



**IVAN JÚNIOR ASCARI**

**ADIÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA-I OU  
MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO  
CHOQUE TÉRMICO**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**IVAN JÚNIOR ASCARI**

**ADIÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À  
INSULINA-I OU MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Nadja Gomes Alves

Coorientador

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ascari, Ivan Júnior.

Adição do fator de crescimento semelhante à insulina-I ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico / Ivan Júnior Ascari. – Lavras : UFLA, 2016.

119 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Nadja Gomes Alves.

Bibliografia.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Apoptose celular. 3. Fragmentação de DNA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**IVAN JÚNIOR ASCARI**

**ADIÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À  
INSULINA-I OU MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de dezembro de 2015.

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo	EMBRAPA
Dr. Renato Ribeiro de Lima	UFLA
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dr. Guilherme Oberlender	IF Sul de Minas

Dra. Nadja Gomes Alves  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2015**

**DEDICO**

*Aos meus pais, Vicanor e Hilda, e às irmãs, Joslei e Jociani, pelo amor, carinho, incentivo e aos meus avós, Vergínio e Verônica, Luiz (in memorian) e Luiza, pelo exemplo de vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a chance de atingir mais um objetivo nesta vida.

Aos meus pais, Vicanor e Hilda, pela dedicação infinita em me educar para o bem, pelo amor e paciência, pelos ensinamentos de vida e por entenderem a necessidade da distância.

Às minhas irmãs, Joslei e Jociani, pelo carinho e incentivo, ainda que estejamos separados por algumas milhas.

À professora Nadja Gomes Alves, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, pela oportunidade e orientação na condução e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelo apoio e incentivo, pelos sábios conselhos e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Ao professor Renato Ribeiro de Lima, por todo o tempo, atenção e paciência dispensados nas análises estatísticas dos dados.

Aos membros da banca examinadora, professores Márcio e Guilherme pela participação.

À colega de pós-graduação Jasmin, pela agradável convivência, ajuda e companheirismo durante todo o período de condução do projeto.

À toda a equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite: Carolina Capobiango, Myro, Joel, Bruno Carvalho, João Henrique, Bruna, Fernanda, Sávio, Deividy, Thiago, Juliane, Eliza, Carolina Marinho, Natana, Jéssica e Gustavo.

Ao Núcleo de Estudos em Nutrição e Reprodução Animal (NUTRAN) da UFLA.

Aos amigos Felipe, César, Gabrielen, Douglas, Alexandre, Augusto, Gil, Indalécio, Leandro e Sancho, pela amizade e companheirismo. Desejo muito sucesso a todos.

A Márcia Helena, pela dedicação durante esses anos em Lavras.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Zootecnia e a Embrapa, pela oportunidade de realizar o trabalho, fico muito grato.

Ao CNPQ, pela bolsa e a FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO GERAL

Temperaturas ambientais elevadas podem levar a redução nos índices reprodutivos. Nesse contexto, o IGF-I e a melatonina podem atuar de forma termoprotetora e na redução do estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar o efeito do IGF-I ou da melatonina adicionados ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico, sobre a qualidade e a competência de desenvolvimento de oócitos e a qualidade dos embriões. Folículos de três a oito milímetros de diâmetro foram puncionados de ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) coletados em abatedouro. Foram selecionados os complexos cumulus-oócitos que apresentaram citoplasma homogêneo com, no mínimo, três camadas de células. Foram realizados dois experimentos, em que adição de IGF-I (0, 25 e 100 ng/mL) ou de melatonina (0,  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$  M) ao meio MIV e duas condições de incubação foram avaliadas. As condições de incubação foram a convencional: 24 horas a 38,5°C ou choque térmico: 12 horas a 41°C seguido por 12 horas a 38,5°C. Não houve interação entre condição de incubação e IGF-I ou melatonina em todas as análises ( $P > 0,05$ ). No Experimento I, a adição de IGF-I aumentou a atividade mitocondrial ( $P < 0,01$ ) e a produção de espécies reativas de oxigênio - EROS ( $P < 0,01$ ), enquanto reduziu a taxa de blastocistos nos dias sete e oito ( $P < 0,01$ ) e a taxa de células apoptóticas da MCI ( $P < 0,01$ ). O choque térmico aumentou a porcentagem de oócitos TUNEL-positivos ( $P < 0,01$ ) e a produção de EROS ( $P < 0,01$ ) e reduziu a atividade mitocondrial ( $P < 0,01$ ). No Experimento II, a adição de melatonina reduziu a produção de EROS ( $P < 0,01$ ) nos oócitos, enquanto o choque térmico aumentou ( $P < 0,01$ ). A atividade mitocondrial não foi afetada ( $P > 0,05$ ) pela melatonina, porém foi reduzida pelo choque térmico. O choque térmico reduziu a porcentagem de oócitos que progrediram ao estágio de metáfase II ( $P < 0,01$ ) e a taxa de blastocistos nos dias sete ( $P = 0,02$ ) e oito ( $P < 0,01$ ). Em conclusão, a suplementação de IGF-I ou melatonina ao meio MIV possibilita a melhoria da qualidade dos embriões produzidos. Um dos resultados mais relevantes do IGF-I foi o aumento da atividade mitocondrial, enquanto que da melatonina foi a redução do estresse oxidativo no oócito.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Apoptose celular. Fragmentação de DNA. Termoproteção. Antioxidante.

## GENERAL ABSTRACT

High ambient temperatures can cause reduced reproductive rates. In this context, IGF-I and melatonin can act as thermo-protector, reducing oxidative stress during the *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes subjected to heat shock. The aims of this study were to evaluate the effects of IGF-I or melatonin added to the IVM medium of bovine oocytes, subjected to heat shock, on the quality and competence of oocyte development and the quality of the embryos. Follicles of three to eight millimeters in diameter were aspirated from ovaries collected at abattoirs of predominantly crossbred cows (Holstein-Gyr). We selected the cumulus-oocyte complexes that presented homogeneous cytoplasm with at least three layers of cells. Two experiments were performed, in which the addition of IGF-I (0, 25 e 100 ng/mL) or melatonin (0,  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$  M) to the IVM medium, under two incubation conditions, were evaluated. The incubation conditions were conventional, with 24 hours at 38.5°C, or heat shock with 12 hours at 41°C followed by 12 hours at 38.5°C. There was no interaction between incubation condition and IGF-I or melatonin in any analyze ( $P > 0.05$ ). In Experiment I, the addition of IGF-I increased mitochondrial activity ( $P < 0.01$ ) and the production of reactive oxygen species - ROS ( $P < 0.01$ ), while reducing blastocyst rate in the seven and eight days ( $P < 0.01$ ), as well as apoptotic cells rate of inner cell mass ( $P < 0.01$ ). Heat shock increased the percentage of TUNEL-positive oocytes ( $P < 0.01$ ) and the production of ROS ( $P < 0.01$ ), and reduced mitochondrial activity ( $P < 0.01$ ). In Experiment II, the addition of melatonin reduced the production of ROS ( $P < 0.01$ ) in the oocytes, while heat shock increased ( $P < 0.01$ ) its production. Mitochondrial activity was not affected ( $P > 0.05$ ) by melatonin, but was reduced by heat shock. Heat shock also reduced the percentage of oocytes that have progressed to metaphase II stage ( $P < 0.01$ ) and blastocyst rate in seven ( $P = 0.02$ ) and eight ( $P < 0.01$ ) days. In conclusion, the supplementation of IGF-I or melatonin to IVM medium improves the quality of the embryos produced. One of the most important results of IGF-I was the increased mitochondrial activity, whereas, for melatonin, it was the reduction of oxidative stress in the oocyte

Keywords: Oxygen reactive species. Cellular apoptosis. DNA fragmentation. Thermo-protector. Antioxidant.

## LISTA DE ABREVISATURA

PIV	Produção <i>in vitro</i>
VG	Vesícula germinativa
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo II
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IGF-IIR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo II
IGFBPs	Proteínas de ligação aos fatores de crescimento semelhante à
IGF-III	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo III
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
EROS	espécies reativas de oxigênio
ERNS	espécies reativas de nitrogênio
ATP	trifosfato de adenosina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superóxido

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 14
<b>2.1</b>	<b>Influência do estresse térmico na reprodução</b> ..... 14
<b>2.2</b>	<b>Influência do estresse térmico na qualidade oocitária</b> ..... 16
<b>2.3</b>	<b>Influências dos radicais livres na qualidade oocitária</b> ..... 18
<b>2.4</b>	<b>Atividade mitocondrial nos oócitos</b> ..... 21
<b>2.5</b>	<b>Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I</b> ..... 23
<b>2.6</b>	<b>Ação antioxidante da Melatonina</b> ..... 28
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> ..... 33
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 34
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> ..... 50	
	<b>ARTIGO 1</b> Adição de IGF-I ao meio de maturação e qualidade de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico ..... 50
	<b>ARTIGO 2</b> Adição de melatonina ao meio de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico: efeitos sobre a qualidade e a competência de desenvolvimento ..... 82

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

O estresse térmico de vacas em lactação é um fator de grande impacto econômico na indústria leiteira, especialmente em regiões de clima quente, podendo causar prejuízos tanto nos aspectos produtivos quanto nos reprodutivos. No entanto, poucas são as estratégias eficientes para resolver esse problema. A hipertermia afeta diretamente a fisiologia reprodutiva (MOUSSA et al. 2015), sendo que, entre todas as funções fisiológicas dos mamíferos, essa é considerada a mais susceptível (HANSEN, 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que oócitos em desenvolvimento são extremamente sensíveis a temperaturas elevadas que ocasionam redução da taxa de clivagem e da subsequente produção de blastocistos (EDWARDS et al., 1997; ROTH; HANSEN 2004; FERREIRA et al., 2011; MEIYU; LIU; ROTH, 2015).

As pesquisas que visam avaliar os efeitos da temperatura elevada sobre os oócitos com frequência utilizam o modelo de choque térmico (*in vitro*), que é eficiente em recriar os efeitos do estresse térmico (*in vivo*) em oócitos e embriões (GENDELMAN; ROTH, 2012), além de permitir a caracterização das alterações celulares e de desenvolvimento induzidas pela temperatura elevada. A diminuição da qualidade e da competência de desenvolvimento observada em oócitos expostos ao choque térmico está relacionada às alterações celulares como diminuição da maturação nuclear, apoptose e desorganização do citoesqueleto (JU et al., 2005; ROTH; HANSEN, 2004; 2005). A temperatura elevada também pode ser responsável pela formação e acúmulo de radicais livres nas células, o qual é característico do estresse oxidativo. O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA e indução da apoptose, sendo

considerado prejudicial para o oócito e para o desenvolvimento embrionário (TAMURA et al., 2013; ZHANG et al., 2013; CRUZ et al., 2014a, 2014b).

Os efeitos do choque térmico em oócitos bovinos podem ser modulados por fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I). Pesquisa *in vivo* demonstrou que a exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico diminui a concentração circulante de IGF-I, o que resultou em comprometimento da qualidade oocitária (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Os IGFs desempenham papéis múltiplos no metabolismo celular, auxiliando a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário, como demonstrado pelo aumento do número total de células em blastocistos expostos ao estresse térmico (SATRAPA et al. 2011; SARTORI et al. 2013). No entanto, os mecanismos celulares pelos quais a temperatura elevada e o IGF-I afetam a competência de desenvolvimento dos oócitos não são totalmente compreendidos (MEIYU; LIU; ROTH, 2015; MOUSSA et al. 2015).

Durante a MIV o oócito é muito mais suscetível ao estresse oxidativo, em razão da sua reduzida defesa antioxidante, o que prejudica o subsequente desenvolvimento embrionário. Para contornar esse problema, diversos sistemas de produção *in vitro* de embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de radicais livres por meio do uso de antioxidantes. A melatonina pode ser utilizada como um importante protetor, durante a produção *in vitro* de embriões embrião, agindo como hormônio imunoestimulador, citoprotetor (SCHAFFAZICK et al., 2005) e antiapoptótico pela inibição da ativação de caspases (BAYDAS et al., 2005). A maioria dos estudos disponíveis avaliaram as ações de melatonina durante o cultivo de embriões (TAKADA et al., 2010; TAKADA et al. 2012) e alguns poucos focaram no papel direto desse hormônio na maturação do oócito (EL-RAEY et al. 2011; TAMURA et al., 2013). No entanto, seus efeitos, bem como o seu mecanismo de ação relacionados à maturação e ao desenvolvimento do embrião ainda necessitam de

maior compreensão (PAULA-LOPES et al., 2013; CRUZ et al., 2014b). É importante ressaltar que nos trabalhos correlatos ao assunto existentes na literatura a suplementação direta de melatonina ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico não foi avaliada e, portanto, esse é um campo de pesquisa a ser explorado.

Diante dos efeitos do estresse térmico na reprodução, torna-se importante a realização de estudos para avaliar o papel termoprotetor do IGF-I e antioxidante da melatonina em diferentes concentrações na MIV de oócitos bovinos como forma de amenizar os danos celulares causados pelo estresse térmico. Objetivou-se avaliar o efeito termoprotetor e antioxidante do IGF-I ou melatonina adicionados ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre a qualidade dos oócitos e a competência de desenvolvimento a blastocistos, bem como a qualidade dos embriões produzidos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Influência do estresse térmico na reprodução

O estresse térmico é um grande problema que afeta a indústria de produção de bovinos mundialmente (SILVA et al., 2013). Tal fato apresenta consequências na fisiologia e no desempenho reprodutivo de vacas, porém o principal efeito para os produtores é a redução da fertilidade (SILVA et al., 2013; DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015). O estresse térmico pode ser definido como um ambiente quente que atua alterando a temperatura corporal do animal para um valor acima da temperatura ideal, que é de 38,0 a 39,1°C (HANSEN, 2009; ROBERTSHAW, 2004).

A redução na função reprodutiva ocorre durante o verão mesmo nos animais que vivem em regiões de clima temperado, sendo que a hipertermia pode ocorrer de forma intensa em bovinos quando a temperatura ambiental está por volta de 25-28 °C (HANSEN, 2007; SILVA, 2011; DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015). Em bovinos de leite, estima-se que a taxa de concepção começa a diminuir quando a temperatura uterina sobe cerca de 0,5°C acima do normal (GWAZDAUSKAS; THATCHER; WILCOX, 1973).

Como resposta fisiológica ao estresse térmico, ocorrem redução na produção de calor corporal, na ingestão de alimentos e na produção de leite (redução da produção de calor pelo metabolismo de nutrientes), aumento da circulação sanguínea periférica (aumento da perda de calor por condução e convecção) e do volume respiratório (perda de calor por evaporação) (CHOSHNIAK et al., 1982; HANSEN; ARECHIGA, 1999; AL-HAIDARY et al., 2001; HANSEN, 2004). Seus efeitos sobre a fertilidade incluem redução da taxa de concepção, aumento do número de dias em abertos e elevada taxa de anestro (DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015). O

estresse térmico é considerado um problema multifatorial que afeta funções fisiológicas e celulares em vários tecidos (PAULA-LOPES et al., 2013). Compromete o crescimento folicular (TORRES-JÚNIOR et al., 2008; HANSEN, 2013), reduz o tamanho do folículo dominante (WEBB; CAMPBELL, 2007), reduz a secreção hormonal (TORRES-JÚNIOR et al., 2008; RISPOLI et al., 2013) e aumenta da secreção de prostaglandina pelo endométrio (PUTNEY et al., 1988). Além disso, compromete a qualidade e a capacidade de desenvolvimento do embrião (RISPOLI et al., 2013).

O estresse térmico pode levar ao aumento da circulação periférica com o intuito de aumentar a perda de calor por convecção. Como consequência, ocorre redução do fluxo sanguíneo no útero e aumento da temperatura local. Isso representa a geração de um ambiente inadequado no trato genital para a sobrevivência do oócito, espermatozóide e zigoto (ROMAN-PONCE et al., 1978; LUBLIN; WOLFENSON, 1996; DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015). Assim, essas alterações aumentam a perda embrionária nos estágios iniciais do desenvolvimento.

A redução na competência de desenvolvimento embrionário decorre das inúmeras alterações celulares induzidas pelo estresse térmico, destacando-se os danos ao citoesqueleto, à indução da apoptose e ao estresse oxidativo embrionário (LIMA et al., 2013). Portanto, o conhecimento dos danos celulares e dos mecanismos desencadeados pelo estresse térmico são de grande importância para o desenvolvimento de medidas corretivas destinadas a minimizar os efeitos adversos da temperatura elevada na função reprodutiva dos bovinos (LIMA et al., 2013).

A susceptibilidade embrionária a temperatura elevada já foi bem caracterizada tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* (LIMA et al., 2013). Uma das consequências da exposição a temperaturas elevadas no embrião bovino, durante a fase de pré-implantação é a indução da apoptose em uma

fração dos blastômeros (HANSEN, 2007). A indução da apoptose é causada, em parte, por alterações ultraestruturais como a ruptura de microfilamentos e microtubulos, que resultam em redistribuição de organelas, vacuolização e rompimento da membrana mitocondrial (RIVERA et al., 2003; RIVERA et al., 2004). Ademais, Brad e Hansen (2006) relataram que a apoptose induzida pelo choque térmico no embrião de duas células é o resultado da disfunção mitocondrial mediada por ativação das caspase-9 e 3.

Ao longo dos anos, muitas pesquisas têm focado no estudo dos mecanismos pelos quais a temperatura elevada reduz os índices reprodutivos. No entanto, as estratégias atualmente disponíveis para solucionar esse problema ainda são limitadas (LIMA et al., 2013).

## **2.2 Influência do estresse térmico na qualidade oocitária**

Muitos dos efeitos do estresse térmico sobre a função do oócito e do embrião envolvem ações diretas da temperatura na função celular (HANSEN, 2014), afetando os eventos necessários para a maturação do oócito, fertilização e capacidade de desenvolvimento do embrião (PAULA-LOPES et al., 2012; 2013; HANSEN, 2013; MOUSSA et al., 2015). Os mecanismos responsáveis pela redução da competência oocitária são complexos e não estão totalmente compreendidos (MOUSSA et al., 2015), bem como os fatores envolvidos na resistência térmica ao estresse (PAULA-LOPES et al., 2013).

Durante a maturação oocitária em preparação para a fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário, ocorrem mudanças no núcleo e no citoplasma (LANDIMG-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). Essas mudanças podem ser afetadas pela exposição oocitária ao estresse térmico (MAYA-SORYANO, et al., 2013), induzindo o envelhecimento precoce do oócito, pela

aceleração do processo de maturação (EDWARDS et al., 2005; ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2010).

Entre os eventos de maturação citoplasmática e nuclear comprometidos pelo estresse térmico podem ser citados: maturação nuclear e translocação dos grânulos corticais do oolema (maturação citoplasmática) (MAYA-SORIANO et al., 2013), formação do fuso e rearranjo do citoesqueleto, as quais poderiam levar à maturação nuclear incompleta, falha na fertilização, e/ou formação anormal do zigoto (ROTH; HANSEN, 2004, 2005). Alguns estudos relatam que o cultivo de oócitos a 41°C tende a reduzir a proporção de oócitos que completam a maturação nuclear (PAYTON et al., 2004; ROTH; HANSEN, 2005), bem como aumentar a proporção de pró-núcleos apoptóticos (MONTERROSO et al., 1995; ROTH; HANSEN, 2004).

Em decorrência das alterações descritas, o número de oócitos maturados e a proporção de oócitos que se tornam blastocistos são reduzidos pelo estresse térmico (ROTH; HANSEN, 2005; NABENISHI et al., 2012). Segundo Roth e Hansen (2005), a maioria dos oócitos submetidos ao choque térmico têm o desenvolvimento interrompido nos estágios metáfase I (MI) a metáfase II (MII). Além disso, oócitos obtidos de vacas Holandesas durante o verão em comparação com oócitos coletados no inverno, apresentaram redução na qualidade e no número de estruturas coletadas, o que resultou na diminuição da capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; GENDELMAN et al., 2010).

