

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DA MEMBRANA CELLFATE®, ASSOCIADA À ADIÇÃO DE MELATONINA
NO MEIO DE CULTIVO, NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

ADRIANO FELIPE MENDES

Médico veterinário

Botucatu, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

**EFEITOS DA MEMBRANA CELLFATE®, ASSOCIADA À ADIÇÃO DE MELATONINA
NO MEIO DE CULTIVO, NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

ADRIANO FELIPE MENDES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan
Membrive

Botucatu, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Mendes, Adriano Felipe.

Efeitos da membrana CellFate®, associada à adição de melatonina no meio de cultivo, na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Adriano Felipe Mendes.
- Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudia Maria Bertan Membrive
Capes: 50504002

1. Antioxidantes. 2. Embrião. 3. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 4. Bovinos - Reprodução.

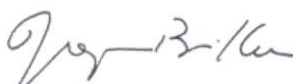
Palavras-chave: Antioxidante; Cultura tridimensional; Embrião; Oócito; Reprodução.

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

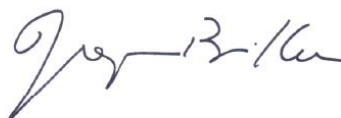
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br- academico@dracena.unesp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeitos do sistema tridimensional e da melatonina no cultivo in vitro de embriões bovinos"** (Effects of the three-dimensional system and melatonin in the in vitro culture of bovine embryos), registrada com o nº 14/2022.R2 – 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 **21/07/2022**.

Dracena, 21 de julho de 2022.



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

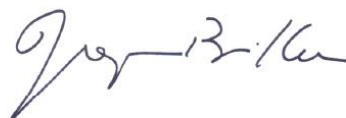
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeitos do sistema tridimensional e da melatonina no cultivo in vitro de oócitos bovinos"** (Effects of the three-dimensional system and melatonin on in vitro culture of bovine oocytes), registrada com o nº 15/2022.R2 – 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 **21/07/2022**.

Dracena, 21 de julho de 2022.



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

Autor: Adriano Felipe Mendes

Título: Efeitos da membrana Cellfate®, associada à adição de melatonina no meio de cultivo, na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Banca avaliadora

Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Presidente e orientadora

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Dracena, SP

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro titular

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Membro titular

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

Membro Titular

Universidade de São Paulo - USP, Pirassununga, SP

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger

Membro titular

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP

Data: 23/02/2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, especialmente minha mãe Elza; minhas irmãs Andréia e Adriana; e amiga Jacqueline. Consegui chegar a esta defesa de tese de Doutorado porque estive rodeado de amor. Tive o privilégio de caminhar pelo mundo acompanhado de pessoas especiais. No início desse caminho fui acompanhado de perto por minha mãe, minhas irmãs e meu irmão, e, mais a frente, por uma pessoa que hoje também é família, Jacqueline que proporcionou uma amizade que nasceu, cresceu e floresceu, um amor que pode ser difícil de explicar no ocidente, mas que, há séculos, encontra definição em uma lenda do oriente “*Unmei no akai ito*” onde duas pessoas estão ligadas por um fio vermelho invisível e as circunstâncias da vida as levariam a um encontro, independente do tempo e distância. Amo vocês, família. Ao meu irmão André, alguém que amei e que me amou de volta, uma pessoa especial que participou também da minha caminhada, infelizmente por um período finito. Hoje ele não está mais presente, mas suas lembranças seguirão comigo para sempre na forma de amor convertido em saudade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia e seus docentes, ao Instituto de Biociências e a Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu/SP, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação exclusiva ao Doutorado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, pela orientação que construiu meu crescimento como pesquisador durante os anos em que estivemos juntos no desenvolvimento dos estudos que compuseram esta tese.

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.

A Dra. Janice Koepp que, à frente da Biocelltis Biotecnologias S.A., cedeu as matrizes CellFate®, imprescindíveis para o estudo desenvolvido. Agradeço também aos demais colaboradores da Biocelltis Biotecnologias S.A. envolvidos indireta ou diretamente no projeto.

Aos membros titulares da comissão avaliadora Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim da Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu/SP; Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP, Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira da Universidade de São Paulo – USP de Pirassununga/SP e Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP, que aceitaram o convite para participar deste momento tão importante. Obrigado por toda contribuição pessoal e científica.

Aos membros do Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião - LIFE, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT da Universidade Estadual Paulista - UNESP de Dracena/SP, em especial à Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado; Ms. Valeska de Castro Lourenço; aos mestrandos Lucas de Oliveira Bezerra e Laura Chuba Machado Rolniche; aos alunos de Iniciação Científica Ana Laura Silva, Maria Eduarda Rocha Pinto, Emily Silva do Nascimento, Gabriel Souza da Silva e Catarina Lazarevicius Prestes.

Ao médico veterinário, Lucas Henrique Gaspar, que junto ao frigorífico ACOVACAT e seus colaboradores, não mediu esforços para garantir a disponibilidade dos ovários que serviram de base para as pesquisas desenvolvidas.

Aos amigos que encontrei em Dracena/SP, e deixo aqui um agradecimento especial aos amigos do “*Massacre do coco elétrico*”, grupo que agora também faço parte.

Aos professores e funcionários técnico-administrativos da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT de Dracena/SP, por todo o suporte oferecido.

A todas as pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo.

A todos, minha enorme gratidão!

RESUMO

A hipótese é que a utilização do sistema de cultivo tridimensional (3D) com o emprego de uma membrana de nanocelulose bacteriana (CellFate®; Biocelltis S.A., Brasil), durante a maturação oocitária (MIV) e cultivo embrionário (CIV) associada à adição de melatonina na MIV, aumenta a produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, esta tese foi construída em três capítulos: revisão de literatura (Capítulo 1); efeito dose-resposta da melatonina adicionada durante a MIV e/ou CIV no sistema de cultivo convencional (bidimensional, 2D) na produção e qualidade embrionária (Capítulo 2; Estudo 1) e associação do cultivo 3D (CellFate®) na MIV e CIV, com a adição de 10 μ M (10000 nM) de melatonina na MIV sobre a produção e qualidade embrionária (Capítulo 3; Estudo 2). No estudo 1, objetivou-se avaliar os efeitos de 0,01, 10 e 10000 nM de melatonina (Sigma Aldrich, M5250), durante a MIV (Experimento 1), CIV (Experimento 2) e MIV e CIV (Experimento 3). Dessa forma, ovários de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram coletados em abatedouro e oócitos derivados desses ovários foram submetidos à MIV por 24 horas em meio próprio acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), além dos tratamentos. A seguir, oócitos e espermatozoides foram co-cultivados por 18 horas. Os prováveis zigotos foram transferidos para o meio fluido sintético de oviduto acrescido com 2,5% de SFB, além dos tratamentos, onde foram cultivados por 9 dias. Todas as etapas foram realizadas gotas de cultivo submersas em óleo mineral para cultivo dispostas em placas de Petri em incubadora a 38,5°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram avaliadas aos 3, 7 e 9 dias de cultivo, considerando a FIV como dia 0 (D0). Aos 9 dias, blastocistos eclodidos foram colhidos para avaliar a expressão de OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), e BAX (*BCL2 associated X*) por RT-qPCR. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida da aplicação de contrastes. A taxa de clivagem não foi alterada nos três experimentos. No Experimento 1, o uso de melatonina no D7 determinou uma tendência para maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P =$

0,0892) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. No D9, observou-se maior número de blastocistos totais ($P = 0,0216$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM e uma tendência ($P = 0,0741$) de maior número de blastocistos eclodidos no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. Não foram observadas diferenças para a RT-qPCR. Nos experimentos 2 e 3 não foram observadas diferenças significativas na produção embrionária. Em conclusão, a adição com melatonina apenas na MIV determina uma tendência para melhores taxas de produção embrionária quando 10000 nM foi comparado a 0,01 nM e que tal adição não alterou a expressão dos transcritos OCT4, SOD2, GPX1 e BAX. No estudo 2, objetivou-se avaliar o efeito do sistema 3D na MIV, CIV ou MIV e CIV, bem como o impacto de 10 μ M de melatonina na MIV na presença ou não do sistema 3D durante a MIV. Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* $\times$ *Bos taurus taurus* foram colhidos em abatedouro para a recuperação oocitária. As etapas de MIV, FIV e CIV, bem como as análises seguiram o protocolo descrito para o Estudo 1, exceto que todas as etapas foram realizadas placas de 4 poços. O sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de clivagem em D3 comparado ao controle ($P = 0,0300$) e ao sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0313$). No D7, o sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de blastocisto inicial comparado ao controle ($P = 0,0079$). No D9, o sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de blastocisto expandido comparado ao sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0491$), maior taxa de blastocisto geral comparado aos grupos controle ($P = 0,0160$) e sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0193$). A utilização do sistema 3D isolado na MIV resultou em taxa de blastocisto geral semelhante ao sistema 3D com melatonina, sendo esses dois sistemas superiores aos sistemas 3D sem melatonina, 3D somente no CIV e controle ($P = 0,0323$). Em conclusão, o sistema 3D com ou sem melatonina, resulta em maior taxa de blastocisto geral no D9, sem alterar a expressão de OCT4, GPX1, SOD2 e BAX em embriões bovinos. Com base nos dois estudos, conclui-se que a utilização de 10 μ M, bem como a utilização do sistema 3D CellFate® melhoram produção embrionária *in vitro*.

Palavras-chave: reprodução, oócito, embrião, antioxidante, cultura tridimensional.

ABSTRACT

The possibility is that the use of the three-dimensional (3D) culture system, with the use of a bacterial nanocellulose membrane (CellFate®), during *in vitro* oocyte maturation (IVM) and *in vitro* embryonic culture (IVC) associated with the addition melatonin in OM increases the production and quality of bovine embryos produced *in vitro*. To achieve this, this thesis was constructed in three chapters: literature review (Chapter 1); dose-response effect of melatonin added during IVM and/or IVC in the conventional culture system (two-dimensional, 2D) on embryonic production and quality (Chapter 2; Study 1) and association of 3D culture (CellFate®) in IVM and IVC, with the addition of 10 μ M (10000 nM) of melatonin in IVM on embryonic production and quality (Chapter 3; Study 2). In study 1, the objective was to evaluate the effects of 0.01, 10 and 10000 nM of melatonin (Sigma Aldrich, M5250), during IVM (Experiment 1), IVC (Experiment 2) and IVM and IVC (Experiment 3). Thus, ovaries from Nellore females (*Bos taurus indicus*) were collected in a slaughterhouse and oocytes derived from these ovaries were subjected to IVM 24 hours in specific medium with 10% fetal bovine serum (FBS), in addition to the treatments. Next, oocytes and sperm are formed co-cultured 18 hours. The probable zygotes were transferred to the synthetic fluid oviduct medium added with 2.5% FBS, in addition to the treatments, where they were cultured for 9 days. All stages were carried out in drops of cultivation submerged in oil for interested cultivation in Petri dishes in an incubator at 38.5°C and a humid atmosphere with 5% CO₂. Cleavage, blastocyst and hatching rates were evaluated at 3, 7 and 9 days of culture, respectively, considering IVF as day 0 (D0). At 9 days, hatched blastocysts were collected to evaluate the expression of OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1), and BAX (BCL2 associated X) by RT-qPCR. The data were subjected to analysis of variance followed by the application of contrasts. The cleavage rate was not changed in the three experiments. In Experiment 1, the use of melatonin determined on D7, a tendency for a greater number of hatched ($P = 0.0686$) and total ($P = 0.0892$) blastocysts in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group. On D9,

we encouraged a greater number of total blastocysts ($P = 0.0216$) in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group and a tendency ($P = 0.0741$) for a greater number of blastocysts hatched in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group. No differences were observed for RT-qPCR. In experiments 2 and 3, no important differences in embryo production were observed. In conclusion, the addition of melatonin only to IVM determines a trend towards better embryonic production rates when 10000 nM was compared to 0.01 nM and that such addition did not alter the expression of OCT4, SOD2, GPX1 and BAX transcripts. In study 2, the aim was to evaluate the effect of the 3D system on IVM, IVC or IVM and IVC, as well as the impact of 10 μ M melatonin on IVM in the presence or absence of the 3D system during an IVM. Ovaries from *Bos taurus indicus* $\times$ *Bos taurus taurus* females were collected in a slaughterhouse for oocyte recovery. The IVM, IVF and IVC steps, as well as the analyzes followed the protocol described for Study 1, except that all steps were performed in 4-well plates. The IVM, IVF and IVC steps, as well as the analyzes followed the protocol described for Study 1. The 3D system with melatonin showed higher cleavage rates in D3 compared to control ($P = 0.0300$) and to the 3D system without melatonin ($P = 0.0313$). On D7, the 3D system with melatonin showed higher early blastocyst rates compared to the control ($P = 0.0079$). On D9, the 3D system with melatonin showed higher expanded blastocyst rates compared to the 3D system without melatonin ($P = 0.0491$), higher overall blastocyst rates compared to the control ($P = 0.0160$) and 3D system without melatonin groups. melatonin ($P = 0.0193$). The use of the 3D system alone in IVM resulted in an overall blastocyst rate similar to the 3D system with melatonin, with these two systems being superior to the 3D systems without melatonin, 3D only in IVC and control ($P = 0.0323$). In conclusion, the 3D system with or without melatonin results in higher overall blastocyst rates at D9, without altering the expression of OCT4, GPX1, SOD2 and BAX in bovine embryos. Based on our two studies, in conclusion, the use of 10 μ M as well as the use of the 3D CellFate® system improves *in vitro* embryo production.

Keywords: reproduction, oocyte, embryo, antioxidant, three-dimensional culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	20
2.2.ESTRESSE OXIDATIVO EM OÓCITOS E EMBRIÕES DURANTE A PIVE.....	21
2.3.PROPRIEDADES BENÉFICAS DA MELATONINA.....	23
2.4.EFEITOS DA MELATONINA EM COMPLEXOS <i>CUMULUS</i> -OÓCITO E EMBRIÕES.....	24
2.5.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAL.....	30
2.6.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAIS BASEADOS EM MATRIZES DE NANOCELULOSE BACTERIANA.....	31
2.7.HIPÓTESE.....	32
2.8.OBJETIVOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 2: ESTUDO 1.....	56
CAPÍTULO 3: ESTUDO 2.....	107

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma proporcional ao aumento da população. O Brasil possui alta representatividade quando se trata da atual e futura produção de alimentos. Em busca de alcançar o máximo de êxito no que se refere aos 17 objetivos preconizados pela Organização das Nações Unidas (ONU) até 2030, especialmente "Fome Zero, Consumo e Produção Responsável, Ação Climática e Vida na Terra", o Brasil busca ferramentas para a produção mais eficiente de alimentos, incluindo a produção de proteína animal. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2022) reconheceu o Brasil como o detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 234,4 milhões de animais.

Considerando o sistema de produção de carne e a fase de cria, a importância no aumento da eficiência reprodutiva, aliado ao melhoramento genético dos produtos nascidos, fez com que a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se estabelecesse como uma ferramenta biotecnológica com aplicação crescente no mundo e especialmente no Brasil. A PIVE em bovinos, possibilita a multiplicação exponencial de fêmeas geneticamente superiores. Estabelecendo uma análise comparativa, fêmeas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo produzem um bezerro ao ano e até 10 bezerros ao longo de sua vida reprodutiva (LOIOLA *et al.*, 2014). Tal número pode ser grandemente ampliado com o uso intensivo da aspiração folicular guiada por ultrassonografia aliada à PIVE. A associação dessas técnicas utilizada intensivamente possibilita às fêmeas a contabilização do equivalente a um bezerro por semana, gerando assim um grande aumento no número de proles ao longo da vida produtiva e reprodutiva (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008; LOIOLA *et al.*, 2014). De acordo com Viana (2022), em 2021 foram produzidos no mundo 1.521.018 embriões bovinos pelo sistema *in vitro*, número 3,96 vezes maior que a produção *in vivo*, que foi de 386.374 no mesmo ano.

A PIVE envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fertilização *in vitro* dos oócitos (FIV) e cultivo *in vitro* dos embriões (CIV). As etapas de MIV e FIV são

realizadas com aceitável eficiência. Entretanto, sete dias após o início do CIV, a porcentagem de oócitos inicialmente cultivados que se desenvolvem até o estágio de blastocisto é de aproximadamente 40% (RIZOS *et al.*, 2008). Assim, torna-se de grande interesse o aperfeiçoamento da PIVE, para um maior êxito na taxa de conversão de oócitos em blastocistos após sete dias de cultivo.

A manipulação exercida sobre os oócitos e embriões na execução da PIVE, assim como as próprias condições do cultivo, reconhecidamente se associam para promover o estresse oxidativo (GUÉRIN *et al.*, 2001; SOTO-HERAS e PARAMIO, 2020). Tal estresse é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a remoção delas através de sistemas enzimáticos ou não. As EROs determinam danos celulares e favorecerem o desencadeamento dos mecanismos apoptóticos nas células (LI *et al.*, 2019). Níveis supra fisiológicos de EROs foram relacionados ao envelhecimento e aberrações cromossômicas em oócitos (LORD; MARTIN; AITKEN, 2015; MIHALAS *et al.*, 2017; SASAKI *et al.*, 2019).

A melatonina (N-acetilsalicílico-5-metoxitriptamina) é um hormônio com propriedades antioxidantes e reconhecidamente determina efeitos importantes na proteção dos tecidos ovarianos contra o estresse oxidativo (TAMURA *et al.*, 2012; MANCHESTER *et al.*, 2015; REITER *et al.*, 2016; RAI; GOSH, 2021), regulando a expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), ambas envolvidas na remoção de EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014a). Reportou-se que a melatonina, encontrada no fluído folicular, protege diretamente os oócitos das EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; FATEHI *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2012) e age inibindo a formação de EROs (TAMURA *et al.*, 2020). Observações recentes permitem sugerir que a melatonina favorece o desenvolvimento de oócitos e/ou embriões em diferentes espécies, como murinos (TIAN *et al.*, 2017b; KESHAVARZI *et al.*, 2018a; EZZATI *et al.*, 2018), ovinos (TIAN *et al.*, 2017a), bovinos (YANG *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; AN

et al., 2019; PANG *et al.*, 2019), suínos (LEE *et al.*, 2018; NIE *et al.*, 2018; WANG; ZENG, 2018) e caprinos (SAEEDABADI *et al.*, 2018).

Para a espécie bovina, a melatonina já foi testada na maturação oocitária e/ou cultivo embrionário. Cebrian-Serrano *et al.* (2013), em seu estudo, utilizaram a melatonina em ambas as etapas da PIVE. Nesse estudo, os autores investigaram a capacidade da melatonina atenuar efeitos nocivos do estresse térmico durante a PIVE que foi realizada a partir de ovários provenientes de abatedouro. O grupo genético dos animais utilizados não foi especificado no referido trabalho e, até o momento, não temos conhecimento de estudos com o uso de melatonina durante a PIVE com oócitos e embriões provenientes de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*).

O desenvolvimento embrionário inicial, *in vivo*, ocorre no oviduto sob influência de estímulos hormonais sistêmicos e locais, entre o embrião e epitélio tubário, onde o embrião modula localmente a expressão gênica, síntese de proteínas e atividade secretora das células tubárias, bem como sua velocidade de trânsito da tuba até a cavidade uterina (KÖLLE; HUGHES; STEELE, 2020). Na PIVE convencional, as etapas de MIV e CIV são realizadas em um sistema de cultivo bidimensional (2D), onde oócitos e embriões são cultivados em placas na presença de um meio de cultivo estabelecido, padecendo da ausência dos estímulos provenientes do tecido materno. No sistema 2D, parte do oócito ou embrião se adere na superfície da placa de cultivo ocasionando; na área em contato direto com a placa, a restrição de troca entre a estrutura e os componentes do meio de cultivo. Além disso, nos primeiros quatro dias de desenvolvimento *in vivo* dos embriões, o oviduto apresenta contrações musculares que determinam movimentos progressivos e retrógrados repetitivos do embrião no lúmen do oviduto. Tal movimentação é determinada por uma força mecânica que não é estabelecida nos cultivos *in vitro* (LI; WINUTHAYANON, 2017).

Frente a esse contexto, surge a necessidade de se buscar novas perspectivas que possam melhor mimetizar o ambiente fisiológico que envolve os oócitos e embriões, com a expectativa de contribuir para um aumento na produção e qualidade dos embriões produzidos. Dentro dessa proposta, uma

das alternativas pode ser o cultivo tridimensional (3D), que permite ao oócito e embrião estabelecer a área de troca nas suas três dimensões, ampliando a área de superfície de troca entre tais estruturas e os componentes do meio de cultivo. Relata-se que o ambiente 3D oferece um ambiente fisiologicamente mais similar ao microambiente uterino materno quando comparado ao 2D, com a possibilidade de exercer *in vitro*, a depender do material utilizado, força mecânica semelhante àquela exercida pela matriz extracelular *in vivo*, condição favorável ao desenvolvimento *in vitro* (WOODRUFF; SHEA, 2007).

Com base nessas informações, um novo tipo de membrana, denominada Cellfate® (Biocelltis Biotecnologia S.A, Brasil), constituída por biopolímeros naturais à base de nanocelulose bacteriana foi desenvolvida para o cultivo de diferentes tipos celulares. Até o momento, não foram realizadas pesquisas que avaliassem o emprego da membrana Cellfate® na PIVE e, considerando que o aperfeiçoamento das condições de cultivo de gametas e embriões bovinos se faz necessário diante do que foi exposto, esse trabalho foi desenvolvido para investigar os efeitos da utilização do referido sistema 3D. Além disso a utilização de melatonina durante a PIVE foi implementada. Essas modificações foram propostas com o objetivo de melhorar a taxa de sucesso da PIVE. O ineditismo do trabalho apresentado refere-se aos efeitos do cultivo 3D com membrana Cellfate® associado a melatonina, adicionada aos meios de cultivo de oócitos e embriões bovinos a partir de oócitos obtidos de fêmeas da raça Nelore, no desenvolvimento embrionário.

2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A PIVE em bovinos é uma biotécnica estabelecida e aplicada comercialmente no mundo todo. A América do Norte e a América do Sul concentram 95,70% da produção mundial, sendo responsáveis pela produção de 764.750 e 690.856 embriões, respectivamente. O Brasil apresenta grande destaque nesse cenário, com a produção de 429.848 embriões (VIANA, 2022), cerca de 62,21% da produção total da América Latina.

Os valores expressivos obtidos pela PIVE no Brasil são apoiados pelo melhor desempenho das raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) na referida biotécnica, especialmente a raça Nelore. Segundo Watanabe *et al.* (2017), quando fêmeas de diferentes raças foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia e os oócitos submetidos à PIVE, estimou-se uma recuperação média de 27,2 oócitos na raça Nelore (*Bos taurus indicus*); 23,8 na Gir (*Bos taurus indicus*) e 21,8 oócitos na raça Senepol e 19,3 na raça Holandesa (ambas *Bos taurus taurus*). Em relação à produção embrionária, o grupo genético também apresenta grande influência na capacidade de conversão dos oócitos a blastocistos. Baruselli *et al.* (2012) relata que em fêmeas Holandesas (*Bos taurus taurus*) uma média de 22 folículos são observados nos ovários antes da aspiração folicular *in vivo*, dos quais 15 oócitos são recuperados, gerando posteriormente 5,2 embriões clivados e apenas 1,1 embrião considerado transferível no D7 (D0 = dia da FIV). Os mesmos autores relatam que em fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) uma média de 42 folículos observados nos ovários antes da aspiração folicular *in vivo*, dos quais 37 são recuperados, gerando 21,7 embriões clivados e 5,3 embriões transferíveis no D7. Tais observações evidenciam o maior êxito de fêmeas Nelore na PIVE quando comparadas com outras raças.

Apesar da PIVE ter alcançado viabilidade comercial, aproximadamente 40% dos oócitos submetidos à MIV e FIV produzem embriões que se desenvolvem até o estágio de blastocisto (RIZOS *et al.*, 2008). Embriões produzidos *in vitro* se desenvolvem mais lentamente e atingem os

estágios de mórula e blastocisto de 12 a 24 horas mais tarde quando comparados aos produzidos *in vivo* (HOLM; BOOTH; CALLESEN, 2002; USHIJIMA; AKIYAMA; TAJIMA, 2008) e ainda apresentam menor contagem de blastômeros (IWASAKI *et al.*, 1990; KNIJN *et al.*, 2003; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2007). Foi demonstrado que genes como EZR, EPN1, PSEN2, FST, IGFBP3, RBBP4, STAT3, FDPS e IRS1, todos envolvidos na fisiologia da maturação oocitária (ADONA *et al.*, 2016), AQP3 (alterações regulatórias de volume e osmolaridade), SEPT7 (regulação da progressão do ciclo celular), ABHD4 (hidrólise de lipídios de sinalização) e SIAH2 (indução de apoptose após a exposição ao estresse) são alterados durante a MIV (KATZ-JAFFE *et al.*, 2009). Assim, o aperfeiçoamento das condições de cultivo durante a PIVE, é alvo de muitos estudos.

Outro fator que causa grande impacto na PIVE refere-se à tensão de oxigênio. A tensão de oxigênio presente no oviduto é de 5 a 7%, enquanto na atmosfera da incubadora de cultivo é de aproximadamente 20% (SIMON; KEITH, 2008; AMIN *et al.*, 2014), condição que expõe os gametas e embriões à tensão de oxigênio muito acima das tensões fisiológicas. Quando o desenvolvimento embrionário ocorre no oviduto, diante de uma menor tensão de oxigênio, observou-se um maior equilíbrio entre a produção de EROs e a ação de enzimas antioxidantes (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; GUPTA *et al.*, 2010). Nas condições *in vitro* de cultivo, tal mecanismo fisiológico protetivo é perdido. Ainda deve-se considerar que o meio de cultivo, dependendo da sua composição, pode constituir uma fonte de EROs (MARTÍN-ROMERO *et al.*, 2008). Dessa forma, a PIVE realizada em sistema com alta tensão de oxigênio e/ou na falta da proteção enzimática dos antioxidantes, ocorre o acúmulo de EROs que induz ao estresse oxidativo de oócitos e embriões (FEIL *et al.*, 2006; SIMON; KEITH, 2008; AMIN *et al.*, 2014).

