



FABIANE ANGÉLICA DE PAIVA PAULA

**EFEITO DA MELATONINA NA MATURAÇÃO
IN VITRO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A
QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS SOB
CHOQUE TÉRMICO**

LAVRAS – MG

2017

FABIANE ANGÉLICA DE PAIVA PAULA

**EFEITO DA MELATONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA E A QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS SOB
CHOQUE TÉRMICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução animal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves

Orientadora

Prof. Dr. José Camisão de Souza

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Coorientadores

LAVRAS - MG

2017

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

Paiva Paula, Fabiane Angélica de.

Efeito da melatonina na maturação *in vitro* sobre a expressão
gênica e a qualidade de oócitos bovinos sob choque térmico /
Fabiane Angélica de Paiva Paula. - 2017.

92 p. : il.

Orientadora: Nadja Gomes Alves.

Coorientadores: José Camisão de Souza; Luiz Sérgio de Almeida
Camargo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Apoptose. 2. Atividade mitocondrial. 3. Estresse oxidativo. I.
Alves, Nadja Gomes. II. Souza, José Camisão de. III. Camargo,
Luiz Sérgio de Almeida. IV. Título.

FABIANE ANGÉLICA DE PAIVA PAULA

**EFEITO DA MELATONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA E A QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS SOB
CHOQUE TÉRMICO**

**EFFECT OF MELATONIN IN *IN VITRO* MATURATION ON GENE
EXPRESSION AND THE QUALITY OF BOVINE OOCYTES UNDER
HEAT SHOCK**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de agosto de 2017.

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo	EMBRAPA
Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Prof. Dr. Renato Ribeiro de Lima	UFLA
Prof. Dr. Tathiane Ramalho Santos Gionbelli	UFLA

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

LAVRAS - MG

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me dar forças para concluir mais esta etapa em minha vida;

Agradeço a minha família, meus pais Antônio Augusto e Teresinha, meu tio Ailton, meu avô Zé, meus irmãos Fábio e Cristiane e meus sobrinhos, por todo carinho, apoio, paciência e confiança em mim depositados;

Agradeço ao meu esposo João Paulo, por estar ao meu lado durante toda essa etapa, pelo carinho, compreensão e apoio, principalmente nos momentos difíceis, o que tornou possível a realização deste projeto;

À minha orientadora Nadja, pelo apoio, confiança, orientação, contribuição com seus conhecimentos e por todos os ensinamentos;

Ao meu coorientador Luiz Sérgio, pela oportunidade, apoio, auxílio, orientação e contribuição para que este trabalho pudesse ser realizado;

À Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora e a todos os funcionários, em especial Joel, Miro e Carol;

A todos os amigos que fiz nesta jornada, ao Grupo Nutran, em especial ao João Pedro e Débora que muito me ajudaram nesta etapa final;

Um agradecimento especial também a todos os amigos que fiz no Laboratório de Reprodução animal da Embrapa Gado de Leite, Eliza, Jéssica, Luciano, Pedro, Vivian, Gustavo, Rafaela, Judith, Ríbrio, Rhaisa. Lilian e Rafaela pela grandiosa ajuda no experimento, madrugadas de estudo, trocas de estufa, pelos cafés de confraternização e, principalmente, pela amizade.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciências Veterinárias;