A intensidade do estresse pode ser considerada uma função da temperatura e do tempo de exposição (PAULA-LOPES et al., 2012). O choque térmico moderado (40°C), durante as primeiras 12 horas de MIV, reduz a proporção de oócitos clivados no dia 3 e a taxa de blastocisto no dia 8, após a fecundação *in vitro* (FIV) (ROTH; HANSEN, 2004; PAULA-LOPES et al., 2008). A exposição de oócitos bovinos à temperatura extrema (42 a 44°C), ou à

temperatura de 40 a 41°C, durante as primeiras 12 horas de maturação *in vitro* (MIV), bloqueia ou reduz o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (ROTH; HANSEN, 2004; PAULA-LOPES et al., 2008).

Os efeitos da temperatura elevada na função oocitária foram demonstrados em experimentos *in vitro* em que o choque térmico foi aplicado em oócitos na fase de vesícula germinativa (VG) (PAULA-LOPES et al., 2012). Durante o período em que os oócitos permanecem em fase de VG no folículo antral (42 dias), oócitos podem ser expostos às flutuações diárias de temperatura corporal, acima de 41°C, comprometendo a função oocitária antes da maturação (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987; RIVERA; HANSEN, 2001; PAULA-LOPES et al., 2012).

Uma estratégia potencial para melhorar a eficiência de sistemas de produção de embriões *in vitro* é de alterar as condições de MIV de oócitos e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões para mimetizar a fisiologia embrionária *in vivo*. Essa alteração pode ser realizada por meio da adição de fatores de crescimento, antioxidantes, hormônios e outras moléculas regulatórias (BLOCK, 2007; BLOCK; HANSEN 2007; HANSEN, 2013).

### **2.3 Influências dos radicais livres na qualidade oocitária**

Os radicais livres são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita atômica ou molecular. Radicais livres e suas espécies não radicais relacionadas são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (TAMURA et al., 2009). Os radicais livres são considerados prejudiciais para o oócito (TAMURA et al., 2009) e para o desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI, 2012), em razão da sua capacidade de destruição

do DNA, aceleração da apoptose e deterioração da membrana lipídica (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999).

O embrião bovino requer energia para um rápido crescimento e diferenciação, utilizando trifosfato de adenosina (ATP) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esses substratos são produzidos por meio da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias. As EROS também são geradas como subproduto desse sistema de produção de energia (TAKAHASHI, 2012). Além do fato de que as EROS sejam produzidas pelo metabolismo normal das células (TAMURA et al., 2009), sua formação também está ligada aos efeitos diretos da temperatura elevada (HANSEN, 2013).

A hipertermia é considerada uma das causas do estresse oxidativo nas células e nos tecidos, por meio da geração do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou anion superóxido ( $O_2^-$ ). Em condições fisiológicas, o  $O_2^-$  é degradado a  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase (SOD) no citosol e na mitocôndria. O  $H_2O_2$  é então removido pela catalase ou glutathione peroxidase (GPx) e glutathione transferase (FISHER et al., 1991; JU et al., 2005). Concentrações supra-fisiológicas de EROS foram associadas com efeitos deletérios, em decorrência da destruição ou alteração de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos em células (MA, 2010). Tem sido relatado que o  $H_2O_2$  e o  $O_2^-$  podem causar efeitos diretos nas mitocôndrias e ativar proteases e as caspases, resultando em condensação da cromatina e fragmentação, apoptose, alteração da divisão celular e do desenvolvimento embrionário (VELEZ-PARDO et al., 2007).

Outro fator que pode alterar a produção de EROS está relacionado ao fato de que as concentrações intra e extracelulares de EROS são reguladas pelo balanço entre enzimas antioxidantes e pró-oxidantes, portanto, qualquer alteração fisiológica pode acarretar em uma produção excessiva de EROS (TAKAHASHI, 2012), podendo levar ao seu acúmulo e ser responsável pelo estresse oxidativo (TAMURA et al., 2013). O estresse oxidativo pode ser

definido como o desequilíbrio entre espécies oxidantes celulares como EROS e antioxidantes, e possui um efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA (CRUZ et al., 2014a, 2014b; TAMURA et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e indução da apoptose (TAKAHASHI, 2012), podendo danificar oócitos e células da granulosa dentro do folículo (TAMURA et al., 2013).

O equilíbrio entre a produção de EROS e a ação de antioxidantes é um fator importante para maturação dos oócitos e fertilização (TAMURA, 2009). Durante a MIV, o oócito é mais suscetível ao estresse oxidativo, em razão da defesa antioxidante reduzida, o que prejudica-o e afeta o desenvolvimento embrionário subsequente (DU PLESSIS et al., 2008; ZHANG et al., 2013). Tem sido relatado que o estresse oxidativo também pode ser um importante mecanismo envolvido nos efeitos tóxicos de procedimentos de criopreservação, podendo desencadear a cascata de apoptose que conduz a uma redução na sobrevivência e taxa de desenvolvimento de gametas e embriões (MARTINO et al., 2012). Embora o impacto do estresse oxidativo no oócito e na função reprodutiva não seja completamente compreendido, demonstrou-se que o mesmo afeta a homeostase do  $Ca^{2+}$  no oócito e, assim, também a maturação do oócito e interação oócito-espermatozoides (AGARWAL et al., 2012).

A produção de EROS é aumentada quando oócitos em maturação e embriões em estágio inicial de clivagem são expostos ao choque térmico *in vitro* (SAKATANI; KOBAYASHI; TAKASHI et al., 2004; NABENISHI et al., 2012). Além disso, Bernabucci et al. (2012) relataram que vacas da raça Holandesa expostas ao estresse térmico apresentaram aumento do estresse oxidativo. Resultados como esses sugerem ser possível melhorar as defesas antioxidantes e, assim, reduzir os efeitos do estresse térmico sobre a fertilidade. No entanto, a maioria das tentativas, nesse sentido, falharam, incluindo injeções

de vitamina E com ou sem selênio (ARÉCHIGA et al., 1998) e injeção de  $\beta$ -caroteno (PAULA-LOPES et al., 2003).

Ainda não há conhecimento suficiente sobre a suplementação antioxidante, a qual provavelmente é o meio mais eficaz para melhorar a fertilidade durante o estresse térmico (HANSEN, 2013). Existem indicações de que a administração crônica de antioxidantes, tais como a melatonina (GARCIA-ISPIERTO; ABDELFAH; LÓPEZ-GATIUS, 2013) pode melhorar a fertilidade, porém ainda há a necessidade de mais pesquisas (HANSEN, 2013). Perseguir essas e outras abordagens terapêuticas para reduzir as consequências do estresse térmico em espécies animais, deve ser prioridade, pelas perspectivas da continuação na mudança climática global (HANSEN, 2013). Igualmente importante é a elucidação dos mecanismos precisos, por meio dos quais o estresse oxidativo afeta o oócito (LIAN et al., 2013).

#### **2.4 Atividade mitocondrial nos oócitos**

As mitocôndrias têm sido objeto de um grande número de estudos e recentes evidências têm demonstrado a influência direta ou indireta da mesma na competência do oócito e desenvolvimento do blastocisto (CHAPPEL, 2013; MOUSSA et al., 2015). Além disso, são consideradas o local de expressão de marcadores que refletem a qualidade do oócito (MOUSSA et al., 2015). No entanto, sua contribuição na determinação da competência de desenvolvimento do oócito e produção de EROS em oócitos e embriões ainda não está totalmente esclarecida (MARTINO et al., 2013).

As mitocôndrias não se dividem, durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário, o que sugere que as de origem oocitária devem apresentar recurso de energia para o início da clivagem até que novas vias metabólicas sejam iniciadas (TARAZONA et al., 2006). Durante a maturação e

fertilização do oócito, alterações nucleares durante a maturação do oócito são coordenadas com movimentos de organelas e alterações bioquímicas no citoplasma para assegurar uma adequada fertilização e o desenvolvimento embrionário (LIU et al., 2010).

A maturação nuclear é relacionada com o aumento da atividade respiratória mitocondrial, aumento no número de locais ativos em cada mitocondria, além da alteração na distribuição mitocondrial (RUSSO et al., 2014), tornando-se difusa por todo o citoplasma (TARAZONA et al., 2006). Outros eventos de maturação que são dependentes da geração de ATP, como o rearranjo do citoesqueleto e a maturação nuclear e citoplasmática necessitam de alta atividade mitocondrial (WANG; LESSMAN, 2002; PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

No oócito não fertilizado e nos estágios iniciais de desenvolvimento durante a pré-implantação, as mitocondrias são a principal fonte de energia, por meio da produção de ATP pela fosforilação oxidativa via lactato e piruvato (LANE; GARDNER, 1998; DUMOLLARD et al., 2004; DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). Além disso, possuem ação na homeostase do íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e sinalização de transdução (BROOKES et al., 2004; DUMOLLARD et al., 2009) e apoptose (RAMALHO-SANTOS et al., 2009). A dependência de ATP por embriões no estágio inicial de desenvolvimento diminui depois da ativação do genoma, sendo que, durante esse período, a principal via utilizada é a glicólise anaeróbica (TURCOTTE, 2003).

Com o aumento da fosforilação para produção de ATP, ocorre o aumento da produção de EROS, o que torna as mitocondrias a principal fonte de EROS (CADENAS; DAVIES, 2000). Além disso, oócitos em MII em comparação com oócitos em VG tendem a aumentar o conteúdo de ATP e aumentar a produção intracelular de EROS (RUSSO et al., 2014). Dessa forma, a perturbação na atividade mitocondrial pode ocasionar aumento na produção de

EROS e liberação de citocromo c mitocondrial, que conduz a apoptose (BROOKES et al., 2004).

Uma variação significativa nas concentrações de EROS pode ser observada durante o processo de maturação, a qual pode ser atribuída a variações na atividade metabólica do oócito nas diferentes fases do processo de maturação, com participação ativa da cadeia respiratória (MORADO et al., 2009). Em oócitos e hepatócitos, a produção de EROS e aumento da respiração mitocondrial foram relacionados a um aumento da utilização do ATP resultante da atividade mitocondrial mais intensa, além disso, regiões produzindo altas concentrações de EROS foram colocadas com mitocôndrias (RAVAL et al., 2006; MARTINO et al., 2012).

O estresse oxidativo e os danos mitocondriais têm sido associados com o declínio da qualidade e do envelhecimento dos oócitos (ZANDER-FOX; LANE et al., 2012). O envelhecimento celular diminui a capacidade do oócito em reduzir o estresse oxidativo (SHIH et al., 2014; SILVA et al., 2015), o que tem sido proposto como uma das causas de diminuição do desenvolvimento embrionário (MEHAISEN et al., 2015). Portanto, a adição de antioxidantes ao meio de cultura pode ser o próximo passo na tentativa de resgatar a função mitocondrial e, por conseguinte, a produção de ATP (ZANDER-FOX; LANE et al., 2012), apoiando, dessa forma, o desenvolvimento embrionário (KUMAR et al., 2015; SILVA et al., 2015).

## **2.5 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I**

O ambiente do trato reprodutivo contém vários fatores de crescimento e moléculas que são responsáveis por regular o desenvolvimento embrionário (BLOCK, 2007). Entre tais moléculas, os fatores de crescimento desempenham

um papel importante por regular a mitogênese, a diferenciação, o metabolismo e a apoptose celular (DIAZ-CUETO; GERTON, 2001).

Apesar de suas ações no desenvolvimento embrionário inicial, fatores de crescimento não são rotineiramente incluídos na cultura de embriões (PAULA-LOPES et al., 2012). A falta de exposição a um fator de crescimento pode ser uma razão pela qual os embriões produzidos *in vitro* diferem dos cultivados *in vivo* em termos de metabolismo, expressão gênica, sobrevivência e desenvolvimento após transferência (KHURANA; NIEMANN, 2000; VAN WAGTENDONK LEEUW, 2000; BERTOLINI et al., 2002). Um fator de crescimento que modifica a fisiologia embrionária é o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), o qual apresenta efeitos benéficos sobre o desenvolvimento de embriões bovinos durante o CIV (BLOCK, 2007).

O IGF-I é um pequeno peptídeo formado de 70 aminoácidos com uma massa molecular de 7649 daltons (LARON, 2001), sendo um dos dois ligantes do sistema IGF (IGF-I, IGF-II), que também inclui dois receptores (IGF-IR, IGF-IIR) (VELAZQUEZ et al., 2009). O receptor tipo I (IGF-IR) medeia a maioria das ações do IGF-I e II, sendo a afinidade desse receptor para IGF-I um pouco maior do que para o IGF-II. Os efeitos do IGF-II são provavelmente mediados por meio dos receptores de IGF-I. O receptor tipo II liga-se ao IGF-II, porém, ao IGF-I com uma afinidade muito baixa (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009). Para se controlar a biodisponibilidade de IGF-I e II, há seis proteínas de ligação de IGF (IGFBP), que se ligam a IGF-I e II com alta afinidade (MONGET et al., 2002, Figura 1). Recentemente, a existência de um terceiro ligante, denominado IGF-III, foi demonstrado em peixes. A expressão de mRNA do IGF-III parece ser restrita a células somáticas, células da granulosa no ovário e células intersticiais do testículo (REINECKE, 2010).

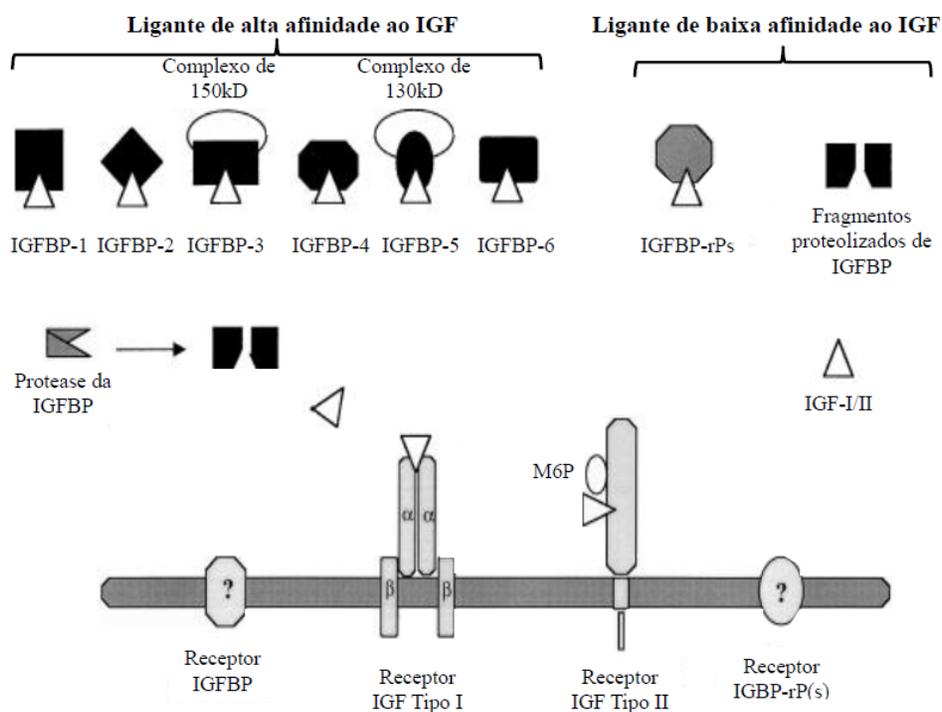


Figura 1 O sistema IGF. Os componentes desse sistema incluem os peptídeos IGF-I e II, IGFBP-1 a -6, IGFBP-rPs, protease das IGFBP(s), receptores do IGF tipo I e II e potenciais receptores IGFBP(s) e IGFBP-rP(s). M6P, Manose-6-fosfato

Fonte: Adaptado de Hwa, Oh e Rosenfeld (1999).

Os IGF-I e II desempenham múltiplos papéis no metabolismo celular, auxiliando o crescimento, a proliferação e a diferenciação de muitos tipos de células, a maturação do oócito, o desenvolvimento embrionário e também aumentando o número de células totais em blastocistos (SATRAPA et al., 2011; SARTORI et al., 2013; MEIUY; LIU; ROTH, 2015; ARAT et al., 2015).

O sistema IGF tem importante papel no crescimento folicular, por meio da estimulação da proliferação das células da granulosa e do sinergismo com as gonadotrofinas, para promover a diferenciação das células foliculares (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011). Efeitos mitogênicos e,

principalmente, antiapoptóticos induzidos pelo IGF-I têm sido relatados em embriões bovinos em fase de pré-implantação (MATSUI et al., 1997, VELAZQUEZ et al., 2009; VELAZQUEZ et al., 2011).

A adição de IGF-I ao meio de cultivo pode alterar a abundância de alguns genes relacionados ao desenvolvimento (BLOCK; HANSEN, 2007), reduzir a proporção de blastômeros apópticos (BLOCK et al., 2003), aumentar o número de células do blastocisto, a resistência ao choque térmico celular e o desenvolvimento de embriões bovinos para o estágio de blastocisto (SIRISATHIEN; BRACKETT, 2003; JOUSAN; HANSEN, 2007; BLOCK; HANSEN, 2007).

Foi demonstrado que a exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico diminui os níveis circulantes de IGF-I, levando ao comprometimento da qualidade oocitária (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). No entanto, o aumento das taxas de prenhez na transferência de embriões, durante o verão, pode ser obtido pela exposição dos embriões ao IGF-I, durante o cultivo, antes da transferência (BLOCK; HANSEN, 2007).

O tratamento de mórulas bovinas com IGF-I reduziu os efeitos deletérios do choque térmico no que se refere ao desenvolvimento ao estágio de blastocisto e à apoptose (JOUSAN; HANSEN, 2004; JOUSAN; HANSEN, 2007). Assim, a suplementação de IGF-I no meio de cultivo pode alterar os processos de desenvolvimento, resultando em blastocistos com maior capacidade de sobrevivência, durante o estresse térmico. Outra possibilidade é a de que embriões tratados com IGF-I possam superar alterações uterinas e no concepto causadas pelo estresse térmico (BLOCK, 2007). Uma possibilidade é a de que as ações do IGF-I no desenvolvimento *in vitro* do embrião podem auxiliar no desenvolvimento do concepto e ou secreção hormonal, durante o reconhecimento materno da prenhez, quando o embrião sofre alongamento e libera interferon-tau (IFN-t) (BLOCK et al., 2007).

É possível que o IGF-I exerça um papel termoprotetor nos oócitos em fase de vesícula germinativa expostos à temperatura elevada, reduzindo a morte celular e promovendo o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (PAULA-LOPES, 2012). A ação benéfica do IGF foi demonstrada quando o fator foi adicionado ao meio de CIV (100 ng/mL) de embriões bovinos expostos ao choque térmico (JOUSAN; HANSEN et al., 2004). Nesse estudo, houve melhoria do desenvolvimento embrionário, com o aumento no número total de células e redução no número de blastômeros apoptóticos.

Estudos avaliando a adição de IGF-I ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico relataram que a adição de 100 ng/mL reverteu os efeitos da temperatura elevada na indução da apoptose e atividade mitocondrial (ISPADA et al, 2010, 2011). No entanto, Risolia et al. (2011) relataram que a concentração de 100 ng/mL não foi capaz de se contrapor aos efeitos negativos do choque térmico no desenvolvimento ao estágio de blastocisto. Experimentos com FIV demonstraram que a exposição *in vivo* de oócitos bovinos a concentrações suprafisiológicas de IGF-I induziu alterações na expressão de genes importantes para o desenvolvimento pré-implantacional de embriões produzidos *in vitro* (OROPEZA et al., 2004; ZARAZA et al., 2010).

Moss, Lima e Paula-Lopes (2009) avaliaram o efeito do IGF-I na redução do efeito da menadiona, uma naftoquinona utilizada como fonte de vitamina K na alimentação animal, a qual pode gerar EROS e ocasionar a apoptose. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual o IGF-I protege os embriões dos efeitos da menadiona envolve a inibição dos efeitos ocasionados pelas EROS, como a apoptose, e não por meio do bloqueio de sua produção. É possível, no entanto, que a inibição da apoptose não seja o único mecanismo envolvido por IGF-I para a proteção embrionária (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009). Em embriões expostos ao choque térmico, o IGF-I reduz as células apoptóticas, por meio da ativação da via fosfatidil 3-quinase/Akt (JOUSAN;

HANSEN, 2004, 2007). Outro possível mecanismo pelo qual o IGF-I pode reduzir as consequências das EROS seria por meio do aumento da síntese da proteína p53. Essa proteína pode ser translocada para a mitocôndria em resposta às EROS e pode interagir com a DNA-polimerase c mitocôndrial, resultando no aumento da replicação mitocôndrial (ACHANTA et al., 2005). Evidências sugerem que as mitocôndrias são mais ativas nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário bovino (TARAZONA et al., 2006), sendo que o aumento da presença de mitocôndrias ativas pode aumentar a resposta dos radicais livres ao choque térmico (HANSEN, 2007).