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO EM OÓCITOS E EMBRIÕES DURANTE A PIVE

O oxigênio é utilizado como matéria prima no metabolismo oxidativo e consiste na principal forma de obtenção de energia dos organismos aeróbios. Os radicais livres são gerados como subprodutos

na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial durante a respiração celular (LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002). Durante o metabolismo oxidativo ocorre a redução parcial de oxigênio, gerando EROs (DEVLIN, 1999). As EROs podem ser radicais livres, representados por moléculas com elétrons de valência desemparelhados, como o superóxido e a hidroxila. As EROs também podem ser representadas por compostos não radicalares como o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Níveis fisiológicos das EROs são necessários para a maturação oocitária (MORADO *et al.*, 2009), retomada da meiose em oócitos em fase de diplóteno (TRIPATHI *et al.*, 2009), estimulação da liberação de cálcio intracelular em oócitos (CHAUBE *et al.*, 2008), hiperativação (LAMIRANDE; GAGNON, 1993; CHAUBE *et al.*, 2008) e reação acrossomal nos espermatozoides (LECLERC; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1998).

As células apresentam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para manter adequados níveis de EROs. As defesas enzimáticas contra o estresse oxidativo incluem a glutatona, superóxido dismutase, catalase e tioredoxina, moléculas relacionadas à melhoria na conversão de oócitos a blastocistos em diferentes espécies (TAKAHASHI, 2012). A glutatona foi relacionada com o aumento na taxa de blastocisto, quando os embriões bovinos foram cultivados em atmosfera não controlada devido a diminuição do estresse do retículo endoplasmático (YOON *et al.*, 2014). As defesas celulares antioxidantes não enzimáticas são compostas por diferentes moléculas, como o ácido ascórbico, o α -tocoferol, selênio e a melatonina (NUNES *et al.*, 2005). Quando a geração de EROs passa a ser maior que a capacidade de atenuação celular pelos sistemas enzimáticos ou não, é estabelecido um desequilíbrio que determina o estresse oxidativo. As EROs promovem danos celulares e favorecem os mecanismos apoptóticos nas células (WANG *et al.*, 2012). Em embriões, os danos causados pelo excesso de EROs incluem peroxidação lipídica da membrana, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, depleção de trifosfato de adenosina e disfunção mitocondrial e, além disso, as EROs em excesso determinam um bloqueio na maturação oocitária e no desenvolvimento dos embriões (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; JUKNAT *et al.*,

2005; MATSUZUKA *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012). O excesso de EROs ainda foi relacionado a ativação da resposta apoptótica mitocondrial (JUKNAT *et al.*, 2005). Durante o estresse oxidativo, o equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas como proteína X associada à BCL-2 (BAX), proteína antagonista da BCL-2 (BAK) e a proteína reguladora de apoptose (BAD) e as antiapoptóticas BCL2, BCLW e BCLXL, favorecendo os mecanismos apoptóticos nas células (MAITY *et al.*, 2009).

2.3.PROPRIEDADES BENÉFICAS DA MELATONINA

A melatonina é um hormônio sintetizado a partir do triptofano, que é inicialmente hidroxilado para produzir 5-hidroxitriptofano que, por sua vez, é descarboxilado gerando a serotonina. A serotonina é acetilada a N-acetilserotonina ou metilada para gerar 5-metroxitriptamina, cujos produtos podem ser metilados ou acetilados respectivamente, para gerar melatonina (ZHAO *et al.*, 2019).

A melatonina é uma molécula com reconhecida capacidade de reduzir os níveis de EROs. Tal efeito decorre da atenuação direta de moléculas como oxigênio singleto, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila por meio de reações antioxidantes (POEGGELER *et al.*, 1996) e através da regulação positiva de genes responsáveis por codificar proteínas antioxidantes (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995; ANTOLÍN *et al.*, 1996; MAYO *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Os metabólitos da melatonina também apresentam expressiva capacidade antioxidante (RESSMEYER *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2007; GALANO; TAN; REITER, 2011). Entretanto, deve-se considerar que a efetividade de tais mecanismos protetivos aqui relacionados parece estar reduzida nas condições de cultivo *in vitro*.

A melatonina está presente no interior do folículo ovariano em uma concentração maior que a encontrada no sangue periférico e assume-se que, possivelmente, essa molécula representa a substância antioxidante mais potente encontrada nos folículos, onde age protegendo os oócitos das EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; FATEHI *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2012). A utilização de moléculas capazes de controlar os níveis de EROs, como a melatonina, torna-se uma importante estratégia para aperfeiçoar as condições de cultivo na PIVE.

2.4.EFEITOS DA MELATONINA EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO E EMBRIÕES

Os efeitos positivos da melatonina na PIVE foram observados em diversas espécies. Em oócitos murinos envelhecidos, a melatonina recuperou parcialmente os efeitos do envelhecimento, determinando uma redução de EROs e inibição da apoptose (DAI *et al.*, 2017). O uso de melatonina durante a MIV aumentou a taxa de blastocisto e o número de células por blastocisto (HE *et al.*, 2016), aumentou a expansão, maturação, fertilização e taxa de blastocisto (BAHADORI *et al.*, 2013; KESHAVARZI *et al.*, 2018) e aumentou a viabilidade de blastocistos durante a vitrificação e o descongelamento (ZHANG *et al.*, 2016). A melatonina quando adicionada durante o CIV aumentou a qualidade e taxa de desenvolvimento de embriões e preveniu a apoptose (NIKNAFS; MEHDIPOUR; ROUSHANDEH, 2014). Demonstrou-se que a melatonina aumenta as proteínas SOD e BCL2 e diminui CAS3 e p53; favorecendo o desenvolvimento de embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas (SALEHI; KATO; TSUNODA, 2014).

Zigotos bovinos suplementados com melatonina, por três horas após a fertilização, tiveram uma redução nos níveis de EROs (ORTEGA *et al.*, 2016). Komninou *et al.* (2016), cultivaram embriões com nano cápsulas de núcleo lipídico carregadas com melatonina e verificaram aumento na taxa de eclosão e no número de células embrionárias, bem como redução nos níveis de EROs e dos mecanismos apoptóticos.

A melatonina, quando adicionada no CIV, a promoveu aumento na taxa de clivagem e taxa de blastocisto, além de acelerar o desenvolvimento de embriões *in vitro* e qualidade de blastocistos quando adicionada ao cultivo *in vitro* (WANG *et al.*, 2014a). A melatonina adicionada nos primeiros dois dias do CIV aumentou a taxa de blastocisto e blastocisto eclodido (WANG *et al.*, 2014b). A melatonina atua regulando positivamente superóxido dismutase 1 (ZnSOD) e 2 (MnSOD) em células do *cumulus*, diminuindo a fragmentação nuclear, além de diminuir as EROs em oócitos durante a MIV (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016). Observou-se que a suplementação de oócitos

com melatonina com nano cápsulas de núcleo lipídico regula positivamente a glutathione peroxidase (GPX1) e a SOD2 e, negativamente, a CASP3 e BAX; aumenta a produção *in vitro* de embriões, diminui os níveis de EROs e núcleos apoptóticos, além de regular positivamente a GPX1 e SOD2 e, negativamente, CASP3 e BAX (REMIÃO *et al.*, 2016).

Também foi observado que a melatonina diminui a organização de fuso aberrante, aumenta a produção de adenosina trifosfato, aumenta o desenvolvimento de oócitos, reduz a taxa apoptótica, além de regular negativamente BAX e CASP3 e positivamente a BCL2 (LIANG *et al.*, 2017). Quando oócitos em fase de vesícula germinativa foram suplementados durante a MIV, a melatonina melhorou o desenvolvimento embrionário e número total de células após a FIV, além de regular positivamente GDF9, MARF1 e DNMT1 α (TIAN *et al.*, 2014). A melatonina aumentou a taxa de blastocisto de embriões derivados de oócitos submetidos ao estresse térmico e suplementados posteriormente com a melatonina (CEBRIAN-SERRANO *et al.*, 2013).

Além de modelos murinos e bovinos, conforme apresentado, outros estudos trouxeram evidências da ação da melatonina em outras espécies. Em suínos, a melatonina, quando adicionada na MIV, aumenta a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número total de células por blastocisto, além de regular o metabolismo lipídico, fornecendo energia para a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (JIN *et al.*, 2017). Em suínos a melatonina, adicionada na MIV, promoveu melhorias na maturação oocitária e na expansão das células do *cumulus* através da regulação de genes sinalizadores da resposta proteica contra o estresse do retículo endoplasmático durante a MIV (PARK *et al.*, 2017). A melatonina melhora a extrusão do corpúsculo polar e taxa de blastocisto prejudicadas pelo estresse térmico, além de preservar os níveis de hormônio esteroide, reduzir as espécies reativas de oxigênio, aumentar a produção de GSH (*glutathione*) e inibir a apoptose (LI *et al.*, 2015). Também foi observado que a melatonina aumenta a taxa de blastocisto e diminui a incidência de núcleos apoptóticos em embriões quando adicionada na MIV e CIV (DO *et al.*, 2015) e aumenta a proliferação de fibroblastos fetais e taxa de blastocisto, além de reduzir a incidência de

núcleos apoptóticos, regular positivamente BCL2L1 e, negativamente, BAX e p53 quando utilizada para suplementar células doadoras e embriões gerados por transferência nuclear de célula somática (PANG *et al.*, 2013). Em suínos, em células da granulosa submetidas à hipóxia, a melatonina promoveu a eliminação de EROs, estimulação de enzimas antioxidantes e, em relação à apoptose, foi capaz de promover a inibição do eixo caspase 8/9 – caspase 3 através da via MTNR1B – PKA (TAO *et al.*, 2021).

Os efeitos positivos da melatonina durante a PIVE também foram reportados em humanos (ARJMAND *et al.*, 2016), bubalinos (NAGINA *et al.*, 2016), coelhos (MEHAISEN *et al.*, 2015; MEHAISEN; SAEED, 2015) e ovinos (SUCCU *et al.*, 2014). Dessa forma, a melatonina apresenta grande potencial para melhorar os resultados da PIVE em muitos mamíferos, exercendo principalmente efeitos antioxidantes, seja por ação direta sobre as EROs ou na regulação positiva de enzimas com ação antioxidante. Tais efeitos, altamente desejáveis, promovem um aumento da viabilidade celular e redução da apoptose. Além dos efeitos antioxidantes, a melatonina também atua sobre oócitos e embriões por meio da interação com os receptores MT1, MT2 e 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 diferentes autores em diferentes doses e momentos da PIVE, em diferentes espécies de mamíferos, estão sumarizadas na **Tabela 1**; quando utilizada em embriões, na **Tabela 2**; em oócitos e embriões na **Tabela 3** e em folículo ovariano, células da granulosa e ovário, na **Tabela 4**.

Tabela 1. Sumarização dos efeitos da melatonina em oócitos segundo a espécie, concentração de melatonina utilizada, principais efeitos observados e referência bibliográfica.

Mamífero	Concentração	Principais efeitos observados	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
Suíno	10^{-9} a 10^6 M	Protegeu os oócitos do estresse térmico	LI <i>et al.</i> , 2015
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
Búfalo	250 a 1000 μ M	Melhorou a taxa de fertilização	NAGINA <i>et al.</i> , 2016
Camundongo	10^{-9} a 10^{-5} M	Melhorou a qualidade oocitária e acelerou a capacidade de desenvolvimento embrionário pós fertilização <i>in vitro</i>	HE <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
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
Camundongo	10^{-9} a 10^{-3} M	Melhorou a capacidade de fertilização, redução de EROs e apoptose e estabilização das proteínas ovastacina e Juno	DAI <i>et al.</i> , 2017
Camundongo	10^{-9} a 10^6 M	Melhorou a competência oocitária	KESHAVARZI <i>et al.</i> , 2018
Humano	1 a 100 μ M	Manteve o potencial de membrana mitocondrial e diminui os níveis excessivos de Ca ²⁺ intracelular em oócitos	LIU <i>et al.</i> , 2019
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
Camundongo	1 μ M	Reduziu defeitos meióticos avançados associados à idade materna em oócitos	LI <i>et al.</i> , 2020
Camelídeo	25 a 75 μ M	Melhorou a maturação, fertilização e o desenvolvimento embrionário pré-implantação de oócitos	FATHI <i>et al.</i> , 2021
Camundongo	10^{-11} a 10^{-12} M	Protegeu oócitos de camundongos contra defeitos induzidos pela rotenona	WANG <i>et al.</i> , 2023

Tabela 2. Sumarização dos efeitos da melatonina em embriões segundo a espécie, concentração de melatonina utilizada, principais efeitos observados e referência bibliográfica.

Mamífero	Estrutura suplementada	Concentração	Principais efeitos observados	Referência
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
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
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
Camundongo	Embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas	10^{-12} a 10^{-6} M	Aumentou a velocidade de formação de blastocistos	SALEHI <i>et al.</i> , 2014
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
Coelho	Embriões	10^{-3} M	Aumentou a taxa de blastocistos em embriões frescos e vitrificados com múltiplos mecanismos de melhorou o desenvolvimento embrionário	MEHAISEN <i>et al.</i> , 2015
Coelho	Embriões	10^{-9} a 10^{-3} M	Melhorou as taxas de desenvolvimento e eclodibilidade de embriões recuperados 48 horas após a inseminação	MEHAISEN; SAEED, 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
Humano	Embriões	10^{-7} M	Estendeu o período de sobrevivência embrionária	ARJMAND <i>et al.</i> , 2016

Tabela 3. Sumarização dos efeitos da melatonina em oócitos e embriões segundo a espécie, concentração de melatonina utilizada, principais efeitos observados e referência bibliográfica.

Mamífero	Estrutura suplementada	Concentração	Principais efeitos observados	Referência
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
Camundongo	Oócitos e embriões	10 nM a 100 M	Melhorou a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário	BAHADORI <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
Camundongo	Oócitos e embriões	10^{-9} a 10^6 M	Aumentou o potencial de desenvolvimento de oócitos MII vitrificados	ZHANG <i>et al.</i> , 2016
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

Tabela 4. Sumarização dos efeitos da melatonina em folículo ovariano, células da granulosa e ovário segundo a espécie, concentração de melatonina utilizada, principais efeitos observados e referência bibliográfica.

Mamífero	Estrutura suplementada	Concentração	Principais efeitos observados	Referência
Ovino	Folículo ovariano	100 a 1000 pg/ml	Promoveu o desenvolvimento e diminui os níveis de EROs em oócitos ovinos de folículos antrais precoces cultivados <i>in vitro</i> ; aumentou a atividade mitocondrial e promoveu a aquisição da competência meiótica de oócitos	BARROS <i>et al.</i> , 2020
Suíno	Células da granulosa	10^{-9} a 10^{-3} M	Protegeu da apoptose induzida por hipóxia	TAO <i>et al.</i> , 2021
Esquilo	Ovário	10 nM	Diminuiu significativamente os danos ovarianos, agindo como um agente citoprotetor através do seu receptor MT1	PAL CHOWDHURY; HALDAR, 2022

2.5.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAL

Na busca por melhores resultados na PIVE, novas abordagens relacionadas ao sistema de cultura estão sendo desenvolvidas. Nesse cenário, se destacam os cultivos tridimensionais (3D), os quais incluem matrizes 3D compostas por diferentes materiais. Tais materiais referem-se a agarose, colágeno, hialuronano e hidrogel de alginato; micro biorreatores de mármore líquido, além de dispositivos de levitação magnética e micro fluídica. Tais modelos ilustram alguns dos sistemas 3D que já foram testados em modelos voltados para a reprodução de mamíferos (CHOI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015; FERRAZ *et al.*, 2018; ANTONINO *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2021; DESAI *et al.*, 2022; DE AVILA FERRONATO *et al.*, 2023).

Em relação às matrizes, Park *et al.* (2021) observaram que oócitos suínos podem ser maturados *in vitro* com competência de desenvolvimento melhorada e citoplasma de alta qualidade utilizando-se de matrizes de agarose suplementadas com fibronectina, colágeno ou laminina. Além de agarose, o colágeno também pode ser utilizado em sistemas 3D, como mostrado por Choi *et al.* (2014). Tais autores apresentaram um modelo que simula características ovarianas de mamíferos *in vitro* através do encapsulamento de folículos ovarianos em invólucros de hidrogel de colágeno (0,5%) simulando a medula ovariana, revestidos por hidrogel de alginato (2%) simulando o córtex ovariano. O gel de hialuronano, um biomaterial baseado em matriz extracelular, também pode ser empregado em folículos ovarianos, pois permite a ovulação de oócitos em metáfase II funcionalmente competentes, aptos a fertilização, ativação genômica e blastulação (DESAI *et al.*, 2022). Outro material utilizado como matriz 3D é o hidrogel de alginato, cujas características o tornam ideal como matriz extracelular 3D. Esse material já foi testado no cultivo embrionário de diferentes formas; em cultura de sobreposição e cultura por encapsulamento. Tais cultivos apoiaram a proliferação, alongamento e diferenciação celular de embriões bovinos eclodidos durante o CIV prolongada (ZHAO *et al.*, 2015).

Outras abordagens 3D, incluindo micro biorreatores de mármore líquido, dispositivos de levitação magnética e micro fluídica também já foram testados em estudos voltados para a reprodução (FERRAZ *et al.*, 2018; ANTONINO *et al.*, 2019; DE AVILA FERRONATO *et al.*, 2023). Todos esses modelos buscam elevar o sucesso das técnicas de reprodução assistida por meio da simulação de ambientes de desenvolvimento mais adequados e, principalmente, trazendo aspectos observados *in vivo* para o ambiente *in vitro*.

2.6.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAIS BASEADOS EM MATRIZES DE NANOCELULOSE BACTERIANA

A nanocelulose bacteriana é produzida por diversas espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Gluconacetobacter* e *Sarcina* (HU *et al.*, 2014). A purificação da celulose bacteriana requer a morte dos microrganismos, bem como a remoção de resíduos celulares presentes no meio de cultura da matriz. A celulose é composta por monômeros de D-glicose conectados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A nanocelulose bacteriana, como o próprio nome sugere, é sintetizada em escala nanométrica e apresenta propriedades importantes como alta resistência mecânica, pureza, cristalinidade e teor de água (KLEMM *et al.*, 2005). Estruturalmente, a nanocelulose bacteriana se organiza em uma rede tridimensional de nanofibrilas altamente hidrofílica e porosa, o que permite a retenção de água (DE AMORIM *et al.*, 2020). Devido às suas características físico-químicas e biológicas únicas, a celulose bacteriana representa um biopolímero natural viável para várias aplicações biomédicas (SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

Dentre as aplicações biomédicas da nanocelulose se destacam a sua utilização como carreadora de compostos como fármacos (SALIMI *et al.*, 2019), siRNA (NDONG NTOUTOUME *et al.*, 2017) e proteínas (MÜLLER *et al.*, 2013). A nanocelulose também apresenta aplicações em engenharia de tecidos, como tecidos ósseos (SUKUL *et al.*, 2015) dentários (PENG *et al.*, 2021), tecidos moles (ANTON-SALES *et al.*, 2021) e pele (SILVA *et al.*, 2020).

Com base no exposto, materiais à base de nanocelulose bacteriana apresentam características promissoras em aplicações diversas. Contudo, os efeitos desse material ainda não foram investigados na PIVE. Características como força mecânica semelhante à proporcionada pela matriz extracelular, porosidade que permite a difusão de nutrientes através das nanofibras, bem como a capacidade de carrear compostos bioativos; tornam a nanocelulose bacteriana um material altamente promissor para confecção de sistemas tridimensionais aplicados à PIVE. Recentemente foi lançado um sistema tridimensional à base de nanocelulose bacteriana para cultivo de células denominado CellFate® (Biocelltis, S.A., Brasil). As matrizes CellFate® são compostas por nanofibras poliméricas naturais de 50 a 100 nm de diâmetro, semelhante ao colágeno humano, cuja organização tridimensional é similar a matriz extracelular, o que proporciona um microambiente adequado para o crescimento de qualquer tipo celular de forma reprodutível. Além disso, tal sistema oferece potencial para incrementar os resultados da PIVE, considerando proporcionar maior área de troca entre a superfície do embrião e o meio de cultivo devido a sua porosidade, além de favorecer o desenvolvimento de oócitos e/ou embriões por produzir uma força mecânica semelhante ao observado *in vivo*.

Com base nos dados apresentados, o presente estudo foi concebido para investigar a resposta de oócitos e embriões com genética *Bos taurus indicus* à melatonina em condições *in vitro*, visto que não foram encontradas tais informações na literatura consultada. Além disso, este estudo se propôs a aprimorar a PIVE por meio da utilização de um sistema 3D inédito denominado CellFate®, caracterizado por uma matriz de nanocelulose bacteriana com propriedades similares à matriz extracelular.

2.7.HIPÓTESE

Conforme ilustrado na **Figura 1**, a hipótese do presente estudo é que o sistema de cultivo 3D, utilizando a Membrana Cellfate® durante a MIV e CIV, associado à adição de melatonina no meio de cultivo da MIV, favorece o desenvolvimento de oócitos, aumenta o número de embriões

produzidos no D7 e D9 (D0 = dia da FIV) em relação ao número de oócitos cultivados e promove um aumento na qualidade dos blastocistos observada no D9 através da regulação positiva dos genes “*POU class 5 homebox 1*” (OCT4) marcador de qualidade embrionária; superóxido dismutase 2 (SOD 2) e glutathiona peroxidase 1 (GPX1) ambos com ação oxidante; e uma regulação negativa do gene BAX de ação pró-apoptótica.

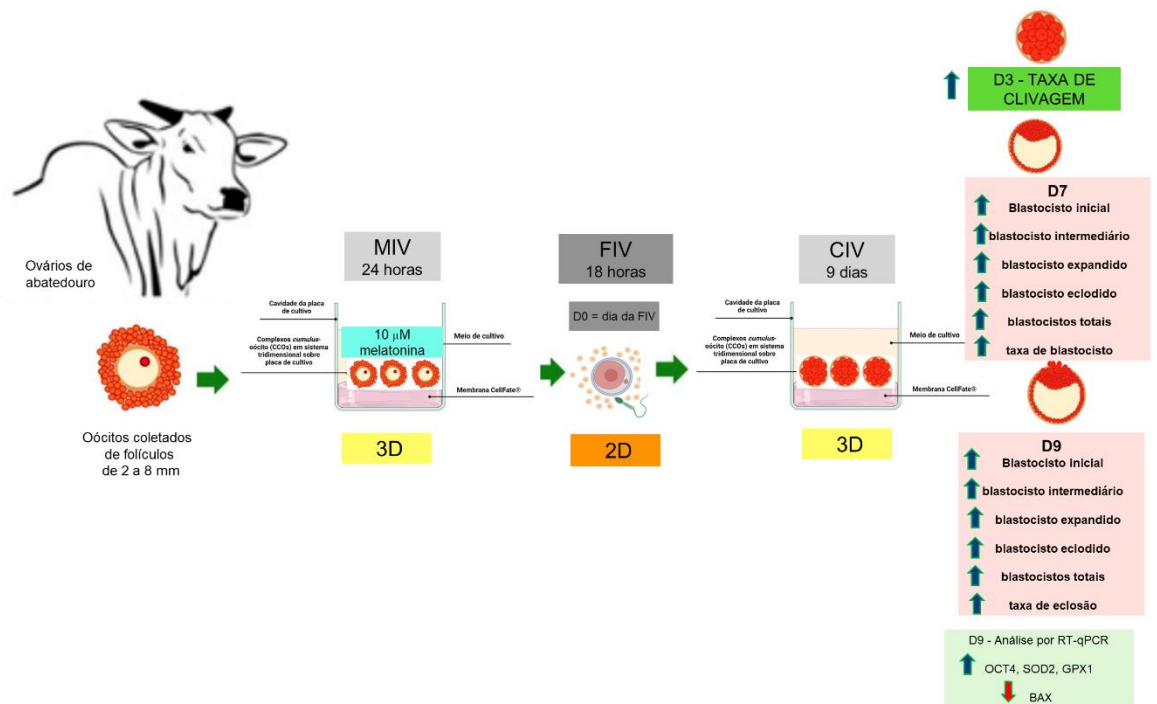


Figura 1. Modelo hipotético. O sistema de cultivo 3D utilizando a Membrana Cellfate® durante a MIV e CIV, associado à adição de melatonina no meio de cultivo da MIV, favorece o desenvolvimento de oócitos, aumenta o número de embriões produzidos no D7 e D9 (D0 = dia da FIV) em relação ao número de oócitos cultivados e promove um aumento na qualidade dos blastocistos observada no D9 através da regulação positiva dos genes OCT4, marcador de qualidade embrionária, SOD 2 e GPX1, ambos com ação oxidante, e uma regulação negativa do gene BAX, de ação pró-apoptótica.