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO GERAL

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar o efeito da adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre sua qualidade e expressão de genes específicos. Foram aspirados folículos ovarianos, provenientes de ovários de abatedouro, com 3 a 8 mm de diâmetro. Os oócitos foram maturados sob choque térmico em meio MIV acrescido de melatonina nas concentrações 0; 10^{-12} ; 10^{-9} ; 10^{-6} e 10^{-3} M. No controle positivo, os oócitos foram maturados na ausência de melatonina (NS) sob condição convencional. Foram realizadas de três a seis baterias por análise. Foi considerado o delineamento em blocos ao acaso, sendo os blocos formados pelas baterias. As taxas de maturação e de apoptose, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a atividade mitocondrial foram analisadas por modelos lineares generalizados pelo procedimento GLIMMIX (SAS®). Na análise de expressão gênica, foi utilizado como calibrador o tratamento NS e a eficiência do primer foi calculada pelo programa LinRegPCR, com os resultados analisados pelo *software* REST®. A taxa de maturação não diferiu entre oócitos maturados sob choque térmico com diferentes concentrações de melatonina e não diferiu entre oócitos dos tratamentos 0 M de melatonina sob choque térmico e 0 M de melatonina sob condição convencional. As concentrações 10^{-3} e 10^{-9} M de melatonina reduziram a taxa de maturação em relação ao NS. A melatonina não influenciou a taxa de apoptose. A taxa de apoptose do grupo NS foi menor do que a observada no grupo 0 M, mas não diferiu da observada no tratamento 10^{-3} M. A produção de EROS foi menor nos tratamentos 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M e maior nos tratamentos 0 e 10^{-12} M. A atividade mitocondrial foi menor no tratamento 10^{-3} M em comparação aos demais tratamentos sob choque térmico. A atividade mitocondrial dos oócitos maturados com 10^{-12} , 10^{-9} e 10^{-6} M de melatonina não diferiu da observada nos oócitos do tratamento NS. Oócitos do grupo 0 M apresentaram maior atividade mitocondrial comparado ao grupo NS. Houve sub expressão dos genes *C-MOS* nos tratamentos 10^{-9} e 10^{-12} M de melatonina e de *MAPK* no tratamento 10^{-12} M. Os tratamentos 10^{-3} ; 10^{-6} e 10^{-9} M de melatonina apresentaram superexpressão do gene *GDF9*. Os genes *ZARI* e *HSP40* não foram afetados pela adição de melatonina ao meio MIV ou pelo choque térmico. Conclui-se que a melatonina é capaz de proteger os oócitos contra prejuízos causados pelo choque térmico, sendo a concentração 10^{-6} M a mais eficiente.

Palavras-chave: Apoptose. Atividade mitocondrial. Estresse oxidativo. Maturação nuclear. Transcritos gênicos.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of melatonin addition to the in vitro maturation (IVM) medium of bovine oocytes subjected to heat shock on quality and expression of specific genes. Ovarian follicles from 3 to 8 mm of diameter, were aspirated from ovaries obtained in a slaughterhouse. Oocytes were matured under heat shock in IVM medium with melatonin, in the following concentrations: 0; 10^{12} ; 10^{-9} ; 10^{-6} e 10^{-3} M. In the positive control, oocytes were matured in the absence of melatonin (NS) on conventional condition. Three to six batteries were performed for each analysis. The randomized block design was utilized, being the blocks formed by the batteries. Maturation and apoptosis rate, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial activity were analyzed by generalized linear models through the GLIMMIX procedure (SAS[®]). To the gene expression analysis, the treatment NS was used as a calibrator and the primer efficiency was calculated through the program LinRegPCR, with the results being analyzed by the REST[®] software. Maturation rate did not differ between oocytes matured under heat shock with different melatonin concentration and did not differ between oocytes from treatments 0 M of melatonin under heat shock and 0 M of melatonin under conventional conditions. The concentrations 10^{-3} and 10^{-9} M of melatonin reduced the maturation rate in comparison to NS. Melatonin did not influence the apoptosis rate. Apoptosis rate from NS group was lower than observed on group 0 M, but it did not differ from the rate observed in the treatment 10^{-3} . ROS production was lower in the treatments 10^{-9} , 10^{-6} , and 10^{-3} M and greater in the treatments 0 and 10^{-12} . Mitochondrial activity of oocytes matured at 10^{-12} , 10^{-9} , and 10^{-6} M of melatonin did not differ from the one observed in oocytes of treatment NS. Oocytes from group 0 M presented greater mitochondrial activity compared to oocytes from group NS. There was subexpression of genes c-MOS in the treatments 10^{-9} and 10^{-12} M of melatonin and of MAPK in the treatment 10^{-12} M. The treatments 10^{-3} ; 10^{-6} and 10^{-9} M of melatonin presented subexpression of the gene GDF-9. Genes ZAR1 and HSP40 were not affected by the melatonin addition to the IVM medium or by the heat shock. Concluding, melatonin is able to protect oocytes from the damage caused by heat shock, being the concentration 10^{-6} the most efficient.