Além disso, o IGF-I pode bloquear os efeitos de  $H_2O_2$  sobre o desenvolvimento de embriões de camundongos (KURZAWA et al., 2002). Esse resultado pode ser decorrente da ação estimulatória do IGF-I na produção de enzimas antioxidantes.

Os mecanismos celulares pelos quais a temperatura elevada e o IGF-I afetam a competência dos oócitos expostos ao estresse térmico não são totalmente compreendidos (MEIUY; LIU; ROTH, 2014; MOUSSA et al., 2015). Uma melhor compreensão das respostas fisiológicas de oócitos submetidos ao estresse térmico pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na termoproteção, permitindo, assim, o desenvolvimento de novas estratégias para reverter os efeitos do estresse térmico na produção *in vitro* (PIV) de embriões.

## **2.6 Ação antioxidante da Melatonina**

Antioxidantes vêm sendo utilizados por diversos sistemas de PIV de embriões com o intuito de minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de radicais livres (TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014; CHEUQUEMÁN et al., 2015). Nesse contexto, a melatonina é uma alternativa por apresentar mecanismos antioxidantes e capacidade antiapoptótica (TIAN et al., 2014). A

melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina) é uma pequena indoleamina lipofílica produzida a partir do triptofano na glândula pineal de maneira circadiana em mamíferos (REITER, 1991; REITER; TAN; KORKMAZ, 2009; KUMAR et al., 2015).

A melatonina tem efeito multifatorial nos animais (GARCIA-IPERTO; ABDELFAH; LÓPEZ-GATIUS, 2013). Modula o ritmo circadiano (GILLETTE; TISCHKAU, 1999), a reprodução (ASHRAFI; KOHRAM, H.; ARDABILI, 2013) e os sistemas neuroendócrino, imunológico e cardiovascular (CARDINALI; PEVET, 1998; REITER; TAN; KORKMAZ, 2009; ASHRAFI; KOHRAM, H.; ARDABILI, 2013). Além da sua atuação sistêmica, estudos têm sugerido sua atuação na fisiologia ovariana, uma vez que foram detectadas altas concentrações de melatonina no fluido folicular e a presença de seus receptores em células foliculares (ROCHA, 2011). O equilíbrio entre EROS e antioxidantes no interior do folículo, parece ser crítico para a função do oócito e células da granulosa e evidências têm demonstrado que a melatonina está envolvida na proteção dessas células (CRUZ et al., 2014a).

A melatonina e seus metabolitos são considerados poderosos antioxidantes indiretos, sequestradores de radicais livres diretos, imunoestimuladores e citoprotetores (SCHAFFAZICK et al., 2005; ADRIAENS et al., 2006; KANG et al., 2009), além de atuar na preservação mitocondrial (JOU et al., 2010). A melatonina atua eliminando diretamente diferentes tipos de radicais livres como o  $O_2$ ,  $H_2O_2$ , ácido hipocloroso, óxido nítrico e ânion peroxinitrito (HARDELAND, 2005). No entanto, recentes estudos *in vitro* têm demonstrado que a melatonina pode apresentar atividade pró-oxidante (BEJARANO et al., 2011; GIRISH et al., 2013).

A melatonina é considerada uma molécula altamente eletroreativa que atua como um poderoso doador de elétrons, neutralizando EROS e ERNS (VIJAYALAXMI et al., 2004). Além disso, a melatonina estimula várias

enzimas antioxidantes incluindo SOD, GPx, catalase, glutatona redutase e ligase glutamil glicina (REITER et al., 2013; KUMAR et al., 2015). Estudos têm mostrado que a melatonina melhora os níveis intracelulares de glutatona, por estimular a enzima limitante de sua biossíntese,  $\gamma$ -glutamilsteína sintetase (ROCHA et al., 2011). Por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e redução da atividade de pró-oxidantes, a melatonina atua na redução dos danos ao DNA nuclear e protege a membrana lipídica de danos oxidativos (peroxidação lipídica), melhorando a capacidade de defesa antioxidante total do organismo (REITER; TAN; KORKMAZ, 2009; WANG et al., 2013).

Ademais, a melatonina age como um hormônio antiapoptótico, por meio da inibição da liberação do citocromo c, da inibição e indução da expressão das proteínas pró-apoptótica Bax e antiapoptótica Bcl-2, respectivamente. A melatonina também pode atuar por meio da inibição da ativação das caspases -9 e -3 (BAYDAS et al., 2005).

Sua ação protetora foi descrita para diferentes biotecnologias reprodutivas em bovinos (CEBRIAN-SERANO et al., 2013; WANG et al., 2014; TIAN et al., 2014), ovinos (CASAO et al., 2010), suínos (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007) e bubalinos (MANJUNATHA et al., 2009). Alguns estudos têm focado no papel direto da melatonina na maturação do oócito e luteinização de células da granulosa, utilizada como antioxidante com a função de reduzir o estresse oxidativo induzido por EROS (TAMURA et al., 2013). Existem evidências de que a melatonina pode melhorar a função do ovário e a sobrevivência embrionária *in vitro* (SHI et al., 2009), sendo que a maioria dos estudos avaliaram as ações de melatonina durante a cultura de embriões (TAKADA et al., 2012).

El-Raey et al. (2011) demonstraram que suplementação de melatonina, em concentrações de 10 e 50 ng/mL durante o processo de MIV teve um efeito

positivo na qualidade de oócitos bovinos. A suplementação afetou a progressão nuclear de oócitos bovinos, o que resultou em alta frequência de oócitos MII após 22 horas de MIV. A suplementação de melatonina também resultou redução de EROS nos oócitos, aumento das taxas de oócitos com mitocôndrias dispersas no citoplasma e células do cumulus expandidas. De maneira similar, Takada et al. (2012) observaram que a adição de melatonina, durante a MIV de oócitos bovinos, protegeu as CCs de danos ao DNA, mas esse efeito não influencia o desenvolvimento do embrião *in vitro*.

A adição de melatonina na dosagem de 1 µg/mL ao meio CIV de embriões ovinos aumentou a taxa de embriões eclodidos e diminuiu a taxa de degenerados, aumentando a sobrevivência embrionária (ABECIA; FORCADA; ZUNIGA, 2002). A MIV de oócitos bubalinos com melatonina (20 e 50 µM), resultou em aumento da taxa de maturação nuclear, danos ao DNA e peroxidação lipídica e produção embrionária (MANJUNATHA et al., 2009). A suplementação *in vivo* de caprinos com melatonina (3,0 mg) auxiliou o crescimento folicular e a qualidade oocitária, avaliada pela competência de desenvolvimento dos oócitos, com maior taxa de clivagem e formação de blastocistos (BERLINGUER et al., 2009).

Em estudo *in vivo*, Garcia-Ispierto, Abdelfatah e López-Gatius (2013) observaram que a administração de implantes de melatonina começando aos 220 dias de gestação para vacas, durante o verão, reduziu o intervalo de concepção no período pós-parto subsequente e diminuiu a incidência de vacas que apresentaram mais que três serviços por concepção. Recentemente Cebrian-Serrano et al. (2013) avaliaram a suplementação de melatonina ao meio de CIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Nesse estudo, a suplementação resultou em aumento da taxa de produção de blastocistos, mas a qualidade oocitária não foi avaliada.

Em razão desses fatores, a utilização da melatonina é uma estratégia promissora para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas submetidas a estresse térmico (DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015), no entanto, seus efeitos, bem como o seu mecanismo de ação relacionados a maturação e o desenvolvimento do embrião ainda necessitam de maior compreensão (PAULA-LOPES et al., 2013; CRUZ et al., 2014b).

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estresse térmico é um dos fatores ligados à redução da eficiência reprodutiva mais estudados nos últimos anos. A utilização da técnica de PIV de embriões tem possibilitado o estudo dos mecanismos pelos quais a temperatura elevada influencia negativamente a viabilidade de oócitos embriões bovinos. Uma das principais causas da redução da fertilidade é a produção excessiva de EROS pelas células, que possuem potencial para danificar oócitos e embriões. No entanto, apesar dos estudos realizados, poucas são as alternativas para reduzir a produção e ação das EROS. Portanto, a realização de estudos com o intuito de aprimorar os meios de MIV, FIV e CIV por meio da adição de substâncias e a criação de protocolos de utilização podem ser uma alternativa.

Sendo assim, os presentes estudos têm como objetivo colaborar com a compreensão da atuação do IGF-I e da melatonina durante a MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Dessa forma, os resultados da presente pesquisa poderão ser utilizados de forma rotineira em laboratórios comerciais além de servir de base para posteriores pesquisas.

## REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonin on secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 151-158, Mar. 2002.
- ACHANTA, G. et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gama. **EMBO Journal**, Oxford, v. 24, n. 19, p. 3482-3492, Oct. 2005.
- ADRIAENS, I. et al. Melatonin has dosedependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, Limerick, v. 228, n. 2-3, p. 333-343, Dec. 2006.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S.l.], v. 10, n. 49, June 2012.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holsteins cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 390-396, Feb. 2002.
- AL-HAIDARY, A. et al. Thermoregulatory ability of beef heifers following intake of endophyte-infected tall fescue during controlled heat challenge. **Journal of Animal Science**, Champaign, 79, p. 1780-1788, July 2001.
- ANDREU-VAZQUEZ, C. et al. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 293-299, Nov. 2010.
- ARAT, S. et al. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of cloned bovine embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 7, p. 1-9, Oct. 2015.
- ARÉCHIGA, C. F. et al. Effects of timed insemination and supplemental  $\beta$ -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 390-402, Feb. 1998.
- ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved

bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 139, n. 1-4, p. 25-30, June 2013.

BAYDAS, G. et al. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. **Neuroscience**, Oxford, v. 135, n. 3, p. 879-886, 2005.

BEJARANO, I. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 108, n. 1, p. 14-20, Jan. 2011.

BERLINGUER, F. et al. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 46, n. 4, p. 383-391, May 2009.

BERTOLINI, M. et al. Growth, development, and gene expression by in vivo and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 63, n. 3, p. 318-328, Nov. 2002.

BERNABUCCI, U. et al. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2173-2179, Sept. 2002.

BLOCK, J. et al. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n.6, p. 1590-1602, June 2003.

BLOCK, J. et al. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to Day 14 of gestation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n. 2, p. 153-161, July 2007.

BLOCK, J. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n. 1, p. 49-55, Sept. 2007.

BLOCK, J.; HANSEN, P. J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 9, p. 1518-1529, June 2007.

BLOCK, J. et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 75, n. 5, p. 895-903, May 2008.

BRAD, A. M.; HANSEN, P. J. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of events leading to caspase 9 activation and to group II caspase-mediated DNA damage. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 23, 2006. Preprint.

BROOKES, P. S. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 287, n. 4, p. C817-C833, Oct. 2004.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, Aug. 2000.

CARDINALI, D. P.; PEVET, P. Basic aspects of melatonin action. **Sleep Medicine Reviews**, [Philadelphia], v. 2, n. 3, p. 175-190, Aug. 1998.

CASAO, A. et al. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. **Spanish Journal Agricultural Research**, Madrid, v. 8, n. 1, p. 35-41. Jan. 2010.

CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **Obstetrics and Gynecology International**, Cambridge, v. 2013, n. 1, 2013.

CEBRIAN-SERRANO, A. et al. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 738-746, Oct. 2013.

CHEUQUEMÁN, C. et al. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. **Andrologia**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 604-615, Aug. 2015.

CHOSHNIAK, I. et al. Blood flow and catecholamine concentration in bovine and caprine skin during thermal sweating. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 37-42, 1982.

CRUZ, M. H. C. et al. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. **Theriogenology**, Stoneham v. 82, n. 7, p. 925-932, Oct. 2014a.

CRUZ, M. H. C. et al. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos, p. A brief review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 150-160, Mar. 2014b.

DE RENSIS F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 6, p. 1139-51, Oct. 2003.

DE RENSIS F.; GARCIA-ISPIERTO I.; LÓPEZ-GATIUS F. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 84, n. 5, p. 659-666, Sept. 2015.

DIAZ-CUETO, L.; GERTON, G. L. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. **Archives of Medical Research**, Ciudad de Mexico, v. 32, n. 6, p. 619-626, Nov./Dec. 2001.

DU PLESSIS, S. S. et al. Impact of oxidative stress on IVF. **Expert Review of Obstetrics and Gynecology**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 539-554, 2008.

DUMOLLARD, R. et al. Sperm-triggered [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 13, p. 3057-3067, July 2004.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 77, p. 21-49, 2007.

DUMOLLARD, R. et al. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, 20, n. 3, p. 346-353, May 2009.

EDWARDS, J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4326-4333, Dec. 2005.

EDWARDS, J. L. et al. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 48, n. 1, p. 25-33, Sept. 1997.

EL-RAEY, M. et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 78, n. 4, p. 250-262, Apr. 2011.

FERREIRA, R. M. et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, May 2011.

FISHER, P. R. et al. Oxidative metabolism and heat shock-enhanced chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*. **Journal Cell Science**, v. 99, p. 741-750, 1991.

GARCIA-ISPIERTO, I.; ABDELFAH, A.; LÓPEZ-GATIUS, F. Melatonin treatment at dry-off improves reproductive performance postpartum in high-producing dairy cows under heat stress conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 577-583, Aug. 2013.

GENDELMAN, M. et al. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, Cambridge, v. 140, n. 1, p. 73-82, July 2010.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 1-9, Jan. 2012.

GILLETTE, M. U.; TISCHKAU, S. A. Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 54, p. 33-58, Feb. 1999.

GIRISH, K. S. et al. Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 438, n. 1, p. 198-204, Aug. 2013.

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 7, p. 873-877, July 1973.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 349-360, July 2004.

HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, suppl. 1, p. S242-S249, Sept. 2007.

HANSEN, P. J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 322-333, July/Sept. 2013.

HANSEN, J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 27, n. 1, p. 22-30, Dec. 2014.

HWA, V.; OH, Y.; ROSENFELD, R. G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 20, n. 6, p. 761-787, Dec. 1999.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C. F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, suppl. 2, p. 36-50, 1999.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, Nov. 2009.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 119-130, July 2005.

ISPADA, J. et al. The role of insulin-like growth factor-I on inhibition of heat-induced apoptosis in bovine oocytes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 3., 2010, Águas de São Pedro. **Proceeding...** Águas de São Pedro: CBRA, 2010.

ISPADA, J. et al. Insulin-like growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 24, n. 1, p. 209, Nov. 2011.

JOUSAN F. D.; HANSEN P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 5, p. 1665-1670, Nov. 2004.

JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. Insulin-Like Growth Factor-I Promotes Resistance of Bovine Preimplantation Embryos to Heat Shock Through Actions Independent of its Anti-Apoptotic Actions Requiring PI3K Signaling. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, n. 2, p. 189-196, Feb. 2007.

JOU, M. et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 20-38, Jan. 2010.

JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, n. 3, p. 336-340, July 1999.

JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 79-90, Apr./June 2005.

JU, J. C. et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, n.8, p. 1677-1689, Nov. 2005.

KANG, J. T. et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 46, n.1, p. 22-28, Jan. 2009.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 4, p. 847-856, Apr. 2000.

KUMAR, A. et al. Sustained delivery of exogenous melatonin influences biomarkers of oxidative stress and total antioxidant capacity in summer-stressed anestrus water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 83, n. 9, p. 1402-1407, June 2015.

KURZAWA, R. et al. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. **Reproductive Biology**, v. 2, n. 2, p. 143-62, July 2002.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, Feb. 1999.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 150-158, July/Sept. 2014.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 991-997, Apr. 1998.

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, n. 5, p. 311-316, Oct. 2001.

LIAN, H. Y. et al. Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 146, n. 6, p. 559-68, Oct. 2013.

LIMA, R. S. et al. Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em embriões bovinos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 257-264, 2013.

LIU, S. et al. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 95, n. 5, p. 1550-1555, Mar. 2010.

LUBLIN, A.; D. WOLFENSON. Lactation and pregnancy effects on blood flow to mammary and reproductive systems in heat-stressed rabbits. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, New York, v. 115, n. 4, p. 277-285, Dec. 1996.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. J. Growth rates of follicles in the ovary of cow. **Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 301-307, Nov. 1987.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 125, n. 3, p. 376-393, Mar. 2010.

MANJUNATHA, B. M. et al. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on Buffalo in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 12-16, Feb. 2009.

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

MARTINO, N. A. et al. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. **Reproduction Biology and Endocrinology**, [S.l.], v. 3, p. 11-27, Apr. 2013.

MATSUI, M. et al. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, n. 4, p. 605-616, Sept. 1997.

MAYA-SORIANO, M. J. et al. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 2, p. 299-305, Jan. 2013.

MEHAISEN, G. M. et al. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: morphological and molecular aspects. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, p. 1-16, Oct. 2015.

MEIYU, Q.; LIU, L.; ROTH, Z. IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 514-524, Aug. 2015.

MONGET, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 23, n. 1-2, p. 139-154, July 2002.

MONTERROSO, V. H. et al. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, n. 7, p. 947-961, Nov. 1995.

MORADO, S. A. et al. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 21, n. 4, p. 608-614, 2009.

MOSS, J. I.; PONTES, E.; HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Archives of Toxicology**, New York, v. 83, n. 11, p. 1001-1007, Nov. 2009.

MOUSSA, M. et al. Maternal control of oocyte quality in cattle “areview”. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 155, p. 11-27, Jan. 2015.

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

OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, R. M.; MINGOTI, G. Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 418-432, out./dez. 2011.

OROPEZA, A. et al. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1634-1643, June 2004.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, Apr. 2002.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 7, p. 2343-2351, July 2003.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Heat shock-induced damage in bovine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 43, p. 208, 2008.

PAULA-LOPES, F. F. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 395-403, July/Sept. 2012.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Physiology and Endocrinology Symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 3, p. 1143-1153, Mar. 2013.

PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, Oct. 2004.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [Philadelphia], v. 145, n. 1-2, p. 27-37, Oct. 1998.

PUTNEY, D. J. et al. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 717-728, Oct. 1988.

RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 553-572, Sept./Oct. 2009.

RAVAL, J, et al. Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 41, n. 11, p. 1645-1654, Dec. 2006.

REINECKE, M. Insulin-like growth factors and fish reproduction. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 656-661, Apr. 2010.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 12, n. 2, p. 151-180, May 1991.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; KORKMAZ, A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. **Journal of Hypertension**, London, v. 27, n. 6, p. S17-S20, Aug. 2009.

REITER, R. J. et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 373-384, Mar. 2013.

RISOLIA, P. H. B. et al. O papel do fator de crescimento semelhante a insulina-I na competência de oócitos bovinos expostos ao estresse térmico *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 25., 2011, Cumbuco. **Anais...** Cumbuco: Acta Scientiae Veterinariae, 2011.

RISPOLI, L. A. et al. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**, Cambridge, v. 146, n. 2, p. 193-207, Aug. 2013.

RIVERA, R. M. et al. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically relevant heat shock. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 6, p. 2068-2077, Dec. 2003.

RIVERA, R. M. et al. Reorganization of microtubules and microfilaments by thermal stress in two-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1852-1862, June 2004.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 1, p. 107-115, Jan. 2001.

ROBERTSHAW, D. Temperature regulation and the thermal environment. In: REECE, W. O. (Ed.). 12th ed. **Dukes' Physiology of Domestic Animals**. Ithaca: Cornell University Press, 2004.

ROCHA, R. M. P. et al. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 147-157, 2011.

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

ROMAN-PONCE, H. et al. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 46, n. 1, p. 175-180, Jan. 1978.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 6, p. 1898-1906, Dec. 2004.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, Cambridge, v. 129, n. 2, p. 235-244, Feb. 2005.

RUSSO, R. et al. Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after in vitro maturation. **Reproduction Biology and Endocrinology**, [S.l.], v. 18, n. 12, p. 16, Feb. 2014.

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

SARTORI, R. et al. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, n. 3, p. 199-205, July/Sept. 2013.

SATRAPA, R. A. et al. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, n. 6, p. 1162-1167, Oct. 2011.