2.8.OBJETIVOS

No Estudo 1, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com melatonina em diferentes concentrações (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM) no sistema convencional (2D), durante a MIV e/ou

CIV no número de embriões produzidos no D7 e D9 (D0 = dia da FIV) na quantidade e qualidade dos blastocistos no D9 de desenvolvimento analisada por RT-PCR da expressão dos transcritos de dois genes “*POU class 5 homebox 1*” (OCT4) marcador de qualidade embrionária; superóxido dismutase 2 (SOD 2) e glutathione peroxidase 1 (GPX1) ambos com ação oxidante; e uma regulação negativa do gene BAX de ação pró-apoptótica. No Estudo 2, objetivou-se avaliar os efeitos da utilização do sistema 3D com a membrana CellFate® na MIV e/ou CIV combinada com a suplementação com melatonina (10000 nM) na MIV; no número de embriões produzidos no D7 e D9 de desenvolvimento e no aumento na qualidade dos blastocistos no D9 analisada por RT-PCR da expressão dos transcritos OCT4, SOD 2, GPX1 e BAX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V.; BIASE, F. H.; DE BEM, T. H.; MESQUITA, L. G.; MEIRELLES, F. V.; FERRAZ, A. L.; FURLAN, L. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 624–633, 2016. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/in-vitro-maturation-alters-gene-expression-in-bovine-oocytes/502367A82764191A6255669AD9CD1AF4>>.
- AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 497–513, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.22316>>.
- AN, Q.; PENG, W.; CHENG, Y.; LU, Z.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; SU, J. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 10, p. 17370–17381, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28357>>.
- ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SÁINZ, 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. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 882–890, 1996. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.10.8.8666165>>.
- ANTONINO, D. de C.; SOARES, M. M.; JÚNIOR, J. de M.; DE ALVARENGA, P. B.; MOHALLEM, R. de F. F.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. A.; DE SOUZA, A. G.; BELETTI, M. E.; ALVES, B. G.; JACOMINI, J. O.; GOULART, L. R.; ALVES, K. A. Three-dimensional levitation

culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 300–311, 2019.

ANTON-SALES, I.; KOIVUSALO, L.; SKOTTMAN, H.; LAROMAIN, A.; ROIG, A.; ANTON-SALES, I.; LAROMAIN, A.; ROIG, A.; KOIVUSALO, L.; SKOTTMAN, H. Limbal Stem Cells on Bacterial Nanocellulose Carriers for Ocular Surface Regeneration. **Small**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 2003937, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.202003937>>.

ARJMAND, F.; KHANMOHAMMADI, M.; ARASTEH, S.; MOHAMMADZADEH, A.; KAZEMNEJAD, S.; AKHONDI, M. M. Extended Culture of Encapsulated Human Blastocysts in Alginate Hydrogel Containing Decidualized Endometrial Stromal Cells in the Presence of Melatonin. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 684–694, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-016-9968-4>>.

BAHADORI, M. H.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; ASGARI, Z. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 11, 2013. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3941378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/241378/)>.

BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W. J.; KUMAR, B. M.; OCK, S. A.; YOO, J. G.; IM, G. S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 265–275, 2007.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 497–502, 1995.

BARROS, V. R. P.; MONTE, A. P. O.; SANTOS, J. M. S.; LINS, T. L. B. G.; CAVALCANTE, A. Y. P.; GOUVEIA, B. B.; MÜLLER, M. C.; OLIVEIRA JUNIOR, J. L.; BARBERINO, R. S.;

DONFACK, N. J.; ARAÚJO, V. R.; MATOS, M. H. T. Effects of melatonin on the *in vitro* growth of early antral follicles and maturation of ovine oocytes. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 71, p. 106386, 2020.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 47, n. SUPPL.4, p. 134–141, 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12154>>.

CHAUBE, S. K.; KHATUN, S.; MISRA, S. K.; SHRIVASTAV, T. G. Calcium ionophore-induced egg activation and apoptosis are associated with the generation of intracellular hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 212–220, 2008. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715760701868352>>.

CHOI, J. K.; AGARWAL, P.; HUANG, H.; ZHAO, S.; HE, X. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. **Biomaterials**, [s. l.], v. 35, n. 19, p. 5122–5128, 2014.

DAI, X.; LU, Y.; ZHANG, M.; MIAO, Y.; ZHOU, C.; CUI, Z.; XIONG, B. Melatonin improves the fertilization ability of post-ovulatory aged mouse oocytes by stabilizing ovastacin and Juno to promote sperm binding and fusion. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 598–606, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dew362>>.

DE AMORIM, J. D. P.; DE SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; DA SILVA DUARTE, I.; DE ASSIS SALES RIBEIRO, F.; SILVA, G. S.; DE FARIAS, P. M. A.; STINGL, A.; COSTA, A. F. S.;

VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters** 2020 18:3, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-020-00989-9>>.

DE AVILA FERRONATO, G.; DOS SANTOS, C. M.; ROSA, P. M. da S.; BRIDI, A.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SANGALLI, J. R.; DA SILVEIRA, J. C. Bovine *in vitro* oocyte maturation and embryo culture in liquid marbles 3D culture system. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. e0284809, 2023. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0284809>>.

DESAI, N.; SPANGLER, M.; NANAVATY, V.; GISHTO, A.; BROWN, A. New hyaluronan-based biomatrix for 3-D follicle culture yields functionally competent oocytes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-022-01019-9>>.

DEVLIN, T. M. **Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas**. 4. ed. [s.l.: s.n.]. v. 2
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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12607>>.

EZZATI, M.; ROSHANGAR, L.; RAD, J. S.; KARIMIAN, N. Evaluating The Effect of Melatonin on HAS2, and PGR Expression, as Well as *Cumulus* Expansion, and Fertility Potential in Mice. **Cell Journal (Yakhteh)**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 108–112, 2018. Disponível em: <https://www.celljournal.org/article_250491.html>.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVEERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization

protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 177–185, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16128413/>>.

FATHI, M.; SALAMA, A.; EL-SHAHAT, K. H.; EL-SHERBINY, H. R.; ABDELNABY, E. A. Effect of melatonin supplementation during IVM of dromedary camel oocytes (*Camelus dromedarius*) on their maturation, fertilization, and developmental rates *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], v. 172, p. 187–192, 2021.

FEIL, D.; LANE, M.; ROBERTS, C. T.; KELLEY, R. L.; EDWARDS, L. J.; THOMPSON, J. G.; KIND, K. L. Effect of culturing mouse embryos under different oxygen concentrations on subsequent fetal and placental development. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 572, n. 1, p. 87–96, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/jphysiol.2005.102681>>.

FERRAZ, M. A. M. M.; RHO, H. S.; HEMERICH, D.; HENNING, H. H. W.; VAN TOL, H. T. A.; HÖLKER, M.; BESENFELDER, U.; MOKRY, M.; VOS, P. L. A. M.; STOUT, T. A. E.; LE GAC, S.; GADELLA, B. M. An oviduct-on-a-chip provides an enhanced *in vitro* environment for zygote genome reprogramming. **Nature Communications** 2018 9:1, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-018-07119-8>>.

GE, W.; XIAO, L.; DUAN, H.; ZHAO, X.; LI, J.; HU, J. Proteomic analysis of iTRAQ in melatonin-treated sheep epididymal epithelial cells. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1406–1417, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.14217>>.

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. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>>.

GUPTA, S.; SEKHON, L.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. **Current Women's Health Reviews**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 227–238, 2010.

HALLIWELL, Barry.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. [s.l.]: Oxford University Press, 2007.

HE, C.; WANG, J.; ZHANG, Z.; YANG, M.; LI, Y.; TIAN, X.; MA, T.; TAO, J.; ZHU, K.; SONG, Y.; JI, P.; LIU, G. Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under *in vitro* Conditions. **International Journal of Molecular Sciences** 2016, **Vol. 17, Page 939**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 939, 2016. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/939/htm>>.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reproduction**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 553–565, 2002. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/4/553.xml>>.

HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Reproduction**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 279–284, 1990. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/90/1/jrf_90_1_030.xml>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12388>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2004.00166.x>>.

KATZ-JAFFE, M. G.; MCCALLIE, B. R.; PREIS, K. A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D. K. Transcriptome analysis of in vivo and *in vitro* matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 939–946, 2009.

KESHAVARZI, S.; SALEHI, M.; FARIFTEH-NOBIJARI, F.; HOSSEINI, T.; HOSSEINI, S.; GHAZIFARD, A.; NOVIN, M. G.; FALLAH-OMRANI, V.; NOUROZIAN, M.; HOSSEINI, A. Melatonin Modifies Histone Acetylation during *In vitro* Maturation of Mouse Oocytes. **Cell Journal (Yakhteh)**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 244–249, 2018. Disponível em: <https://www.celljournal.org/article_250508.html>.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200460587>>.

KNIJN, H. M.; GJØRRET, J. O.; VOS, P. L. A. M.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VAN DER WEIJDEN, B. C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. J. Consequences of In Vivo Development and Subsequent Culture on Apoptosis, Cell Number, and Blastocyst Formation in Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 1371–1378, 2003. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.017251>>.

KÖLLE, S.; HUGHES, B.; STEELE, H. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 650–662, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.23352>>.

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. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157561>>.

LAMIRANDE, E. De; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International journal of andrology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 21–25, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8385650/>>.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Interaction Between Ca²⁺, Cyclic 3',5' Adenosine Monophosphate, the Superoxide Anion, and Tyrosine Phosphorylation Pathways in the Regulation of Human Sperm Capacitation. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 434–443, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02037.x>>.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22125349/>>.

LEE, S.; JIN, J. X.; TAWEECHAIPASANKUL, A.; KIM, G. A.; LEE, B. C. Stimulatory Effects of Melatonin on Porcine *In vitro* Maturation Are Mediated by MT2 Receptor. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 1581, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1581, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1581/htm>>.

LEE, S.; KANG, H. G.; JEONG, P. S.; SONG, B. S.; CHOI, W. S.; JIN, Y. B.; HUH, J. W.; KIM, S. U.; SIM, B. W. Expression of the melatonergic system during meiotic maturation of cynomolgus monkey *cumulus*–oocyte complexes. **Journal of Medical Primatology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 163–169, 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jmp.12641>>.

LI, C.; HE, X.; HUANG, Z.; HAN, L.; WU, X.; LI, L.; XIN, Y.; GE, J.; SHA, J.; YIN, Z.; WANG, Q. Melatonin ameliorates the advanced maternal age-associated meiotic defects in oocytes through

the SIRT2-dependent H4K16 deacetylation pathway. **Aging**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1610–1623, 2020. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/article/102703>>.

LI, H. S.; ZHOU, Y. N.; LI, L.; LI, S. F.; LONG, D.; CHEN, X. L.; ZHANG, J. B.; FENG, L.; LI, Y. P. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox biology**, [s. l.], v. 25, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30686776/>>.

LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. **The Journal of endocrinology**, [s. l.], v. 232, n. 1, p. R1–R26, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27875265/>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12268>>.

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. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD16223>>.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 780–787, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11948241/>>.

LIU, Y. J.; JI, D. mei; LIU, Z. B.; WANG, T. J.; XIE, F. F.; ZHANG, Z. G.; WEI, Z. L.; ZHOU, P.; CAO, Y. X. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and decreases excessive intracellular Ca²⁺ levels in immature human oocytes. **Life Sciences**, [s. l.], v. 235, p. 116810, 2019.

LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S.; FERRAZ, P. A.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. D. L. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões

bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2014.

LORD, T.; MARTIN, J. H.; AITKEN, R. J. Accumulation of electrophilic aldehydes during postovulatory aging of mouse oocytes causes reduced fertility, oxidative stress, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 33, 2015.

MAITY, P.; BINDU, S.; DEY, S.; GOYAL, M.; ALAM, A.; PAL, C.; REITER, R.; BANDYOPADHYAY, U. Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 314–323, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2009.00663.x>>.

MANCHESTER, L. C.; COTO-MONTES, A.; BOGA, J. A.; ANDERSEN, L. P. H.; ZHOU, Z.; GALANO, A.; VRIEND, J.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 403–419, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12267>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.13097>>.

MARTÍN-ROMERO, F. J.; MIGUEL-LASOBRAS, E. M.; DOMÍNGUEZ-ARROYO, J. A.; GONZÁLEZ-CARRERA, E.; ÁLVAREZ, I. S. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 652–661, 2008.

MATSUZUKA, T.; SAKAMOTO, N.; OZAWA, M.; USHITANI, A.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Alleviation of maternal hyperthermia-induced early embryonic death by administration

of melatonin to mice. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 217–223, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2005.00260.x>>.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/PL00012498>>.

MEHAISEN, G. M. K.; SAEED, A. M. *In vitro* development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin. **Zygote**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 111–115, 2015. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/in-vitro-development-rate-of-preimplantation-rabbit-embryos-cultured-with-different-levels-of-melatonin/710E60BB388A3CA0D6549E62B462146B>>.

MEHAISEN, G. M. K.; SAEED, A. M.; GAD, A.; ABASS, A. O.; ARAFA, M.; EL-SAYED, A.; FRAIDENRAICH, D. Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitriified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. e0139814, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139814>>.

MIHALAS, B. P.; REDGROVE, K. A.; MCLAUGHLIN, E. A.; NIXON, B. Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, p. 4015874, 2017.

MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 608–614, 2009. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD08198>>.

MÜLLER, A.; NI, Z.; HESSLER, N.; WESARG, F.; MÜLLER, F. A.; KRALISCH, D.; FISCHER, D. The Biopolymer Bacterial Nanocellulose as Drug Delivery System: Investigation of Drug

Loading and Release using the Model Protein Albumin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 579–592, 2013.

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. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/141633>>.

NDONG NTOUTOUME, G. M. A.; GRASSOT, V.; BRÉGIER, F.; CHABANAIS, J.; PETIT, J. M.; GRANET, R.; SOL, V. PEI-cellulose nanocrystal hybrids as efficient siRNA delivery agents—Synthesis, physicochemical characterization and *in vitro* evaluation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 164, p. 258–267, 2017.

NIE, J.; XIAO, P.; WANG, X.; YANG, X.; XU, H.; LU, K.; LU, S.; LIANG, X. Melatonin prevents deterioration in quality by preserving epigenetic modifications of porcine oocytes after prolonged culture. **Aging**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 3897–3909, 2018. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/article/101680>>.

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. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4336669/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336669/)>.

NUNES, V. A.; GOZZO, A. J.; CRUZ-SILVA, I.; JULIANO, M. A.; VIEL, T. A.; GODINHO, R. O.; MEIRELLES, F. V.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M.; ARAUJO, M. S. Vitamin E prevents cell death induced by mild oxidative stress in chicken skeletal muscle cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s. l.], v. 141, n. 3, p. 225–240, 2005.

ORTEGA, M. S.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; MINGOTI, G. Z.; ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 9152–9164, 2016.

PAL CHOWDHURY, J.; HALDAR, C. Stress associated ovarian dysfunctions in a seasonal breeder *Funambulus pennanti*: Role of glucocorticoids and possible amelioration by melatonin. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 316, p. 113962, 2022.

PANG, 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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12024>>.

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. Bin. Melatonin protects against paraquat-induced damage during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. e12532, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12532>>.

PARK, J. E.; KIM, M. S.; LEE, E.; LEE, S. T. *In vitro* maturation using an agarose matrix with incorporated extracellular matrix proteins improves porcine oocyte developmental competence by enhancing cytoplasmic maturation. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 807–817, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/term.3228>>.

PARK, 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. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RDv29n1Ab173>>.

PENG, W.; CHANG, M.; WU, Y.; ZHU, W.; TONG, L.; ZHANG, G.; WANG, Q.; LIU, J.; ZHU, X.; CHENG, T.; LI, Y.; CHEN, X.; WENG, D.; LIU, S.; ZHANG, H.; SU, Y.; ZHOU, J.; LI, H.;

SONG, Y. Lyophilized powder of mesenchymal stem cell supernatant attenuates acute lung injury through the IL-6–p-STAT3–p63–JAG2 pathway. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 216, 2021.

POEGGELER, B.; REITER, R. J.; HARDELAND, R.; TAN, D. X.; BARLOW-WALDEN, L. R. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers *in vitro*. **Redox Report**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 179–184, 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13510002.1996.11747046>>.

RAI, S.; GOSH, H. Modulation of human ovarian function by melatonin. **Frontiers in Bioscience - Elite**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 140–157, 2021. Disponível em: <<https://www.imrpress.com/journal/FBE/13/1/10.2741/875>>.

REITER, R. J.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 253–278, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12360>>.

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.

RESSMEYER, A. R.; MAYO, J. C.; ZELOSKO, V.; SÁINZ, R. M.; TAN, D. X.; POEGGELER, B.; ANTOLÍN, I.; ZSIZSIK, B. K.; REITER, R. J.; HARDELAND, R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. **Redox Report**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 205–213, 2003. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/135100003225002709>>.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *In vitro* Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>>.

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.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>>.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>>.

SAEEDABADI, S.; ABAZARI-KIA, A. H.; RAJABI, H.; PARIVAR, K.; SALEHI, M. Melatonin Improves The Developmental Competence of Goat Oocytes. **International Journal of Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 157–163, 2018. Disponível em: <https://www.ijfs.ir/article_45484.html>.

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. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/effect-of-melatonin-treatment-on-developmental-potential-of-somatic-cell-nucleartransferred-mouse-oocytes-in-vitro/E8AFACBFD538BD962D69E4EE3B1E8B50>>.

SALIMI, S.; SOTUDEH-GHAREBAGH, R.; ZARGHAMI, R.; CHAN, S. Y.; YUEN, K. H. Production of Nanocellulose and Its Applications in Drug Delivery: A Critical Review. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 19, p. 15800–15827, 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.9b02744>>.

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. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3599635/](https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.9b02744)>.

SASAKI, H.; HAMATANI, T.; KAMIJO, S.; IWAI, M.; KOBANAWA, M.; OGAWA, S.; MIYADO, K.; TANAKA, M. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, p. 478890, 2019.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 104, p. 109963, 2019.

SHEFA, A. A.; TAZ, M.; LEE, S. Y.; LEE, B. T. Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 208, p. 168–179, 2019.

SILVA, N. H. C. S.; GARRIDO-PASCUAL, P.; MOREIRINHA, C.; ALMEIDA, A.; PALOMARES, T.; ALONSO-VARONA, A.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R. Multifunctional nanofibrous patches composed of nanocellulose and lysozyme nanofibers for cutaneous wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 165, p. 1198–1210, 2020.

SIMON, M. C.; KEITH, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2008 9:4, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 285–296, 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm2354>>.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 132, p. 342–350, 2020.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12275>>.

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.

SUKUL, M.; NGUYEN, T. B. L.; MIN, Y. K.; LEE, S. Y.; LEE, B. T. Effect of Local Sustainable Release of BMP2-VEGF from Nano-Cellulose Loaded in Sponge Biphasic Calcium Phosphate on Bone Regeneration. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1822–1836, 2015.

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. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22450278/>>.

TAMURA, H.; JOZAKI, M.; TANABE, M.; SHIRAFUTA, Y.; MIHARA, Y.; SHINAGAWA, M.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; SATO, S.; TAKETANI, T.; TAKASAKI, A.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 1135, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 1135, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1135/htm>>.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of ovarian research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 5, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22277103/>>.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and

nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 28–42, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>>.

TAO, J. L.; ZHANG, X.; ZHOU, J. Q.; LI, C. Y.; YANG, M. H.; LIU, Z. J.; ZHANG, L. L.; DENG, S. L.; ZHANG, L.; SHEN, M.; LIU, G. S.; LIU, H. L. Melatonin Alleviates Hypoxia-Induced Apoptosis of Granulosa Cells by Reducing ROS and Activating MTNR1B–PKA–Caspase8/9 Pathway. **Antioxidants** 2021, Vol. 10, Page 184, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 184, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/184/htm>>.

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 Superoxide Dismutase Activity in Porcine Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1150–1157, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.029264>>.

TIAN, X.; WANG, F.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LV, D.; ABULIZI, W.; WANG, X.; LIAN, Z.; LIU, G. Beneficial Effects of Melatonin on the *In vitro* Maturation of Sheep Oocytes and Its Relation to Melatonin Receptors. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, Vol. 18, Page 834, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 834, 2017. a. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/834/htm>>.

TIAN, X.; WANG, F.; ZHANG, L.; JI, P.; WANG, J.; LV, D.; LI, G.; CHAI, M.; LIAN, Z.; LIU, G. Melatonin Promotes the *In vitro* Development of Microinjected Pronuclear Mouse Embryos via Its Anti-Oxidative and Anti-Apoptotic Effects. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, Vol. 18, Page 988, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 988, 2017. b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/988/htm>>.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; HE, C. J.; ZHANG, L.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P. Y.; LIU, G. S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 239–247, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12163>>.

TRIPATHI, A.; KHATUN, S.; PANDEY, A. N.; MISHRA, S. K.; CHAUBE, R.; SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 287–294, 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715760802695985>>.

USHIJIMA, H.; AKIYAMA, K.; TAJIMA, T. Transition of Cell Numbers in Bovine Preimplantation Embryos: In Vivo Collected and *In vitro* Produced Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 239–243, 2008.

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

VIANA, J. H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 22–40, 2022.

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. a. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093641>>.

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. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24666110/>>.

WANG, X.; LI, H.; MU, H.; ZHANG, S.; LI, Y.; HAN, X.; ZHANG, L.; XIANG, W. Melatonin improves the quality of rotenone-exposed mouse oocytes through association with histone modifications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 262, p. 115186, 2023.

WANG, Y.; ZENG, S. Melatonin Promotes Ubiquitination of Phosphorylated Pro-Apoptotic Protein Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death-Extra Long (BimEL) in Porcine Granulosa Cells. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 3431, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 3431, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3431/htm>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2011.00952.x>>.

WATANABE, Y. F.; DE SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; SANTANA BATISTA, E. O.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.; FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 635–644, 2017. Disponível em: <<http://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR1008>>.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, [s. l.], v. 14, n. 8 Suppl, p. 6, 2007. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2648348/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17344448/)>.

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, 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** 2020, Vol. 10, Page 209, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 209, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/2/209/htm>>.

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** **2017**, Vol. **22**, Page **2059**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2059, 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/22/12/2059/htm>>.

YOON, S. Bin; 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. 1–10, 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.113.113480>>.

ZHANG, Y.; LI, W.; MA, Y.; WANG, D.; ZHAO, X.; ZENG, C.; ZHANG, M.; ZENG, X.; MENG, Q.; ZHOU, G. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. **Cryobiology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 335–342, 2016.

ZHAO, D.; YU, Y.; SHEN, Y.; LIU, Q.; ZHAO, Z.; SHARMA, R.; REITER, R. J. Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 441357, 2019.

ZHAO, S.; LIU, Z. X.; GAO, H.; WU, Y.; FANG, Y.; WU, S. S.; LI, M. J.; BAI, J. H.; LIU, Y.; EVANS, A.; ZENG, S. M. A three-dimensional culture system using alginate hydrogel prolongs hatched cattle embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 184–192, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25881989/>>.

CAPÍTULO 2: ESTUDO 1

MELATONINA APRESENTA POTENCIAL PARA AUMENTAR A QUANTIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*?

Adriano Felipe Mendes¹, Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado², Isabella Rio Feltrin¹, Guilherme Pugliesi³, Angela Gonella-Diaza⁴, Valeska de Castro Lourenço⁵; Lucas de Oliveira Bezerra¹, Laura Chuba Machado Rolniche⁵, Maria Eduarda Rocha Pinto⁵, Emily Silva do Nascimento⁵, Ana Laura Silva⁵, Claudia Maria Bertan Membrive^{1,5}.

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-689, Brasil.

²University of Florida, Department of Animal Sciences, Bovine Embryo Laboratory, 2250 Shealy Drive, Gainesville, Florida, 32608, United States of America.

³Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de Caxias Norte, 255, Pirassununga, São Paulo, 13635-900, Brasil.

⁴University of Florida, North Florida Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, Marianna, Florida, 32466, United States of America.

⁵Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP 294), Km 651, Dracena, São Paulo, 17915-899, Brasil.

RESUMO

A hipótese é que a adição de melatonina durante a maturação oocitária (MIV) e cultivo embrionário (CIV), aumenta a quantidade e a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, objetivou-se avaliar os efeitos de 0,01, 10 e 10000 nM de melatonina (Sigma Aldrich, M5250), durante a MIV e/ou CIV, na taxa de clivagem no D3 e na produção embrionária no D7 e D9 (D0 = dia da FIV) e a qualidade dos blastocistos eclodidos no D9; através da avaliação da expressão gênica por RT-qPCT de OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), e BAX (*BCL2 associated X*). Oócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus*, derivados de ovários de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) abatidas, foram cultivados em meio base para MIV acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a MIV, os oócitos foram co-cultivados com espermatozoides durante 18 horas, tendo sido utilizado o sêmen de um único touro Nelore (D0 = dia da fertilização). Posteriormente, os prováveis zigotos foram transferidos para o meio fluido sintético de oviduto (SOF) acrescido com 2,5% de SFB, onde permaneceram em cultivo *in vitro* (CIV), durante 9 dias em placa de Petri e incubadora a 38,5°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. No Experimento 1, as concentrações de 0 (controle), 0,01, 10 e 10000 nM foram utilizadas exclusivamente na MIV; durante 24 horas. No Experimento 2, as concentrações de 0 (controle), 0,01, 10 e 10000 nM foram utilizadas exclusivamente no CIV; ao longo de 9 dias. No Experimento 3, as concentrações de 0 (controle), 0,01, 10 e 10000 nM foram utilizadas na MIV e CIV. Em todos os experimentos foi avaliada a taxa de clivagem no D3 e a produção embrionária em D7 e D9. No Experimento 1, embriões no D9 foram avaliados por RT-qPCR. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida da aplicação de contrastes entre os grupos. Em todos os experimentos, a taxa de clivagem não foi alterada. No Experimento 1, no D7, observou-se uma tendência para maior número de blastocistos eclodidos (P = 0,0686) e totais (P = 0,0892) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. No D9, observou-se maior número de blastocistos totais (P = 0,0216) no grupo 10000 nM comparado

ao grupo 0,01 nM e uma tendência ($P = 0,0741$) de maior número de blastocistos eclodidos no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. Não foram observadas diferenças na abundância de transcritos para todos os genes avaliados. Nos experimentos 2 e 3, não foram observadas diferenças significativas na produção embrionária quando a melatonina foi utilizada isoladamente no CIV e simultaneamente na MIV e CIV. Em conclusão, a adição de melatonina apenas na MIV apresenta tendência para melhores taxas de produção embrionária quando 10000 nM foi comparado a 0,01 nM e a suplementação com melatonina na MIV não altera a expressão dos transcritos OCT4, SOD2, GPX1 e BAX.

Palavras-chave: oócito, embrião, antioxidante, apoptose, Nelore.