Keywords: Apoptosis. Mitochondrial activity. Oxidative stress. Nuclear maturation. Gene transcripts.

LISTA DE ABREVIATURAS

FIV	Fertilização in vitro
PIV	Produção <i>in vitro</i>
VG	Vesícula germinativa
MIV	Maturação in vitro
CIV	<i>cultivo in vitro</i>
GNRh	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
ATP	Trifosfato de adenosina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂ ⁻	Anion superóxido
SOD	Superóxido desmutase
NO	Óxido nítrico
ITU	Índice de temperatura e umidade
Td	Temperatura de bulbo seco
Tw	Temperatura de bulbo úmido
NS	Não estresse
<i>C-MOS</i>	<i>Murine sarcoma viral proto-oncogene homolog</i>
CCOs	Complexos cumulus-ophorus
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
<i>GDF9</i>	<i>Growth differentiation factor 9</i>

GVBD	Quebra da vesícula germinativa
HSP	Proteína do choque térmico
<i>HSP40</i>	Proteína do choque térmico de 40 kda
HSP70	Proteína do choque térmico de 70 kda
<i>MAPK</i>	Proteína quinase ativada por mitógeno
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PVA	Álcool polivinílico
REST	<i>Relative expression software tool</i>
TALP	<i>Tyrode's albumin lactate pyruvate</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling</i>
YWHAZ	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>
ZARI	<i>Zygote arrest</i>

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIALTEÓRICO	15
2.1	Estresse térmico em bovinos	15
2.2	Estresse térmico e reprodução	17
2.2.1	Eventos celulares e moleculares desencadeados pelo estresse térmico nos oócitos e embriões	20
2.3	Melatonina na reprodução	23
2.3.1	Melatonina como antioxidante e anti-apoptótico	25
2.3.2	Efeitos na maturação de oócitos e cultivo de embriões <i>invitro</i>	27
2.4	Genes relacionados à competência oocitária e ao estresse térmico	30
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	35
	REFERÊNCIAS	37
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	51
	ARTIGO 1 - MELATONINA PROTEGE OÓCITOS BOVINOS CONTRA O CHOQUE TÉRMICO E INFLUENCIA A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO	51

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O estresse térmico é um problema severo em bovinos, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos dentro da pecuária leiteira. Tais prejuízos estão relacionados à diminuição da capacidade produtiva e redução do desempenho reprodutivo de todo o rebanho. A diminuição do desempenho reprodutivo foi associada às alterações nos mecanismos endócrinos e hormonais, ao desenvolvimento folicular e à redução na qualidade e na competência de desenvolvimento de oócitos e embriões.

As alterações ocorridas em oócitos e embriões provenientes de animais em estresse térmico têm sido estudadas por meio do modelo do choque térmico, uma vez que os efeitos do estresse térmico *in vivo* são recriados com eficiência em oócitos e embriões submetidos ao choque térmico *in vitro* (PAULA-LOPES et al., 2012). Diminuição da qualidade e da competência de desenvolvimento de oócitos expostos ao choque térmico foi relacionada à diminuição da maturação nuclear, apoptose (ROTH; HANSEN, 2004; 2005), desorganização do citoesqueleto (JU, 2005; ROTH; HANSEN, 2005) e às alterações nos níveis transcricionais de genes envolvidos no crescimento celular, ciclo celular e morte celular programada (PAYTON et al., 2011). Além disso, os prejuízos causados pelo choque térmico têm sido relacionados ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS), levando ao estresse oxidativo (TAMURA et al., 2013).

O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto nas células, podendo levar à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA (TAMURA et al., 2013) e indução da apoptose e, portanto, é prejudicial ao oócito e ao desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI, 2012). Assim, a adição de antioxidantes, como por exemplo, a melatonina, aos meios utilizados na

produção *in vitro* de embriões (PIV) tem sido avaliada como forma de minimizar os efeitos deletérios causados pela produção de radicais livres.