SCHAFFAZICKS, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 289, n. 1-2, p. 209-213, Jan. 2005.

SHI, J. M. et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 47, n. 4, p. 318-323, Nov. 2009.

SHIH, Y. F. et al. Effects of reactive oxygen species levels in prepared culture media on embryo development: a comparison of two media. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 4, p. 504-508, Dec. 2014.

SILVA, E. et al. Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, Mar. 2015. Preprint.

SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 8, p. 1193-208, May 2009.

SILVA, C. F. **Efeito do estresse térmico calórico na expressão de alguns genes relacionados à implantação e desenvolvimento inicial de embriões Nelore (bosindicus) e Jersey (bostaurus) produzidos in vitro**. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

SILVA, C. F. et al. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 2, p. 351-357, Jan. 2013.

SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. G. Tunel analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 65, n. 1, p. 51-56, May 2003.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, May 2004.

TAKADA, L. et al. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 393-398, Aug. 2010.

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

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

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 92, n. 1, p. 328-343, July 2009.

TAMURA, H. et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2013.

TARAZONA, A. M. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 5-11, Feb. 2006.

TIAN, X. Z. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 57, n. 3, p. 239-247, Oct. 2014.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 2, p. 155-166, Jan. 2008.

TURCOTTE, L. Mitochondria: biogenesis, structure, and function-Symposium introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Hagerstown, v. 35, n. 1, p. 82-85, Jan. 2003.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organisation, ATP content and competence. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 2621-2633. Dec. 2000.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. E. et al. Effects of different reproduction techniques, p. AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 2, p. 575-597, Jan. 2000.

VELAZQUEZ, M. A. et al. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. **Reproduction**, Cambridge, v. 137, n. 2, p. 161-180, Feb. 2009.

VELAZQUEZ, M. A. et al. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 91-103, Jan. 2011.

VELEZ-PARDO, C. et al. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 7, p. 1285-1296, Apr. 2007.

VIJAYALAXMI et al. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology: Biology Physics**, New York, v. 59, n. 3, p. 639-653, July 2004.

WAKEFIELD, S. L. et al. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. **American Journal Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 294, n. 2, p. e425-e434, Feb. 2008.

WANG, T.; LESSMAN, C. A. Isoforms of soluble alpha-tubulin in oocytes and brain of the frog (genus *Rana*): changes during oocyte maturation. **Cell and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, n. 12, p. 2216-2223, Dec. 2002.

WANG, F. et al. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. **PloS One**, San Francisco, v. 9, p. 1-7, 2014.

WANG, F. et al. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 55, n. 3, p. 267-274, Oct. 2013.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, [Oxford], v. 64, p. 141-163, 2007.

ZANDER-FOX, D.; LANE, M. The future of human embryo culture media-or have we reached the Ceiling? In: YAMADA, S.; TAKAKUWA, T. (Ed.). **The Human Embryo**. Rijeka: INTECH, 2012. cap. 5. p. 73-98.

ZARAZA, J. et al. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 1, p. 75-89, July 2010.

ZHANG, H. et al. Improving development of cloned goat embryos by supplementing a-lipoic acid to oocyte in vitro maturation médium. **Theriogenology**, Stoneham, v. 80, n. 3, p. 228-233, Aug. 2013.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Adição de IGF-I ao meio de maturação e qualidade de oócitos  
bovinos submetidos ao choque térmico**

Artigo que segue as normas e formato do periódico *Reproduction, Fertility and  
Development*. \*

\*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da  
revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

**Adição De IGF-I ao Meio de Maturação e Qualidade de Oócitos Bovinos  
Submetidos ao Choque Térmico**

**Título curto:** IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

**I J Ascari<sup>1</sup>, N G Alves<sup>1</sup>, J Jasmin<sup>2</sup>, R R Lima<sup>3</sup>, C C R Quintão<sup>4</sup>, P F Pinto<sup>5</sup>,  
L S A Camargo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

**Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito termoprotetor e antioxidante do IGF-I sobre a maturação de oócitos submetidos ao choque térmico e o subsequente desenvolvimento *in vitro*. Duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5 °C ou choque térmico: 12 horas a 41 °C seguido por 12 horas a 38,5 °C) e três concentrações de IGF-I (0, 25 e 100 ng/mL) foram adicionados ao meio MIV de oócitos provenientes de ovários de abatedouro. Não houve interação entre condição de incubação e concentração de IGF-I. A adição de IGF-I não alterou a taxa de maturação nuclear e de oócitos TUNEL-positivos, a atividade de enzima caspase-3, a taxa de blastocisto no dia sete e no dia 8, o número total de células e a taxa de massa celular interna (MCI). Porém, a atividade mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) foram aumentadas no oócito, enquanto a taxa de células apoptóticas da MCI foi reduzida pela adição de IGF-I. O choque térmico aumentou a porcentagem de oócitos TUNEL-positivos, aumentou a produção de EROS e reduziu a atividade mitocondrial. Em conclusão, era esperado que a suplementação de IGF-I apresentasse efeito antioxidante, no entanto, esse efeito não foi observado, além disso, o aumento de EROS sugeriu um aumento no estresse oxidativo, contudo melhorou a qualidade embrionária, por meio da redução da apoptose celular.

**Palavras-chave:** termoproteção, produção *in vitro* de embriões, estresse térmico, qualidade embrionária

## Introdução

A hipertermia afeta diretamente a fisiologia reprodutiva (Moussa *et al.* 2015), sendo que entre todas as funções fisiológicas dos mamíferos, essa é considerada a mais susceptível (Hansen, 2015). A maior parte dos efeitos do estresse térmico sobre o estabelecimento e a manutenção da prenhez envolve mudanças na função ovariana, que reduzem a competência do oócito em ser fertilizado e o desenvolvimento embrionário (Hansen *et al.* 2013).

Muitos dos efeitos do estresse térmico sobre os oócitos e embriões envolvem ações diretas da temperatura elevada na função celular (Hansen, 2015), afetando os eventos necessários para a maturação do oócito, fertilização e capacidade de desenvolvimento do embrião (Paula-Lopes *et al.* 2012; 2013; Moussa *et al.* 2015). A redução da função do oócito bovino induzida pelo estresse térmico ocorre em razão de uma série de alterações celulares que afetam a função nuclear e os compartimentos celulares (Paula-Lopes *et al.* 2012). A exposição de oócitos à temperatura elevada, durante a maturação *in vitro* (MIV), pode afetar a maturação nuclear (Nabenishi *et al.* 2012), a formação do fuso, a organização de microtúbulos (Ju *et al.* 2005), a atividade mitocondrial (Paula-Lopes *et al.* 2013), além de induzir a apoptose (Roth; Hansen, 2004) e a formação de radicais livres (Tamura *et al.* 2013).

A relação entre a qualidade do oócito e a eficiência reprodutiva tem sido demonstrada e, em razão disso, a melhor compreensão dos mecanismos básicos pelos quais o estresse térmico compromete o oócito é importante para o desenvolvimento de soluções práticas para amenizar seus efeitos na fertilidade (Edwards *et al.* 2009; Grimard *et al.* 2013; Meiyu *et al.* 2014). Recentemente, o papel termoprotetor de moléculas como IGF-I tem sido relatado, reduzindo os danos celulares ocasionados pelo calor em oócitos e embriões (Paula-Lopes *et al.*, 2013). Os IGFs desempenham múltiplos papéis no metabolismo celular,

auxiliando o crescimento, a proliferação e a diferenciação de muitos tipos de células, a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário, com o aumento do número de células totais em blastocistos em estado inicial expostos ao estresse (Satrapa *et al.* 2011; Sartori *et al.* 2013). No entanto, os mecanismos celulares pelos quais a temperatura elevada e o IGF-I afetam a competência de oócitos não são totalmente compreendidos (Meiuy *et al.* 2014; Moussad *et al.* 2015).

Quando adicionado ao meio de cultura, o IGF-I reduziu o efeito prejudicial do peróxido de hidrogênio no desenvolvimento de embriões de camundongos que foram submetidos ao estresse oxidativo durante o CIV (Kurzawa *et al.*, 2004). O resultado sugeriu a existência de um possível efeito antioxidante direto ou indireto do IGF-I, pelo qual pode haver melhoria da qualidade embrionária. No entanto, o efeito antioxidante do IGF-I em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico ainda não foi avaliado.

Além dos fatores expostos acima, observa-se a necessidade de avaliar concentrações de IGF-I mais próximas às encontradas no líquido folicular (17 ng/mL; Ginther *et al.* 2002). Isso se deve ao fato de que a concentração utilizada na MIV e CIV (100 ng/mL), na grande maioria dos estudos, tem apresentado resultados contraditórios (Jousan e Hansen *et al.*, 2004; Zhandi *et al.*, 2009). Além disso, oócitos bovinos expostos a concentrações elevadas de IGF-I (1000 ng/mL) tiveram reduzido desenvolvimento embrionário *in vivo* (Velazquez *et al.* 2011). Assim, o uso de concentrações próximas às fisiológicas pode apresentar melhores resultados na qualidade e na produção de embriões. Objetivou-se, neste estudo, avaliar o efeito termoprotetor e antioxidante do IGF-I adicionado ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre a qualidade dos oócitos e a competência de desenvolvimento a blastocistos, bem como a qualidade dos embriões produzidos.

## Material e métodos

Os métodos e procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras, registrado sob o número de protocolo 10/2015.

### *Recuperação, classificação e maturação dos oócitos*

O experimento foi conduzido na Embrapa – Unidade de Pesquisa em Juiz de Fora (MG, Brasil). Foram utilizados ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) provenientes de abatedouro. Os ovários foram removidos, aproximadamente, 15 minutos após o abate do animal, no momento da evisceração e depositados em recipientes isotérmicos, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), acrescida de antibiótico (0,05 g/litro de sulfato de estreptomicina) à temperatura de 35°C. O tempo decorrido entre a coleta dos ovários e sua chegada ao laboratório foi de aproximadamente 1 hora.

No laboratório, os ovários foram lavados e mantidos a 37°C em banho-maria. Foram aspirados folículos com diâmetro entre três e oito mm com o auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha 18g. O conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico estéril imerso em banho-maria (35 °C). Após 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado em meio TALP-HEPES (Gordon, 2004) e vertido em placa de Petri descartável de 100 x 20 mm. Foram selecionados os complexos cumulus-oócitos (CCOs) que apresentaram citoplasma homogêneo com, no mínimo, três camadas de células (Sugima *et al.*, 2007).

Os CCOs selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-HEPES e uma vez em meio MIV TCM 199 (Tissue Culture Medium 199 – Invitrogen, São Paulo, BR) suplementado com 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH, Pluset<sup>®</sup>, Hertape Calier, Juatuba, MG, BR) e soro inativado

de vaca em cio (10%). Três meios de MIV foram elaborados: sem adição de IGF-I ou acrescido de IGF-I nas concentrações de 25 ou 100 ng/mL. Os meios, preparados com duas horas de antecedência, foram mantidos a 38,5 °C em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> (Pereira et al., 2010). A maturação ocorreu em placa de cultivo do tipo Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), em poços contendo 400 µL de meio de maturação e 30 a 40 CCOs por poço.

O delineamento utilizado foi o de Blocos Casualizados (DBC) e as fases experimentais foram executadas em fatorial 3 x 2, no qual foram avaliadas três concentrações (0 ng/mL, 25 ng/mL e 100 ng/mL) de IGF-I humano (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) adicionadas ao meio MIV e duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>; ou choque térmico: 12 horas a 41 °C seguido por 12 horas a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>).

*Fase 1: Influência da adição de IGF-I ao meio MIV na fragmentação de DNA e maturação de oócitos bovinos submetidos ou não ao choque térmico*

Para análise da fragmentação de DNA e da maturação oocitária, foram realizadas quatro repetições e utilizados  $208 \pm 20$  oócitos por repetição. Após o período de maturação, os CCOs foram desnudados em solução de PBS acrescida de hialuronidase 0,1% (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em vórtex por cinco minutos e lavados duas vezes em solução salina tamponada (PBS), contendo 0,1% de polivinilpirrolidona PVP aquecido a 37 °C. Após o desnudamento os oócitos foram lavados três vezes em solução de PBS-PVP, com posterior imersão do material em 4% de paraformaldeído em PBS por uma hora. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de PBS-PVP. Após a fixação os oócitos foram armazenados a 4 °C em microtubos com 1000 µL de PBS-PVP.

Os oócitos fixados foram processados para o ensaio de marcação nick-end com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL)

utilizado para identificar fragmentos de DNA, característicos do processo de apoptose. Para tanto, foi utilizado o kit comercial DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Os oócitos foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) em solução salina fosfatada por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. No controle positivo, os oócitos foram pré-incubados com enzima DNase, mimetizando o processo de morte celular. Em seguida, foram incubados em uma solução contendo tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. No controle negativo, os oócitos foram incubados na ausência da enzima rTdT.

Após o período de incubação, os oócitos foram transferidos para lâminas e corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) (corante de DNA) e recobertos com lamínula para observação em microscópio de epifluorescência (200x) (Motic, BA400, Motic Instruments Inc., Richmond, Canadá). Em cada oócito foi observada a presença de DNA íntegro. A quantificação dos oócitos em metáfase II (oócitos maturados) foi realizada, por meio da observação morfológica dos núcleos corados com DAPI.

*Fase 2: Influência da adição de IGF-I ao meio de MIV na atividade da enzima caspase-3 em oócitos bovinos submetidos ou não ao choque térmico*

Para análise da atividade da enzima caspase-3 foram realizadas três repetições e utilizados  $91 \pm 8$  oócitos por repetição. Os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50  $\mu$ L de TCM-199-HEPES-PVA e incubados em gotas de 15  $\mu$ L de TCM-199-HEPES-PVA contendo 5  $\mu$ M de PhiPhiLux-G1D2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), substrato específico para a enzima caspase-

3, por 40 minutos a 38 °C protegido da luz. Os oócitos para controle negativo foram incubados em gotas de 15 µL de TCM-199-HEPES-PVA. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de TCM-199-HEPES-PVA. Após, os oócitos foram transferidos para lâminas em gotas de 10 µL TCM-199-HEPES-PVA e recobertos com lamínula para leitura da atividade de caspase-3. As emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas, utilizando uma câmara digital acoplada ao microscópio de fluorescência (Olympus BX53; Câmera: Olympus ccd DP72, Tokio, JP). A intensidade emitida foi quantificada por meio do software Image J (1.49, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

*Fase 3: Influência da adição de IGF-I ao meio de MIV na atividade mitocondrial e produção de EROS em oócitos bovinos submetidos ou não ao choque térmico*

Para a avaliação da atividade mitocondrial e produção de EROS foram realizadas três repetições. Foram utilizados  $117 \pm 7$  oócitos por repetição para a atividade mitocondrial e  $110 \pm 10$  oócitos por repetição para a produção de EROS. Após a MIV os oócitos desnudados foram incubados em 200 µL do meio PBS acrescido de PVA (0,1%), contendo 50 nM do MitoTracker Red CMX-Ros (Invitrogen, EUA), durante 30 minutos a 38,5°C. Em seguida, os oócitos foram lavados em PBS-PVA. Após a lavagem em PBS-PVA, esses oócitos foram incubados em gotas de PBS, contendo 10 µM de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) durante 15 minutos 38,5°C.

Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de PBS-PVA e montados em lâminas para análise da atividade mitocondrial e produção de EROS, por meio da leitura das emissões fluorescentes, conforme descrito acima. A leitura foi realizada em todos os oócitos para a avaliação da atividade mitocondrial, no entanto, para a avaliação de EROS, a leitura foi possível

somente uma parcela dos oócitos. A intensidade emitida foi quantificada por meio do software Image J.

*Fase 4: Influência da adição de IGF-I ao meio de MIV de oócitos bovinos submetidos ou não ao choque térmico na produção in vitro de embriões*

Para produção in vitro de embriões foram realizadas seis repetições e utilizados de  $216 \pm 18$  oócitos por repetição. Após o período de maturação os CCOs foram submetidos à fertilização e cultivo embrionário. Foram observadas as taxas de clivagem dos embriões no dia 3, o número, o estágio de desenvolvimento dos embriões nos dias 7 e 8 e a taxa de estruturas degeneradas em relação ao número total de oócitos. A qualidade embrionária foi avaliada por meio da mensuração da quantidade de células totais, índice de células da MCI, apoptose de células totais e da MCI.

*Preparo do sêmen e fertilização in vitro*

Após 24 horas de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen congelado de uma única partida de um único touro provado da raça Holandesa, disponível no mercado. O descongelamento da palheta de sêmen foi realizado em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e a motilidade espermática avaliada em seguida. Para lavagem e seleção espermática, a dose de sêmen foi depositada sobre a superfície do gradiente de Percoll<sup>®</sup> (Biodux, Campinas, Brasil), previamente estabilizado em estufa para ambientação. O gradiente de Percoll foi preparado com 200 µL de Percoll 90% e 200 µL de percoll 45% colocados em ordem crescente em Eppendorf.

O tubo foi levado à microcentrífuga por 7 minutos a 300 G. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 400 µL de meio de fertilização (FERT-TALP, acrescidos de 10 UI/mL de heparina). O tubo foi novamente centrifugado por 5 minutos a 300 G e

o sobrenadante descartado, restando aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  de sêmen no tubo. Foram então adicionados 70  $\mu\text{L}$  de meio (FERT-TALP, acrescidos de 10 UI/mL de heparina) sobre *pellet* de sêmen. O conteúdo final de 100  $\mu\text{L}$  (30  $\mu\text{L}$  de sêmen e 70  $\mu\text{L}$  de meio de fertilização) foi homogeneizado e utilizado para a avaliação de motilidade e vigor, contagem espermática pós-percoll e fecundação dos oócitos. A motilidade e o vigor foram avaliados em microscopia de campo claro com aumento de 400 x. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma diluição de 1:20. O sêmen foi diluído em volume apropriado do meio de fertilização, para a obtenção da concentração espermática de  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram lavados duas vezes no meio de fertilização, antes de serem transferidos para as gotas do meio de fertilização (100  $\mu\text{L}$ ) cobertas com óleo mineral em placas de Petri de 35 x 10 mm. O processo de fertilização dos oócitos foi realizado por um período de 20 a 22 horas a 38,5 °C em 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e umidade saturada. Em cada gota de fecundação, foram colocados aproximadamente 30 oócitos.

#### *Desnudamento e cultivo in vitro dos embriões*

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL e desnudados em hialuronidase 0,1% m/v (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em vórtex por 5 minutos, para remover as células do cumulus circundante e os espermatozoides associados. Após o desnudamento, as estruturas foram rastreadas, lavadas duas vezes em meio TALP-HEPES e, por último, em meio de cultivo (CR2aa acrescido de soro fetal bovino a 2,5%). Em seguida, foram transferidas para placas de quatro poços, contendo 400  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo coberto com óleo mineral. Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em estufa de cultivo contendo uma mistura gasosa de 5% de  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$  e 90% de  $\text{N}_2$  (White Martins, São

Paulo, SP, Brasil), com temperatura de 38,5 °C e umidade saturada por oito dias (D8).

*Imunocitoquímica e índice apoptótico embrionário (TUNEL)*

Após a avaliação do desenvolvimento embrionário em D8, foram realizadas as análises de imunocitoquímica, para quantificar a massa celular interna, e de TUNEL, para quantificar a fragmentação do DNA nas células embrionárias. Os mesmos embriões foram utilizados para a realização das duas análises. Inicialmente, as estruturas foram fixadas conforme descrito para os oócitos na fase 1. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos em PBS com 0,3% de Triton X-100. Após as lavagens, foi realizado o bloqueio em 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por 30 minutos, e incubação durante a noite em geladeira com o anticorpo primário anti-SOX2, IgG de coelho (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

No dia seguinte, os embriões foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de Triton X-100 por cinco minutos e incubados com o anticorpo secundário cy3 anti-IgG de coelho (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído 1:800 em PBS-BSA 2%. Essa incubação foi feita em câmara úmida, por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Três novas lavagens com PBS-Triton 0,01% foram realizadas antes da adição de 0,1% de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por cinco minutos. Em seguida, o material foi lavado com PBS e então submetido à análise de TUNEL.