ABSTRACT

The hypothesis is that the addition of melatonin during oocyte maturation (IVM) and/or embryonic culture (CIV) increases the quantity and quality of bovine embryos produced *in vitro*. To this end, the objective was to evaluate the effects of 0.01, 10 and 10000 nM of melatonin (Sigma Aldrich, M5250), during IVM and/or CIV, on the cleavage rate at D3 and embryonic production at D7 and D9 (D0 = day of IVF) and the quality of blastocysts hatched on D9; through the evaluation of gene expression by RT-qPCT of OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1), and BAX (BCL2 associated X). Oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple layers of cumulus cells, derived from ovaries of slaughtered Nelore (*Bos taurus indicus*) females, were cultured in IVM base medium plus 10% fetal bovine serum (FBS). After IVM, oocytes were co-cultured with sperm for 18 hours, using semen from a single Nelore bull (D0 = day of fertilization). Subsequently, the probable zygotes were transferred to synthetic oviduct fluid medium (SOF) added with 2.5% FBS, where they remained in *in vitro* culture (IVC) for 9 days in a Petri dish and incubator at 38.5° C and humid atmosphere with 5% CO₂. In Experiment 1, concentrations of 0 (control), 0.01, 10 and 10000 nM were used exclusively in IVM; for 24 hours. In Experiment 2, concentrations of 0 (control), 0.01, 10 and 10000 nM were used exclusively in the IVC; over 9 days. In Experiment 3, concentrations of 0 (control), 0.01, 10 and 10000 nM were used in MIV and IVC. In all experiments, the cleavage rate at D3 and embryonic production at D7 and D9 were evaluated. In Experiment 1, embryos at D9 were evaluated by RT-qPCR. The data were subjected to analysis of variance followed by the application of contrasts between groups. In all experiments, the cleavage rate was not changed. In Experiment 1, on D7, a trend was observed for a greater number of hatched (P = 0.0686) and total (P = 0.0892) blastocysts in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group. On D9, a greater number of total blastocysts (P = 0.0216) was observed in the 10,000 nM group compared to the 0.01 nM group and a tendency (P = 0.0741) for a greater number of blastocysts hatched in the 10,000 nM group compared to the

0.01 nM group. No differences were observed in transcript abundance for all genes evaluated. In experiments 2 and 3, no significant differences were observed in embryonic production when melatonin was used alone in the IVC and simultaneously in the IVM and IVC. In conclusion, supplementation with melatonin only in IVM shows a tendency for better embryonic production rates when 10000 nM was compared to 0.01 nM and supplementation with melatonin in IVM does not alter the expression of OCT4, SOD2, GPX1 and BAX transcripts.

Keywords: oocyte, embryo, antioxidant, apoptosis, Nelore.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia mundialmente utilizada para incrementar o melhoramento genético e a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos. A PIVE envolve as etapas de coleta *in vivo* ou *in vitro* de oócitos, maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fertilização *in vitro* dos oócitos (FIV) e cultivo *in vitro* dos embriões (CIV). As etapas de MIV e FIV são realizadas com aceitável eficiência, entretanto sete dias após o início do CIV, a porcentagem de oócitos inseridos na MIV que prosperam ao estágio de blastocisto é de aproximadamente 40% (RIZOS *et al.*, 2008). Assim, torna-se de interesse o aperfeiçoamento da PIVE, para um maior êxito na taxa de conversão de oócitos em blastocistos após sete dias de cultivo.

A manipulação exercida sobre os oócitos e embriões durante a execução das diferentes etapas da PIVE, assim como as próprias condições do cultivo, reconhecidamente predis põem ao estresse oxidativo (GUÉRIN *et al.*, 2001; DENNERY, 2007; SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020). Tal estresse é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a remoção delas através de sistemas enzimáticos ou não. As EROs determinam danos celulares e favorecerem o desencadeamento de mecanismos apoptóticos nas células (LI *et al.*, 2019). As EROs em níveis acima dos fisiológicos foram relacionadas ao envelhecimento e aberrações cromossômicas em oócitos (LORD; MARTIN; AITKEN, 2015; MIHALAS *et al.*, 2017; SASAKI *et al.*, 2019), condições que comprometem o desenvolvimento embrionário, afetando o número e a qualidade dos embriões produzidos (DENNERY, 2007).

A melatonina (N-acetilsalicílico-5-metoxitriptamina), um hormônio secretado por diferentes tecidos, reconhecidamente promove efeitos antioxidantes, inclusive protegendo os tecidos ovarianos do estresse oxidativo (TAMURA *et al.*, 2012; MANCHESTER *et al.*, 2015; REITER *et al.*, 2016; RAI; GOSH, 2021). Reportou-se que a melatonina, encontrada no fluído folicular, protege diretamente os oócitos das EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; FATEHI *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2012) e age inibindo a formação de EROs (TAMURA *et al.*, 2020). Suas ações são determinadas

pela regulação da expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), ambas envolvidas na remoção de EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014b). Observações recentes permitem sugerir que a melatonina favorece o desenvolvimento de oócitos e/ou embriões em diferentes espécies, como murinos (TIAN *et al.*, 2017b; EZZATI *et al.*, 2018; KESHAVARZI *et al.*, 2018), ovinos (TIAN *et al.*, 2017a), bovinos (YANG *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2019; AN *et al.*, 2019), suínos (LEE *et al.*, 2018; NIE *et al.*, 2018; WANG; ZENG, 2018) e caprinos (SAEEDABADI *et al.*, 2018).

A melatonina pode ser empregada em diferentes momentos da PIVE em bovinos. Cebrian-Serrano *et al.* (2013) utilizaram a melatonina em duas das etapas da PIVE (MIV e CIV) e investigaram a capacidade da melatonina em atenuar os efeitos nocivos do estresse térmico durante a PIVE. O grupo genético dos animais utilizados não foi especificado no referido estudo e, até o momento, não temos conhecimento de estudos com o uso de melatonina durante a MIV e/ou CIV durante a PIVE na raça Nelore (*Bos taurus indicus*). De acordo com a literatura consultada, em geral, os oócitos são comumente recuperados de ovários provenientes de fêmeas *Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus* ou sem raça definida (SAMPAIO *et al.*, 2012; CEBRIAN-SERRANO *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014a; REMIÃO *et al.*, 2016; RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2017) e, eventualmente, de fêmeas *Bos taurus taurus* (KOMNINOOU *et al.*, 2016; YAACOBI-ARTZI *et al.*, 2020). Nesse contexto, o presente estudo busca preencher uma lacuna no que diz respeito à raça e o momento da PIVE mais adequado para a inserção da melatonina, por meio da utilização exclusiva de fêmeas Nelore e adoção de delineamento que permite a identificação do momento da PIVE mais adequado para a inserção da melatonina.

A hipótese é que a adição de melatonina ao meio de cultivo durante as etapas de MIV e CIV aumenta a quantidade e a qualidade dos embriões bovinos produzidos por PIVE, sendo tal efeito dose dependente. Para tanto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com 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 protetor do estresse oxidativo mitocondrial; GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), gene protetor contra o estresse oxidativo 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

Ovários bovinos foram obtidos no abatedouro ACOVACAT, localizado no município de Tupã, estado de São Paulo, Brasil. A PIVE, aplicação dos tratamentos e coleta de amostras biológicas foram realizadas no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), sediado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), cidade 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), na 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.

2.2. Coleta dos ovários e recuperação dos oócitos

Ovários de fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) foram obtidos no abatedouro e, imediatamente após o abate, foram transportados ao laboratório imersos em solução salina (NaCl 0,9%) a 37°C, de forma que a temperatura fosse mantida durante o transporte. 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. Após a decantação dos oócitos

para o fundo de cada tubo, o sedimento contendo os oócitos foi transferido para placas de poliestireno 100 × 20 mm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA) juntamente com 2 mL de fluido folicular.

2.3. Seleção dos oócitos

Com o auxílio de um estereomicroscópico (Nikon SMZ800N, Tokyo, Japão), os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram rastreados, avaliados e categorizados em graus I, II ou III (STOJKOVIC *et al.*, 2001). Foram utilizados somente COCs classificados 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 (5 mg/mL), piruvato (2 µL/ml de solução a 100 mM) e amicacina (75 µL/mL)]. Em seguida, os oócitos foram distribuídos de forma equitativa entre os diferentes grupos experimentais, onde a cada repetição experimental utilizou-se de 14 a 25 oócitos por tratamento.

2.4. 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 (diluyente 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.

2.5.Delineamento 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 foram testadas exclusivamente na MIV (Experimento 1), exclusivamente no CIV (Experimento 2) e na MIV e CIV (Experimento 3), conforme apresentado na **Figura 1**.

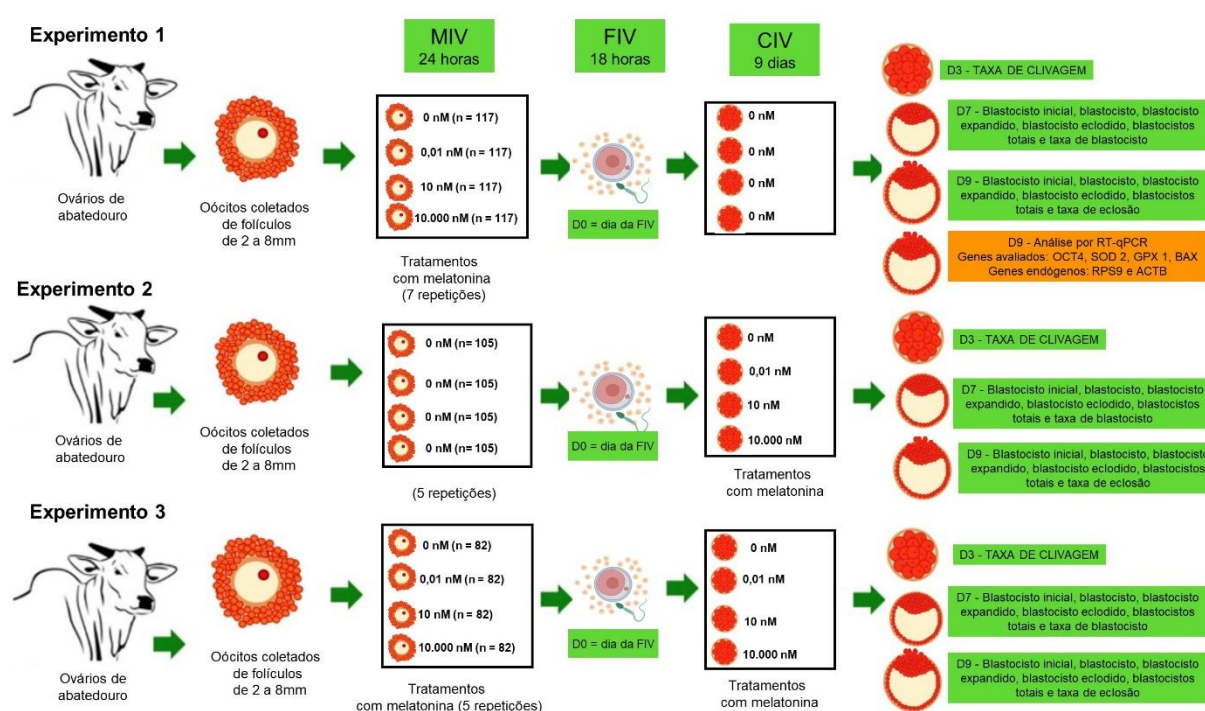


Figura 1. Delineamento experimental. Concentrações de 0,01 nM (10^{-11} M), 10 nM (10^{-8} M) e 10000 nM (10^{-5} M) de melatonina (M5250, Sigma Aldrich) foram utilizadas no meio de cultivo exclusivamente na MIV (Experimento 1), exclusivamente no CIV (Experimento 2) e na MIV e CIV (Experimento 3). Em 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.

Experimento 1. Oócitos bovinos (*Bos taurus indicus*; Nelore) foram suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM, além do grupo controle acrescido com 0,01% de DMSO) durante a MIV. Foram realizadas 7 repetições, que totalizaram 117 oócitos por grupo de tratamento. 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]. 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.

Experimento 2. Embriões bovinos (*Bos taurus indicus*; Nelore) foram suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM, além do grupo controle acrescido com 0,01% de DMSO) durante o CIV. Foram realizadas 5 repetições, que totalizaram 105 oócitos por grupo. Os embriões foram avaliados 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 e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. 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.

Experimento 3. Oócitos bovinos (*Bos taurus indicus*; Nelore) foram suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0,01 nM, 10 nM e 10000 nM, além do grupo controle acrescido com 0,01% de DMSO) durante a MIV e CIV. Foram realizadas 5 repetições, que totalizaram 82 oócitos por grupo. Os embriões foram avaliados 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 e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. 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.

2.6.Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

Os oócitos previamente 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 os oócitos foram lavados por mais três vezes, onde 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 (2 µL/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 locadas 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.

2.7.Preparo dos oócitos para a fertilização *in vitro* (FIV)

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 a fertilização contidas em placas de Petri 35 mm livres de nucleases, onde cada gota acomodou até 25 estruturas.

2.8.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. 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 μ L do *pellet* foram transferidos para um microtubo contendo 50 μ L 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*].

2.9.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.

2.10. Cultivo *in vitro* dos presumíveis embriões (CIV)

Após as 18 horas de FIV, os presumíveis embriões foram submetidos ao desnudamento, pelo procedimento de turbilhonamento do meio 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 μ L de meio de lavagem. Em seguida os embriões foram lavados por mais três vezes, onde para cada uma das lavagens foi utilizado 50 μ L 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 μ L/mL de solução a 100 mM)] acrescido de 2,5% de SFB. 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).

2.11. 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, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. 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].

2.12. 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.

2.13. 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/A₂₈₀) 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: $Eficiência = -1 + 10^{(-1/inclinação)}$. 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 1**. A **Tabela 2** 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 1. 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. ATGTGGCTAATTGCTGCA	Pluripotência celular	-	CINTRA <i>et al.</i> , 2022
SOD2 (<i>superoxide dismutase 2</i>)	F. AGCACGAGCAGGAGACTGGT R. GACGTTGAGGTTGTTACGTCAG	Antioxidante mitocondrial	-	CINTRA <i>et al.</i> , 2022
GPX1 (<i>glutathione peroxidase 1</i>)	F. GCAACCAGTTTGGGCATCA R. CTCGCACTTTTCGAAGAGCATA	Antioxidante celular	NM_174076	CANÓN-BELTRÁN <i>et al.</i> , 2020
BAX (<i>BCL2 associated X</i>)	F. TGTTTTCTGACGGCAACTTCA R. CGAAGGAAGTCCAATGTCCAG	Pró-apoptótico	-	CINTRA <i>et al.</i> , 2022
RPS9 (<i>Ribosomal protein S9</i>)	F. GAGCTGGGTTTGTGCGAAA R. GGTCGAGGCGGGACTTCT	Gene de referência	DT860044	HUGHES <i>et al.</i> , 2017
ACTB (<i>beta-actin</i>)	F. GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R. TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	Gene de referência	NM_173979.3	BETTEGOWDA <i>et al.</i> , 2006

Tabela 2. 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 (<i>POU class 5 homeobox 1</i>)	SOD2 (<i>superoxide dismutase 2</i>)	GPX1 (<i>glutathione peroxidase 1</i>)	BAX (<i>BCL2 associated X</i>)	RPS9 (<i>ribosomal protein S9</i>)	ACTB (<i>beta-actin</i>)
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

2.14. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), onde considerou-se a gota de cultivo como unidade experimental.

Para a avaliação das taxas de desenvolvimento embrionário, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de execução de contrastes para comparação entre os grupos: grupo controle vs. todas as concentrações de melatonina, grupo controle vs. 10000 nM de melatonina e 0,01 vs. 10000 nM de melatonina. Os resultados das taxas de desenvolvimento embrionário estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

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

3. RESULTADOS

3.1.Experimento 1

3.1.1. Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na **Figura 2**, a adição de melatonina não aumentou a taxa de clivagem ($P = 0,5694$) quando os diferentes grupos de tratamento foram comparados, assim como quando a comparação foi estabelecida pelos contrastes.

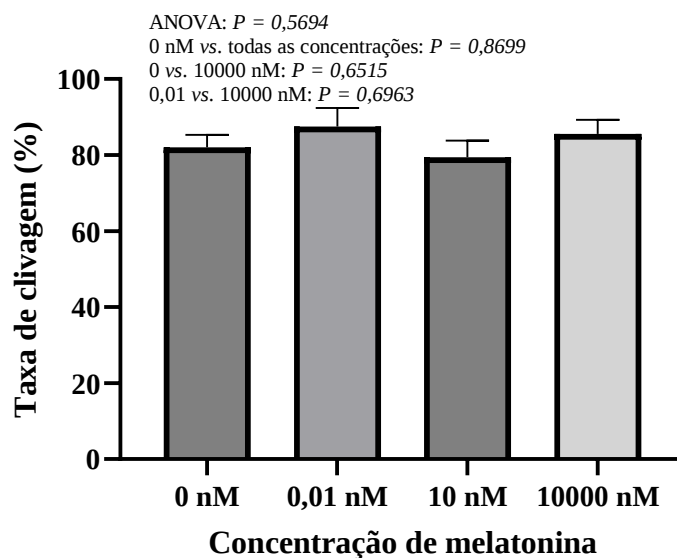


Figura 2. *Experimento 1.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV de oócitos bovinos na taxa de clivagem de embriões no D3 (D0 = dia da FIV); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.1.2. Produção de embriões no D7

Conforme ilustrado na **Figura 3**, 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 maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P = 0,0892$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM.

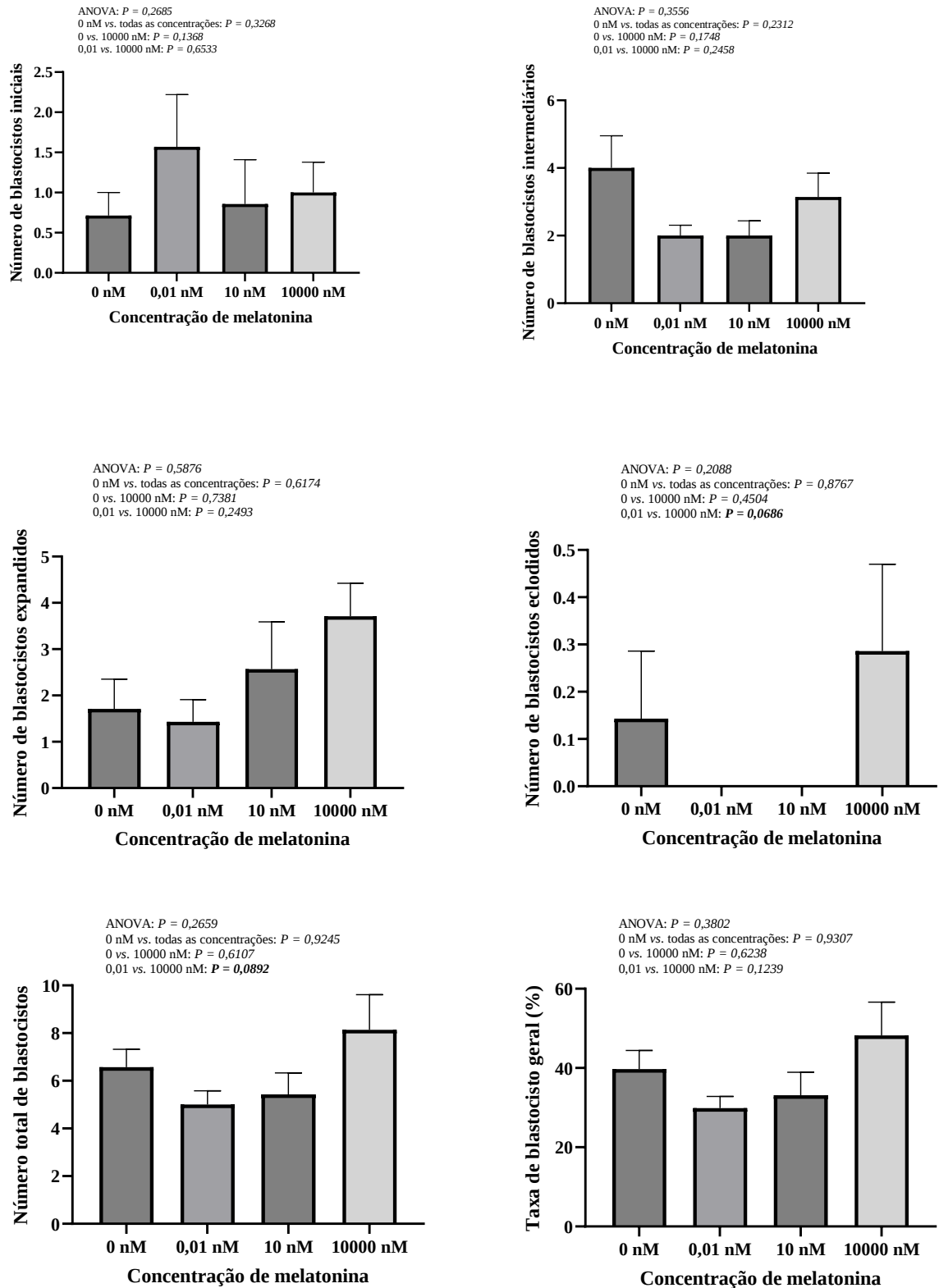


Figura 3. *Experimento 1.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos,

eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D7 (D0 = dia da FIV); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.1.3 Produção de embriões no D9. Conforme ilustrado na **Figura 4**, 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 menor número de blastocistos intermediários ($P = 0,0884$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0 nM. Observou-se um maior número de blastocistos totais ($P = 0,0216$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM e uma tendência ($P = 0,0741$) de maior número de blastocistos eclodidos no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM.

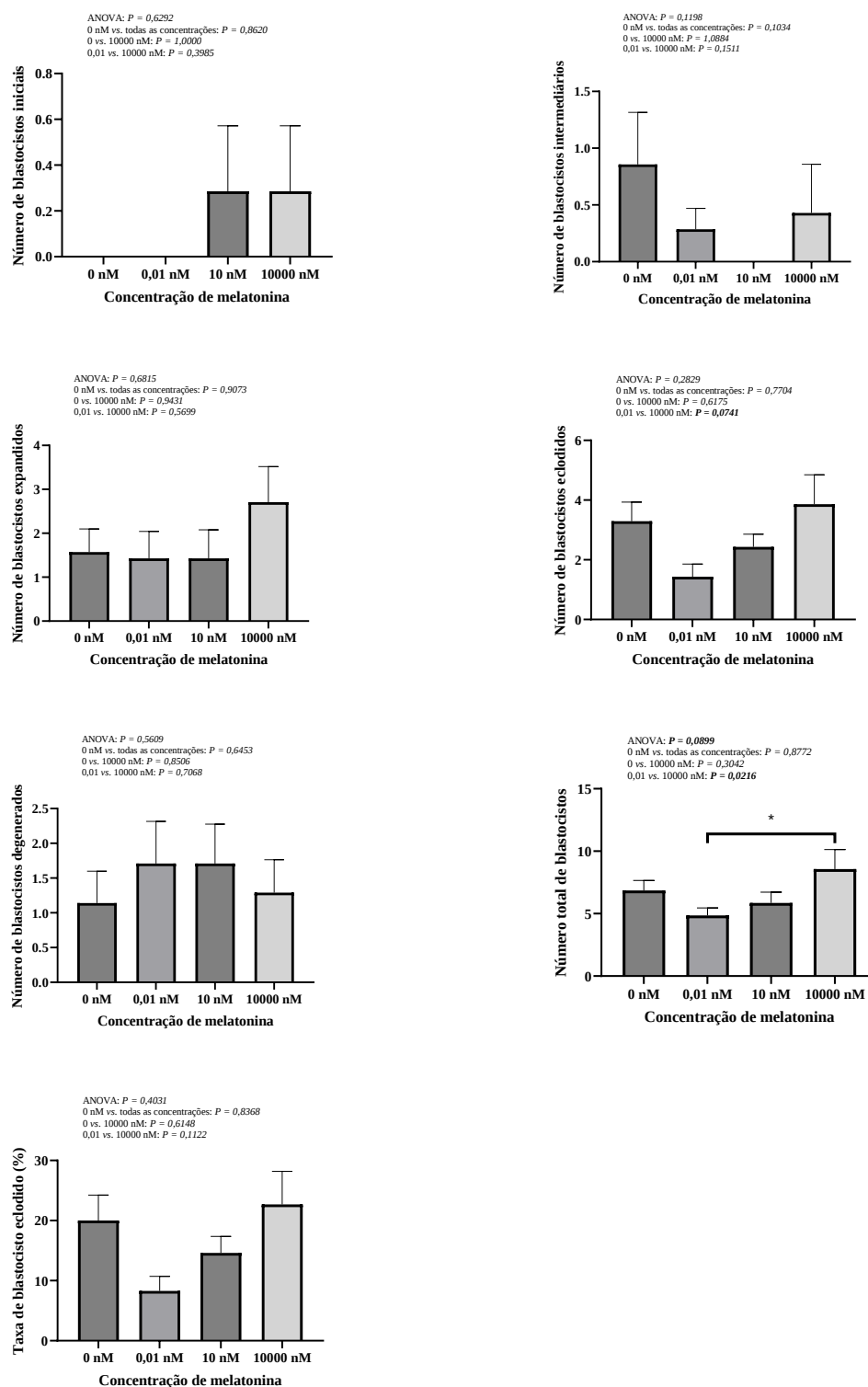


Figura 4. *Experimento 1.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV no número de blastocistos iniciais, intermediários, expandidos, eclodidos, totais e na taxa de blastocisto geral no D9 (D0 = dia da FIV); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.1.3. Expressão gênica de embriões no D9

Conforme ilustrado na **Figura 5**, a adição de melatonina nas concentrações de 10 e 10000 nM não aumentou a abundância dos transcritos dos genes OCT4, SOD2, GPX1 e BAX quando os diferentes grupos de tratamento foram comparados, assim como quando a comparação foi estabelecida pelos contrastes.

