, n. 1, p. 22-28, 2009.

KEANE, J. A.; EALY, A. D. An overview of reactive oxygen species damage occurring during *in vitro* bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. **Animals (Basel)**, v. 14, n. 2, 2024.

KOMNINO, E. R.; REMIÃO, M. H.; LUCAS, C. G.; DOMINGUES, W. B.; BASSO, A. C.; JORNADA, D. S.; DESCHAMPS, J. C.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BORDIGNON, V.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; GUTERRES, S. S.; COLLARES, T. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0157561, 2016.

KRAMPE B, AL-RUBEAI M. Morte celular em cultura de células de mamíferos: mecanismos moleculares e estratégias de engenharia de linhagem celular. **Cytotechnology**, v. 62, n. 3, p. 175-188, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v.7, n.6, p. 438-457, 2015.

LERNER, A. B.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p. 1992-1997, 1960.

LI, Y.; ZHANG, Z. Z.; HE, C. J.; ZHU, K. F.; XU, Z. Y.; MA, T.; TAO, J. L.; LIU, G. S. Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 365-375, 2015.

LIANG, S.; GUO, J.; CHOI, J. W.; KIM, N. H.; CUI, X. S. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1821-1831, 2017.

LIRA, A. da S.; CHAVES, R. de M.; MORAES JUNIOR, F. de J.; COSTA JUNIOR, S. H.; AMARAL, B. K. L.; TROVÃO, H. M. P. Use of Melatonin in the *In vitro* Production of Bovine Embryos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 21, p. 01-09, 2020.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturação de oócitos *in vitro*. **Annu Rev Anim Biosci**, v. 4, p. 255-68, 2016.

LUBERDA Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

MAGALHÃES, R.; GUAITOLINI, C. R. F.; TRAMONTIN, M. D. L.; SESTARI, D. A. O.; BARROS, B. D.; ELIAS, A. S. L.; ARAUJO, A. L.; GIOSA, D. C.; TRINDADE, A. B.; MAZIERO, R. R. D. Avaliação das taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando meio de cultura suplementado com melatonina. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, 2021.

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

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A. C.; CECON, E. The immune-pineal axis: a Shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.

MARQUES, T. C.; DA SILVA SANTOS, E. C.; DIESEL, T. O.; LEME, L. O.; MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; DE OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 226-236, 2018.

MATSUZUKA, T.; SAKAMOTO, N.; OZAWA, M.; USHITANI, A.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Alleviation of maternal hyperthermia-induced early embryonic death by administration of melatonin tom ice. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 217-223, 2005.

MEHAISEN, G. M.; SAEED, A. M, GAD, A., ABASS, A. O.; ARAFA, M.; EL-SAYED, A. Capacidade antioxidante da melatonina no desenvolvimento pré-implantação de embriões de coelho frescos e vitrificados: aspectos morfológicos e moleculares. **Plos one**, 2015.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MENDES, A. F. Efeitos da membrana Cellfate®, associada à adição de melatonina no meio de cultivo, na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, 2024.

MENDES, A. F.; MALDONADO, M. B. C.; FELTRIN, I. R.; BEZERRA, O. L.; MEMBRIVE, B. M. C. Produção *in vitro* de embriões bovinos: a revolução biotecnológica na pecuária. **Imast 2021**, cap. 24, p. 386-405, 2021.

NA, K.; KIM, J.; LEE, T.; YOON, L.; CHA, D. L. Effect of Melatonin on the Maturation of Mouse GV Oocytes and Apoptosis of Cumulus Cells *In vitro*. **Fertility and Sterility (ISSN: 0015-0282)**, v. 84, p. S103, 2005.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

NAGINA, G.; ASIMA, A.; NEMAT, U.; SHAMIM, A. Effect of melatonin on maturation capacity and fertilization of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Open Veterinary Journal**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 128-134, 2016.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n.4, p. 1012-1016, 2003.

NIKNAFS, B.; MEHDIPOUR, A.; ROUSHANDEH, A. M. Melatonin improves development of early mouse embryos impaired by actinomycin-D and TNF- α . **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 799, 2014.

OFOSU, J.; QAZI, I. H.; FANG, Y.; ZHOU, G. Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review. **Animal Reproduction Science**, v. 233, p. 1065-1080, 2021.

PAIVA PAULA, F. A. Efeito da melatonina na maturação *in vitro* sobre a expressão gênica e a qualidade de oócitos bovinos sob choque térmico. Dissertação (mestrado acadêmico). Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2017.

PAL, S.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin attenuates LPS-induced ovarian toxicity via modulation of SIRT-1, PI3K/pAkt, pErk1/2 and NFkB/COX-2 expressions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 451, 2022.

PANG, Y. W.; JIANG, X. L.; WANG, Y. C.; WANG, Y. Y.; HAO, H. S.; ZHAO, S. J.; DU, W. H.; ZHAO, X. M.; WANG, L.; ZHU, H. B. Melatonin protects against paraquat-induced damage during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 66, p. e12532, 2019.