A captura das imagens foi executada em microscópio confocal Leica TCS SP5II (Mannheim, Alemanha), utilizando aumento de 40x. Foram processados, no mínimo, 15 embriões expandidos, que foram escolhidos aleatoriamente de *pools* de quatro repetições de cada grupo. O número de células totais, células da massa celular interna e o número de células apoptóticas foram

analisados, utilizando-se o software LAS AF (2.6.3, Leica Microsystem, Alemanha). Os índices de células da massa celular interna e de células apoptóticas foram calculados em relação ao número total de células e o número de células positivas para SOX2 ou TUNEL, respectivamente. Para a avaliação de toda a estrutura tridimensional do embrião as imagens de microscopia foram adquiridas em cortes seriados com aproximadamente 6 micrômetros de distância entre as microfotografias.

#### *Análise estatística*

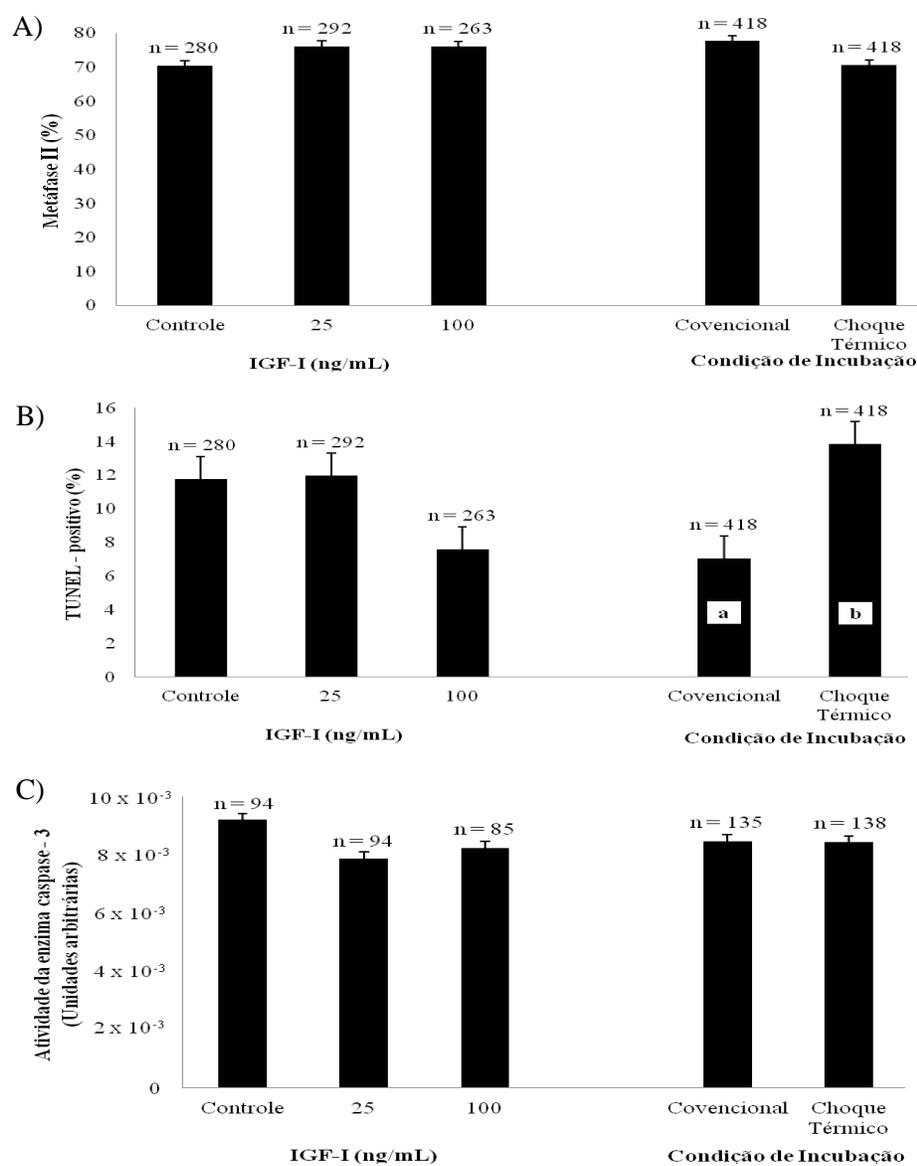
Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis System, versão 9.3, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). A variável taxa de fragmentação de DNA foi analisada por modelos lineares generalizados, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GENMOD. A variável porcentagem de maturação foi analisada por modelos lineares generalizados, mistos, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GLIMMIX e a repetição como efeito aleatório. A produção de EROS, atividade mitocondrial e atividade da enzima caspase-3 foram analisadas pelo procedimento MIXED, utilizando o oócito como efeito aleatório.

A taxa de clivagem e de blastocistos nos dias 7 e 8, classificação de blastocistos (porcentagem de blastocistos e blastocistos eclodidos) foram analisadas por modelos lineares generalizados, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GENMOD. O número total de células embrionárias foi analisado por modelos lineares generalizados mistos, considerando a distribuição de Poisson e função de ligação log, utilizando o procedimento GLIMMIX, como embrião como efeito aleatório. Apoptose do número total de células embrionárias, porcentagem e apoptose da massa celular interna foram analisadas por modelos lineares generalizados

mistos, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GLIMMIX , com o embrião como efeito aleatório. O modelo considerou os efeitos da condição de incubação, concentração de IGF-I, a repetição e interação entre a concentração de IGF-I e condição de incubação. As diferenças foram consideradas significativas quando o  $P < 0,05$ , dados contínuos, foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) e dados binomiais apresentados como porcentagens.

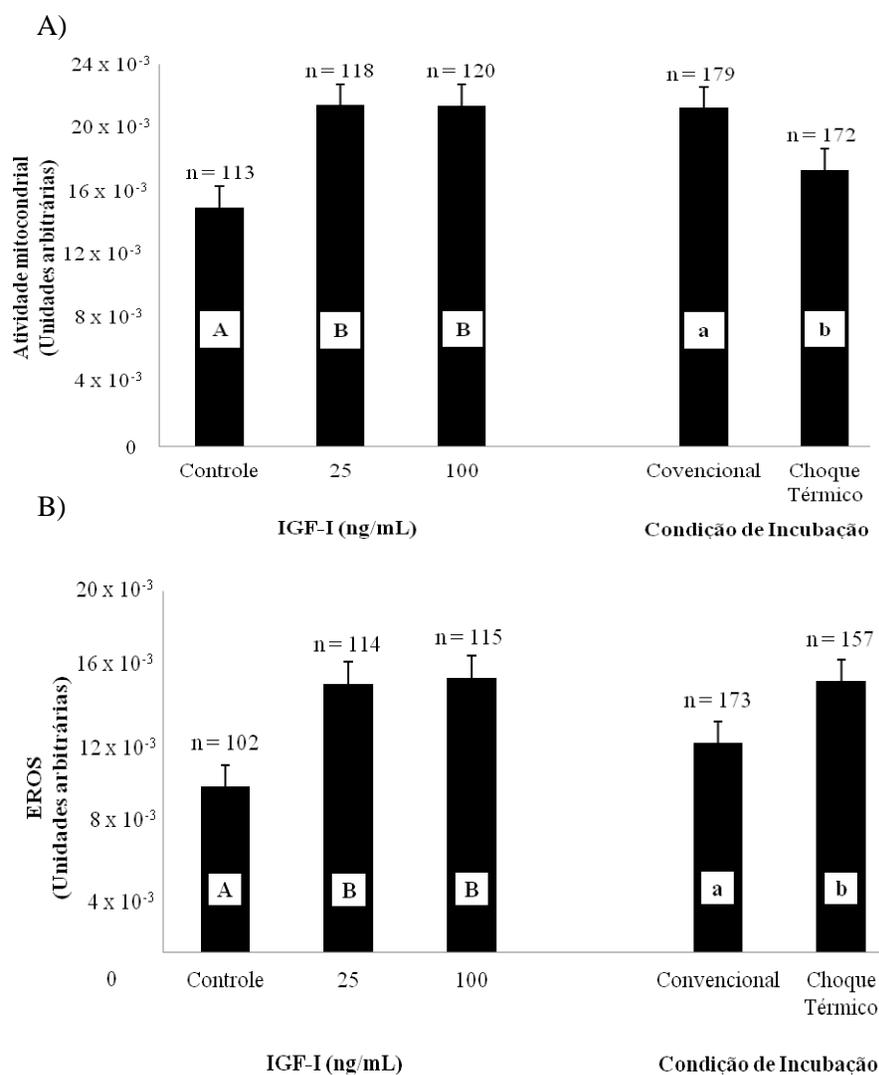
### **Resultados**

Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre adição de IGF-I ao meio MIV e condição de incubação na maturação nuclear, porcentagem de oócitos TUNEL-positivos e atividade da enzima caspase-3. A adição de IGF-I ao meio MIV e a condição de incubação não afetaram a porcentagem de maturação nuclear e atividade da enzima caspase-3 ( $P > 0,05$ ; Figura 1 - A; C). A adição de IGF-I não alterou ( $P > 0,05$ ), porém o choque térmico aumentou a porcentagem de oócitos TUNEL-positivos ( $P < 0,01$ ; Figura 1 - B).



**Fig. 1.** Efeito da adição de IGF-I e da condição de incubação durante a MIV na maturação nuclear (Metáfase II - A), fragmentação de DNA (TUNEL-positivo B) e atividade da enzima caspase-3 (C) de oócitos bovinos. Letras diferentes representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Barras sobrescritas representam o E.P.M.

Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre adição de IGF-I ao meio MIV e condição de incubação na atividade mitocondrial e produção de EROS. A atividade mitocondrial foi elevada pelo IGF-I e reduzida pelo choque térmico ( $P < 0,01$ ; Figura 2 A). Contudo, a adição de IGF-I ao meio MIV e o choque térmico aumentaram produção de EROS ( $P < 0,05$ , Figura 2 B).



**Fig. 2.** Efeito da adição de IGF-I ao meio MIV e da condição de incubação na atividade mitocondrial (A) e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS - B) de oócitos bovinos. Letras maiúsculas diferentes representam diferença entre concentrações de IGF-1 ( $P < 0,05$ ) e minúsculas representam diferença entre condições de incubação ( $P < 0,05$ ). Barras sobescritas representam o E.P.M.

Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre adição de IGF-I ao meio MIV e condição de incubação em todas as variáveis de produção embrionária. A adição de IGF-I e a condição de incubação não influenciaram a taxa de clivagem e a proporção de embriões no estágio de duas, três a sete e oito ou mais células ( $P > 0,05$ ; Tabela 1). A taxa de blastocistos em relação ao número total de oócitos nos dias sete e oito não foi influenciada pela adição de IGF-I ao meio MIV ( $P > 0,05$ ), mas foi reduzida pelo choque térmico ( $P < 0,05$ ; Tabela 1). A taxa de estruturas degeneradas, bem como a taxa de blastocistos expandidos e eclodidos, no dia 8, não foram influenciadas pelo IGF-I ( $P > 0,05$ ), no entanto, foram reduzidas pelo choque térmico ( $P < 0,05$ ; Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito da adição de IGF-I ao meio MIV e da condição de incubação nas taxas de clivagem, embriões com 2 células, 3-7 células e  $\geq 8$  células, blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8), estruturas degeneradas, blastocistos expandidos (Bx) e eclodidos (Be) no dia 8 (Média  $\pm$  E.P.M)

Variável	IGF-I (ng/mL)			Condição de Incubação	
	0 (n = 429)	25 (n = 449)	100 (n = 418)	Convencional (n = 647)	Choque térmico (n = 649)
<i>Clivagem (72 horas após FIV)</i>					
Clivagem (%)	70,7 $\pm$ 3,0	73,2 $\pm$ 2,6	73,1 $\pm$ 3,0	73,8 $\pm$ 2,5	70,9 $\pm$ 2,2
2 células (%)	17,5 $\pm$ 2,8	13,5 $\pm$ 1,7	16,3 $\pm$ 3,2	13,9 $\pm$ 1,6	17,6 $\pm$ 2,5
3-7 células (%)	68,1 $\pm$ 3,7	71,2 $\pm$ 2,6	66,5 $\pm$ 2,7	69,1 $\pm$ 2,3	68,1 $\pm$ 2,6
$\geq 8$ células (%)	14,4 $\pm$ 2,2	15,3 $\pm$ 2,2	17,2 $\pm$ 2,6	17,0 $\pm$ 2,2	14,3 $\pm$ 1,6
<i>Blastocisto</i>					
D7 (%)	24,6 $\pm$ 2,7	26,0 $\pm$ 2,4	27,4 $\pm$ 2,9	29,7 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	22,3 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
D8 (%)	27,0 $\pm$ 2,8	28,0 $\pm$ 2,6	30,3 $\pm$ 3,7	34,4 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
Degeneradas (%)	73,0 $\pm$ 2,8	72,0 $\pm$ 2,6	69,7 $\pm$ 3,7	65,6 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	77,5 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
Bx (%)	12,3 $\pm$ 1,8	12,8 $\pm$ 1,7	13,4 $\pm$ 2,0	16,2 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
Be (%)	3,7 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 1,1	5,4 $\pm$ 1,6	6,1 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ).

Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre adição de IGF-I ao meio MIV e condição de incubação no número total de células, taxa de células embrionárias em apoptose, taxa de células da massa celular interna (MCI) e taxa de células em apoptose na MCI.

O IGF-I não alterou o número total de células e a taxa de células da MCI ( $P > 0,05$ ), no entanto, reduziu apoptose nas células embrionárias e nas células da MCI ( $P < 0,05$ ). O choque térmico não alterou a taxa de células embrionárias em apoptose ( $P > 0,05$ ), contudo, reduziu o número total de células e a taxa de células da MCI, bem como aumentou a taxa de células em apoptose na MCI ( $P < 0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito da adição de IGF-I e da condição de incubação, durante a MIV de oócitos bovinos, na qualidade embrionária (Média  $\pm$  E.P.M)

Variável	IGF-I (ng/mL)			Condição de Incubação	
	0 (n = 30)	25 (n = 30)	100 (n = 30)	Convencional (n = 45)	Choque térmico (n = 45)
Total de células	91,4 $\pm$ 3,8	98,3 $\pm$ 3,6	100,2 $\pm$ 4,1	104,4 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	88,9 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
Apoptose (%)	5,5 $\pm$ 0,8 <sup>A</sup>	2,2 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	2,7 $\pm$ 0,5 <sup>B</sup>	3,5 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,5
MCI (%)	30,5 $\pm$ 2,3	33,8 $\pm$ 2,4	36,9 $\pm$ 2,8	40,1 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	27,2 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
Apoptose de MCI (%)	13,6 $\pm$ 3,2 <sup>A</sup>	5,1 $\pm$ 2,2 <sup>B</sup>	8,5 $\pm$ 2,5 <sup>B</sup>	6,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	12,0 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>

<sup>A,B</sup> Médias de concentração seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> Médias de condição de incubação seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

Este foi o primeiro estudo a demonstrar o efeito do IGF-I na produção de EROS por oócitos bovinos. A adição de IGF-I ao meio MIV resultou em aumento da atividade mitocondrial e da produção de EROS pelo oócito e melhorou a qualidade embrionária. O aumento da produção de EROS, tanto em oócitos maturados em condições convencionais quanto nos submetidos ao choque térmico, contraria a hipótese experimental de que o IGF poderia atuar como antioxidante quando adicionado ao meio MIV de oócitos bovinos. No entanto, o IGF-I adicionado ao meio de cultivo de embriões de camundongos reduziu os efeitos do estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (Kurzawa et al., 2004).

Os resultados do presente trabalho indicam que os efeitos benéficos ocasionados pela adição de IGF-I na MIV não estão relacionados ao bloqueio da geração de EROS, mas sim à redução dos efeitos negativos, como demonstrado por menor ocorrência de apoptose celular. Redução da apoptose celular pela adição de IGF-I ao meio CIV já foi demonstrada em embriões bovinos (Jousan e Hansen *et al.* 2004; Moss *et al.* 2009).

O aumento na produção de EROS é condizente com o aumento da atividade mitocondrial observada nos oócitos maturados em presença de IGF-I, visto que as mitocôndrias representam a principal fonte de EROS (Feugang *et al.*, 2004; Choi *et al.* 2011). O aumento de EROS intracelulares foi relacionado ao aumento da atividade mitocondrial em oócitos bovinos submetidos à vitrificação (Zhao *et al.* 2009), oócitos equinos (Martino *et al.* 2014) e embriões de camundongos (Martino *et al.*, 2013) e sugere maior “turnover” de trifosfato de adenosina (ATP), bem como maior viabilidade celular (Martino *et al.* 2012). A alta atividade mitocondrial é necessária para eventos de maturação, que são dependentes da geração de ATP (Tarazona *et al.* 2006), como o rearranjo do

citoesqueleto (Ju *et al.* 2005), a maturação citoplasmática e nuclear e o acúmulo de RNAm necessário para o desenvolvimento inicial do embrião, antes do início de transcrição gênica (Picton *et al.* 1998). Dessa forma, a atividade mitocondrial é relacionada com a competência oocitária (Tarazona *et al.* 2006). Até o momento, os mecanismos de atuação do IGF-I no aumento da atividade mitocondrial oocitária são pouco compreendidos. Uma das formas de ação do IGF-I no metabolismo mitocondrial pode ser por meio de sua ação reguladora na expressão do gene citocromo c oxidase subunidade 1 (COX-1), o qual está relacionado com o metabolismo celular, agindo, indiretamente, na atividade da cadeia respiratória em oócitos (Gonsalves *et al.*, 2015).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que oócitos bovinos são susceptíveis a temperaturas elevadas (Ferreira *et al.* 2011; Gendelman *et al.* 2012; Meiyu *et al.* 2014). Os resultados do presente experimento corroboram estudos anteriores, demonstrando que os efeitos do choque térmico em oócitos bovinos vão além da redução da qualidade oocitária, refletindo negativamente na posterior produção e qualidade embrionária. Conforme observado, o choque térmico pode levar ao aumento da ocorrência de oócitos Tunel-positivos, em razão do aumento da fragmentação do DNA no compartimento nuclear, que é característico de apoptose. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por alguns autores, que observaram que o choque térmico promoveu aumento da porcentagem de oócitos bovinos Tunel-positivos (Ispada *et al.* 2011; Meiyu *et al.* 2014).

O choque térmico aumentou a fragmentação de DNA e diminuiu a atividade mitocondrial sem aumentar a atividade de enzima caspase-3. Esse resultado sugere a ativação da via de apoptose, por meio do fator de indução da apoptose (AIF), uma flavoproteína (Candé *et al.*, 2004; Shen *et al.* 2010), a qual induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando a apoptose

celular, independente da ativação de caspases (Susin *et al.* 1999; Bröker *et al.* 2005).

O presente estudo demonstrou ainda que o choque térmico pode ocasionar estresse oxidativo, por meio do aumento da produção de EROS, tendo efeito negativo na qualidade dos embriões produzidos a partir desses oócitos. A elevada produção de EROS pelos oócitos submetidos ao choque térmico, possivelmente se deve ao fato de que a temperatura elevada é responsável pela redução de defesas antioxidantes que consistem de enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase ou redutase (Winyard *et al.* 2005), reduzindo, assim, a capacidade antioxidante oocitária e, conseqüentemente, gerando o acúmulo de EROS. Pesquisas anteriores demonstraram que o estresse térmico pode afetar o estado redox do embrião, ocasionando estresse oxidativo (Lima *et al.* 2013), o qual possui efeito tóxico direto nas células, podendo causar danos ao DNA (Tamura *et al.* 2013; Cruz *et al.* 2014 a). No entanto, este foi o primeiro estudo a demonstrar que a maturação sob choque térmico aumenta a produção de EROS.

A apoptose é considerada como um processo normal em embriões em fase de pré-implantação, com a finalidade de eliminar células anormais, no entanto, a alta incidência de células apoptóticas é relacionada à morfologia anormal e redução do potencial de desenvolvimento (Korhonen *et al.* 2010). O choque térmico afetou negativamente a qualidade dos blastocistos, como demonstrado pelo aumento do percentual de células apoptóticas. Esse resultado pode estar relacionado à redução da atividade mitocondrial dos oócitos submetidos ao choque térmico, já que mitocôndrias desempenham papel fundamental na regulação da apoptose (Susin *et al.*, 1999). Além disso, é provável que oócitos expostos ao estresse térmico tenham tido a transcrição gênica prejudicada, reduzindo a expressão de genes no blastocisto em desenvolvimento (Gendelman e Roth, 2012).