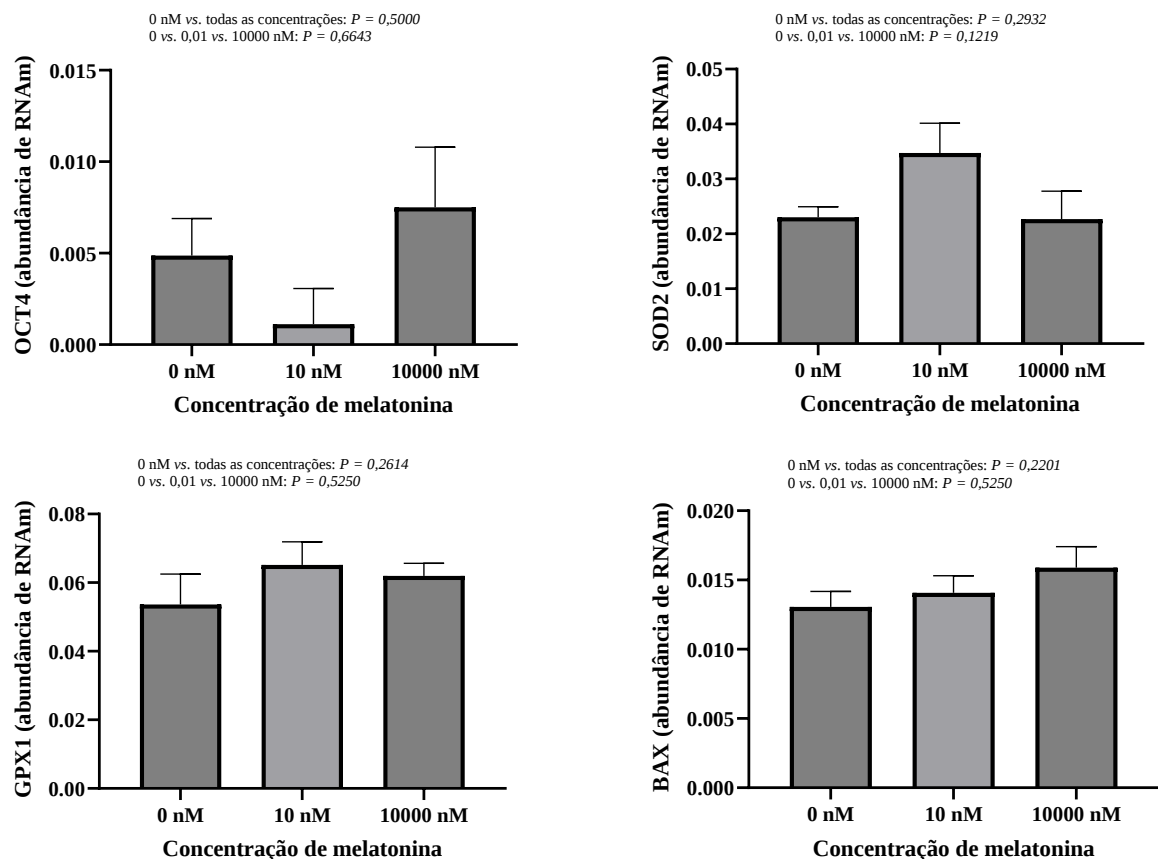


Figura 5. *Experimento 1.* Avaliação por RT-qPCR da expressão dos transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*) e BAX (*BCL2 associated X*) em blastocistos eclodidos no D9 (D0 = dia da FIV) oriundos de oócitos suplementados diferentes concentrações de melatonina (0, 10 ou 10000 nM) durante a MIV; valores apresentados como média ± erro padrão.

3.2.Experimento 2

3.2.1. Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na **Figura 6**, a adição de melatonina no CIV não afetou a taxa de clivagem ($P = 0,8637$) quando os diferentes grupos de tratamento foram comparados, assim como quando a comparação foi estabelecida por contrastes.

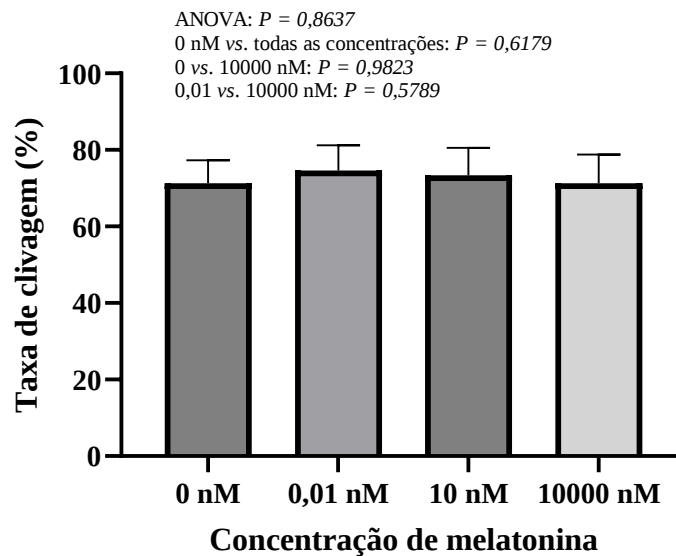


Figura 6. Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o CIV na taxa de clivagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* no D3 (D0 = dia da FIV); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.2.2. Produção de embriões no D7

Conforme apresentado na **Figura 7**, 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.

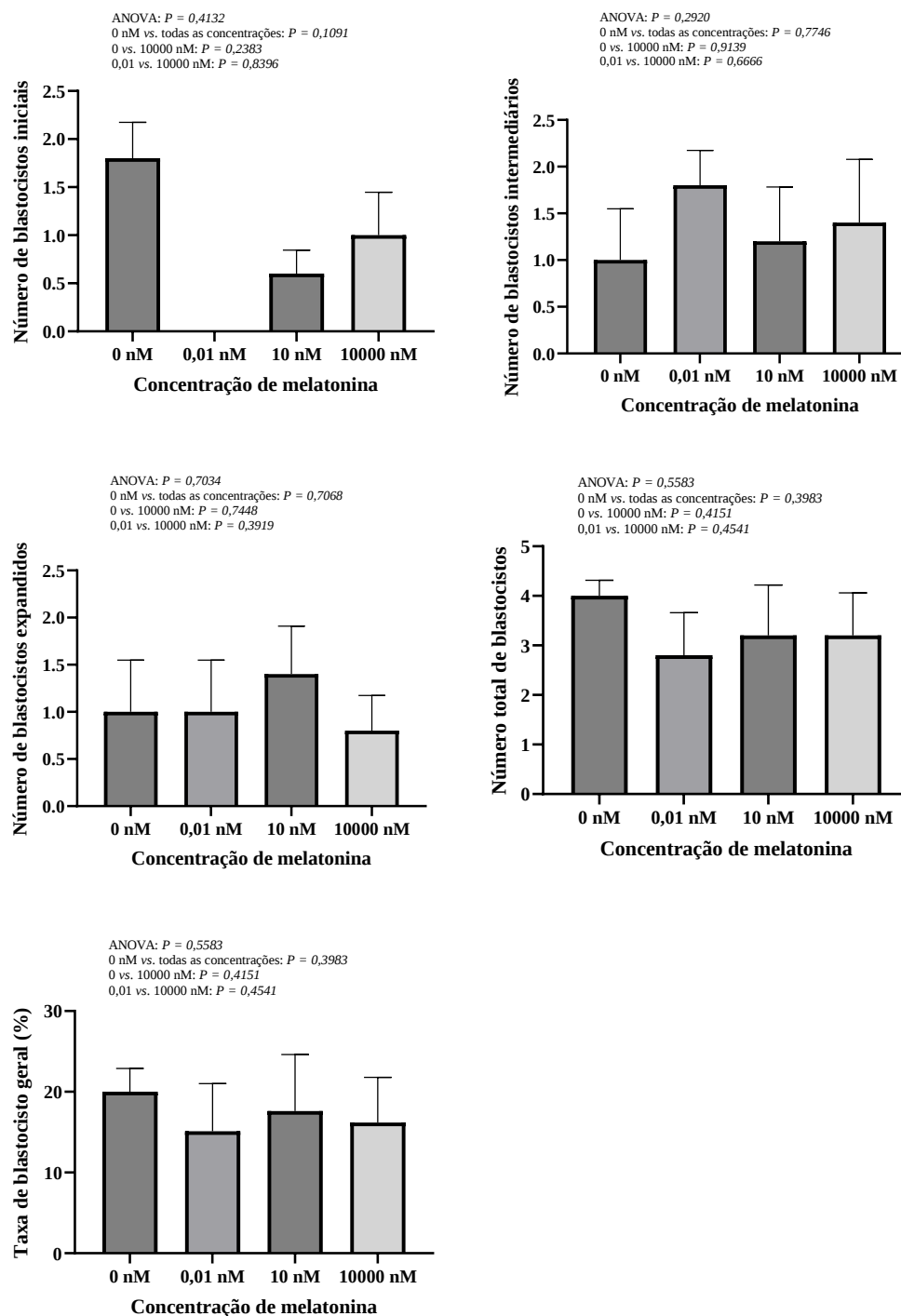


Figura 7. *Experimento 2.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o CIV no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, blastocisto expandido, blastocisto eclodido, blastocistos totais e taxa de blastocisto; valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.2.3 Produção de embriões no D9. Conforme ilustrado na **Figura 8**, a adição de melatonina durante o CIV, para todas as concentrações avaliadas, não afetou a produção de blastocisto inicial, intermediário, blastocisto expandido, blastocisto eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão.

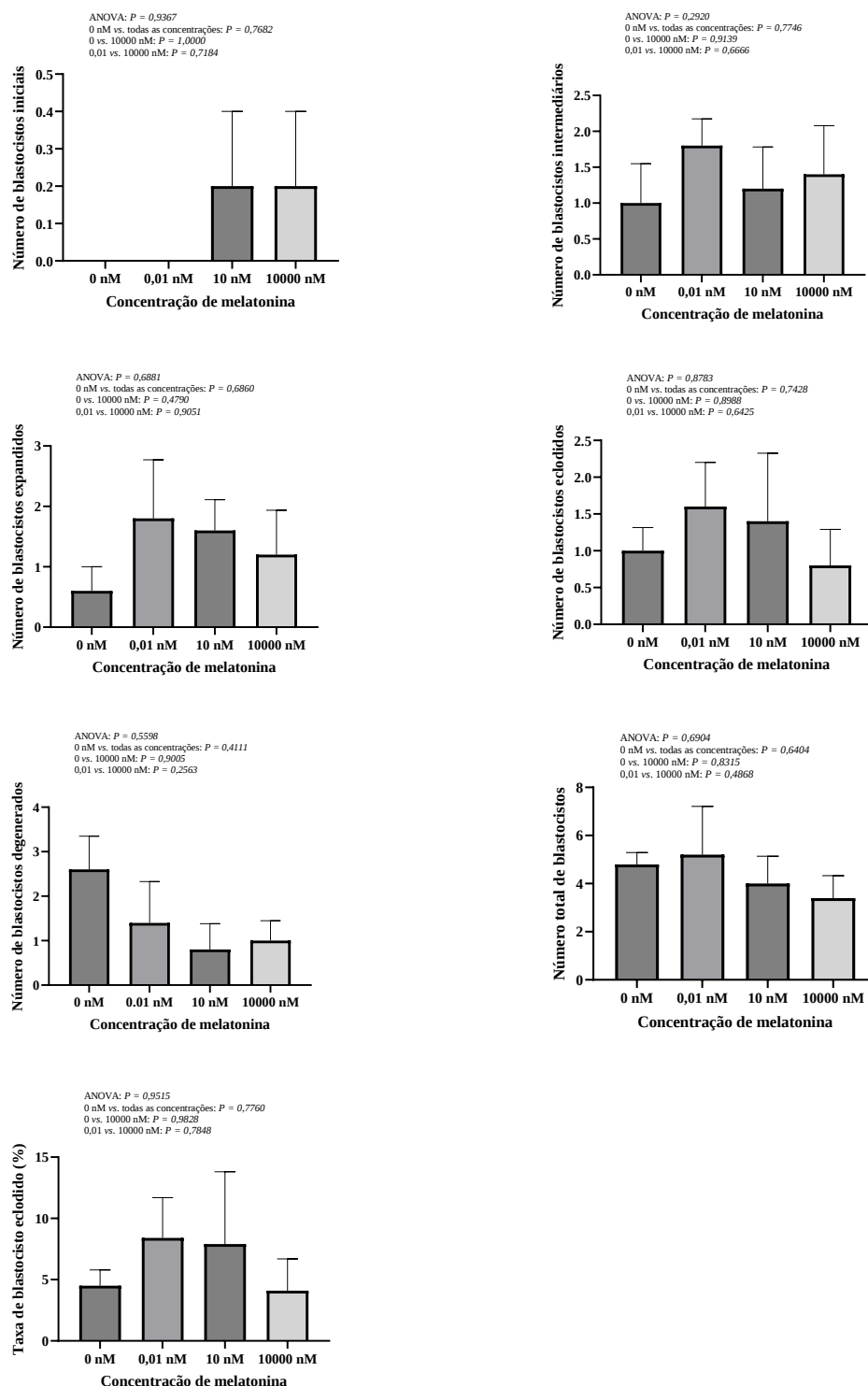


Figura 8. Experimento 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante o CIV no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão; valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.3.Experimento 3

3.3.1. Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na **Figura 9** a adição de melatonina, durante a MIV e CIV, não afetou a taxa de clivagem ($P = 0,6685$) quando os diferentes grupos de tratamento foram comparados, assim como quando a comparação foi estabelecida por contrastes.

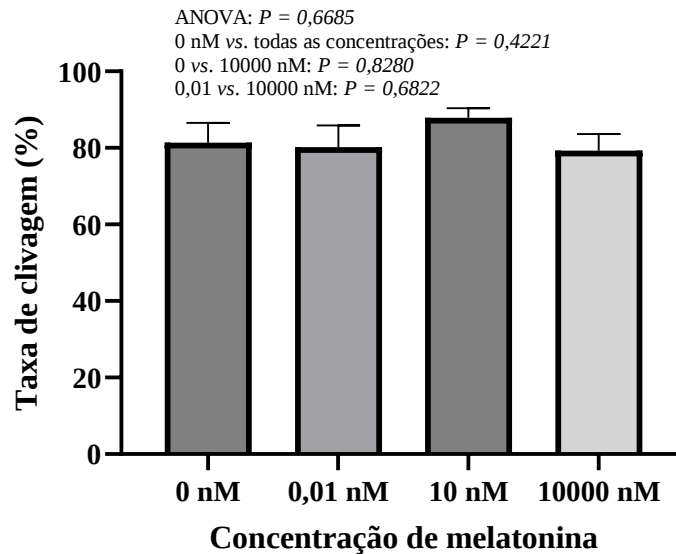


Figura 9. Experimento 3. Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV e CIV na taxa de clivagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* no D3 (D0 = dia da FIV); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

3.3.2. Produção de embriões no D7

Conforme ilustrado na **Figura 10** 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.

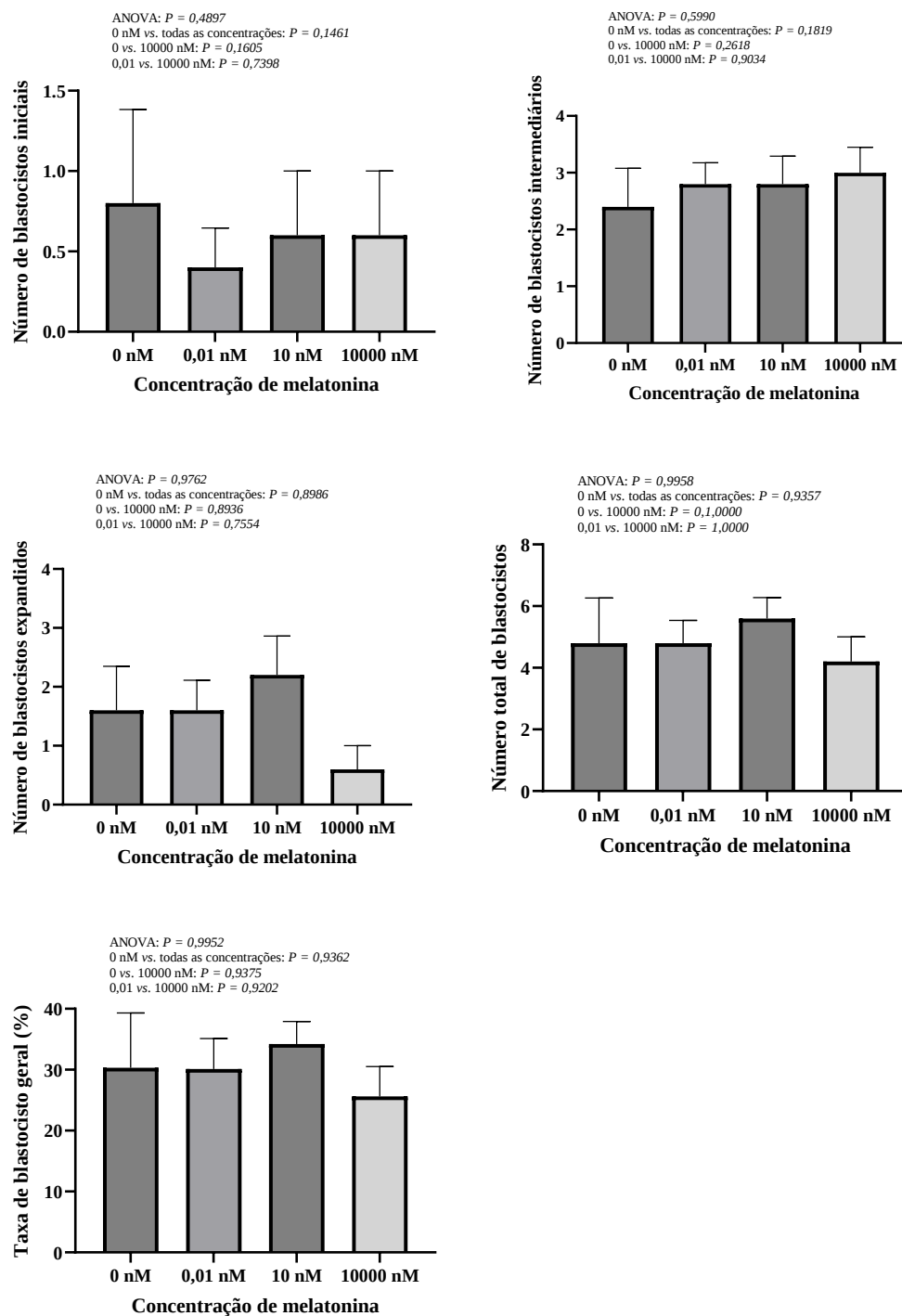


Figura 10. *Experimento 3.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV e CIV no número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) produzidos no D7 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto inicial, intermediário, blastocisto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

3.3.3. Produção de embriões no D9

Conforme ilustrado na **Figura 11**, 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.

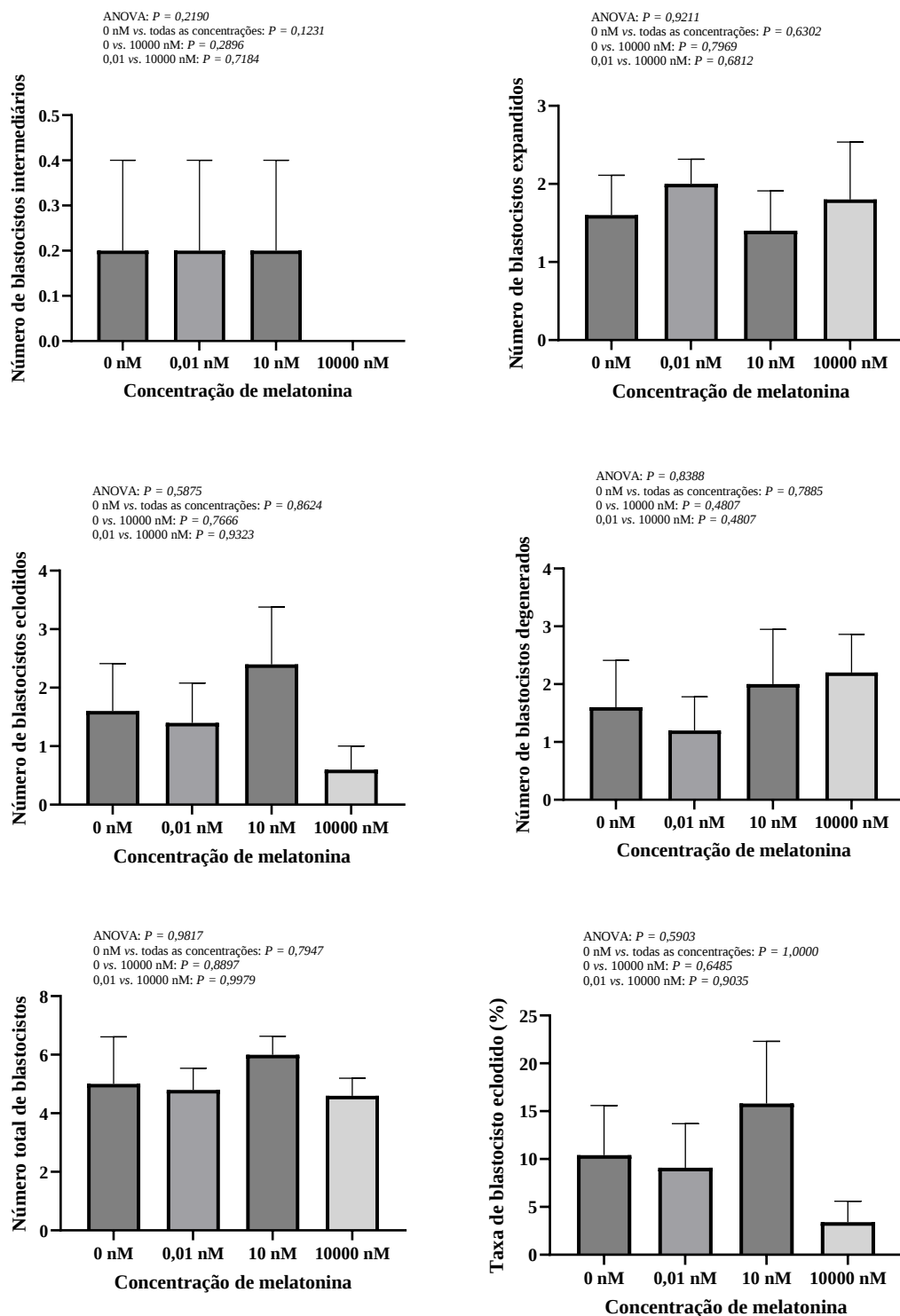


Figura 11. *Experimento 3.* Efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina (0, 0,01, 10 ou 10000 nM) durante a MIV e CIV no número de blastocistos produzidos no D9 (D0 = dia da FIV) de acordo com a categoria de blastocisto intermediário, expandido, eclodido, blastocistos totais e taxa de eclosão; valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

4. DISCUSSÃO

Suplementamos oócitos e/ou embriões bovinos com melatonina nas concentrações de 0,01 nM (10^{-11} M), 10 nM (10^{-8} M) e 10000 nM (10^{-5} M). Observamos neste estudo que os efeitos da melatonina na PIVE com oócitos provenientes de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) variam de acordo com a concentração e momento da suplementação. Quando avaliamos os resultados obtidos com o emprego da melatonina na MIV e/ou CIV, observamos que nenhuma das concentrações testadas promoveu efeitos positivos na produção embrionária comparada ao grupo controle. Quanto ao momento da suplementação, a MIV nos parece o momento mais promissor, onde encontramos algumas tendências. Quando a melatonina foi incorporada a MIV, verificamos uma tendência para maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P = 0,0892$) quando foi utilizada a maior concentração de melatonina (10000 nM ou 10^{-5} M) comparada com a menor concentração (0,01 nM ou 10^{-11} M). Reporta-se em bovinos a concentração de melatonina no fluido folicular é de cerca de $1,1$ a $1,3 \times 10^{-10}$ M (TIAN *et al.*, 2014). Verificou-se que a melatonina difundida no fluido folicular pode ser produzida localmente em oócitos de rato (SAKAGUCHI *et al.*, 2013), células do *cumulus* bovinas (REITER *et al.*, 2013) e células da granulosa humanas (REITER *et al.*, 2009). Embora estudos prévios tenham reportado que a adição de melatonina durante a MIV melhora o desenvolvimento embrionário (CEBRIAN-SERRANO *et al.*, 2013), aumenta a capacidade de desenvolvimento de embriões precoces (LIANG *et al.*, 2017), melhora a qualidade embrionária quando associada a nano cápsulas poliméricas de núcleo lipídico (REMIÃO *et al.*, 2016), estimula a retomada da meiose em oócitos tratados apoiando o desenvolvimento embrionário subsequente (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016); nesse estudo não verificamos o aumento na produção embrionária, em todos os momentos e concentrações testadas.

No contexto da geração de EROs, a técnica de obtenção de oócitos tem grande potencial estressor para os gametas, seja em ovários obtidos em abatedouro (*in vitro*) ou aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*in vivo*). Quando *in vitro*, a aspiração dos oócitos ocorre mediante abate do animal

e o transporte dos ovários ao laboratório pode demorar algumas horas. Durante o procedimento de aspiração folicular, seja *in vivo* ou *in vitro*, os gametas são expostos a condições adversas, como luz, temperatura ambiente e contato com diferentes meios de cultivo, além de sucessivas manipulações em diferentes meios de cultivo. Todas essas circunstâncias adversas favorecem o estresse oxidativo, o que impacta negativamente na PIVE, abrindo dessa forma, precedentes para a inclusão de moléculas antioxidantes (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020). De acordo com o exposto, o estresse inclusive oxidativo pode ser mais proeminente antes da MIV do que durante o CIV, o que poderia tornar os efeitos positivos da melatonina mais evidentes durante a MIV do que no CIV.