A presença de melatonina no fluido folicular ovariano em diferentes espécies animais fornece indícios de sua atuação na maturação oocitária e/ou no desenvolvimento folicular (BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA et al., 1987; SHI et al., 2009; WANG et al., 2014). Seus efeitos estão relacionados à sua alta eletroreatividade (VIJAYALAXMI et al., 2004) e à capacidade de estimular a atividade de várias enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2008), incluindo glutatona peroxidase e superóxido dismutase (REITER, 2000). Além disso, os efeitos da melatonina no embrião podem ser mediados por mecanismos epigenéticos (LI et al., 2016), sendo capaz de influenciar o estado de metilação do genoma (KORKMAZ; REITER, 2008) e de regular a expressão de genes relacionados à maturação (CRUZ, 2016; TIAN et al., 2014) e ao desenvolvimento do embrião (CRUZ, 2016). O estabelecimento de um estado epigenético maduro no genoma faz parte do processo de maturação do oócito e é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização (HAO et al., 2017). Assim, os possíveis benefícios da adição de melatonina aos meios utilizados na PIV e seu mecanismo de atuação têm sido avaliados.

Apesar dos recentes estudos, ainda não há um consenso sobre a melhor dose a ser adicionada ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. Os resultados disponíveis na literatura mostram variação na resposta em função da dose utilizada, bem como a possibilidade de efeito nocivo com a adição de doses elevadas. Além disso, na maioria dos estudos, a ação da melatonina foi avaliada sob condição convencional de maturação. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de melatonina adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre a sua qualidade, *status* antioxidante e expressão de genes específicos. A adição de melatonina ao meio MIV poderá resultar em oócitos com maior potencial de desenvolvimento, por

melhoria na maturação, redução de apoptose e do estresse oxidativo e regulação da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e às defesas antioxidantes. Os resultados desse estudo têm o potencial de serem aplicados na PIV de embriões, com a sugestão da dose de melatonina que resulte em benéficos na maturação oocitária, especialmente se os oócitos forem provenientes de vacas em estresse térmico.

2 REFERENCIALTEÓRICO

2.1 Estresse térmico em bovinos

Como todos os homeotérmicos, os bovinos regulam a temperatura corporal por meio da troca de calor para o ambiente e utilizam diferentes formas de adaptação para manter seu estado de homeostase (RHOADS et al., 2010). A termorregulação é um fenômeno natural dos animais e é priorizada dentre muitas funções do organismo (produção e reprodução). A menor capacidade do animal em realizar o controle da temperatura corporal, ou seja, de se manter em condições termoneutras, é responsável pela diminuição da produtividade do animal (MARTELLO et al., 2013).

O estresse térmico é definido como um ambiente que age alterando a temperatura do corpo além da temperatura ideal (HANSEN, 2009), por meio da combinação de diferentes fatores como, temperatura, umidade relativa, radiação solar, movimento do ar e precipitação (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007). O índice de temperatura e umidade (ITU) é uma medida amplamente utilizada para estimar o grau de estresse térmico do animal e associa os efeitos da temperatura do ambiente e umidade relativa do ar (THOM, 1959 apud BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007). Diferentes formas têm sido propostas para o cálculo do ITU, levando em consideração a temperatura de bulbo seco e temperatura de bulbo úmido. Thom (1959) apud Bohmanova, Misztal e Cole (2007), sugere o modelo descrito abaixo para cálculo do ITU:

$$\text{ITU} = 0,72 \times (\text{Td} + \text{Tw}) + 40,6$$

Em que;

ITU= índice de temperatura e umidade;

Td = temperatura de bulbo seco, °C;

T_w = temperatura de bulbo úmido, °C

Vacas leiteiras de alta produção não apresentam estresse quando o ITU for inferior a 72. O estresse é considerado ameno ou brando quando o intervalo for de 72 a 78, moderado quando for de 79 a 88 e severo quando for de 89 a 98 (ARMSTRONG, 1994).