O IGF-I foi capaz de reduzir a taxa de apoptose celular no embrião. A reduzida taxa de apoptose nos embriões originados de oócitos maturados na presença de IGF-I pode estar relacionada ao aumento da atividade mitocondrial nos oócitos. Oropeza *et al.* (2004) demonstraram que a exposição *in vivo* de oócitos a concentrações supra-fisiológicas de IGF-I alterou a expressão de genes importantes no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*. Além disso, a exposição de oócitos ao IGF-I, durante a MIV aumentou a expressão de mRNA dos transportadores de glicose que, por sua vez, pode aumentar o consumo de glicose pelos blastocistos resultantes (Velazquez *et al.* 2012), aumentando a viabilidade embrionária. Os resultados do presente estudo suportam a hipótese de que a qualidade embrionária depende diretamente da qualidade oocitária.

A hipótese de que altas concentrações de IGF-I podem afetar o desenvolvimento do embrião foi investigada em trabalhos *in vivo*, em que oócitos bovinos foram expostos a concentrações elevadas de IGF-I. Altas concentrações (1000 ng/mL) de IGF-I têm efeitos negativos na formação de blastocistos, aumentando a apoptose celular total, das células do trofoblasto e da MCI (Velazquez *et al.* 2012). No entanto, os resultados do presente estudo demonstram que a concentração de 100 ng/mL não ocasionou efeitos negativos na qualidade e competência de desenvolvimento dos oócitos. Adicionalmente, a utilização de 25 ng/mL não resultou em diferenças nos parâmetros avaliados em comparação à concentração de 100 ng/mL, o que possivelmente se deva ao fato de que a concentração de 25 ng/mL é próxima à concentração fisiológica encontrada no fluido folicular (17 ng/mL; Ginther *et al.* 2002). Os resultados demonstram que concentrações próximas à fisiológica têm potencial de utilização na MIV, com aumento da qualidade embrionária.

Em conclusão, a suplementação de IGF-I ao meio de MIV não apresenta efeito antioxidante, no entanto, foi responsável pelo aumento da atividade mitocondrial dos oócitos. Esse aumento está relacionado com a melhora na

qualidade embrionária observada em embriões produzidos a partir dos oócitos maturados com IGF-I, por meio da redução da apoptose nos blastômeros. O IGF-I aumentou a produção de EROS, no entanto, nenhum efeito negativo foi observado nas variáveis avaliadas. O choque térmico foi responsável pelo aumento da fragmentação de DNA nos oócitos, redução da qualidade e da produção embrionária.

### **Agradecimentos**

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

### **Referências**

- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155-3162.
- Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 15, 4727-34.
- Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C.C., Hartman, D.L., and Hinrichs, K. (2011). Production of live foals via intra cytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 142, 529-538.
- Cruz, M. H. C., Leal, C. L. ., Cruz, J. F., Tan, D. X., and Reiter, R.J. (2014). Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 82, 925-932.

- Edwards, J. L., Bogart, A.N., Rispoli, L. A., Saxton, A. M., and Schrick, F. N. (2009). Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *J. Dairy Sci.* 92, 563-570.
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C.A., Watanabe, Y.F., Vireque, A.A., Joaquim, D. C., and Smith, L. C. (2011). The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.* 94, 2383-2392.
- Feugang, J. M., de Roover, R., Moens, A., Léonard, S., Dessy, F and Donnay I. (2004). Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* 61, 71-90.
- Gordon, I. 2004. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. Cambridge University Press, London, 576.
- Gendelman, M., and Roth, Z. (2012). Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence. *Biol. Reprod.* 86, 1-9.
- Ginther, O. J., M. A. Beg, D. R. Bergfelt, and K. Kot. (2002). Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol. Reprod.* 67, 14-19.
- Gonçalves, D. R., Ticianelli, J. S., Ispada, J., Risolia, P. H. B., Rodrigues, T. A. and F. F. Paula-Lopes. (2015). The effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mitochondrial gene expression of bovine oocytes subjected to heat shock. *Anim. Reprod.* 12, 775.

- Grimard, B., Marquant-Leguienne, B., Remy, D., Richard, C., Nuttinck, F., Humblot, P., and Ponter, A. A. (2013). Postpartum variations of plasma IGF and IGFbps, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 183-94.
- Hansen, J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. (2013). *Anim. Reprod.* 10, 3, 322-333.
- Hansen, J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. (2015). *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 22-30.
- Ispada, J., Lima, R. S., H. B. and Risolia, P. H. B. Assumpção, J. A. Visintin, and F. F. Paula-Lopes. (2011). Insulin-like growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 209.
- Jousan F. D.; Hansen P. J. (2004). Insulin-like Growth Factor-I as a Survival Factor for the Bovine Preimplantation Embryo Exposed to Heat Shock. *J. Biol. Reprod.*, 71, 1665-1670.
- Ju, J. C., Jiang, S., Tseng, J.K., Parks, J.E., and Yang, X. (2005). Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 64, 1677-1689.
- Korhonen, K., Kananen, K., Ketoja, E., Matomäki, J., Halmekytö, M., and Peippo, J. (2010). Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 45 42-9.
- Kurzawa, R., Głabowski, W., Baczkowski, T., Wiszniewska, B., Marchlewicz, M. (2004). Growth factors protect in vitro cultured embryos from the consequences of oxidative stress. *Zygote* 12, 231-240.

- Lima, R. S., Assumpção, M. O. D., Visintin, J. A., and Lopes, F. F. (2013). Cellular alterations induced by heat stress in bovine embryos . *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, 50, 4, 257-264.
- Martino, N. A., Lacalandra, G. M., Filioli Uranio, M., Ambruosi, B., Caira, M., Silvestre, F., Pizzi, F., Desantis, S., Accogli, G., and Dell'Aquila, M. E. (2012). Oocyte mitochondrial bioenergy potential and oxidative stress: within-/between-subject, in vivo versus in vitro maturation, and age-related variations in a sheep model. *Fertil. Steril.* 97, 720-728.
- Martino, N. A., Dell'aquila, M. E., Cardone, R. A., Somoskoi, B., Lacalandra, G. M., and Cseh, S. (2013). Vitriification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 11-27.
- Martino, N. A., Dell'Aquila, M. E., Filioli Uranio, M., Rutigliano, L., Nicassio, M., Lacalandra, and G. M., Hinrichs, K. (2014). Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 12-99.
- Meiyu, Q., Liu, L., and Roth, Z. (2014). IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. *Zygote* 1-11.
- Moss, J. I.; Pontes, E.; Hansen, P. J. (2009). Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. *Archives Toxicology*, 83, 1001-1007.
- Moussad, M., Shud, J., Zhangb, X.H., and Zeng, F. (2015). Maternal control of oocyte quality in cattle “areview”. *Anim. Reprod. Scien.* 155, 11-27.
- Nabenishi, H., Takagi, S., Kamata, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., and Tsuzuki, Y. (2012). The role of mitochondrial transition pores on

- bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 31-40.
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Hadel, K. G., Niemann, H. et al. (2004). Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol. Reprod.* 70, 1634-1643.
- Paula-Lopes, F. F., Lima, R. S., Risolia, P. H. B., Ispada, J., Assunção, M. E. O. A., Visintin, J. A. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim. Reprod.* 9, 395-403.
- Paula-Lopes, F. F., Lima, R. S., Satrapa, R. A., and Barros C. M. (2013). Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *J. Anim. Sci.* 91, 1143-1153.
- Pereira, M. M.; Machado, M. A.; Costa, F. Q.; Serapiao, R. V.; Viana, J. H. M.; Camargo, L. S. (2010). Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:1074-1082.
- Picton, H.; Briggs, D.; Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45, 27-37.
- Roth, Z., and Hansen, J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71, 1898-1906.
- Sartori, R., Guardieiro, M. M., Surjus, R. S., Melo, L. F., Prata, A. B. Ishiguro, M., Bastos, M. R., Nascimento, A. B. (2013). Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Anim. Reprod.* 10, 199-205.
- Satrapa, R. A., Nabhan, T., Silva, C. F., Simões, R. A. L., Razza, E. M., Puelker R. Z., Trinca L. A., and Barros, C. M. (2011). Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration

- on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 76, 1162-1167.
- Shen, S. M., Yu, Y., Wu, Y. L., Cheng, J. K., Wang, L. S., Chen, G. Q. (2010). Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis*. 31(3):419-26.
- Sugiyama, S., McGowan, M., Phillips, N., Kafi, M., Young, M. (2007). Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the in vitro development of bovine zygotes. *Reprod. Domest. Anim.* 42. 271-274.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, , Loef, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. , Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Tamura, H., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka., and Sugino, N. (2013). Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine Journal*, 60, 1-13.
- Tarazona, A. M., Rodriguez, J. I., Restrepo, L. F., Oliveira-Ange, M. (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 5-11.
- Velazquez, M. A., Hermann, D., Kues, W. A., and Niemann, H. (2011). Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction*, 141, 91-103.
- Velazquez, M. A., Hadelers, K. G., Herrmann, D., Kues, W. A., Rémy, B., Beckers, J. F., and Niemann H. (2012). In vivo oocyte IGF-1 priming

increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. *Theriogenology* 78, 517-27.

Winyard, G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends. Biochem. Sci.* 30, 453-461.

Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M. H., Eftekhari-Yazdi, Zare-Shahneh, A. (2009). Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *J. Assist. Reprod. Gen.* 26, 605-611.

Zhao, X. M., Fu, X. W., Hou, Y. P., Yan, C. L., Suo, L., Wang, Y. P., Zhu, H. B., Dinnyes, A., Zhu, S. E. (2009). Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos. *Mol. Reprod.* 76:1056-1063.

**ARTIGO 2 Adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos  
bovinos submetidos ao choque térmico: efeitos sobre a qualidade  
e a competência de desenvolvimento**

Artigo segue as normas e formato do periódico *Journal of Dairy Science*.\*

\*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

**Adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico: efeitos sobre a qualidade e a competência de desenvolvimento**

**Título curto:** Melatonina na maturação *in vitro* de oócitos

**I. J. Ascari\***, **N. G. Alves\***, **J. Jasmin†**, **R. R. Lima§**, **C.C.R. Quintão‡**, **L. S. A.Camargo‡**

\*Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brasil

† Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

§Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brazil

‡ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora, Brasil

## RESUMO

Temperaturas ambientais elevadas podem levar à formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células. Nesse contexto, a melatonina pode atuar na redução do estresse oxidativo de gametas, durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Objetivou-se avaliar o efeito da melatonina adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre a maturação nuclear, fragmentação de DNA, atividade antioxidante da melatonina, mitocondrial e de caspase-3 e produção *in vitro* e qualidade de embriões. Folículos com 3-8 mm de diâmetro foram puncionados de ovários de vacas coletados em abatedouro. Foram avaliadas duas condições de maturação (convencional: 24 horas a 38,5 °C ou choque térmico: 12 horas a 41 °C seguido de 12 horas a 38,5 °C) e três concentrações de melatonina (0, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-4</sup> M) adicionada ao meio de maturação. Não houve interação entre condição de incubação e concentração de melatonina. O choque térmico que reduziu e a adição de melatonina não alterou a porcentagem de oócitos que progrediram ao estágio de metáfase II. A condição de maturação e adição de melatonina não alteraram a porcentagem de oócitos TUNEL-positivos. O choque térmico aumentou enquanto que a adição de melatonina reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos oócitos. A atividade mitocondrial foi reduzida pelo choque térmico, porém não foi afetada pela melatonina. A atividade caspase não foi influenciada pelo choque térmico ou pela melatonina. O choque térmico não afetou a taxa de clivagem, porém, reduziu a taxa de blastocistos no dia 7 (D7) e no dia 8 (D8). A adição de melatonina não afetou a taxa de clivagem e de blastocisto em D7 e D8. A adição de melatonina não afetou o número total de células e taxa de células apoptóticas, mas reduziu a taxa de células apoptóticas da massa celular interna. Em conclusão, o choque térmico reduz a maturação nuclear, a produção de

embriões e a qualidade embrionária, enquanto que a suplementação de melatonina ao meio de MIV melhora a maturação oocitária e qualidade embrionária.

**Palavras-chave:** antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, apoptose, fragmentação de DNA.

## INTRODUÇÃO

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que oócitos em desenvolvimento são extremamente sensíveis a temperaturas elevadas e seu processo de maturação *in vitro* (MIV) é também suscetível a interrupções pelo estresse térmico, reduzindo, dessa forma, a taxa de clivagem e a produção de blastocistos (Edwards et al., 1997; Roth e Hansen 2004a; Ferreira et al., 2011; Meiyu, et al., 2014). Tendo em conta que um mecanismo multifatorial está envolvido, o desenvolvimento de métodos para reduzir os efeitos negativos de temperaturas elevadas sobre a competência do ovócito e melhorar o desempenho reprodutivo de bovinos em clima quente é um grande desafio (Meiyu et al., 2014).

Temperaturas elevadas podem levar à formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células (Sakatani et al., 2012; Tamura et al., 2013). Quando uma quantidade excessiva de EROS é produzida e a célula não consegue se adaptar, ocorre o fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Zhang et al., 2013). O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica de membrana, oxidação de proteínas, danos ao DNA (Tamura et al., 2013; Cruz et al., 2014 a, b) e indução da apoptose (Zhang et al., 2013). Durante a MIV, o oócito é muito mais suscetível ao estresse oxidativo, em razão da sua reduzida defesa antioxidante, o que prejudica o subsequente desenvolvimento embrionário (Du Plessis et al., 2008; Takahashi, 2012; Zhang et al., 2013).

Diversos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de radicais livres, por meio do uso de antioxidantes (Tian et al., 2014; Wang et al., 2014; Cheuquemán et al., 2015). Nesse contexto, a melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina), uma indoleamina lipofílica produzida a partir do triptofano na glândula pineal de maneira circadiana em mamíferos (Reiter et al., 2009; Kumar 2015), pode ser

utilizada como uma alternativa para a PIV (Tian et al., 2014). A melatonina participa de um grande número de funções fisiológicas. Além do controle da reprodução sazonal (Ashrafi et al., 2013), atua na preservação mitocondrial (Jou et al., 2010), como hormônio imunoestimulador, citoprotetor (Schaffazick et al., 2005) e antiapoptótico pela inibição da ativação das caspases -9 e -3 (Baydas et al., 2005). A melatonina é uma molécula altamente eletroreativa, que age detoxificando espécies reativas de oxigênio eletrodeficientes (Vijayalaxmi et al., 2004), além de estimular a atividade de outras enzimas antioxidantes (Tamura et al., 2008; Kumar 2015). Sua ação protetora foi descrita recentemente durante a produção *in vitro* de embriões bovinos (Cebrian-Serano et al., 2013; Wang et al., 2014; Tian et al., 2014).

O equilíbrio entre EROS e antioxidantes no interior do folículo é crítico para a função do oócito e células da granulosa e há evidências de que a melatonina esteja envolvida na proteção dessas células (Cruz et al., 2014 a). Em decorrência desses fatores, a utilização da melatonina está surgindo como uma estratégia promissora para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas submetidas a estresse térmico (De Rensis et al., 2015). No entanto, seus efeitos, bem como o seu mecanismo de ação relacionados à maturação e ao desenvolvimento do embrião ainda necessitam de maior compreensão (Paula-Lopes et al., 2013; Cruz et al., 2014 b). Uma possibilidade é que as ações da melatonina não pode permitir uma redução no estresse oxidativo, durante a MIV oocitária, melhorando a qualidade mitocondrial, reduzindo a atividade de enzimas caspase e conseqüentemente a apoptose celular. A inibição de apoptose, por meio da utilização de antioxidantes, tais como a melatonina pode ser uma ferramenta útil para diminuir os efeitos negativos do estresse térmico na competência de desenvolvimento oocitária (Zhandi et al., 2009), além disso, o uso de ensaios *in vitro* podem auxiliar na compreensão da atuação desse hormônio durante a MIV.

Embora que a ação benéfica da melatonina em alguns aspectos reprodutivos seja conhecida (Rocha et al., 2013), a maioria dos trabalhos avaliou a adição desse hormônio nos meios de cultivo de embriões, sendo seu papel na maturação de oócitos bovinos, pouco avaliado. Além disso, é importante ressaltar que os trabalhos correlatos ao assunto não avaliaram a suplementação direta de melatonina exclusivamente ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico, bem como o seu modo de ação e sua influencia no desenvolvimento embrionário precoce. Somado a isso, a qualidade embrionária, representada pelo número de células de blastocistos, proporção e blastômeros apoptóticos e de massa celular interna, também precisa ser avaliada, já que a melhoria nos índices reprodutivos está diretamente relacionada à eficiência de implantação, após a transferência embrionária (Wang et al., 2014). Portanto, a utilização da melatonina bem como a compreensão de sua atuação pode resultar em ações práticas a serem adotadas na PIV de embriões bovinos, além de gerar possíveis recomendações para seu uso *in vivo*. Assim, objetivou-se, neste estudo, avaliar o efeito antioxidante da melatonina adicionada ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico, podendo melhorar sua qualidade e competência de desenvolvimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Ética*

Os métodos e procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa – Gado de Leite, registrado sob o número de protocolo 01/2015, com todos os protocolos experimentais estando em conformidade com os princípios éticos de experimentação animal dessa instituição.

### ***Reagentes***

A menos que indicado de outra forma, todos os produtos químicos e os reagentes utilizados, neste estudo, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química S.A. (São Paulo, SP, Brasil).

### ***Recuperação e classificação dos oócitos***

O experimento foi conduzido na Embrapa – Unidade de Pesquisa em Juiz de Fora (MG, Brasil). Foram utilizados ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) provenientes de abatedouro. Os ovários foram removidos, aproximadamente, 15 minutos após o abate do animal, no momento da evisceração e depositados em recipientes isotérmicos, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), acrescida de antibiótico (0,05 g/litro de sulfato de estreptomicina) à temperatura de 35°C . O tempo decorrido entre a coleta dos ovários e sua chegada ao laboratório foi de aproximadamente 1 hora.

No laboratório, os ovários foram lavados e mantidos a 37°C em banho-maria. Foram aspirados folículos com diâmetro entre três e oito mm com auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha 18g. O conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico estéril imerso em banho-maria (35 °C). Após 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado em meio TALP-HEPES (Gordon, 2004) e vertido em placa de Petri descartável de 100 x 20 mm. Foram selecionados os complexos cumulus-oócitos (CCOs) que apresentaram citoplasma homogêneo com no mínimo três camadas de células (Sugima *et al.*, 2007).

Os CCOs selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-HEPES e uma vez em meio MIV TCM 199 (Tissue Culture Medium 199 – Invitrogen, São Paulo, BR) suplementado com 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH, Pluset<sup>®</sup>, Hertape Calier, Juatuba, MG, BR) e soro inativado de vaca em cio (10%). Três meios de MIV foram elaborados: sem adição de

melatonina ou acrescido de melatonina nas concentrações de  $10^{-6}$  M e  $10^{-4}$  M. Os meios, preparados com duas horas de antecedência, foram mantidos a 38,5 °C em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> (Pereira et al., 2010). A maturação ocorreu em placa de cultivo do tipo Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), em poços contendo 400 µL de meio de maturação e 30 a 40 CCOs por poço.

O delineamento utilizado foi Blocos Casualizados (DBC) e as fases experimentais foram executadas em fatorial 3 x 2, no qual foram avaliadas três concentrações (0 M,  $10^{-6}$  M e  $10^{-4}$  M) de IGF-I humano (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) adicionadas ao meio MIV e duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>; ou choque térmico: 12 horas a 41 °C seguido por 12 horas a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>). As concentrações de melatonina utilizadas foram determinadas de resultados descritos na literatura, em que foram observadas variações entre  $10^{-11}$  M até  $10^{-3}$  M em meios de MIV e CIV de oócitos bovinos (Takada, et al., 2010; Cebrian-Serrano et al., 2013; Tian et al., 2014).