Observamos uma taxa de blastocisto em D7 de 48,20% quando a concentração de 10^{-5} M de melatonina foi utilizada na MIV caracterizando uma tendência a ser superior frente a menor concentração utilizada de 10^{-11} M. Remião *et al.* (2016), verificaram com as concentrações de 10^{-6} , 10^{-9} e 10^{-12} M de melatonina taxas de blastocisto no D7 de 42,09%, 39,56% e 43,75%, respectivamente, sendo tais taxas maiores que no grupo controle (35,26%). Tian *et al.* (2014), identificaram que a concentração de 10^{-9} M de melatonina resultou em uma maior taxa de blastocisto de 41,2% comparada a 26,5% no grupo controle. Sampaio *et al.*, (2012) obtiveram as taxas de blastocisto de 32, 43,7 e 30% para as concentrações de 0,0001 nM, 0,001 nM e 1 nM, respectivamente; e esses valores foram superiores ao grupo controle (30,9%). Em geral, esses autores utilizaram concentrações mais baixas de melatonina e, embora nossos dados tenham se limitado a uma tendência, a taxa de blastocisto obtida foi superior aos trabalhos relatados acima.

Sabendo que um dos mecanismos pelos quais a melatonina promove a eliminação de EROs se baseia no aumento da expressão de enzimas antioxidantes, investigamos o impacto da melatonina na expressão dos transcritos das enzimas SOD2 e GPX1. Esperávamos que esses dois transcritos fossem regulados positivamente, uma vez que esse efeito foi relatado na literatura citada anteriormente, mas a suplementação com melatonina durante a MIV não resultou em expressão diferenciada de SOD2 e GPX1. Adicionalmente, também investigamos os efeitos da melatonina

em no marcador de qualidade embrionária OCT4. Considerando que a melatonina tende a acelerar o desenvolvimento embrionário, esperávamos que a expressão de OCT4 pudesse estar aumentada em blastocistos eclodidos no D9, visto que OCT4 regula a manutenção da pluripotência e eventos de diferenciação, sendo, portanto, fundamental para o desenvolvimento embrionário de mamíferos (FRUM; RALSTON, 2015). Recentemente foi demonstrado em embriões bovinos que OCT4 também é necessário durante a diferenciação da segunda linhagem para a manutenção da pluripotência do epiblasto e diferenciação do hipoblasto (SIMMET *et al.*, 2022). Entretanto, em nosso estudo não verificamos diferenças entre os três grupos avaliados (controle; 10 e 10000 nM de melatonina).

Além de investigar o efeito da melatonina sobre transcritos relacionados com a proteção contra EROs e qualidade embrionária, também incluímos a avaliação da expressão de BAX, reconhecido como um regulador intrínseco de apoptose na via apoptótica mitocondrial (THORBURN, 2008), estando presente no citosol dessa organela como monômero inativo que, durante o processo de apoptose, modula a liberação do citocromo C, um marcador de apoptose mediado pela mitocôndria, do espaço intermembrana para o citosol (HEIMLICH *et al.*, 2004). Esperávamos uma regulação negativa desse transcrito, uma vez que a melatonina proporciona efeitos protetores. Contudo, a adição de melatonina não afetou a expressão desse gene. A melatonina, na concentração de 10^{-9} M, foi relacionada com a diminuição dos níveis da expressão de BAX em oócitos e embriões bovinos (KOMNINO *et al.*, 2016; REMIÃO *et al.*, 2016). Embora nossas análises de RT-qPCR não tenham identificado expressão diferencial de genes susceptíveis ao efeito da melatonina, diferindo da literatura consultada, os benefícios proporcionados pela melatonina são relatados de forma consistente por diversos autores.

Além da suplementação com melatonina na MIV, também suplementamos embriões durante o CIV, mas não observamos efeitos significativos. É possível adicionar uma concentração de melatonina em todo o período de cultivo, como fizemos, ou utilizar diferentes concentrações a depender do

estágio de desenvolvimento das estruturas. Nesse sentido, Wang *et al.* (2014b), dividiram o cultivo *in vitro* de embriões bovinos em dois períodos: primeiros 2 dias e últimos 6 dias de cultivo, totalizando 8 dias de cultivo, onde diferentes concentrações de melatonina foram testadas (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} e 10^{-3} M). Esses autores verificaram que embriões expostos a 10^{-7} M de melatonina nos 2 primeiros dias de cultivo apresentaram maior taxa de blastocisto e maior taxa de eclosão. De forma semelhante, 10^{-9} M de melatonina adicionada nos últimos 6 dias de cultivo foi capaz de produzir os mesmos efeitos proporcionados por 10^{-7} M nos primeiros 2 dias. Com base nesses resultados, um novo cultivo foi realizado, onde as concentrações de 10^{-7} M e 10^{-9} M de melatonina foram adicionadas nos 2 dias iniciais e 6 dias finais, respectivamente; onde verificaram que a suplementação com melatonina promoveu maior taxa de clivagem, maior taxa de blastocisto e maior número médio de células por blastocisto. Nesse sentido, no experimento 2 do nosso estudo, os embriões foram expostos à melatonina durante 9 dias de cultivo; onde nenhuma das concentrações testadas apresentou benefícios na produção embrionária diferindo do observado por Wang *et al.* (2014b). O período pós FIV pode ser particularmente estressante, visto que nesse momento os presumíveis embriões passam pelo processo de desnudamento por meio de turbilhonamento, o que pode acentuar o estresse oxidativo das estruturas e abrir um precedente para que a melatonina exógena exerça suas ações antioxidantes, o que estaria de acordo com os achados de Wang *et al.*, (2014b), que indicaram maior benefício de concentrações maiores de melatonina no início do cultivo.

Os benefícios da melatonina são mediados por uma variedade de caminhos, desde atenuação direta que, por si só, já apresenta complexidade, uma vez que já foram relatados efeitos antioxidantes até para metabólitos quaternários (TAN *et al.*, 2007). Também vale ressaltar que, salvo os efeitos diretos da melatonina sobre EROs, oócitos e embriões não compartilham os mesmos sítios de ligação da melatonina. Tanto oócitos quanto blastocistos bovinos expressam receptores para a melatonina, sendo MT1 e MT2 receptores de membrana acoplados à proteína G e, MT3, sítio de ligação da

melatonina na enzima citosólica NQO2 (SAMPAIO *et al.*, 2012). Enquanto oócitos expressam MT1 e MT3, blastocistos bovinos expressam apenas MT1, conforme apresentado por (SAMPAIO *et al.*, 2012). A maior parte da ação celular da melatonina possivelmente ocorre através da sua ligação aos receptores MT1 e MT2, o que promove aumento na atividade da proteína G e, principalmente, inibição da adenilato ciclase (RIAZ *et al.*, 2019). MT1 e MT2 estão envolvidos em processos fisiológicos normais da reprodução de mamíferos (TALPUR *et al.*, 2017). De acordo com estudos recentes, a melatonina pode ser sintetizada em complexos *cumulus*-oócito ovinos e caprinos, regulando assim MT1 e/ou MT2 (SOTO-HERAS *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2019). Em relação a NQO2, a melatonina possivelmente atua suprimindo a capacidade dessa enzima em produzir espécies reativas de oxigênio quando estimulada por xenobióticos, participando assim, de mecanismos gerais de defesa do oócito (REYBIER *et al.*, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2012). Assim, enquanto oócitos se desenvolvem em um ambiente rico em melatonina e expressam múltiplos sítios de ligação, blastocistos bovinos encontram-se no lúmen uterino e estão limitados a expressar MT1, o que reduz as vias de sinalização possíveis. Com base nas informações apresentadas, os embriões podem apresentar uma resposta bifásica em relação à concentração de melatonina, sendo favorecidos por maiores concentrações no início do cultivo, momento de maior manipulação, onde o efeito positivo será mediado por atenuação direta e interação com o receptor MT1 e, com o avanço do cultivo, em uma condição de cultura de maior estabilidade, concentrações menores podem ser mais adequadas, uma vez que o principal alvo seria restrito ao receptor MT1.

Com base na distribuição de receptores para a melatonina em oócitos e embriões, benefícios da adição de melatonina seriam esperados tanto na MIV quanto no CIV, uma vez que os sítios de ligação para a melatonina estão presentes tanto em oócitos quanto em embriões. No experimento 3, suplementamos tanto oócitos quanto embriões, buscando verificar se os benefícios observados no experimento 1, onde a melatonina foi adicionada apenas na MIV, seriam complementados. Contudo, nenhum efeito positivo foi observado em comparação ao grupo controle. De forma semelhante,

Marques *et al.* (2018) reportaram que a suplementação com 10^{-9} M de melatonina utilizada simultaneamente na maturação *in vitro* de oócitos e cultivo *in vitro* de embriões bovinos, em comparação com a utilização apenas no cultivo *in vitro* de embriões resulta em menor taxa de blastocisto (42,2% vs. 52,08%) e maior número de células apoptóticas (5,4% vs. 3%). Contudo, os mecanismos adjacentes que sustentam esse efeito não estão elucidados. Como discutido anteriormente, a não evidência de benefícios da melatonina empregada tanto na MIV quanto no CIV pode estar relacionada com seus sítios de ligação e com a manipulação exercida de acordo com a etapa da PIVE, sendo maior na MIV e início do CIV. Esses dados sugerem que a melatonina pode apresentar melhores resultados em concentrações mais altas na MIV e início do CIV, e concentrações mais baixas a partir do terceiro dia de cultivo.

Outro fator a ser considerado neste estudo é a composição genética dos oócitos e embriões. Nosso grupo de pesquisa prioriza bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) nos estudos envolvendo a PIVE. Dessa forma, temos uma abordagem direcionada a animais *Bos taurus indicus* em vez de animais *Bos taurus taurus* e cruzamentos (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*), embora muitas informações discutidas aqui sejam compartilhadas entre mamíferos de forma geral. Dito isso, não encontramos na literatura estudos que abordaram a interação melatonina × raça bovina. Uma investigação dessa interação poderia trazer mais respostas acerca da variação da susceptibilidade à melhoria na PIVE de acordo com o grupo genético.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação com melatonina apresentou tendência para melhores taxas de produção embrionária quando utilizada na MIV na concentração de 10000 nM comparada à 0,01 nM. Adicionalmente, a melatonina não alterou a expressão dos transcritos OCT4, SOD2, GPX1 e BAX.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALRABIAH, N. A.; EVANS, A. C. O.; FAHEY, A. G.; CANTWELL, N.; LONERGAN, P.; MCCORMACK, J.; BROWNE, J. A.; FAIR, T. Immunological aspects of ovarian follicle ovulation and corpus luteum formation in cattle. **Reproduction**, [s. l.], v. 162, n. 3, p. 209–225, 2021. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/162/3/REP-21-0165.xml>>.
- AN, Q.; PENG, W.; CHENG, Y.; LU, Z.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; SU, J. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 10, p. 17370–17381, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28357>>.
- 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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.20333>>.
- 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.
- 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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12154>>.
- 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.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 155–162, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bdrc.20098>>.

EZZATI, M.; ROSHANGAR, L.; RAD, J. S.; KARIMIAN, N. Evaluating The Effect of Melatonin on HAS2 , and PGR Expression, as Well as Cumulus Expansion, and Fertility Potential in Mice. **Cell Journal (Yakhteh)**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 108–112, 2018. Disponível em: <https://www.celljournal.org/article_250491.html>.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 177–185, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16128413/>>.

FRUM, T.; RALSTON, A. Cell signaling and transcription factors regulating cell fate during formation of the mouse blastocyst. **Trends in genetics : TIG**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 402–410, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999217/>>.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 1–16, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x>>.

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. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>>.

HEIMLICH, G.; MCKINNON, A. D.; BERNARDO, K.; BRDICZKA, D.; REED, J. C.; KAIN, R.; KRÖNKE, M.; JÜRGENSMEIER, J. M. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 378, n. 1, p. 247–255, 2004. Disponível em: </biochemj/article/378/1/247/40977/Bax-induced-cytochrome-c-release-from-mitochondria>.

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.

KESHAVARZI, S.; SALEHI, M.; FARIFTEH-NOBIJARI, F.; HOSSEINI, T.; HOSSEINI, S.; GHAZIFARD, A.; NOVIN, M. G.; FALLAH-OMRANI, V.; NOUROZIAN, M.; HOSSEINI, A. Melatonin Modifies Histone Acetylation during In Vitro Maturation of Mouse Oocytes. **Cell Journal (Yakhteh)**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 244–249, 2018. Disponível em: <https://www.celljournal.org/article_250508.html>.

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. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157561>.

LE BIN, G. C.; MUÑOZ-DESCALZO, S.; KUROWSKI, A.; LEITCH, H.; LOU, X.; MANSFIELD, W.; ETIENNE-DUMEAU, C.; GRABOLE, N.; MULAS, C.; NIWA, H.; HADJANTONAKIS, A. K.; NICHOLS, J. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. **Development (Cambridge)**, [s. l.], v. 141, n. 5, p. 1001–1010, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24504341/>.

LEE, S.; JIN, J. X.; TAWEECHAIPASANKUL, A.; KIM, G. A.; LEE, B. C. Stimulatory Effects of Melatonin on Porcine In Vitro Maturation Are Mediated by MT2 Receptor. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 1581, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1581, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1581/htm>>.

LI, H. S.; ZHOU, Y. N.; LI, L.; LI, S. F.; LONG, D.; CHEN, X. L.; ZHANG, J. B.; FENG, L.; LI, Y. P. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox biology**, [s. l.], v. 25, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30686776/>>.

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. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD16223>>.

LORD, T.; MARTIN, J. H.; AITKEN, R. J. Accumulation of electrophilic aldehydes during postovulatory aging of mouse oocytes causes reduced fertility, oxidative stress, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 33, 2015.

MANCHESTER, L. C.; COTO-MONTES, A.; BOGA, J. A.; ANDERSEN, L. P. H.; ZHOU, Z.; GALANO, A.; VRIEND, J.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 403–419, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12267>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.13097>>.

MIHALAS, B. P.; REDGROVE, K. A.; MCLAUGHLIN, E. A.; NIXON, B. Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, p. 4015874, 2017.

MIRIYALA, S.; SPASOJEVIC, I.; TOVMASYAN, A.; SALVEMINI, D.; VUJASKOVIC, Z.; ST. CLAIR, D.; BATINIC-HABERLE, I. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1822, n. 5, p. 794–814, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22198225/>>.

NIE, J.; XIAO, P.; WANG, X.; YANG, X.; XU, H.; LU, K.; LU, S.; LIANG, X. Melatonin prevents deterioration in quality by preserving epigenetic modifications of porcine oocytes after prolonged culture. **Aging**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 3897–3909, 2018. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/article/101680>>.

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. Bin. Melatonin protects against paraquat-induced damage during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. e12532, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12532>>.

RAI, S.; GOSH, H. Modulation of human ovarian function by melatonin. **Frontiers in Bioscience - Elite**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 140–157, 2021. Disponível em: <<https://www.imrpress.com/journal/FBE/13/1/10.2741/875>>.

REITER, R. J.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 253–278, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12360>>.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of**

Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 7231-7272, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 7231–7272, 2013.

Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/14/4/7231/htm>>.

REITER, R. J.; TAN, D.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative StressA Review. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 444–458, 2000.

Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1159/000025480>>.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and Reproduction Revisited. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 445–456, 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.075655>>.

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.

REYBIER, K.; PERIO, P.; FERRY, G.; BOUAJILA, J.; DELAGRANGE, P.; BOUTIN, J. A.; NEPVEU, F. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 1184–1195, 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715762.2011.605788>>. Acesso em: 23 jan. 2024.

RIAZ, H.; YOUSUF, M. R.; LIANG, A.; HUA, G. H.; YANG, L. Effect of melatonin on regulation of apoptosis and steroidogenesis in cultured buffalo granulosa cells. **Animal Science Journal**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 473–480, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.13152>>.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development

and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>>.

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.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>>.

SAEEDABADI, S.; ABAZARI-KIA, A. H.; RAJABI, H.; PARIVAR, K.; SALEHI, M. Melatonin Improves The Developmental Competence of Goat Oocytes. **International Journal of Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 157–163, 2018. Disponível em: <https://www.ijfs.ir/article_45484.html>.

SAKAGUCHI, K.; ITOH, M. T.; TAKAHASHI, N.; TARUMI, W.; ISHIZUKA, B. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 674–682, 2013. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD12091>>.

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**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-10-103>>.

SASAKI, H.; HAMATANI, T.; KAMIJO, S.; IWAI, M.; KOBANAWA, M.; OGAWA, S.; MIYADO, K.; TANAKA, M. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, p. 478890, 2019.

SIMMET, K.; KUROME, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; REICHENBACH, H. D.; SPRINGER, C.; BÄHR, A.; BLUM, H.; PHILIPPOU-MASSIER, J.; WOLF, E. OCT4/POU5F1 is indispensable for the lineage differentiation of the inner cell mass in bovine embryos. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. e22337, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.202101713RRR>>.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 132, p. 342–350, 2020.

SOTO-HERAS, S.; ROURA, M.; CATALÁ, M. G.; MENÉNDEZ-BLANCO, I.; IZQUIERDO, D.; FOULADI-NASHTA, A. A.; PARAMIO, M. T. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 253–261, 2018. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD17170>>.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12275>>.

TALPUR, H. S.; WORKU, T.; REHMAN, Z. ur; DAD, R.; BHATTARAI, D.; BANO, I.; FARMANULLAH; LIANG, A.; HE, C.; YANG, L. Knockdown of melatonin receptor 1 and induction of follicle-stimulating hormone on the regulation of mouse granulosa cell function. **Reproductive Biology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 380–388, 2017.

TAMURA, H.; JOZAKI, M.; TANABE, M.; SHIRAFUTA, Y.; MIHARA, Y.; SHINAGAWA, M.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; SATO, S.; TAKETANI, T.; TAKASAKI, A.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 1135, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 1135, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1135/htm>>.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of ovarian research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 5, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22277103/>>.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 28–42, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>>.

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 Superoxide Dismutase Activity in Porcine Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1150–1157, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.029264>>.

THORBURN, A. Apoptosis and autophagy: Regulatory connections between two supposedly different processes. **Apoptosis**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–9, 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-007-0154-9>>.

TIAN, X.; WANG, F.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LV, D.; ABULIZI, W.; WANG, X.; LIAN, Z.; LIU, G. Beneficial Effects of Melatonin on the In Vitro Maturation of Sheep Oocytes and Its Relation to Melatonin Receptors. **International Journal of Molecular Sciences** **2017**, **Vol. 18**, **Page 834**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 834, 2017. a. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/834/htm>>.

TIAN, X.; WANG, F.; ZHANG, L.; JI, P.; WANG, J.; LV, D.; LI, G.; CHAI, M.; LIAN, Z.; LIU, G. Melatonin Promotes the In Vitro Development of Microinjected Pronuclear Mouse Embryos via Its Anti-Oxidative and Anti-Apoptotic Effects. **International Journal of Molecular Sciences** **2017**, **Vol. 18**, **Page 988**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 988, 2017. b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/988/htm>>.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; HE, C. J.; ZHANG, L.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P. Y.; LIU, G. S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 239–247, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12163>>.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12184808/>>.

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. a. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093641>>.

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. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24666110/>>.

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. c. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12126>>.

WANG, Y.; ZENG, S. Melatonin Promotes Ubiquitination of Phosphorylated Pro-Apoptotic Protein Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death-Extra Long (BimEL) in Porcine Granulosa Cells. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 3431, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 3431, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3431/htm>>.

WARNER, B. B.; STUART, L.; GEBE, S.; WISPÉ, J. R. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.1.L150>, [s. l.], v. 271, n. 1 15-1, 1996. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.1996.271.1.L150>>.

XIAO, L.; HU, J.; SONG, L.; ZHANG, Y.; DONG, W.; JIANG, Y.; ZHANG, Q.; YUAN, L.; ZHAO, X. Profile of melatonin and its receptors and synthesizing enzymes in cumulus-oocyte complexes of the developing sheep antral follicle - A potential estradiol-mediated mechanism. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0446-7>>.

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, 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** 2017, Vol. 22, Page

2059, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2059, 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/22/12/2059/htm>>.

CAPÍTULO 3: ESTUDO 2

CULTIVO 3D COM MEMBRANA DE NANOCELULOSE BACTERIANA ASSOCIADO A ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS AUMENTA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Adriano Felipe Mendes¹, Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado², Isabella Rio Feltrin¹, Guilherme Pugliesi³, Angela Gonella-Díaz⁴, Lucas de Oliveira Bezerra¹, Laura Chuba Machado Rolniche⁵, Maria Eduarda Rocha Pinto⁵, Emily Silva do Nascimento⁵, Ana Laura Silva⁵, Gabriel Souza da Silva⁵ e Claudia Maria Bertan Membrive^{1,5}.

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-689. Brasil.

²University of Florida, Department of Animal Sciences, Bovine Embryo Laboratory, 2250 Shealy Drive, Gainesville, Florida, 32608. United States of America

³Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de Caxias Norte, 255, Pirassununga, São Paulo, 13635-900. Brasil,

⁴University of Florida, North Florida Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, Marianna, Florida, 32466. United States of America.

⁵Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP 294), Km 651, Dracena, São Paulo, 17915-899. Brasil.

RESUMO

A hipótese do presente estudo é que a utilização do sistema 3D CellFate® (Biocelltis S.A., Brasil) durante a maturação oocitária (MIV) e o cultivo embrionário (CIV), associada a suplementação de 10 μ M (10^{-5} M) de melatonina durante a MIV aumenta as taxas de produção embrionária e melhora a qualidade dos embriões. Objetivou-se comparar os sistemas 2D e 3D (CellFate®) durante a maturação oocitária (MIV) e/ou cultivo embrionário (CIV) e avaliar os efeitos da adição de 10 μ M de melatonina MIV dos sistemas 2D (controle) e 3D (CellFate®) na taxa de clivagem no D3 e na produção embrionária no D7 e D9 (D0 = dia da FIV) e a qualidade dos blastocistos eclodidos no D9, através da avaliação da expressão gênica por RT-qPCR de OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), e BAX (*BCL2 associated X*). Oócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do cumulus, derivados de ovários de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) abatidas, foram cultivados em meio base para MIV acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) em sistema 3D CellFate® ou sistema 2D convencional com o meio acrescido ou não com 10 μ M de melatonina (Sigma Aldrich, M5250). Após a MIV, os oócitos foram cocultivados com espermatozoides durante 18 horas, tendo sido utilizado o sêmen de um único touro Nelore (D0 = dia da fertilização). Posteriormente, os prováveis zigotos foram transferidos para o meio fluido sintético de oviduto (SOF) acrescido com 2,5% de SFB, onde permaneceram em cultivo *in vitro* (CIV), durante 9 dias em sistema 3D CellFate®. No D3, o sistema 3D com melatonina apresentou maior ($P = 0,0300$) taxa de clivagem comparado ao controle e ao sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0313$). No D7, o sistema 3D com melatonina apresentou maior ($P = 0,0079$) taxa de blastocisto inicial comparado ao controle. No D9, o sistema 3D com melatonina apresentou maior ($P = 0,0491$) taxa de blastocisto expandido comparado ao sistema 3D sem melatonina, maior taxa de blastocisto geral comparado aos grupos controle ($P = 0,0160$) e sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0193$). A utilização do sistema 3D isolado na MIV resultou em taxa de blastocisto geral semelhante ao sistema 3D com melatonina, sendo esses dois sistemas superiores

aos sistemas 3D sem melatonina, 3D somente no CIV e controle ($P = 0,0323$). Em conclusão, o sistema 3D com melatonina, bem como a MIV 3D isolada resultam em maior taxa de blastocisto geral no D9, sem alterar a expressão de OCT4, GPX1, SOD2 e BAX em embriões bovinos.

Palavras-chave: reprodução, oócito, embrião, antioxidante, cultura tridimensional.

ABSTRACT

The hypothesis of the present study is that the use of the 3D CellFate® system (Biocelltis S.A., Brazil) during oocyte maturation (IVM) and embryonic cultivation (IVC) associated with 10 μ M (10^{-5} M) melatonin supplementation during IVM; increases embryo production rates and improves embryo quality. The objective was to compare the 2D and 3D systems (CellFate®) during oocyte maturation (IVM) and/or embryonic culture (IVC) and evaluate the effects of adding 10 μ M melatonin MIV of the 2D (control) and 3D (CellFate) systems in the cleavage rate on D3 and embryo production on D7 and D9 (D0 = day of IVF) and the quality of the blastocysts hatched on D9; through the evaluation of gene expression by RT-qPCT of OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1), and BAX (BCL2 associated X). Oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple layers of cumulus cells, derived from ovaries of slaughtered Nelore (*Bos taurus indicus*) females, were cultured in base medium for IVM plus 10% fetal bovine serum (FBS) in a 3D CellFate® system or system Conventional 2D with the medium added or not with 10 μ M melatonin (Sigma Aldrich, M5250). After IVM, oocytes were co-cultured with sperm for 18 hours, using semen from a single Nelore bull (D0 = day of fertilization). Subsequently, the probable zygotes were transferred to the synthetic fluid oviduct medium (SOF) added with 2.5% FBS, where they remained in *in vitro* culture (IVC) for 9 days in the 3D CellFate® system. On D3, the 3D system with melatonin showed a higher ($P = 0.0300$) cleavage rate compared to the control and the 3D system without melatonin ($P = 0.0313$). On D7, the 3D system with melatonin showed a higher ($P = 0.0079$) initial blastocyst rate compared to the control. On D9, the 3D system with melatonin showed a higher ($P = 0.0491$) expanded blastocyst rate compared to the 3D system without melatonin, a higher overall blastocyst rate compared to the control ($P = 0.0160$) and 3D system without melatonin groups ($P = 0.0193$). The use of the 3D system alone in IVM resulted in an overall blastocyst rate like the 3D system with melatonin, with these two systems being superior to the 3D systems without melatonin, 3D only in IVC and control ($P = 0.0323$). In

conclusion, the 3D system with melatonin, as well as 3D IVM alone, results in a higher overall blastocyst rate at D9, without altering the expression of OCT4, GPX1, SOD2 and BAX in bovine embryos.