As respostas fisiológicas dos bovinos ao estresse térmico têm sido bem descritas (BEATTY et al., 2006; MARTELLO et al., 2013; O'BRIEN et al., 2010; SILVA et al., 2002) e incluem a redução do consumo de matéria seca, aumento da temperatura retal, das frequências respiratória e cardíaca e do consumo de água. A magnitude do estresse térmico depende de adaptações genéticas e fisiológicas que determinam a temperatura corporal (HANSEN, 2013b). Uma rede de genes responde ao estresse térmico com sinais intra e extracelulares, que coordenam o metabolismo celular e animal. A ativação desse sistema parece ser iniciada quando a temperatura da superfície corporal excede 35 °C, e os animais começam a armazenar calor e aumentar rapidamente os mecanismos de regulação da perda de calor por evaporação cutânea. Com a persistência do estresse, essas alterações de expressão de genes conduzem a um estado fisiológico alterado em resposta a sinais do sistema endócrino (COLLIER et al., 2008).

Os animais *Bos indicus* são mais bem adaptados para lidar com períodos contínuos de alta temperatura e umidade, pois experimentam menor variação no consumo de matéria seca, na temperatura corporal, na frequência respiratória e nos gases sanguíneos (BEATTY et al., 2006). Assim, raças de *Bos indicus* são mais resistentes às condições tropicais, alta umidade e alta temperatura, comparadas às raças que evoluíram na Europa, como o gado holandês (PAULA-LOPES et al., 2003). Animais *Bos indicus* têm maior capacidade termorregulatória que *Bos taurus*, em razão de uma série de diferenças genéticas

que lhes conferem melhor tolerância térmica (ROY; COLLIER, 2012). Tal fato relaciona-se ao fenômeno de aclimatação, que refere-se às mudanças fenotípicas ao longo da vida em animais sob condições de estresse (COLLIER et al., 2008; ROY; COLLIER, 2012).

Vacas de alta produção de leite são mais susceptíveis ao calor por possuírem maior demanda metabólica e maior produção de calor metabólico (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000). A produção e acúmulo de calor, somados à capacidade de arrefecimento comprometida, em decorrência das condições ambientais, faz com que a carga térmica na vaca aumente de tal forma que a temperatura do corpo se eleve, resultando em perda da produtividade animal (WEST, 2003). Assim, animais em lactação e com alta produção são mais susceptíveis aos efeitos prejudiciais gerados pelo estresse térmico, sofrem maiores efeitos na reprodução, provavelmente, em razão de sua taxa metabólica aumentada e sua menor capacidade de termorregulação (BERMAN et al., 1985 apud AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999).

Nesse contexto, é importante ressaltar que diferentes estratégias ambientais utilizadas para o controle do estresse térmico, tais como o uso de ventiladores e aspersores nas instalações, conseguem resolver parcialmente o problema, melhorando as condições ambientais às quais o rebanho é mantido, e minimizando efeitos na produção. No entanto, as estratégias disponíveis para solucionar esses problemas ainda são limitadas (LIMA et al., 2013) e os prejuízos nas funções reprodutivas persistem (HANSEN et al., 2001). Com isso, torna-se necessária a busca de alternativas para aumentar a capacidade reprodutiva do rebanho e assim sua eficiência produtiva.

2.2 Estresse térmico e reprodução

Tem sido relatado que o estresse térmico é responsável pelo aumento do número de serviços e do intervalo de partos (RAY; HALBACH;

ARMSTRONG, 1992), redução da duração e intensidade do estro (GANGWAR; BRANTON; EVANS, 1964; HUSSAIN; FUQUAY; YOUNAS, 1992) e redução na taxa de concepção (JORDAN, 2003). Essas alterações são consequências de diversos fatores como falhas no desenvolvimento folicular, nos mecanismos endócrinos e hormonais, na qualidade e na capacidade de desenvolvimento do oócito e do embrião (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; BADINGA et al., 1993; RENSIS; SCARAMUZZI, 2003; WILSON et al., 1998a; 1998b).