PARK, H. J.; PARK, J. Y.; KIM, J. W.; YANG, S. G.; JUNG, J. M.; KIM, M. J.; KANG, M. J.; CHO, Y. H.; WEE, G.; YANG, H. Y.; SONG, B. S.; KIM, S. U. K.; KOO, D. B. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during *in vitro* maturation. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 2, p. 1-10, 2018.

POLGE, C.; ROWSON L. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C . **Nature**, v. 169, p. 626-627, 1952.

QUEIROZ, I. F.; AMORIM, A. R.; SILVA, C. R.; NUNES, G. B.; MINGOTI, G. Z.; DALL'ACQUA, P. C. Melatonina: efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Interação Interdisciplinar (ISSN: 2526-9550)**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2022.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxidized, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

REITER, R. J. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. **News in Physiological Sciences**, v. 15, p. 246-250, 2000.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S.; COTO-MONTES, A.; BOGA, J. A.; TAN, D. X.; DAVIS, J. M.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: The requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 269-274, 2011.

REITER, R. J.; TAMURA, H.; TAN, D. X.; XU, X. Y. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 2, p. 321-328, 2014.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; CORRAL, S. R.; MANCHESTER, L. C. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 373-384, 2013b.

REITER, R.; PAREDES, S.; KORKMAZ, A.; JOU, M. M.; TAN, D. X. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 137-149, 2008.

REMIÃO, M. H.; LUCAS, C. G.; DOMINGUES, W. B.; SILVEIRA, T.; BARTHER, N. N.; KOMNINO, E. R.; BASSO, A. C.; JORNADA, D. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; JUNIOR, A. S. V.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; GUTERRES, S. S.; COLLARES, T. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 63, p. 70-81, 2016.

REVEL, F. G.; MASSON-PÉVET, M.; PÉVET, P.; MIKKELSEN, J. D.; SIMONNEAUX, V. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. **Neuroendocrinology**, v. 90, n. 1, p. 1-14, 2009.

RODRIGUES-CUNHA, M. C.; MESQUITA, L. G.; BRESSAN, F.; COLLADO, M. Del; BALIEIRO, J. C. C.; SCHWARZ, K. R. L.; DE CASTRO, F. C.; WATANABE, O. Y.; WATANABE, Y. F.; DE ALENCAR COELHO, L.; LEAL, C. L. V. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 1685–1694, 2016.

SAKAGUCHI, K.; ITOH, M. T.; TAKAHASHI, N.; TARUMI, W.; ISHIZUKA B. The rat oocyte synthesizes melatonin. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 4, p. 674-82, 2013.

SALEHI, M.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of melatonin treatment on developmental potential of somatic cell nuclear-transferred mouse oocytes *in vitro*. **Zygote**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 213-217, 2014.

SAMPAIO, R. V.; CONCEIÇÃO, D. S. B.; MIRANDA, M. S.; SAMPAIO, L. de F. S.; OHASHI, O. M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, [s. l.], v. 10, p. 103, 2012.

SANTOS, S. S. D.; DANTAS, J. K.; MIRANDA, M. S.; BIONDI, F. C.; OHASHI, O. M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 266- 270, 2002.

SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; NISHIDE, F. T.; LIMA, F. B.; NETO, J. C.; MACHADO, U. F. A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 22, n. 4, p. 331-338, 2000.

SHI, J. M.; TIAN, X. Z.; ZHOU, G. B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S. E.; ZENG, S. M.; TIAN, J. H.; LIU, G. S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 72, n. 4, p. 318-323, 2009.

SIES H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2007.

SILVA, A. P. T. B.; MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 72, p. 51-58, 2015.

SOUSA, C M. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P.

B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SU, J.; WANG, Y.; XING, X.; ZHANG, L.; SUN, H.; ZHANG, Y. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 455–468, 2015.

SUCCU, S.; PASCIU, V.; MANCA, M. E.; CHELUCCI, S.; TORRES-ROVIRA, L.; LEONI, G. G.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. **Theriogenology**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 1058-1066, 2014.

SUGINO N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. **Reproductive Medicine and Biology** v. 4, n. 1, p. 1-44, 2005.

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

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 1-9, 2012.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-324, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin and female reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2014.

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

TAN, D. X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; KORKMAZ, A.; SAINZ, R. M.; MAWO, J. C.; BROTO, L. F.; REITER, R. J. The changing biological roles of melatonin during Evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 607-623, 2010.

TATEMOTO, H. Enhancement of Developmental Competence after *In vitro* Fertilization of Porcine Oocytes by Treatment with Ascorbic Acid 2-O-Alpha-Glucoside During *In vitro* Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 6, p. 1800-1806, 2001.

TATEMOTO, H. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During *In vitro* Maturation: Role of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 805-810, 2000.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of Porcine Oocytes Against Cell Damage Caused by Oxidative Stress During *In vitro*

Maturation: Role of 142 Superoxide Dismutase Activity in Porcine Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1150–1157, 2004.

TIAN, X.; WANG, F.; HE, C.; ZHANG, L. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 3, p. 239-247, 2014.

TORRES-OSORIO, V.; URREGO, R.; ECHEVERRI-ZULUAGA, J. J.; LÓPEZ-HERRERA, A. Oxidative stress and antioxidant use during *in vitro* mammal embryo production. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 10, n. 2, p. 433-459, 2019.