Keywords: reproduction, oocyte, embryo, antioxidant, three-dimensional culture.

1. INTRODUÇÃO

A taxa de sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), mensurada pela conversão de presumíveis zigotos a blastocistos aos sete dias de desenvolvimento, dificilmente se distancia de valores entre 20 e 50% (RIZOS *et al.*, 2008). Esses valores não inviabilizaram a aplicabilidade e expansão comercial da PIVE mundialmente, uma vez que em 2021 aproximadamente 1.521.018 embriões bovinos foram produzidos *in vitro* (VIANA, 2022). Entretanto, muitos estudos são realizados de aumentar a taxa de sucesso da PIVE, especialmente as condições de cultivo de oócitos e embriões.

Estratégias para aperfeiçoar a PIVE incluem modificações nos meios de cultivo, atmosfera e tipos de cultivo. A PIVE convencional faz uso do sistema bidimensional (2D) na produção comercial. Recentemente vários estudos avaliam diferentes métodos de cultivo tridimensional (3D) para o cultivo de oócitos e/ou embriões, incluindo os sistemas 3D baseados em membranas. Tais sistemas buscam proporcionar um ambiente mais próximo daquele presente *in vivo*, utilizando membranas que mimetizam a força mecânica da matriz extracelular. Nesse sistema 3D, os oócitos e/ou embriões são acondicionados sobre uma membrana, diferindo do sistema 2D, onde oócitos e embriões estabelecem o contato direto com a superfície rígida da placa de cultivo. Tal particularidade amplia a área de superfície de troca entre as referidas estruturas e o meio de cultivo.

Membranas 3D podem ser confeccionadas em diferentes materiais, com destaque para a nanocelulose bacteriana, que se organiza em uma rede tridimensional de nanofibras altamente hidrofílica e porosa, o que permite a retenção de água (DE AMORIM *et al.*, 2020). As características físico-químicas e biológicas da nanocelulose bacteriana são únicas e resultam em um biopolímero natural viável para várias aplicações biomédicas (SHARMA E BHARDWAJ, 2019). Características como força mecânica semelhante à proporcionada pela matriz extracelular, porosidade que permite a difusão de nutrientes através das nanofibras, bem como a capacidade de carrear compostos bioativos tornam a nanocelulose bacteriana um material altamente promissor para confecção de

sistemas tridimensionais que podem ser aplicados à PIVE (MARTÍNEZ ÁVILA *et al.*, 2015; CURVELLO *et al.*, 2019).

As condições de cultivo e a manipulação de oócitos e embriões durante a PIVE desencadeiam o estresse oxidativo nessas estruturas (GUÉRIN *et al.*, 2001; SOTO-HERAS E PARAMIO, 2020). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a remoção delas através de sistemas enzimáticos ou não. As EROs reconhecidamente promovem danos celulares, além de favorecerem o desencadeamento dos mecanismos envolvidos na apoptose (LI *et al.*, 2019). Nesse contexto, modificações nos meios de cultivo baseadas na inserção de moléculas potencialmente benéficas ao sistema, são amplamente estudadas. Dentre centenas de moléculas investigadas, temos a melatonina, cujos principais benefícios se baseiam em sua ação antioxidante que promove a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A melatonina promove a atenuação direta de moléculas como oxigênio singlete, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, relacionadas ao estresse oxidativo (POEGGELER *et al.*, 1996) e regula positivamente genes responsáveis por codificar proteínas antioxidantes (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995; ANTOLÍN *et al.*, 1996; MAYO *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Além desses efeitos, a melatonina, ao interagir com EROs, gera metabólitos primários, secundários, terciários e quaternários que também apresentam atividade antioxidante, gerando uma cascata de eliminação de radicais livres (TAN *et al.*, 2007).

A hipótese do presente estudo é que a utilização do sistema 3D, com o uso membrana de nanocelulose bacteriana denominada CellFate® (Biocelltis S.A., Brasil) durante toda a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV), associação de 10 µM de melatonina ao meio de cultivo durante a MIV, aumenta as taxas de produção embrionária e melhora a qualidade embrionária por aumentar a expressão do transcrito OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*); reduz o estresse oxidativo por aumentar a expressão dos transcritos GPX1 (*glutathione peroxidase 1*) e

SOD2 (*superoxide dismutase 2*) e diminui a expressão de BAX (*BCL2 associated X*) prevenindo a apoptose. Objetivou-se comparar o sistema 2D com o sistema 3D (CellFate®) durante a MIV e/ou CIV e avaliar os efeitos da adição de 10 μ M de melatonina ao meio de cultivo durante a MIV nos sistemas 2D e 3D 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 de diferentes transcritos pela técnica de RT-qPCR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

Ovários foram obtidos no abatedouro ACOVACAT, localizado no município de Tupã, estado de São Paulo, Brasil. A PIVE, aplicação dos tratamentos e coleta de amostras biológicas foram realizadas no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), sediado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), cidade 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), na 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, Certificados nº 14/2022 e 15/2022.

2.2. Coleta dos ovários e recuperação dos oócitos)

Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* (Nelore) foram obtidos no abatedouro e imediatamente após o abate, foram transportados ao laboratório imersos em solução salina (NaCl 0,9%) a 37°C, de forma que a temperatura fosse mantida durante o transporte. 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 fluído folicular obtido da aspiração dos folículos foi depositado em um tubo cônico estéril de 15 mL que foi mantido a 37° C. Após a decantação dos oócitos para o fundo do tubo, o sedimento contendo os oócitos foi transferido para placas de poliestireno 100 × 20 mm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA) juntamente com 2 mL de fluido folicular.

2.3. Seleção dos oócitos

Utilizando um estereomicroscópio (Nikon SMZ800N, Tokyo, Japão), os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram rastreados, avaliados e categorizados em graus I, II ou III; de acordo com as características morfológicas (STOJKOVIC *et al.*, 2001). Foram utilizados somente COCs

classificados como grau I (oócito com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células *cumulus* compactas) e grau II (heterogeneidade discreta no citoplasma oocitário e mais de 5 camadas compactas de células do *cumulus*). Os oócitos selecionados foram capturados e acondicionados em placa de Petri de 35 mm contendo 1 mL 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 distribuídos de forma equitativa entre os grupos diferentes experimentais, de maneira que a cada repetição experimental houvesse de 12 a 22 oócitos por tratamento.

2.4.Preparo da Melatonina

A melatonina (M5250, Sigma Aldrich) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, D2650, Sigma Aldrich) para que fosse utilizada a concentração de 10 µM.

2.5.Delineamento Experimental

Oócitos bovinos foram distribuídos equitativamente em seis grupos, sendo: MIV e CIV em sistema 2D como grupo controle (Grupo MIV e CIV 2D; n = 137 oócitos); MIV 3D e CIV 2D (Grupo MIV 3D e CIV 2D; n = 137 oócitos); MIV 2D e CIV 3D (Grupo MIV 2D e CIV 3D; n = 137 oócitos); MIV e CIV 3D (Grupo MIV e CIV 3D; n = 137 oócitos); MIV 2D com 10 µM de melatonina e CIV 3D (Grupo MIV 2D* e CIV 3D; n = 137 oócitos) e MIV 3D com 10 µM de melatonina e CIV 3D (Grupo MIV 3D* CIV 3D; n = 137 oócitos). A membrana CellFate® foi utilizada como sistema 3D. A produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 [blastocistos totais e por categoria (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de blastocisto] e D9 [blastocistos totais, blastocistos por categoria (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e taxa de eclosão]. Para a RT-qPCR, foram utilizados *pools* de três blastocistos eclodidos para os grupos Grupo MIV e CIV 2D (3 *pools*), Grupo MIV 2D e CIV 3D (4 *pools*), Grupo MIV 2D* e CIV 3D (4 *pools*), Grupo MIV 3D* e CIV 3D (3 *pools*). O delineamento experimental está apresentado na **Figura 1**.

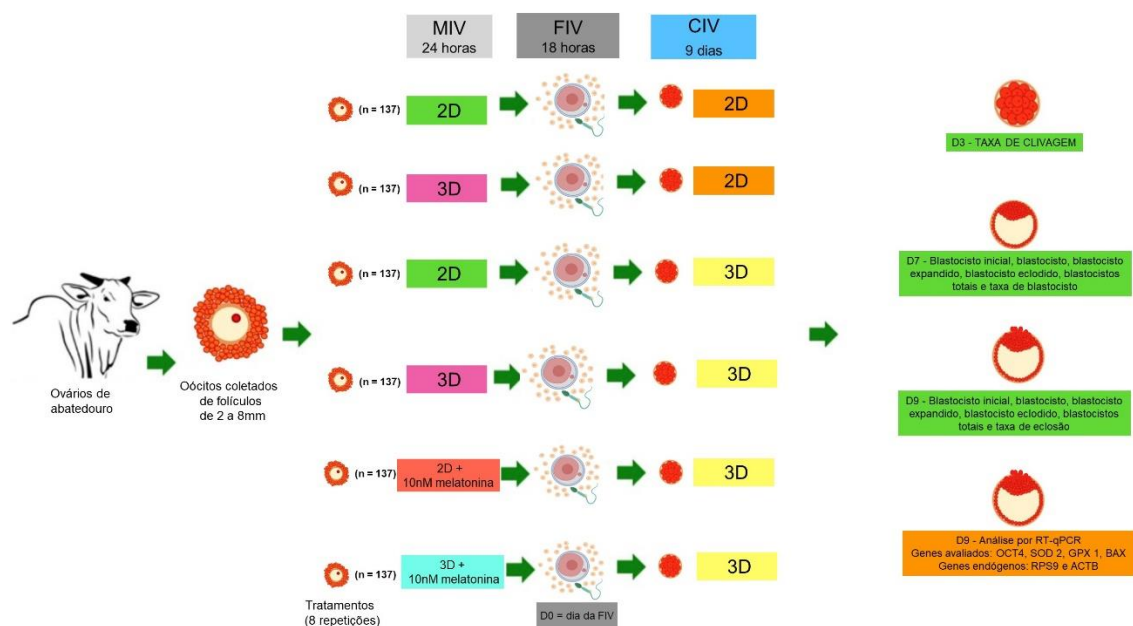


Figura 1. Delineamento experimental. Oócitos bovinos foram distribuídos equitativamente em seis grupos, sendo: MIV e CIV em sistema 2D como grupo controle (Grupo MIV e CIV 2D; n = 137 oócitos); MIV 3D e CIV 2D (Grupo MIV 3D e CIV 2D; n = 137 oócitos); MIV 2D e CIV 3D (Grupo MIV 2D e CIV 3D; n = 137 oócitos); MIV e CIV 3D (Grupo MIV e CIV 3D; n = 137 oócitos); MIV 2D com 10 μ M de melatonina e CIV 3D (Grupo MIV 2D* e CIV 3D; n = 137 oócitos) e MIV 3D com 10 μ M de melatonina e CIV 3D (Grupo MIV 3D* e CIV 3D; n = 137 oócitos). A membrana CellFate® foi utilizada como sistema 3D. A produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 [taxas de blastocisto por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido) e taxa de blastocisto geral (todas as categorias)] e D9 [taxas de blastocisto por categoria (blastocisto inicial, blastocisto intermediário, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocisto degenerado) e taxa blasstocisto geral (todas as categorias)]. Para a RT-qPCR, foram utilizados *pools* de três blastocistos eclodidos para os grupos Grupo MIV e CIV 2D (3 *pools*), Grupo MIV 2D e CIV 3D (4 *pools*), Grupo MIV 2D* e CIV 3D (4 *pools*), Grupo MIV 3D* e CIV 3D (3 *pools*).

2.6. Maturação *in vitro* dos oócitos

Os oócitos previamente 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 os oócitos foram lavados por mais três vezes, onde cada lavagem utilizou-se 50 µL do meio específico de tratamento. 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 (2 µL/mL)] acrescido de soro fetal bovino (10%). A MIV ocorreu em placas de 4 poços (32004, SPL Life Sciences, Coreia) respeitando a proporção de 30 µL de meio por estrutura. No sistema 2D, o poço continha apenas meio de cultivo. No sistema 3D, a membrana CellFate® foi acomodada no fundo do poço para receber as estruturas. As membranas CellFate® são fornecidas pela empresa previamente autoclavadas, onde 24 membranas estão contidas em um tubo cônico de 50 mL contendo 50 mL de água ultrapura tipo 1. No fluxo laminar a membrana foi retirada do tubo com uma pinça autoclavada e colocada no fundo da placa de 4 poços. Em seguida, foi acrescentado 1 mL do meio de tratamento específico a cada membrana, onde permaneceram em incubadora de alta tensão de O₂, atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 38,5°C; durante 60 minutos. Em seguida o meio contendo o tratamento específico foi renovado, onde utilizou-se o volume de 30 µL de meio de cultivo para cada oócito. Considerando que foram utilizados seis tratamentos, foram utilizadas duas placas, contendo 3 tratamentos por placa. O quarto poço de cada placa foi preenchido apenas com água ultrapura tipo 1.

2.7. Preparo dos oócitos para a fertilização *in vitro*

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 μ l/ml de solução a 100 mM), amicacina (75 μ L/mL)]. Em seguida, os oócitos foram lavados por três vezes, onde em cada lavagem foi utilizado 50 μ L de meio base para a 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). Em seguida, os oócitos foram transferidos para gotas com 100 μ L de meio base para a fertilização contidas em placas de Petri 35 mm livres de nucleases, onde cada gota acomodou de 12 a 22 estruturas.

2.8.Preparo do sêmen para a fertilização *in vitro*

Palhetas de sêmen derivadas de um único touro da raça Nelore, única partida, foram utilizadas, 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 μ L a 90% abaixo e 400 μ L a 45% acima, sendo o gradiente superior resultante da diluição de 200 μ L de sílica coloidal em 200 μ L de TL sêmen [TL Stock, piruvato (2 μ L/mL de solução a 100 mM), gentamicina (75 μ g/ml)]. O microtubo foi centrifugado a 1300 x *g* durante cinco minutos em temperatura ambiente. O *pellet* resultante (50 μ L) foi reservado e 5 μ L do *pellet* foi transferido para um microtubo contendo 195 μ L de água deionizada. Em seguida, 10 μ L dessa diluição foi depositada em uma Câmara de Neubauer para avaliação da concentração espermática e motilidade (%). Outros 5 μ L do *pellet* foram transferidos para um microtubo contendo 50 μ L de meio base para fertilização [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)]. Após a avaliação da concentração e motilidade, a seguinte equação foi utilizada para obtenção do volume de meio base (μ L) para fertilização *in vitro* necessário para

diluição do *pellet* remanescente utilizando a seguinte fórmula [(volume do pellet x motilidade x concentração espermática) / 100 - volume do pellet].

2.9.Fertilização *in vitro*

Após a diluição do *pellet*, 6 µL 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 µL. 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.

2.10. Cultivo *in vitro* dos presumíveis embriões

Após a FIV, os presumíveis embriões foram submetidos ao desnudamento, pelo procedimento de turbilhonamento do meio por sucessivas pipetagens com o objetivo de remoção das células do *cumulus* excedentes. Para tal procedimento, foram utilizados 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)] 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. Em seguida os embriões foram lavados por mais três vezes, onde para cada uma das lavagens foi utilizado 50 µL do meio específico de tratamento. 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. O CIV ocorreu em placas de 4 poços (32004, SPL Life Sciences, Coreia) respeitando a proporção de 30 µL de meio por estrutura. No sistema 2D, o poço continha apenas meio de cultivo. No fluxo laminar a membrana foi retirada do tubo com uma pinça autoclavada e colocada no fundo da placa de 4 poços (SPL Life Sciences 32004). Em seguida, foi acrescentado 1 mL do meio de tratamento específico a cada membrana, onde permaneceram em incubadora de alta tensão de O₂, atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 38,5°C; durante 60 minutos. Em seguida o meio contendo o tratamento específico foi renovado, onde utilizou-se o volume de 30 µL de meio de cultivo para cada oócito.

Considerando que foram utilizados seis tratamentos, foram utilizadas duas placas, contendo 3 tratamentos por placa. O quarto poço de cada placa foi preenchido apenas com água ultrapura tipo 1. 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 (D9), onde o dia da FIV foi estabelecida como o dia zero (D0).

2.11. 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, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. No D7 a taxa de blastocistos foi determinada pelo [(número de blastocistos observados / número de presumíveis embriões cultivados) x 100]. No D9, a taxa de eclosão foi determinada pelo [(número de blastocistos eclodidos / número de presumíveis embriões cultivados) x 100].

2.12. 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 Tampão PBS 1X, pH 7.4 (Nova Biotecnologia, Brasil), suplementado com 4% de albumina sérica bovina. Os blastocistos foram acondicionados em tubos de 1,5 mL com aproximadamente 3 µL do meio da última gota de lavagem. Os embriões foram armazenados em *freezer* a -80°C para posterior análise por RT-qPCR.

2.13. 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/A₂₈₀) 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 StepOne 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, testou 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: $Eficiência = -1 + 10^{(-1/inclinação)}$. 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 endógenos foram validados e utilizados como *housekeeping* após determinação da estabilidade de expressão por meio do software geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Após a validação, foram utilizados dois genes endógenos o RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*). A média geométrica da abundância de dois genes de referência foi usada para a normalização da abundância dos genes alvo. No Experimento 1, os transcritos avaliados foram o gene marcador de qualidade embrionária especificamente de pluripotência celular OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*); gene antioxidante mitocondrial que protege as estruturas do estresse oxidativo SOD2 (*superoxide dismutase 2*) e gene antioxidante celular que protege as estruturas do estresse oxidativo GPX1 (*glutathione peroxidase*

1); gene pró-apoptótico ativador de apoptose BAX (*BCL2 apoptosis regulator*); além dos genes de referência RPS9 (*ribosomal protein S9*) e ACTB (*beta-actin*). Também foram testados, mas não validados os genes CDX 2 (*caudal type homeobox 2*), TP53 (*tumor protein p53*), BCL2 (*BCL2 apoptosis regulator*) e CASP3 (*caspase 3*). As características dos primers utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. 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 <i>et al.</i> , 2022
SOD2 (<i>superoxide dismutase 2</i>)	F. AGCACGAGCAGGAGACTGGT R. GACGTTGAGGTTGTTACGCTAG	Antioxidante mitocondrial	-	CINTRA <i>et al.</i> , 2022
GPX1 (<i>glutathione peroxidase 1</i>)	F. GCAACCAGTTTGGGCATCA R. CTCGCACTTTTCGAAGAGCATA	Antioxidante celular	NM_174076	ELIS <i>et al.</i> 2017
BAX (<i>BCL2 associated X</i>)	F. TGTTCCTGACGGCAACTTCA R. CGAAGGAAGTCCAATGTCCAG	Pró-apoptótico	-	CINTRA <i>et al.</i> , 2022
RPS9 (<i>Ribosomal protein S9</i>)	F. GAGCTGGGTTTGTGCGCAA R. GGTCGAGGCGGGACTTCT	Gene de referência	DT860044	HUGHES <i>et al.</i> , 2017
ACTB (<i>beta-actin</i>)	F. GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R. TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	Gene de referência	NM_173979.3	BETTEGOWDA <i>et al.</i> , 2006

A Tabela 2 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 2. 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 (<i>POU</i> <i>class 5 homeobox</i> 1)	SOD2 (<i>superoxide</i> <i>dismutase</i> 2)	GPX1 (<i>glutathione</i> <i>peroxidase</i> 1)	BAX (<i>BCL2</i> <i>associated X</i>)	RPS9 (<i>ribosomal</i> <i>protein S9</i>)	ACTB (<i>beta-actin</i>)
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
Coefficiente de determinação (R ²)	0,88	0,95	0,92	0,91	0,94	0,99

2.14. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), onde considerou-se a gota de cultivo como unidade experimental para os dados de taxa de produção embrionária. Para a avaliação das taxas de desenvolvimento embrionário, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de execução de contrastes para comparação entre os grupos. Foram realizados os seguintes contrastes: (Grupo MIV 2D e CIV 2D vs. Grupo MIV 2D e CIV 3D); (Grupo MIV 2D e CIV 2D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D); (Grupo MIV 2D e CIV 3D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D); (Grupo MIV 3D e CIV 2D vs. Grupo MIV 3D e CIV 3D vs. Grupo MIV 2D e CIV 3D) e (Grupo MIV 2D* e CIV 3D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D). Os resultados das taxas de desenvolvimento embrionário estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A abundância dos transcritos foi analisada por ANOVA utilizando o efeito fixo do tratamento usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) considerando *pools* de três embriões como unidade experimental. Três contrastes foram aplicados no modelo estatístico: (Grupo MIV 2D e CIV 2D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D); (Grupo

MIV 3D e CIV 3D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D) e (Grupo MIV 2D* e CIV 3D vs. Grupo MIV 3D* e CIV 3D). Os resultados estão apresentados com média $\pm$ erro padrão da média. Para todas as análises, a significância foi considerada quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $< 0,1$.

3. RESULTADOS

3.1. Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na Figura 2, o grupo Grupo MIV 3D* e CIV 3D apresentou maior taxa de clivagem quando comparado aos grupos MIV 2D e CIV 2D ($91,8962 \pm 2,4754$ vs. $76,2187 \pm 4,701$ % respectivamente; $P = 0,0300$) e MIV 3D e CIV 3D ($91,8962 \pm 2,4754$ vs. $81,0325 \pm 3,8365$ % respectivamente; $P = 0,0313$).

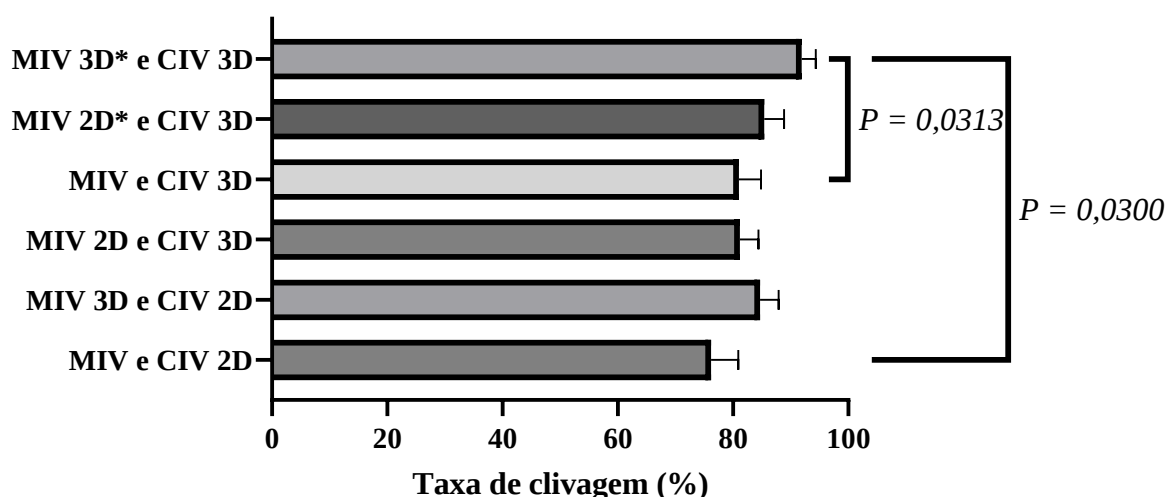


Figura 2. Efeitos da maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócito bovinos nos sistemas 2D ou 3D (CellFate®) associados ou não à suplementação com 10 μ M de melatonina (*) e posterior cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis embriões em sistema 3D (CellFate®) na taxa de clivagem avaliada no D3 (D0 = dia da fertilização *in vitro*); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3.2. Produção de embriões no D7. Conforme ilustrado na Figura 3, o grupo MIV 3D* e CIV 3D aumentou a taxa de blastocisto inicial comparado ao grupo MIV 2D e CIV 2D ($5,9950 \pm 2,0601$ vs. $0,7812 \pm 0,7812$ % respectivamente; $P = 0,0079$). Houve uma tendência do

grupo MIV 3D* e CIV 3D aumentar quando comparado ao MIV 3D e CIV 3D a taxa de blastocisto intermediário ($9,4262 \pm 2,1282$ vs. $5,8950 \pm 1,5995$ % respectivamente; $P = 0,0961$) e taxa de blastocisto geral ($23,9562 \pm 4,1107$ vs. $14,8450 \pm 1,9730$ %; $P = 0,0726$).