Em estudo realizado por Gwazdauskas, Thatcher e Wilcox (1973), a fertilidade de vacas leiteiras foi influenciada, principalmente pela temperatura média diária e pela temperatura uterina. Mesmo animais que vivem em clima temperado sofrem os prejuízos gerados pelo estresse térmico, sendo que a hipertermia pode ocorrer de forma intensa em bovinos quando a temperatura ambiental está por volta de 25-28 °C (RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LOPEZ-GATIUS, 2015; SILVA, 2011).

Dois mecanismos gerais podem estar envolvidos com os prejuízos gerados pelo estresse térmico nos processos reprodutivos (HANSEN, 2009). Primeiro, as adaptações envolvendo a redistribuição do fluxo sanguíneo corporal para a periferia e a redução na ingestão de alimentos durante o estresse térmico. Segundo, as falhas na regulação da reprodução; visto que as temperaturas corporais acima do ideal podem comprometer a função dos gametas, o desenvolvimento inicial do embrião e talvez outras células envolvidas na reprodução. Outra possível explicação seria o efeito da temperatura ambiente levando a modificações físicas e químicas das propriedades das membranas celulares (ZERON et al., 2001).

Em animais sob estresse térmico ocorre a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e o consequente aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticóides. Além disso, o calor ambiental, tanto de curto quanto de longo

prazo, afeta glândulas endócrinas e a liberação de hormônios como tiroxina (T4), triiodotironina (T3), IGF-1, aldosterona, cortisol, hormônio do crescimento (GH) e catecolaminas. O declínio nos hormônios da tireoide juntamente com a diminuição na concentração de GH tem efeito sinérgico para reduzir a produção de calor (AGGARWAL; UPADHYAY, 2013).

O estresse térmico faz com que haja disfunção na liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) (AGGARWAL; UPADHYAY, 2013). Ainda, a exposição prolongada ao estresse térmico por calor pode danificar células da granulosa e da teca no estágio inicial da multiplicação e/ou diferenciação, causando efeitos negativos em longo prazo sobre a qualidade dos folículos ovarianos (BADINGA et al., 1993). Em trabalho realizado em Israel, Zeron et al. (2001) observaram menor taxa de concepção no verão (11,3 e 14,2% em multíparas e 14,6 e 16,6% em primíparas, respectivamente) comparado com o inverno (38,8 e 39,6% em multíparas e 44,4 e 43,7% em primíparas, respectivamente). Segundo os autores, as diferenças relacionadas com a estação do ano provavelmente foram o resultado de mudanças no número de folículos, oócitos ou no desenvolvimento oocitário, visto que os efeitos estacionais afetaram todas as células foliculares (teca, granulosa, *cumulus* e oócitos).

Rocha et al. (1998), avaliando a influência da alta temperatura e da alta umidade na qualidade de oócitos de vacas das raças Holandês e Brahman não lactantes, observaram menor porcentagem de oócitos viáveis e redução no total de oócitos que se desenvolveram aos estágios ≥ 8 células, mórula e blastocisto durante a estação quente, comparado com a estação fria, nas vacas da raça holandesa. Nos animais da raça Brahman, não foi encontrada nenhuma diferença entre as estações. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que no estado aclimatado ("resposta fenotípica ao longo da vida"), o metabolismo é

ajustado para minimizar os efeitos negativos do aumento da carga de calor térmico (COLLIER et al., 2008).

Al-Katanani, Paula-Lopes e Hansen (2002), trabalhando com vacas holandesas em duas estações diferentes, inverno e verão, observaram que a taxa de clivagem durante a estação quente foi ligeiramente maior. No entanto, a proporção de oócitos e embriões clivados que se desenvolveram até blastocisto no dia 8 após a inseminação foi menor, indicando diminuição na competência dos oócitos durante o verão. Diferenças entre as estações do ano, verão e inverno, também foi encontrada por Ferreira et al. (2011), que relataram que a taxa de desenvolvimento de oócitos obtidos de vacas repetidores de cio a blastocistos foi severamente comprometida pelo estresse térmico, sendo essa perda na competência confirmada pela maior taxa de fragmentação nuclear.