TUTT, D. A.; GUVEN-ATES, G.; KWONG, W. Y.; SIMMONS, R.; SANG, F.; SILVESTRI, G.; CANEDO-RIBEIRO, C.; HANDYSIDE, A. H.; LABRECQUE, R.; SIRARD, M. A.; EMES, R. D.; GRIFFIN, D. K.; SINCLAIR, K. D. Developmental, cytogenetic and epigenetic consequences of removing complex proteins and adding melatonin during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, 2023.

VALASI, I.; TSILIGIANNI, T.; PAPANIKOLAOU, T.; DIMITRIADIS, I. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 341, 2006.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VELEZ-PARDO, C.; MORALES, A. T.; RIO, M. J. D.; OLIVEIRA-ANGEL, M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-κB and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 1285-1296, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P. C. O.; MELLO, B. J.; ALMEIDA, A. C.; BUENO, G. E. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development (ISSN: 2525-8761)**, v.7, n.1, p. 10152-10168, 2021.

WANG, F.; TIAN, X. Z.; ZHOU, Y. H.; TAN, D. X.; ZHU, S. E.; DAI, Y. P.; LIU, G. S. Melatonin Improves the Quality of *In vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e93641, 2014.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; GAO, C.; HE, C.; FU, Y.; JI, P.; LI, Y.; LI, N.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal of pineal research**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 333–342, 2014. b.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D. REITER, R. J.; LIU, G. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 267-274, 2013.

WANG, J.; ZHUO, Z.; MA, X.; LIU, Y.; XU, J.; HE, C.; FU, Y.; WANG, F.; JI, P.; ZHANG, L.; LIU, G. Melatonin Alleviates the Suppressive Effect of Hypoxanthine on

Oocyte Nuclear Maturation and Restores Meiosis via the Melatonin Receptor 1 (MT1) - Mediated Pathway. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 1-9, 2021.

WANG, Z.; LIU, D.; WANG, J.; LIU, S.; GAO, M.; LING, E. A.; HAO, A. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment *in vitro*. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 253-264, 2012.

WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 2, p. 711-717, 1986.

WOO, M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. S.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789-4797, 2001.

XU, Y.; ZHANG, K-H.; SUN, M. H.; LAN, M.; WAN, X.; ZHANG, Y.; SUN, S. C. Protective effects of melatonin against zearalenone toxicity on porcine embryos *in vitro*. *Front Pharmacol*, v. 10, p. 327, 2019.

YAACOBI-ARTZI, S.; SHIMONI, C.; KALO, D.; HANSEN, P. J.; ROTH, Z. Melatonin slightly alleviates the effect of heat shock on bovine oocytes and resulting blastocysts. **Theriogenology**, [s. l.], v. 158, p. 477-489, 2020.

YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, H. S.; CHOI, K. W.; OH, K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-1002, 1998.

YANG, L.; WANG, Q.; CUI, M.; LI, Q.; MU, S.; ZHAO, Z. Effect of Melatonin on the *In vitro* Maturation of Porcine Oocytes, Development of Parthenogenetically Activated Embryos, and Expression of Genes Related to the Oocyte Developmental Capability. **Animals** [s. l.], v. 10, n. 2, p. 209, 2020.

YANG, M.; TAO, J.; CHAI, M.; WU, H.; WANG, J.; LI, G.; HE, C.; XIE, L.; JI, P.; DAI, Y.; YANG, L.; LIU, G. Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: mechanisms and results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 2017.

YANG, W. -C.; YANG, L. -G.; RIAZ, H.; TANG, K. -Q.; CHEN, L. & LI, S. -J. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 143, p. 24-29, 2013.

YANG, Y. W.; AN, L.; WANG, P.; YU, Y.; YIN, Q. D.; WANG, X. H.; XIN-ZHANG; QIAN-ZHANG; YANG, M. L.; MIN-GUO; WU, Z. H.; TIAN, J. H. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 389-397, 2013.

YILMAZER, Ç.; CEVIK, M. Effects of subcutaneous melatonin implants and short-term intravaginal progestagen treatments on Reproductive Performance of Kivircik Ewes on Seasonally Anestrus. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 21, n. 2, p. 353-359, 2018.

YOON, S. B.; CHOI, S. A.; SIM, B. W.; KIM, J. S.; MUN, S. E.; JEONG, P. S.; YANG, H. J.; LEE, Y.; PARK, Y. H.; SONG, B. S.; KIM, Y. H.; JEONG, K. J.; HUH, J. W.; LEE, S. R.; KIM, S. U.; CHANG, K. T. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1-40, 2014.

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

ZHAO, X.-M.; MIN, J.-T.; DU, W.-H.; HAO, H.-S.; LIU, Y.; QIN, T.; WANG, D.; ZHU, H.-B. Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the *cumulus* oophorus. **Zygote**, v. 23, p. 1-12, 2014.

ZÚÑIGA, O.; FORCADA, F.; ABECIE, J. A. Effect of melatonin implants on the response to the male effect and on subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 165-174, 2002.