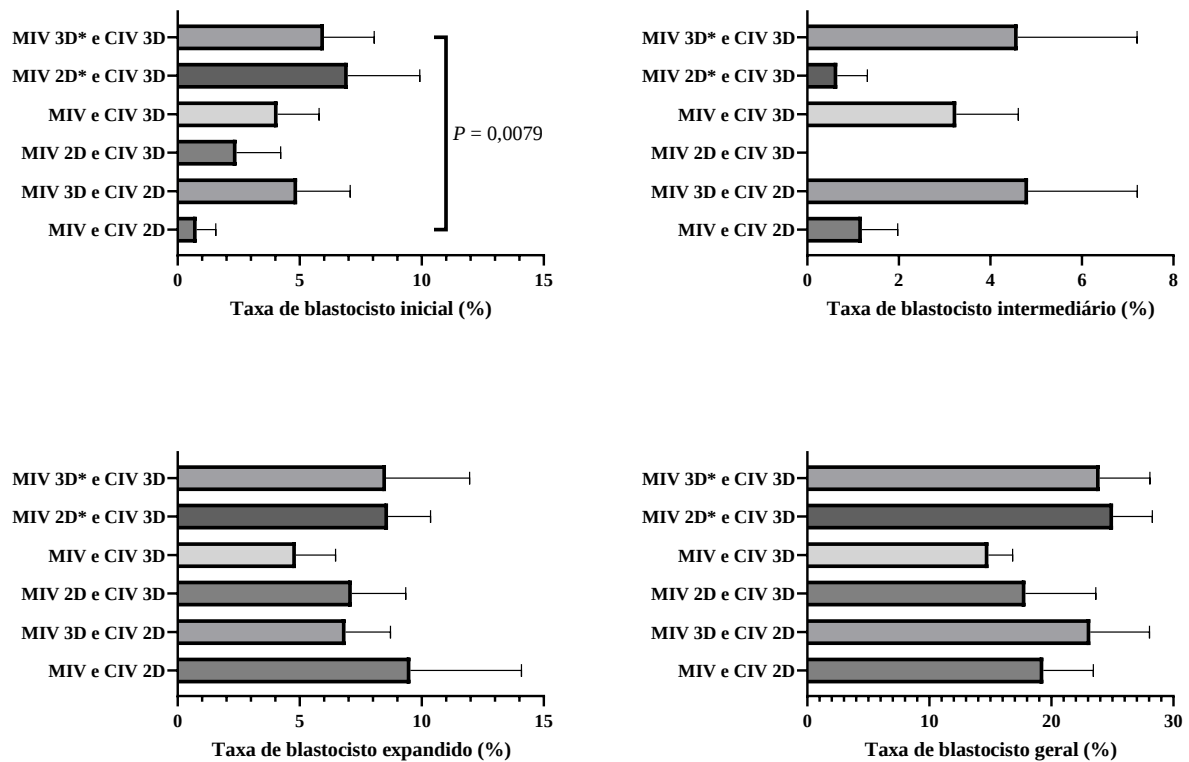


Figura 3. Efeitos da utilização do sistema 3D CellFate® na maturação (MIV) e/ou cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, bem como a suplementação com 10 μ M de melatonina (*) no meio de maturação *in vitro* (24 horas) de complexos *cumulus*-oócito bovinos sobre a taxa de blastocisto inicial, taxa de blastocisto intermediário (embriões entre os estágios de blastocisto inicial e blastocisto expandido), taxa de blastocisto expandido e taxa de blastocisto geral (todos os estágios de blastocisto) no D7 (D0 = dia da fertilização *in vitro*); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

3.3. Produção de embriões no D9

Conforme ilustrado na Figura 4, o grupo MIV 3D* e CIV 3D apresentou maior taxa de blastocisto expandido comparado ao grupo MIV 3D e CIV 3D ($12,1612 \pm 3,2612$ vs. $3,9412 \pm 1,2213$ %

respectivamente; $P = 0,0491$). O grupo MIV 3D* e CIV 3D apresentou maior taxa de blastocisto geral comparado aos grupos MIV 2D e CIV 2D ($30,4300 \pm 5,3459$ vs. $18,4000 \pm 3,8324$ % respectivamente; $P = 0,0160$) e MIV 3D e CIV 3D ($30,4300 \pm 5,3459$ vs. $3,9412 \pm 1,2213$ % respectivamente; $P = 0,0193$). Houve uma tendência do grupo MIV 3D e CIV 3D apresentar maior taxa de blastocisto intermediário quando comparado ao sistema MIV 2D e CIV 2D ($3,2575 \pm 1,3531$ vs. $1,1937 \pm 0,7826$ % respectivamente; $P = 0,0889$). Houve uma tendência do grupo MIV 3D* e CIV 3D apresentar maior taxa de blastocisto eclodido quando comparado ao grupo MIV 3D e CIV 3D ($9,1975 \pm 2,6575$ vs. $4,4800 \pm 1,0697$ % respectivamente; $P = 0,0640$).

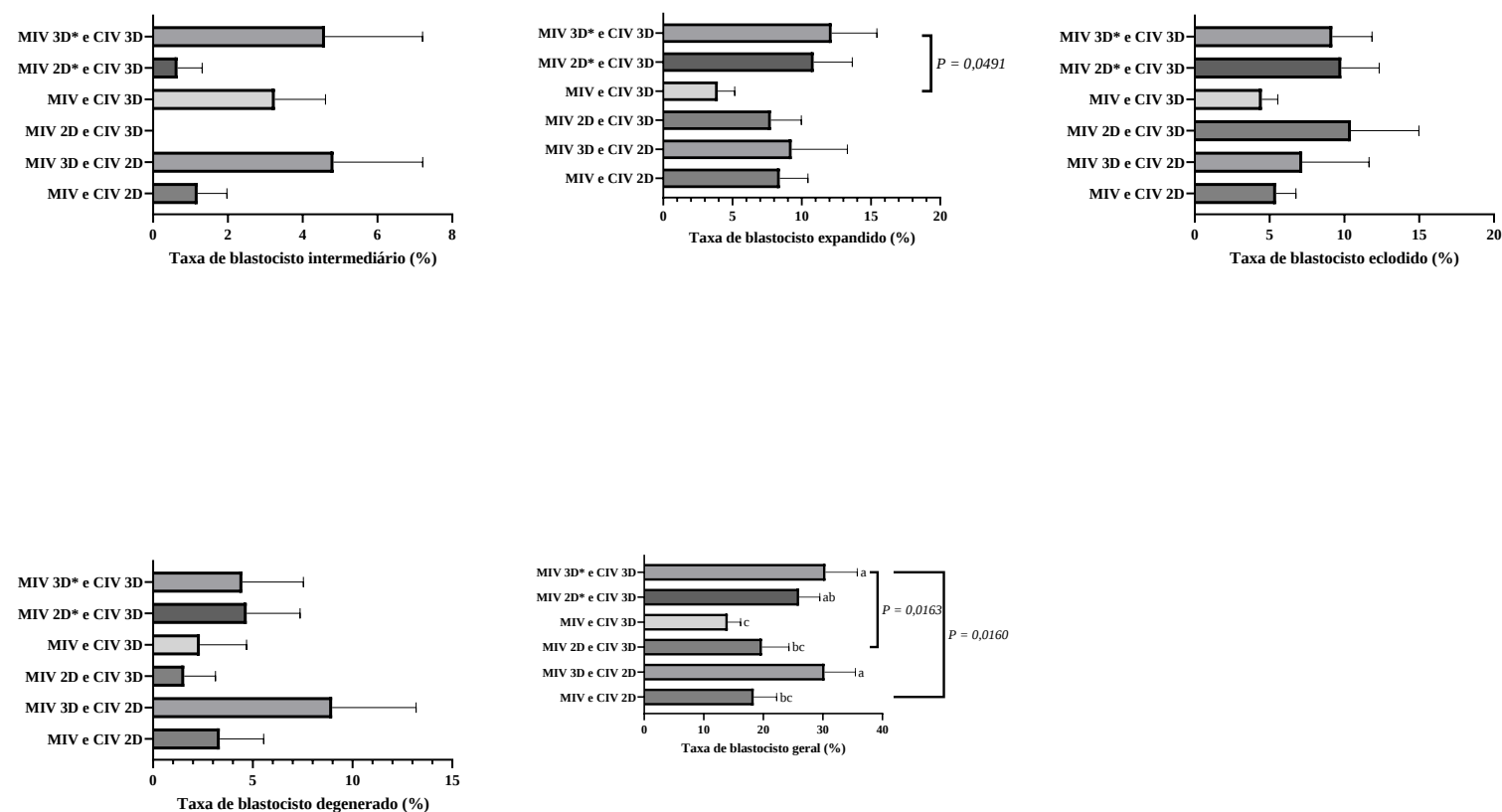


Figura 4. Efeitos da utilização do sistema 3D CellFate® na maturação (MIV) e/ou cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, bem como a suplementação com 10 μ M de melatonina (*) no meio de maturação *in vitro* (24 horas) de complexos *cumulus*-oócito bovinos sobre a taxa de blastocisto intermediário (embriões entre os estágios de blastocisto inicial e blastocisto expandido), taxa de blastocisto expandido, taxa de blastocisto eclodido, taxa de blastocisto degenerado e taxa de blastocisto geral (todos os estágios de blastocisto) no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*); valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

3.4. Expressão gênica dos embriões no D9

Conforme ilustrado na Figura 5, os transcritos dos genes OCT4, SOD2, GPX1 e BAX não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

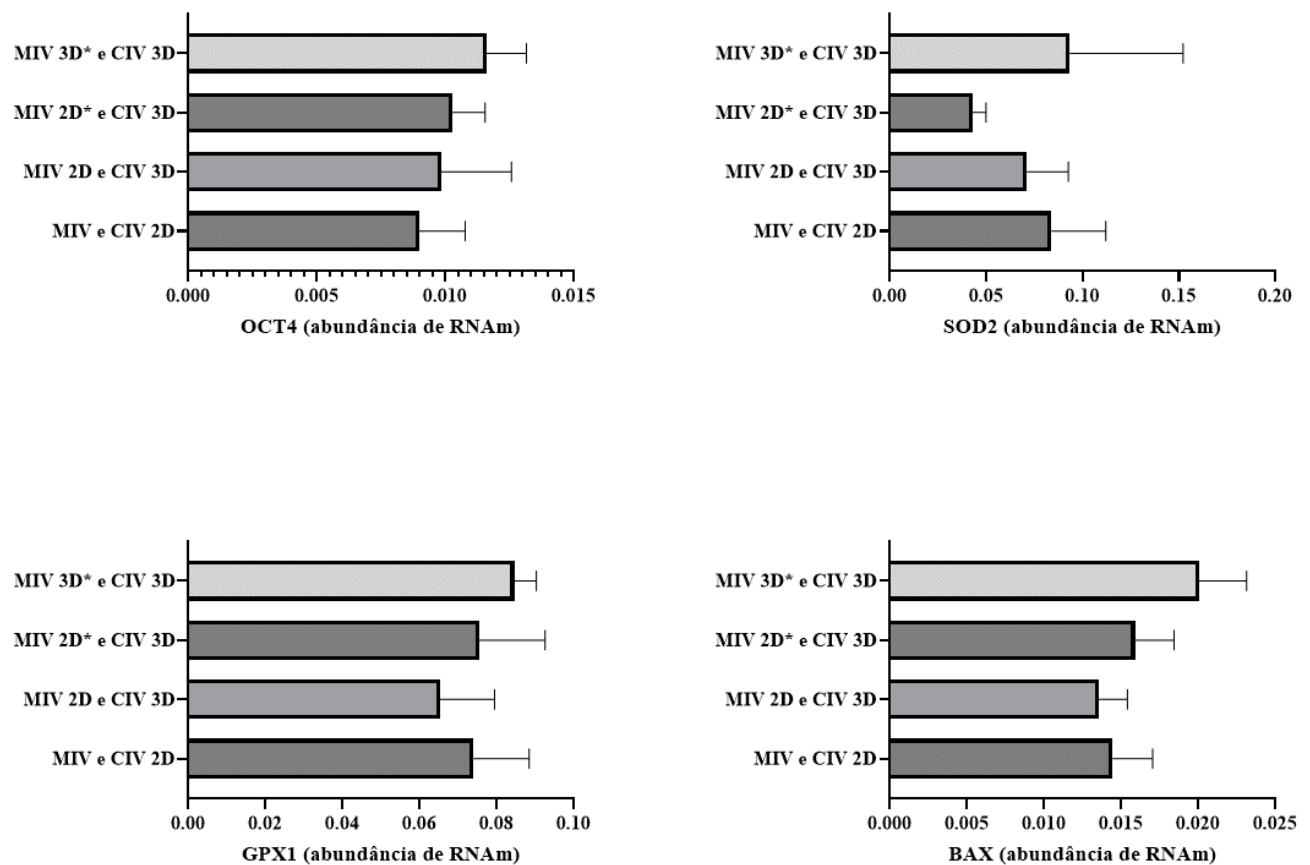


Figura 5. Efeitos da utilização do sistema 3D CellFate® na maturação (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV), bem como a suplementação com 10 μ M de melatonina (*) no meio de maturação *in vitro* (24 horas) de complexos *cumulus*-oócito bovinos sobre a expressão OCT4, SOD2, GPX1 e BAX em blastocistos eclodidos no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*) avaliados por RT-qPCR; valores apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

4. DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que o sistema 3D baseado em nanocelulose bacteriana denominado CellFate®, desenvolvido para o cultivo celular, é utilizado na PIVE. Associamos esse sistema a 10 μ M (10^{-5} M) de melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. A concentração de 10 μ M e o momento da utilização de melatonina (MIV) foram determinados com base no estudo apresentado no Capítulo 2 desta tese.

Os sistemas 3D surgem como ferramenta para contornar as limitações do cultivo 2D, tido como convencional, no que diz respeito à carência de estímulos presentes *in vivo*. Dentre os tratamentos avaliados, o grupo MIV 3D* e CIV 3D apresentou resultados promissores, como maior taxa de clivagem (vs. MIV e CIV 2D e vs. MIV e CIV 3D), maior taxa de blastocisto inicial em D7 (vs. MIV e CIV 2D), maior taxa de blastocisto expandido em D9 (vs. MIV e CIV 2D) e maior taxa de blastocisto geral em D9. Acreditamos os valores positivos encontrados resultaram de dois fatores principais: a) o sistema 3D CellFate® e b) a utilização de melatonina na MIV. O sistema 3D CellFate® é formado por nanocelulose bacteriana e apresenta propriedades mecânicas semelhantes à matriz extracelular. Assim, considerando que o desenvolvimento embrionário inicial ocorre na superfície do oviduto com deslocamento para a cavidade endometrial (KÖLLE; HUGHES; STEELE, 2020), o mimetismo da força mecânica da matriz extracelular em condições *in vitro* pode favorecer o desenvolvimento embrionário em condições laboratoriais. Além disso, a porosidade desse sistema permite que o meio de cultivo chegue até a estrutura cultivada em toda a superfície, o que inclui a área inferior que, em sistema 2D convencional, ficaria em contato direto com a placa de cultivo. Essa propriedade permite a difusão de moléculas presentes no meio de cultivo até a estrutura cultivada de forma mais eficiente que no sistema 2D convencional. Para explorar essa característica, inserimos a melatonina no meio de cultivo, uma vez que essa molécula tem apresentado resultados promissores em estudos reprodutivos conduzidos *in vitro* em diferentes espécies, como aumento nas taxas de clivagem em oócitos suínos na concentração de 10^{-5} M; maior

taxa de maturação oocitária, fertilização e clivagem em camelo dromedário (*Camelus dromedarius*) na concentração de 25 μ M (FATHI *et al.*, 2021) e melhora na taxa de fertilização em búfalos (*Bubalus bubalis*) na concentração de 250 μ M (NAGINA *et al.*, 2016).

A ação positiva da melatonina nas taxas de desenvolvimento embrionário é muitas vezes relacionada com a capacidade de atenuação de EROs por meio do aumento na expressão de transcritos que codificam enzimas antioxidantes como SOD e GPX (TATEMOTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014). Contudo, não identificamos diferenças significativas na expressão de SOD2 e GPX1 em nosso estudo, indicando que os resultados positivos observados na presença de melatonina podem estar relacionados com a atenuação direta de EROs, outro benefício proporcionado pela melatonina (TAN *et al.*, 2007).

Conhecer os mecanismos pelos quais a melatonina exerce suas funções consiste em um grande desafio, pois trata-se de uma molécula capaz de ativar diversas vias. Dentro do contexto da PIVE, além de seus efeitos sobre as EROs, a melatonina pode ativar receptores acoplados à proteína G MT1 e MT2, responsáveis por regular o crescimento de oócitos (YONG *et al.*, 2021). Os receptores para a melatonina, além de estarem presentes em oócitos, já foram identificados em células do *cumulus* e células da granulosa em diversas espécies (SOTO-HERAS *et al.*, 2018; TAMURA *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2014). Nesse sentido, e com base em um estudo prévio, utilizamos melatonina exclusivamente em complexos *cumulus*-oócito, condição que, em sinergia com o sistema 3D CellFate®, proporcionou resultados positivos na PIVE.

Em nosso estudo, no D7, apenas a taxa de blastocisto inicial foi melhorada (vs. MIV e CIV 2D) quando o sistema 3D CellFate® em combinação com a melatonina foi utilizado (MIV 3D* e CIV 3D), embora a taxa de blastocisto geral seja frequentemente melhorada pelo uso da melatonina na MIV de oócitos em camundongos (BAHADORI *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016), suínos (LI *et al.*, 2015) e bovinos (CEBRIAN-SERRANO *et al.*, 2013).

Em relação à taxa de blastocisto geral em D9, quando realizamos a adição de melatonina na MIV em sistema 2D e posterior cultivo em sistema 3D CellFate® (MIV 2D* e CIV 3D), observamos efeitos semelhantes à utilização do sistema 3D CellFate® na MIV e CIV com adição de melatonina na MIV (MIV 3D* e CIV 3D) e utilização do sistema 3D CellFate® apenas na MIV (MIV 3D e CIV 2D). Isso dá indícios de que uma parte importante dos efeitos positivos observados nesse estudo estão ligados principalmente à MIV. Isso pode ser explicado, em parte, pelo processo de obtenção de oócitos e pelo papel da melatonina endógena, presente no fluido folicular. A aspiração folicular tem grande potencial estressor dos oócitos, pois eles são retirados do interior do folículo antes do término de seu desenvolvimento e são expostos a condições não fisiológicas, tais como atmosfera ambiente, meios de cultivo e manipulação exercida durante a execução da PIVE, condições que podem reduzir a viabilidade dos gametas. Além disso, a melatonina está presente naturalmente no interior de folículos ovarianos bovinos na concentração de 10^{-11} M (TIAN *et al.*, 2014) e, portanto, fica claro que essa molécula é necessária no contexto da maturação oocitária, exercendo efeitos por múltiplos mecanismos que se complementam e conduzem ao aumento da eficiência na fertilização oocitária, traduzida no aumento da taxa de maturação oocitária e clivagem embrionária.

Outros efeitos da melatonina estão relacionados com a modulação da função mitocondrial (MOU *et al.*, 2022) e metilação do DNA (SHI *et al.*, 2022), expansão das células do *cumulus* (ZHU *et al.*, 2021) e acetilação de histonas (LI *et al.*, 2020), contudo, o impacto dessas vias no presente estudo não é conhecido.

A utilização do sistema 3D CellFate® na MIV e CIV (MIV e CIV 3D), bem como exclusivamente no CIV (MIV 2D e CIV 3D) não proporcionaram melhores taxas de desenvolvimento embrionário. Esse achado também reforça que os resultados positivos estão relacionados com o aumento na competência dos oócitos. Os motivos pelos quais isso acontece não estão claros. Investigações futuras dos níveis de EROs, antioxidante glutatona e expressão de genes marcadores de qualidade

em oócitos e células do *cumulus* podem trazer novos esclarecimentos acerca das vias metabólicas impactadas na MIV.

Além das taxas de desenvolvimento embrionário, investigamos o impacto dos tratamentos propostos sobre a expressão dos transcritos OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), marcador de qualidade embrionária, SOD2 (*superoxide dismutase 2*) e GPX1 (*glutathione peroxidase 1*) protetores contra o estresse oxidativo e BAX (*BCL2 associated X*) ativador da apoptose. Os grupos de tratamento propostos no presente estudo não induziram expressão aberrante de OCT4, indicando a manutenção do potencial de pluripotência embrionária. A expressão aberrante de OCT4 no decorrer do desenvolvimento embrionário inicial, gestação e parto comumente implica em perda embrionária e à chamada síndrome da prole anormal (RODRÍGUEZ-ALVAREZ *et al.*, 2010). Remião *et al.* (2016) também não identificaram expressão aberrante de OCT4 em embriões bovinos derivados de oócitos suplementados com melatonina.

A melatonina é relatada como capaz de regular positivamente GPX1 (REMIÃO *et al.*, 2016) e SOD2 (REMIÃO *et al.*, 2016; RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016), e, negativamente, BAX (KOMNINO *et al.*, 2016; REMIÃO *et al.*, 2016) em embriões bovinos, sendo esses efeitos desejáveis pela proteção proporcionada pelas enzimas codificadas por GPX1 e SOD2, bem como a não ativação da apoptose por meio de BAX. Contudo, nenhum dos transcritos investigados foi diferencialmente expresso após a utilização do sistema 3D CellFate® associado ou não com a melatonina na MIV. A ausência de efeitos na expressão gênica do presente estudo pode ser decorrente do número limitado de *pools* avaliados que variou de três a quatro para cada grupo. Além disso, o número baixo de embriões por *pool* (três), pode ter contribuído para os resultados observados.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a PIVE em sistema 3D CellFate® associado com a melatonina na MIV, bem como a utilização do sistema 3D CellFate® isoladamente na MIV, resultam em melhor taxa de blastocisto geral no D9, sem alterar a expressão dos transcritos OCT4, GPX1, SOD2 e BAX em embriões bovinos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SÁINZ, 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. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 882–890, 1996. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.10.8.8666165>>.

BAHADORI, M. H.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; ASGARI, Z. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 11, 2013. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3941378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/241378/)>.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 497–502, 1995.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.20333>>.

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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12154>>.

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.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 267, p. 47–61, 2019.

DE AMORIM, J. D. P.; DE SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; DA SILVA DUARTE, I.; DE ASSIS SALES RIBEIRO, F.; SILVA, G. S.; DE FARIAS, P. M. A.; STINGL, A.; COSTA, A. F. S.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters** 2020 18:3, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-020-00989-9>>.

ELIS, S.; OSEIKRIA, M.; VITORINO CARVALHO, A.; BERTEVELLO, P. S.; CORBIN, E.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; LECARDONNEL, J.; ARCHILLA, C.; DURANTHON, V.; LABAS, V.; UZBEKOVA, S. Docosaheanoic acid mechanisms of action on the bovine oocyte-cumulus complex. **Journal of Ovarian Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: <pmc/articles/PMC5679375/>. Acesso em: 2 abr. 2024.

FATHI, M.; SALAMA, A.; EL-SHAHAT, K. H.; EL-SHERBINY, H. R.; ABDELNABY, E. A. Effect of melatonin supplementation during IVM of dromedary camel oocytes (*Camelus dromedarius*) on their maturation, fertilization, and developmental rates *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], v. 172, p. 187–192, 2021.

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. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>>.

HE, C.; WANG, J.; ZHANG, Z.; YANG, M.; LI, Y.; TIAN, X.; MA, T.; TAO, J.; ZHU, K.; SONG, Y.; JI, P.; LIU, G. Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions. **International Journal of Molecular Sciences** **2016**, **Vol. 17**, **Page 939**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 939, 2016. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/939/htm>>.

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.

KÖLLE, S.; HUGHES, B.; STEELE, H. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 650–662, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.23352>>.

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. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157561>>.

LI, C.; HE, X.; HUANG, Z.; HAN, L.; WU, X.; LI, L.; XIN, Y.; GE, J.; SHA, J.; YIN, Z.; WANG, Q. Melatonin ameliorates the advanced maternal age-associated meiotic defects in oocytes through the SIRT2-dependent H4K16 deacetylation pathway. **Aging**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1610–1623, 2020. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/article/102703>>.

LI, H. S.; ZHOU, Y. N.; LI, L.; LI, S. F.; LONG, D.; CHEN, X. L.; ZHANG, J. B.; FENG, L.; LI, Y. P. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox biology**, [s. l.], v. 25, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30686776/>>.

- 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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12268>>.
- MARTÍNEZ ÁVILA, H.; FELDMANN, E. M.; PLEUMEEKERS, M. M.; NIMESKERN, L.; KUO, W.; DE JONG, W. C.; SCHWARZ, S.; MÜLLER, R.; HENDRIKS, J.; ROTTER, N.; VAN OSCH, G. J. V. M.; STOK, K. S.; GATENHOLM, P. Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold supports neocartilage formation *in vitro* and *in vivo*. **Biomaterials**, [s. l.], v. 44, p. 122–133, 2015.
- MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/PL00012498>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- MOU, Q.; YANG, Y. W.; CHEN, L.; FANG, T.; YAO, Y. C.; DU, Z. Q.; YANG, C. X. Melatonin mitigates Chloroquine-induced defects in porcine immature Sertoli cells. **Theriogenology**, [s. l.], v. 177, p. 1–10, 2022.
- 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. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/141633>>.
- POEGGELER, B.; REITER, R. J.; HARDELAND, R.; TAN, D. X.; BARLOW-WALDEN, L. R. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers *in vitro*. **Redox Report**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 179–184, 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13510002.1996.11747046>>.
- 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.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>>.

RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L.; COX, J.; TOVAR, H.; EINSPIANIER, R.; CASTRO, F. O. Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and *in vitro* produced embryos. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 269–279, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20429963/>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

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.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>>.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 104, p. 109963, 2019.

SHI, F.; QIU, J.; ZHANG, S.; ZHAO, X.; FENG, D.; FENG, X. Exogenous melatonin protects preimplantation embryo development from decabromodiphenyl ethane-induced circadian rhythm

disorder and endogenous melatonin reduction. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 292, p. 118445, 2022.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 132, p. 342–350, 2020.

SOTO-HERAS, S.; ROURA, M.; CATALÁ, M. G.; MENÉNDEZ-BLANCO, I.; IZQUIERDO, D.; FOULADI-NASHTA, A. A.; PARAMIO, M. T. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 253–261, 2018. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD17170>>.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>>.

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**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jog.12177>>.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 28–42, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>>.

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

Superoxide Dismutase Activity in Porcine Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1150–1157, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.029264>>.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; HE, C. J.; ZHANG, L.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P. Y.; LIU, G. S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 239–247, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12163>>.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12184808/>>.

VIANA, J. H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals . **Embryo Technology Newsletter**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 22–40, 2022.

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. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093641>>.

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 2020, Vol. 10, Page 209**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 209, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/2/209/htm>>.

YONG, W.; MA, H.; NA, M.; GAO, T.; ZHANG, Y.; HAO, L.; YU, H.; YANG, H.; DENG, X. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 144, p. 112001, 2021.

ZHU, T.; GUAN, S.; LV, D.; ZHAO, M.; YAN, L.; SHI, L.; JI, P.; ZHANG, L.; LIU, G.
Corrigendum: Melatonin Modulates Lipid Metabolism in Porcine Cumulus–Oocyte Complex via
Its Receptors (Front. Cell Dev. Biol., (2021), 9, 10.3389/fcell.2021.648209). **Frontiers in Cell and
Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 727612, 2021.