2.2.1 Eventos celulares e moleculares desencadeados pelo estresse térmico nos oócitos e embriões

Em razão da eficiência em recriar os efeitos do estresse térmico em oócitos e embriões *in vitro*, o modelo de choque térmico tem sido amplamente utilizado (PAULA-LOPES et al., 2012). A exposição do oócito ao estresse térmico tanto na fase de vesícula germinativa (VG) como durante o período de maturação oocitária (PAULA- LOPES et al., 2012), faz com que haja diminuição da competência dos oócitos, diminuindo o número e a qualidade de estruturas capazes de gerar prenhez (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; FERREIRA et al., 2011; GENDELMAN et al., 2010). No entanto, os mecanismos celulares e os eventos moleculares relacionados à sobrevivência ou morte dos oócitos em resposta ao estresse térmico ainda não são bem esclarecidos (PAULA-LOPES et al., 2012). A diminuição da qualidade e da competência de desenvolvimento de oócitos expostos ao choque térmico foi relacionada às alterações celulares, diminuição da maturação nuclear, apoptose

(ROTH; HANSEN, 2004, 2005) e desorganização do citoesqueleto (JU, 2005; ROTH; HANSEN, 2005). Lima (2012) e Paula-Lopes et al. (2012) observaram que o choque térmico resultou no aumento da fragmentação de DNA e reduziu a atividade mitocondrial, sugerindo ativação da via mitocondrial de apoptose.

Ascari (2015), trabalhando com maturação de oócitos sob duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5 °C e 5% CO₂ ou choque térmico: 12 horas a 41 °C seguido por 12 horas a 38,5 °C e 5% CO₂), verificou que o choque térmico reduziu a porcentagem de maturação nuclear e a atividade mitocondrial e aumentou a produção de EROS pelos oócitos. Ainda, neste estudo, houve redução na produção de blastocistos, aumento na taxa de embriões degenerados e redução no número total de células embrionárias.

Os radicais livres e suas espécies não radicais relacionadas são chamados EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; TAMURA et al., 2009). São definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita atômica ou molecular (TAMURA et al., 2009) e incluem radicais hidroxila, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio óxido nítrico (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006). Aumento de EROS, gerado pelo estresse térmico, tem sido relacionado com os danos nos oócitos durante o período pré-ovulatório e durante o desenvolvimento embrionário (HANSEN 2009; NABENISHI et al., 2012; ROTH et al., 2008).

As EROS são produzidas pelo metabolismo normal das células (SORDILLO; AITKEN, 2009; TAMURA et al., 2009), pelo embrião e seu ambiente (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005) e pelo sistema de produção de energia (SORDILLO; AITKEN, 2009). A manutenção da homeostase intracelular é resultado da interação de pro-oxidantes e antioxidante e as falhas, nesse processo, levam à instalação do chamado estresse oxidativo (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, 1993;

TAMURA et al., 2013). Portanto, o estresse oxidativo ocorre quando há aumento na produção de oxidantes e formação de radicais livres que excede a capacidade do corpo de neutralização e eliminação (MANDELKER; VAJDOVICH, 2011). A ação do choque térmico é, provavelmente, reflexo do aumento no metabolismo celular causado pela temperatura elevada, de modo que as reações que geram radicais livres são aumentadas (HANSEN, 2013a).

O estresse térmico está relacionado com o aumento do estresse oxidativo. Em consequência ao estresse oxidativo podem ocorrer peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, 1993; TAMURA et al., 2013) e indução da apoptose (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; TAKAHASHI, 2012). Além dessas consequências, diferentes autores relatam o aumento de danos aos oócitos e células da granulosa dentro do folículo (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; TAMURA et al., 2013) e às membranas celulares e mitocôndrias (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006), redução na formação de colônias e aumento na taxa de apoptose das células da granulosa (FU et al., 2014); redução na taxa de maturação oocitária (ASCARI, 2015) e morte embrionária (MANDELKER; VAJDOVICH, 2011).