### ***Fase 1 - Fragmentação de DNA e maturação de oócitos bovinos***

Para análise da fragmentação de DNA e da maturação oocitária foram realizadas quatro repetições e utilizados  $232 \pm 15$  oócitos por repetição. Após o período de maturação, os CCOs foram desnudados em solução de PBS acrescida de hialuronidase 0,1% (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em vórtex por cinco minutos e lavados duas vezes em solução salina tamponada (PBS) contendo 0,1% de polivinilpirrolidona PVP aquecido a 37 °C. Após o desnudamento, os oócitos foram lavados três vezes em solução de PBS-PVP, com posterior imersão do material em 4% de paraformaldeído em PBS por uma hora. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de PBS-PVP.

Após a fixação os oócitos foram armazenados a 4 °C em microtubos com 1000 µL de PBS-PVP.

Os oócitos fixados foram processados para o ensaio de marcação nick-end com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) utilizado para identificar fragmentos de DNA, característicos do processo de apoptose. Para tanto, foi utilizado o kit comercial DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Os oócitos foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) em solução salina fosfatada por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. No controle positivo, os oócitos foram pré-incubados com enzima DNase, mimetizando o processo de morte celular. Em seguida, foram incubados em uma solução contendo tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. No controle negativo, os oócitos foram incubados na ausência da enzima rTdT.

Após o período de incubação, os oócitos foram transferidos para lâminas e corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) (corante de DNA) e recobertos com lamínula para observação em microscópio de epifluorescência (200x) (Motic, BA400, Motic Instruments Inc., Richmond, Canadá). Em cada oócito foi observada a presença de DNA íntegro. A quantificação dos oócitos em metáfase II (oócitos maturados) foi realizada, por meio da observação morfológica dos núcleos corados com DAPI (Cebrian-Serano et al., 2013).

***Fase 2 - Produção de EROS e atividade mitocondrial*** Para avaliação da atividade mitocondrial e produção de EROS foram realizadas três repetições.

Foram utilizados  $93 \pm 6$  oócitos por repetição para a atividade mitocondrial e  $80 \pm 9$  oócitos por repetição para a produção de EROS. Após a MIV os oócitos desnudados foram incubados em 200  $\mu\text{L}$  do meio PBS acrescido de PVA (0,1%), contendo 50 nM do MitoTracker Red CMX-Ros (Invitrogen, EUA), durante 30 minutos a  $38,5^\circ\text{C}$ . Em seguida, os oócitos foram lavados em PBS-PVA. Após a lavagem em PBS-PVA, esses oócitos foram incubados em gotas de PBS, contendo 10  $\mu\text{M}$  de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR), durante 15 minutos  $38,5^\circ\text{C}$ .

Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de PBS-PVA e montados em lâminas para análise da atividade mitocondrial e produção de EROS, por meio da leitura das emissões fluorescentes, conforme descrito acima. A leitura foi realizada em todos os oócitos para a avaliação da atividade mitocondrial, no entanto, para a avaliação de EROS, a leitura foi possível somente uma parcela dos oócitos. A intensidade emitida foi quantificada por meio do software Image J.

### ***Fase 3 - Atividade da enzima caspase-3***

Para análise da atividade da enzima caspase-3, foram realizadas três repetições e utilizados  $93 \pm 2$  oócitos por repetição. Os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de TCM-199-HEPES-PVA e incubados em gotas de 15  $\mu\text{L}$  de TCM-199-HEPES-PVA contendo 5  $\mu\text{M}$  de PhiPhiLux-G1D2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), substrato específico para a enzima caspase-3, por 40 minutos a  $38^\circ\text{C}$  protegido da luz. Os oócitos para controle negativo foram incubados em gotas de 15  $\mu\text{L}$  de TCM-199-HEPES-PVA. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de TCM-199-HEPES-PVA. Após, os oócitos foram transferidos para lâminas em gotas de 10  $\mu\text{L}$  TCM-199-HEPES-PVA e recobertos com lamínula para leitura da atividade de caspase-3. As emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas utilizando uma câmara

digital acoplada ao microscópio de fluorescência (Olympus BX53; Câmera: Olympus ccd DP72, Tokio, JP). A intensidade emitida foi quantificada por meio do software Image J (1.49, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### ***Fase 4 - Produção in vitro de embriões***

Para produção in vitro de embriões, foram realizadas seis repetições e utilizados de  $193 \pm 14$  oócitos por repetição. Após o período de maturação os CCOs foram submetidos à fertilização e cultivo embrionário. Foram observadas as taxas de clivagem dos embriões no dia 3, o número, o estágio de desenvolvimento dos embriões nos dias 7 e 8 e a taxa de estruturas degeneradas em relação ao número total de oócitos. A qualidade embrionária foi avaliada por meio da mensuração da quantidade de células totais, índice de células da MCI, apoptose de células totais e da MCI.

#### ***Preparo do sêmen e fertilização in vitro***

Após 24 horas de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen congelado de uma única partida de um único touro provado da raça Holandesa, disponível no mercado. O descongelamento da palheta de sêmen foi realizado em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e a motilidade espermática avaliada em seguida. Para lavagem e seleção espermática a dose de sêmen foi depositada sobre a superfície do gradiente de Percoll<sup>®</sup> (Biodux, Campinas, Brasil), previamente estabilizado em estufa para ambientação. O gradiente de Percoll foi preparado com 200 µL de Percoll 90% e 200 µL de percoll 45% colocados em ordem crescente em Eppendorf.

O tubo foi levado à microcentrífuga por 7 minutos a 300 G. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 400 µL de meio de fertilização (FERT-TALP, acrescidos de 10 UI/mL de heparina). O tubo foi novamente centrifugado por 5 minutos a 300 G

e o sobrenadante descartado, restando aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  de sêmen no tubo. Foram então adicionados 70  $\mu\text{L}$  de meio (FERT-TALP, acrescido de 10 UI/mL de heparina) sobre *pellet* de sêmen. O conteúdo final de 100  $\mu\text{L}$  (30  $\mu\text{L}$  de sêmen e 70  $\mu\text{L}$  de meio de fertilização) foi homogeneizado e utilizado para a avaliação de motilidade e vigor, contagem espermática pós-percoll e fecundação dos oócitos. A motilidade e o vigor foram avaliados em microscopia de campo claro com aumento de 400 x. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma diluição de 1:20. O sêmen foi diluído em volume apropriado do meio de fertilização para obtenção da concentração espermática de  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram lavados duas vezes no meio de fertilização, antes de serem transferidos para as gotas do meio de fertilização (100  $\mu\text{L}$ ) cobertas com óleo mineral em placas de Petri de 35 x 10 mm. O processo de fertilização dos oócitos foi realizado por um período de 20 a 22 horas a 38,5 °C em 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e umidade saturada. Em cada gota de fecundação, foram colocados aproximadamente 30 oócitos.

#### ***Desnudamento e cultivo in vitro dos embriões***

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL e desnudados em hialuronidase 0,1% m/v (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) em vórtex por 5 minutos para remover as células do cumulus circundante e os espermatozoides associados. Após o desnudamento, as estruturas foram rastreadas, lavadas duas vezes em meio TALP-HEPES e, por último, em meio de cultivo (CR2aa acrescido de soro fetal bovino a 2,5%). Em seguida, foram transferidas para placas de quatro poços contendo 400  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo coberto com óleo mineral. Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em estufa de cultivo, contendo uma mistura gasosa de 5% de  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$  e 90% de  $\text{N}_2$  (White Martins, São

Paulo, SP, Brasil), com temperatura de 38,5 °C e umidade saturada por oito dias (D8).

### ***Imunocitoquímica e índice apoptótico embrionário (TUNEL)***

Após a avaliação do desenvolvimento embrionário em D8, foram realizadas as análises de imunocitoquímica, para quantificar a massa celular interna, e de TUNEL, para quantificar a fragmentação do DNA nas células embrionárias. Os mesmos embriões foram utilizados para a realização das duas análises. Inicialmente, as estruturas foram fixadas conforme descrito para os oócitos na fase 1. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos em PBS com 0,3% de Triton X-100. Após as lavagens foi realizado o bloqueio em 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por 30 minutos, e incubação durante a noite em geladeira com o anticorpo primário anti-SOX2, IgG de coelho (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

No dia seguinte, os embriões foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de Triton X-100 por cinco minutos e incubados com o anticorpo secundário cy3 anti-IgG de coelho (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído 1:800 em PBS-BSA 2%. Essa incubação foi feita em câmara úmida por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Três novas lavagens com PBS-Triton 0,01% foram realizadas antes da adição de 0,1% de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por cinco minutos. Em seguida, o material foi lavado com PBS e então submetido à análise de TUNEL.

A captura das imagens foi executada em microscópio confocal Leica TCS SP5II (Mannheim, Alemanha), utilizando aumento de 40x. Foram processados, no mínimo, 15 embriões expandidos, que foram escolhidos aleatoriamente de *pools* de quatro repetições de cada grupo. O número de células totais, células da massa celular interna e o número de células apoptóticas foram

analisados utilizando-se o software LAS AF (2.6.3, Leica Microsystem, Alemanha). Os índices de células da massa celular interna e de células apoptóticas foram calculados em relação ao número total de células e o número de células positivas para SOX2 ou TUNEL, respectivamente. Para a avaliação de toda a estrutura tridimensional do embrião as imagens de microscopia foram adquiridas em cortes seriados com aproximadamente 6 micrômetros de distância entre as microfotografias.

### *Análise estatística*

Todas as análises foram realizadas, utilizando-se o software SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis System, versão 9.3, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). A variável taxa de fragmentação de DNA foi analisada por modelos lineares generalizados, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GENMOD. A variável porcentagem de maturação foi analisada por modelos lineares generalizados mistos considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GLIMMIX e a repetição como efeito aleatório. A produção de EROS, atividade mitocondrial e atividade da enzima caspase-3 foram analisadas pelo procedimento MIXED, utilizando o oócito como efeito aleatório.

A taxa de clivagem e de blastocistos nos dias 7 e 8, classificação de blastocistos (porcentagem de blastocistos e blastocistos eclodidos) foram analisadas, por modelos lineares generalizados, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GENMOD. O número total de células embrionárias foi analisado por modelos lineares generalizados mistos, considerando a distribuição de Poisson e função de ligação log, utilizando o procedimento GLIMMIX, como embrião como efeito aleatório. Apoptose do número total de células embrionárias, porcentagem e apoptose da massa celular interna foram analisadas por modelos lineares generalizados

mistos, considerando a distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando o procedimento GLIMMIX , com o embrião como efeito aleatório. O modelo considerou os efeitos da condição de incubação, concentração de IGF-I, a, repetição e interação entre a concentração de IGF-I e condição de incubação. As diferenças foram consideradas significativas quando o  $P < 0,05$ . Dados contínuos foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) e dados binomiais apresentados como porcentagens.

## RESULTADOS

Não houve interação entre condição de incubação e concentrações de melatonina em nenhuma das análises do presente estudo ( $P > 0,05$ ). A adição de melatonina, ao meio MIV, não alterou a porcentagem de maturação nuclear ( $P > 0,05$ ), mas, o choque térmico reduziu a porcentagem de maturação ( $P < 0,05$ ). Tanto a condição de incubação quanto a concentração de melatonina não tiveram efeito na porcentagem de oócitos TUNEL-positivos ( $P > 0,05$ ). A atividade da enzima caspase-3 não foi alterada pela condição de incubação ou pela adição de melatonina ao meio de maturação ( $P > 0,05$ ; Tabela 1).

A melatonina foi eficaz em reduzir a produção de EROS ( $P < 0,05$ ). Além disso, o choque térmico aumentou a produção de EROS ( $P < 0,05$ ). A atividade mitocondrial foi reduzida pelo choque térmico ( $P < 0,05$ ), mas não foi influenciada pela adição de melatonina ( $P > 0,05$ , Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito da adição de melatonina ao meio MIV e da condição de incubação na maturação nuclear (MII), fragmentação de DNA (Tunel-positivo), atividade da enzima caspase-3, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade mitocondrial de oócitos bovinos (Média ± E.P.M)

Variável	Melatonina (M)			Condição de Incubação	
	0	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	Convencional	Choque térmico
	% (n = 8)			% (n = 12)	
MII	65,5 ± 5,7	65,2 ± 5,8	67,6 ± 3,1	83,1 ± 1,7 <sup>a</sup>	65,6 ± 3,9 <sup>b</sup>
Tunel-positivo	3,2 ± 1,4	1,8 ± 1,1	1,7 ± 0,7	2,0 ± 0,7	3,0 ± 1,1
	Unidades arbitrárias			Unidades arbitrárias	
Caspase-3	9214,5 ± 576,5 (n = 94)	9073,9 ± 538,5 (n = 95)	8767,6 ± 518,6 (n = 91)	8928,7 ± 393,4 (n = 153)	9133,4 ± 506,5 (n = 127)
EROS	7000,8 ± 331,7 <sup>A</sup> (n = 81)	5799,4 ± 300,1 <sup>B</sup> (n = 81)	5602,5 ± 294,9 <sup>B</sup> (n = 79)	5494,8 ± 166,9 <sup>a</sup> (n = 127)	6855,9 ± 325,8 <sup>b</sup> (n = 114)
Mitocondrial	31868,1 ± 777,6 (n = 129)	31825,0 ± 1185,7 (n = 125)	33164,5 ± 1165,0 (n = 117)	34919,3 ± 821,0 <sup>a</sup> (n = 177)	29838,4 ± 848,4 <sup>b</sup> (n = 194)

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Não houve efeito da condição de incubação e da adição de melatonina na taxa de clivagem e na proporção de embriões no estágio de duas, três a sete ou com oito ou mais células ( $P > 0,05$ ; Tabela 2). A taxa de blastocistos nos dias 7 e 8 em relação ao número total de oócitos e taxa de blastocistos em relação ao número de estruturas clivadas foram reduzidas pelo choque térmico ( $P < 0,05$ ), mas não foram influenciadas pela adição de melatonina ao meio MIV ( $P > 0,05$ , Tabela 2). Não houve efeito da adição de melatonina ( $P > 0,05$ ) ao meio MIV nas análises de taxa de estruturas degeneradas em relação ao número total de oócitos, taxa de blastocistos expandidos e eclodidos no dia 8 em relação ao número total de oócitos ( $P > 0,05$ ). Porém, o estresse térmico aumentou as taxas de estruturas degeneradas e reduziu a taxa de blastocistos expandidos ( $P < 0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito da adição de IGF-I ao meio MIV e da condição de incubação nas taxas de clivagem, embriões com 2 células, 3-7 células e  $\geq 8$  células, blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8), estruturas degeneradas, blastocistos expandidos (Bx) e eclodidos (Be) no dia 8 (Média  $\pm$  E.P.M)

Variável	Melatonina (M)			Condição de Incubação	
	0 (n = 382)	$10^{-6}$ (n = 387)	$10^{-4}$ (n = 388)	Convencional (n = 584)	Choque térmico (n = 573)
	<i>Clivagem (%) (72 horas após FIV)</i>				
Clivagem	68,7 $\pm$ 4,3	73,2 $\pm$ 5,3	68,8 $\pm$ 3,5	71,9 $\pm$ 3,5	68,5 $\pm$ 3,6
2 células	24,3 $\pm$ 5,3	16,4 $\pm$ 4,9	25,3 $\pm$ 2,3	18,5 $\pm$ 2,5	25,4 $\pm$ 4,3
3-7 células	62,2 $\pm$ 6,2	72,5 $\pm$ 5,3	65,6 $\pm$ 3,1	69,9 $\pm$ 3,4	63,6 $\pm$ 4,8
$\geq 8$ células	13,5 $\pm$ 3,1	11,1 $\pm$ 1,6	9,1 $\pm$ 2,0	11,6 $\pm$ 1,5	10,9 $\pm$ 2,3
	<i>Blastocisto (%)</i>				
D7	23,7 $\pm$ 3,1	26,8 $\pm$ 4,4	25,4 $\pm$ 2,4	28,2 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>
D8	24,6 $\pm$ 3,3	27,0 $\pm$ 4,1	24,5 $\pm$ 2,6	29,7 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	20,9 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
Degeneradas	75,4 $\pm$ 3,3	75,5 $\pm$ 4,1	73,0 $\pm$ 2,6	70,3 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	79,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
Bx	10,8 $\pm$ 0,9	10,9 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 0,7	15,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
Be	5,4 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,4

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ).

Não houve efeito da adição de melatonina no número total de células, taxa de células embrionárias em apoptose em relação ao número total de células e taxa de células da MCI em relação ao número total de células ( $P > 0,05$ ). No entanto, a concentração de  $10^{-4}$  M reduziu a taxa de células em apoptose na MCI em relação ao número total de células da MCI. O choque térmico reduziu o número total de células embrionárias ( $P < 0,05$ ; Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito da adição de melatonina ao meio MIV de oócitos bovinos e do choque térmico na qualidade embrionária (Média ± E.P.M)

Variável	Melatonina (M)			Condição de Incubação	
	0 (n = 30)	10 <sup>-6</sup> (n = 30)	10 <sup>-4</sup> (n = 30)	Convencional (n = 45)	Choque térmico (n = 45)
Total de células	108,2 ± 4,4	112,1 ± 5,5	114,0 ± 3,7	117,6 ± 3,2 <sup>a</sup>	105,2 ± 4,0 <sup>b</sup>
Apoptose (%)	14,9 ± 1,4	13,2 ± 0,9	12,4 ± 1,0	13,0 ± 0,9	14,1 ± 0,9
MCI (%)	23,2 ± 1,6	24,3 ± 1,7	24,8 ± 1,6	24,8 ± 1,1	23,4 ± 1,5
Apoptose de MCI (%)	41,7 ± 3,7 <sup>A</sup>	35,7 ± 3,3 <sup>A</sup>	27,9 ± 2,7 <sup>B</sup>	33,5 ± 2,5	36,7 ± 3,0

<sup>A,B</sup> Médias de concentração seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> Médias de condição de incubação seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O modelo de choque térmico (*in vitro*) é eficiente em recriar os efeitos do estresse térmico (*in vivo*) em oócitos e embriões bovinos (Gendelman; Roth, 2012a). As consequências do choque térmico, durante a MIV do oócito podem ser dependentes do tempo e temperatura (Rispoli et al. 2011). Em razão disso, vários autores têm avaliado a temperatura de 41,0 ou 41,5°C, com diferentes tempos de exposição ao choque térmico (Roth e Hansen, 2004a; Rispoli et al., 2011; Meiyu et al., 2014).

Este foi o primeiro estudo em que se avaliou o efeito da adição de melatonina no meio MIV de oócitos submetidos ao choque térmico. Na primeira fase experimental, a melatonina não apresentou efeito na MIV, contrariando outros estudos que utilizaram melatonina na MIV de o aumento do número total de células oóctios bovinos sob condições convencionais de maturação (38,5°C) (El-Raey et al., 2011; Tian et al., 2014). Da mesma forma, a fragmentação de DNA também não foi influenciada pela melatonina. Esse fato provavelmente se deve ao tempo de exposição ao hormônio, já que embrionárias foi relacionado com a redução da apoptose celular, quando o mesmo foi adicionado ao CIV de embriões suínos (Rodriguez-Osorio et al., 2007).

Como se sabe, os efeitos benéficos da melatonina na maturação exibem dependência da concentração (Reiter et al., 2009; Tian et al., 2014). Assim o excesso de melatonina pode não ter efeito na maturação de oócitos, já que concentrações fisiológicas de EROS são necessárias para o reinício da meiose (Takami et al., 1999; Ramalho-Santos et al., 2009). Apesar de consideradas concentrações utilizadas serem elevadas quando comparadas as presentes no fluido folicular de bovino relatados na literatura, que variam entre  $10^{-9}$  e  $10^{-11}$  M, nenhum efeito negativo foi observado nas variáveis avaliadas no oócito.

A redução da taxa de maturação oocitária promovida pelo choque térmico observada no referido experimento estão de acordo com os apresentados por alguns autores (Nabenishi et al., 2012; Cebrian-Serrano et al., 2013). Sabe-se que o estresse térmico pode ocasionar um atraso na maturação oocitária (Payton et al., 2004), além disso, a redução da taxa de maturação pode ter sido causada pela atuação das EROS diretamente nos oócitos, além da redução da atividade mitocondrial.

A fragmentação de DNA no oócito não foi influenciada pelo choque térmico, como relatado por Takada et al. (2010) e Nabenishi et al. (2012). Contudo, resultados contrários ao presente experimento foram apresentados por Roth e Hansen (2004b; 2005) e Soto e Smith (2009). A redução na maturação ocasionada pelo choque térmico, na ausência de TUNEL positivo, pode estar relacionada à apoptose nas células do cumulus (CCs). Reações apoptóticas são detectadas nas CCs em oócitos submetidos ao choque térmico, mesmo sem a ocorrência da apoptose nos oócitos, sugerindo que a falha de maturação de oócitos submetidos ao choque térmico pode não ter sido, em razão da apoptose ou aos danos no DNA dos oócitos (Yuan et al., 2008; Nabenishi et al., 2012). Portanto, a maturação dos oócitos sob choque térmico pode ter sido inibida pelo aumento de CCs TUNEL positivas.

Na segunda fase experimental, a atividade mitocondrial foi mensurada com base na ação protetora da melatonina sobre mitocôndrias em situações de estresse oxidativo (Carretero et al., 2009; Anjum et al., 2011). Dessa forma, o referido hormônio pode impedir diretamente o dano mitocondrial em oócitos (Tamura et al., 2008), por reduzir os danos às proteínas e ao DNA mitocondrial e melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons (Steinhilber et al., 1995), resultando em melhoria da qualidade oocitária (Tamura et al., 2008). No entanto, a atividade mitocondrial de oócitos tratados não apresentou alteração, resultado similar ao apresentado por autores que adicionaram melatonina ao

meio MIV em oócitos que não foram submetidos ao choque térmico (El-Raey et al., 2011).

O choque térmico reduziu a atividade mitocondrial, demonstrando que mesmo os oócitos de bovinos mestiços podem ser afetados pela temperatura elevada durante o período de maturação. A redução da atividade mitocondrial de oócitos submetidos ao choque térmico durante a MIV também foi observada em bovinos *Bos Taurus* (Gendelman e Roth, 2012 b) e mestiços *Bos Indicus* (Ispada et al., 2011), além da redução do potencial de membrana mitocondrial oocitária (Soto e Smith, 2009).

As mitocôndrias são o principal local intracelular de formação de EROS (Tamura et al., 2013) e a regulação de sua atividade em oócitos é afetada por vários fatores maternos, como o nutricional (Van Hoeck et al, 2013), e ambientais (Soto e Smith, 2009). Algumas das consequências da exposição dos complexos cumulus-oócito ao choque térmico é a redução do potencial de membrana mitocondrial das células do cumulus (Soto; Smith, 2009; Paula-Lopes et al., 2010). Além disso, o DNA mitocondrial é um dos principais alvos das EROS, em razão da sua localização próxima à membrana mitocondrial interna, onde oxidantes são formados e a atividade de reparo do DNA é reduzida (Tamura et al., 2008). O efeito deletério da temperatura pode estar relacionado à perda de competência oocitária e/ou início da ativação da cascata de apoptose. Durante a maturação do oócito, alterações mitocondriais podem surgir a partir da produção excessiva de EROS, que está associada com a produção de energia ou excesso de cálcio que resulta no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e subsequente apoptose (Wang et al., 2009). Tem sido demonstrado que as tensões celulares, muitas vezes, alteram a função mitocondrial e ativam a cascata apoptótica mitocondrial (Ispada et al., 2011). Durante os estádios iniciais da apoptose, proteínas pró-apoptóticas aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, levando à liberação de pequenas moléculas pró-

apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol e subsequente ativação de apoptose (Patterson et al., 2000).

A melatonina reduziu a concentração de EROS, isso se deve ao fato de que o hormônio age detoxificando espécies reativas de oxigênio eletrodeficientes (Vijayalaxmi et al., 2004), além de estimular a atividade de outras enzimas antioxidantes (Tamura et al., 2008; Kumar 2015). Além disso, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o choque térmico direto pode ocasionar um estresse oxidativo em oócitos bovinos, por meio do aumento da produção de EROS.

Na terceira fase experimental, a atividade da enzima caspase-3 foi mensurada, como base no fato de que a melatonina pode atuar como um hormônio antiapoptótico, por meio da regulação da liberação mitocondrial do citocromo c e inibição da caspase -9 e -3 (Baydas et al., 2005). No entanto, a adição do hormônio não alterou a atividade da enzima caspase-3, nessa fase experimental, o que corrobora com o resultado apresentado na primeira fase experimental, em que não ocorreu diferença na fragmentação de DNA.

Na quarta fase experimental, os resultados de PIV observados no presente trabalho corroboram com alguns autores que utilizaram melatonina durante a MIV de oócitos bovinos maturados em condições convencionais e não observaram diferença na clivagem e na taxa de blastocistos (Takada et al., 2010; Takada et al., 2012). Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que a melatonina, quando adicionada ao meio MIV não possui capacidade suficiente para ocasionar alterações no oócito que sejam capazes de influenciar na produção de blastocistos. Esse fato talvez não esteja relacionado à ação ineficiente do hormônio em si, mas sim à curta exposição dos oócitos, durante a MIV, já que trabalhos em que o hormônio foi adicionado ao meio CIV de embriões bovinos (Wang et al., 2014), bubalinos (Manjunatha et al., 2009) ou

suínos (Rodriguez-Osorio et al., 2007) resultaram em maiores percentuais de produção embrionária.

O número de células apoptóticas (Yuan et al., 2003), a fragmentação de DNA (Nabenishi et al., 2012), a produção de EROS (Russo et al., 2014) e o número total de células (Lonergan et al., 2006) são parâmetros que podem ser utilizados para avaliar a qualidade embrionária. Portanto, os dados referentes à qualidade embrionária estão de acordo com a redução da concentração de EROS e atividade mitocondrial, pois, em oócitos bovinos, a maior quantidade de mitocôndrias ativas está positivamente correlacionada com a alta competência de desenvolvimento (Tarazona et al. 2006). Um resultado interessante do presente estudo foi a melhoria da qualidade embrionária ocasionada pela melatonina, representada pela redução da apoptose das células da MCI, melhoria ocasionada pela redução na produção de EROS. Pode-se inferir também que a melhoria na qualidade dos embriões está relacionada à ação independente de sua propriedade antioxidante, uma vez que já foi proposta uma ação epigenética da melatonina (Korkmaz et al., 2008). Além disso, a melatonina não só tem ação de redução de radicais livres, mas também tem efeitos sobre a maturação dos oócitos pela ativação dos receptores de melatonina na membrana (MT1 e MT2), os quais inibem a atividade da enzima adenilato ciclase e ativa a proteína quinase C (PKC), que melhora a maturação nuclear e a qualidade de blastocistos (Sampaio et al., 2012).

Um trabalho recente (Tian et al., 2014) relatou um efeito dose/dependente, em que dosagens de  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M de melatonina no meio MIV melhoraram o desenvolvimento de embriões e o número médio de células por blastocistos bovinos. A melhoria também foi observada com a adição de  $10^{-9}$  M de melatonina ao meio de CIV de embriões suínos (Rodriguez-Osorio et al., 2007), o que difere dos resultados do presente experimento. Apesar da utilização

de concentrações mais elevadas em nosso estudo, nenhum parâmetro foi afetado pela elevação nas concentrações utilizadas durante a MIV.

Em concordância com os resultados desse estudo, outros trabalhos têm demonstrado que o choque térmico durante a MIV de oócitos bovinos não têm efeito sobre a taxa de clivagem (Rispoli et al., 2011; Payton et al., 2011; Silva et al., 2013; Cebrian-Serrano et al., 2013). Porém, apresenta efeito negativo na taxa de blastocistos (Zhandi et al., 2009; Satrapa et al., 2011; Nabenishi et al., 2012; Rispoli et al., 2011). Os embriões produzidos a partir de oócitos submetidos ao choque térmico apresentaram características negativas que podem ser relacionadas ao efeito da alta temperatura. Isso pode ser confirmado pela redução do número de células totais. A qualidade dos oócitos e do embrião é crítica para a PIV, o aumento do número médio de células/blastocistos representa uma melhoria na mitose e na implantação embrionária, sendo que a qualidade oocitária/embrionária reduzida está diretamente associada ao baixo potencial de desenvolvimento do embrião (Tian et al., 2014). Além disso, o meio de MIV pode alterar os níveis de mRNA em oócitos, afetando a sua capacidade de desenvolvimento (Watson et al., 2000). O comprometimento da função mitocondrial pode resultar no aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e depleção do citocromo c, resultando em morte celular após a ovulação e a fertilização (Fernandes et al., 2012). Da mesma forma que no presente estudo, alguns autores (Lawrence et al., 2004; Roth e Hansen, 2004 b; Soto, Smith et al., 2009) não observaram efeito do choque térmico no número de células dos blastocistos, enquanto outros autores (Ju et al., 2005; Zhandi et al., 2009; Cebrian-Serrano et al., 2013) observaram redução. Semelhante ao presente estudo, foi relatado que o choque térmico não afeta a porcentagem de células da MCI (Ju et al., 2005; Zhandi et al., 2009).

## CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que a utilização de melatonina na concentração de  $10^{-4}$  M, durante a MIV de oócitos bovinos possibilita a melhoria da qualidade dos embriões produzidos. Um dos mecanismos mais importantes é o da redução do estresse oxidativo no oócito, porém sem capacidade de alterar a atividade mitocondrial e da enzima caspase-3. São necessárias novas investigações para determinar se a melatonina pode induzir alterações benéficas na qualidade embrionária à nível molecular. Além disso, seria interessante a avaliação em trabalhos futuros a possível utilização de melatonina *in vivo*, por meio de implantes se torna uma alternativa plausível para melhorar os índices reprodutivos em bovinos. Porém, mais estudos são necessários para a avaliação e desenvolvimento de protocolos, a serem utilizados.

## AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

## REFERÊNCIAS

Anjum, S., Rahman, S., Kaur, M., Ahmad, F., Rashid, H., Ansari, R. A., Raisuddin, S. 2011. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. *Brit. Ind. Biolog. Resear. Assoc.* 49:2849-54.

- Ashrafi, I., Kohram, H., Ardabili, F. F. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 139:25-30.
- Baydas, G., Reiter, R. J., Akbulut, M., Tuzcu, M., Tamer, S. 2005. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 135: 879-886,
- Carretero, M., Escames, G., López, L. C. 2009. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J. Pineal. Res.* 47:192-200.
- Cruz, M. H. C., Leal, C. L., Cruz, J. F., Tan, D. X., Reiter, R. J. 2014 a. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 82:925-932.
- Cruz, M. H. C., Leal, C. L., Cruz, J. F., Tan, D. X., Reiter, R. J. 2014 b. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 150-160.
- Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., Raga, E., Dinnyes, A., Silvestre, M. A. 2013. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. *Reprod. Domestic. Anim.* 48:738-746.
- Cheuquemán, C., Arias, M. E., Risopatrón, J., Felmer, R., Álvarez, J., Mogas, T., Sánchez, R. 2015. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. *Andrologia* 47:604-615.
- De Rensis, F., Garcia-Ispuerto, I., López-Gatius, F. 2015. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology* 84:659-666.

- Du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R., Agarwal, A. 2008. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev. Obst. Gyne.* 3:539-554.
- Edwards, J. L., Ealy, A. D., Monterroso, V. H., Hansen, P. J. 1997. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 48:25-33.
- El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A. E., Sosa, G. A., El-Roos, M. E., Nagai, T. 2011. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 78:250-262.
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M.R., Ferraz, M.L., Araújo, A.B., Rodrigues, C.A., Watanabe, Y.F., Vireque, A.A., Joaquim, D.C., Smith, L.C. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.* 94:2383-2392.
- Fernandes, R., Tsuda, C., Perumalsamy, A.L., Naranian, T., Chong, J., Acton, B.M., Tong, Z.B., Nelson, L.M., Jurisicova, A., 2012. NLRP5 mediates mitochondrial function in mouse oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 86:1-10.
- Gendelman, M., Roth, Z. 2012a. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence. *Biol. Reprod.* 86:1-9.
- Gendelman, M., Roth, Z. 2012b. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol. Reprod.* 87:1-12.
- Gordon, I. 2004. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. Cambridge University Press, London, 576 p.

- Ispada, J., Lima, R. S., Risolia, H. B., Assumpção, M. E. O. A., Visintin, J. A., Paula-Lopes, F. F. 2011. Insulin-like growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:209.
- Jou, M., Peng, T., Hsu, L., Jou, S. B., Reiter, R. J., Yang, C. M., Chiao, C. C., Lin, Y.F., Chen, C. C. 2010. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J. Pineal Res.* 48:20-38,
- Ju, J. C., Jiang, S., Tseng, J. K., Parks, J. E., Yang, X. 2005. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 64:1677-1689,
- Korkmaz, A., Reiter, Russel, J. 2008. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? *J. Pineal Res.* 41-44.
- Kumar, A., Mehrotra, S., Singhg., Narayanan, K., Das, G. K., Soni Y. K., Singh M., Mahla A. S., Srivastava N., Verma M. R. 2015. Sustained delivery of exogenous melatonin influences biomarkers of oxidative stress and total antioxidant capacity in summer-stressed anestrous water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 83:1402-1407.
- Lawrence, J. L., Payton, R. R., Godkin, J. D., Saxton, A. M., Schrick, F. N., Edwards, J. L. 2004. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J. Dairy Sci.* 87:2449–2454.
- Lonergan, F. T., Corcoran, D., Evans, A. C. O. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.

- Manjunatha, B. M., Devaraj, M., Gupta, S. P., Ravindra, J. P., Nandi, S. 2009. Effect of Taurine and Melatonin in the Culture Medium on Buffalo In Vitro Embryo Development. *Reprod. Domestic. Anim.* 44:12-16.
- Meiyu, Q., Liu, L., Roth, Z. 2014. IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. *Zygote*, 1-11.
- Nabenishi, H., Takagi, S., Kamata, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., Tsuzuki, Y. 2012. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol. Reprod. Dev.* 79:31-40.
- Paula-Lopes, F. F., C. M. Mendes: H. B. Risolia, J. S. A. Gonçalves, W. B. Feitosa, M. Raposo, M. E. O. A. Assumpção, And J. A. Visintin. 2010. Cumulus cells response to heat shock and insulinlike growth factor-I. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:333.
- Paula-Lopes, F. F., Lima, R. S., Satrapa, R. A., Barros C. M. 2013. Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *J. Anim. Sci.*, 91:1143-1153.
- Patterson, S., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulos, T., Koehler, C., Kroemer, G. 2000. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.* 7:137-144.
- Payton, R. R., Romar, R., Coy, P., Saxton, A. M., Lawrence, J. L., Edwards, J. L. 2004. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol. Reprod.* 71:1303-1308.
- Payton, R. R., Rispoli, L. A., Saxton A. M., Edwards, J. L. 2011. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *J. Reprod. Dev.*, 57:481-491.

- Pereira, M. M., Machado, M. A., Costa, F. Q., Serapiao, R. V., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. 2010. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:1074-1082.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P. C., Souna, A. P., Amaral, A. 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update.* 15:553-572.
- Reiter, R. J, Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S .D., Mayo, J. C., Sainz, R. M. 2009. Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod.* 81:445-456.
- Rispoli, L. A., Lawrence, J. L., Payton, R. R., Saxton, A. M., Schrock, G. E., Schrick, F. N., Middlebrooks, B. W., Dunlap, J. R., Parrish, J. J., Edwards, J. L. 2011. Disparate consequences of heat stress exposure during meiotic maturation: embryo development after chemical activation vs fertilization of bovine oocytes. *Reproduction* 42:831-843.
- Rocha, R. M., Lima, L. F., Alves, A. M., Celestino, J. J., Matos, M. H., Lima-Verde, I. B., Bernuci, M. P., Lopes, C. A., Bao, S. N., Campello, C. C., Rodrigues, A. P., Figueiredo, J. R. 2013. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 44:1-9.
- Rodriguez-Osorio, N., Kim, I., Wang, H., Kaya, A., Memili, E. 2007. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *J. Pineal Res.* 43: 283-288.
- Roth, Z., Hansen, P. J. 2004a. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71:2072-2078.
- Roth, Z., Hansen, P. J. 2004b. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71:1898-1906.

- Roth, Z., Hansen, P. J. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129:235-244.
- Russo, R., Monaco, D., Rubessa M., El-Bahrawy, K. A., El-Sayed, A., Martino, N. A., Beneult, B., Ciannarella, F., Dell'Aquila, M. E., Lacalandra, G. M., Filioli Uranio, M. 2014. Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after in vitro maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 18,12:16.
- Sakatani, M., Balboula, A.Z., Yamanaka, K., Takahashi, M. 2012. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. *Anim. Scien.* 83:394-402.
- Sampaio, R. V, Conceição, S., Miranda, M. S., Sampaio, L. de F., Ohashi, O. M. 2012. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10:103.
- Satrapa, R. A., Nabhan, T., Silva, C. F., Simões, R. A. L., Razza, E. M., Puelker, R. Z., Trinca, L. A. Barros, C. M. 2011. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 76:1162-1167.
- Schaffazicks, S. R., Pohlmann, A. R., De Cordova, C. A., Creczynski-Pasa, T. B., Guterres, S. S. 2005. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int. J. Pharm.* 289: 209-213.
- Silva, C. F., Sartorelli, E. S., Castilho, A. C. S., Satrapa, R. A., Puelker, R. Z., Razza, E. M., Ticianelli, J. S., Eduardo, H. P., Loureiro, B., Barros, C. M. 2013. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* 79:351-357.

- Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O. 1995. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270:7037-7040.
- Soto, P., Smith, LC. 2009. BH4 peptide derived from Bc-1-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stresses bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 76:637-646.
- Sugiyama, S., McGowan, M., Phillips, N., Kafi, M., Young, M. 2007. Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the in vitro development of bovine zygotes. *Reprod. Domest. Anim.* 42:271-274.
- Takada, L., Martins, A. J., Mingoti, G. Z., Balieiro, J. C. C., Coelho, L. A. 2010. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. *Sci. Agric.* 67:393-398.
- Takada, L., Junior, A. M., Mingoti, G. Z., Balieiro, J. C., Cipolla-Neto, J., Coelho, L. A. 2012. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res. Vet. Sci.* 92: 124-127.
- Takahashi, M. 2012. Oxidative stress and redox regulation in vitro development of mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.* 58:1-9.
- Takami, M., Pres., S., Toyloy, V., Behrman, H. R. 1999. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 276:E684-8.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., Sugino, N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res.* 44:280-287.

- Tamura, H., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka., Sugino, N. 2013. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine Journal*, 60: 1-13.
- Tarazona, A. M., Rodriguez, J. I., Restrepo, L. F., Olivera-Angel, M. 2006. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod. Domestic. Anim.* 41:5-11.
- Tian, X. Z., Wang, F., Hel, C. J., Zhang, L., Tan, D. X., Reiter, R. J., Xu, Jin., Ji, Y., Liu, G. S. 2014. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach *J. Pineal Res.* 57:239-247.
- Van Hoeck, Leroy, J., Alvarez, M. A., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Schnorbusch, K., Bols:, Leese, H. J., Sturmey, R. G., 2013. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. *Reproduction* 145:33-44.
- Vijayalaxmi, Reiter, R. J., Tan, D. X., Herman, T. S., Thomas, C. R. 2004. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phy.* 59: 639-653.
- Wang, L., Wang, D., Zou, X., Xu, C. 2009. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10:483-492.
- Wang, F., Tian, X. Z., Zhou Y. H., Tan, D. X., Zhu, S. E., Daí, Y. P., Liu, G. S. 2014. Melatonin improves the quality of in vitro produced (ivp) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *Plos One* 9:1-7.
- Watson, A. J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L. C., Natale,D., Urquhart, J., Westhusin, M. E. 2000. Impact of bovine oocytematurationmedia on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.* 62:355-364.
- Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M. H., Eftekhari-Yazdi, Zare-Shahneh, A. 2009. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on

- bovine oocyte developmental competence under heat stress. *J. Assist. Reprod. Gen.* 26:605-611.
- Zhang, H., Wu, B., Liu, H., Qiu, M., Liu, J., Zhang, Y., Quan, F. 2013. Improving development of cloned goat embryos by supplementing  $\alpha$ -lipoic acid to oocyte in vitro maturation médium. *Theriogenology* 80:228-233.
- Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Coopman, F. O. J., Mintiens, K. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 59:1585-1596.
- Yuan, Y., Hao, Z. D., Liu, J., Wu, Y., Yang, L., Liu, G. S., Tian, J. H., Zhu, S. E., Zeng, S. M. 2008. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* 70:168-178.