O equilíbrio entre a produção de EROS e a ação de antioxidantes é um fator importante para a maturação dos oócitos e fertilização (TAMURA et al., 2009). Tentativas para melhorar as defesas antioxidantes *in vivo*, reduzindo prejuízos na fertilidade causados pelas EROS têm falhado, incluindo injeções de vitamina E com ou sem selênio (EALY; ARECHIGA; BRAY, 1994; PAULA-LOPES et al., 2003) e injeção de β -caroteno (ARÉCHIGA et al., 1998). O uso da melatonina como captador de radicais livres e antioxidante do sistema reprodutivo tem sido avaliado (ADRIAENS et al., 2006; ASCARI, 2015; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; REITER et al., 2007; TAMURA et al., 2012). No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o uso de

antioxidantes nas técnicas reprodutivas a fim de se obter maiores taxas reprodutivas.

2.3 Melatonina na reprodução

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina multifuncional secretada pela glândula pineal (TIAN et al., 2014). A puberdade, crescimento folicular, ovulação, luteinização, fertilização e implantação envolvem mudanças que são controladas pelo sistema endócrino reprodutivo (TAMURA et al., 2014). A regulação da reprodução pela melatonina provavelmente ocorre nos neurônios hipotalâmicos, hipófise, gônadas e tecidos reprodutivos (BALÍK et al., 2004; VANECEK, 1998). No entanto, em mamíferos, o papel mais importante da melatonina é mediar a regulação dos ritmos sazonais por fotoperíodos (VANECEK, 1998), por meio do controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (TAMURA et al., 2014).

A melatonina sinaliza por meio da ativação de pelo menos dois receptores de alta afinidade acoplados à proteína G, MT1 e MT2 (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; TAMURA et al., 1998, 2014). Nos mamíferos, os receptores de melatonina são expressos em alta densidade nos neurônios hipotalâmicos localizados no sistema nervoso central e nos neurônios que secretam GnRH dentro da área pré-óptica e/ou no hipotálamo médio basal, dependendo das espécies (BALÍK et al., 2004; DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005) e nos tecidos periféricos (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). A ligação desses receptores à proteína G provocam redução na concentração de AMPc, via inibição de adenilato sintase, que está envolvida na síntese de AMPc (TAMURA et al., 2009). Outra maneira de ação da melatonina na reprodução é a regulação dos mecanismos dependentes de Ca^{2+} na hipófise. O efeito da melatonina na concentração de Ca^{2+} parece ser

decorrente da hiperpolarização e consequente inibição do influxo de Ca^{2+} por meio de canais voltagem sensíveis (VANECEK, 1995, 1998).

A presença de melatonina no fluido folicular de humanos (BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA et al., 1987), suínos (SHI et al., 2009) e bovinos (TIAN et al., 2014) e a presença de receptores nas células da granulosa (ADRIAENS et al., 2006) fornecem indícios de sua atuação na maturação oocitária e/ou no desenvolvimento folicular. Tamura et al. (1998) observaram que a melatonina diminuiu a produção de AMPc induzido pelo LH nos folículos pré ovulatórios e suprimiu diretamente a esteroidogênese folicular (células da teca) em hamsters. Adriaens et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de melatonina adicionada ao meio de cultivo de folículos *in vitro* na foliculogênese e oogênese de ratos. A concentração de progesterona foi maior na presença de 100 μM e 1mM de melatonina no meio de cultivo. A dose de 100 μM de melatonina aumentou a produção de androstenediona. O cultivo com 1 ou 2 mM de melatonina ocasionou redução na concentração de estradiol. Os autores sugeriram que a melatonina possui efeito direto na esteroidogênese das células da teca.

Em estudo realizado por Webley e Luck (1986), a adição de melatonina ao meio de cultura das células da granulosa de humanos nas doses de 200 e 800 pg/mL, estimulou a secreção de progesterona e não influenciou a de estradiol. Nas células da granulosa de bovinos houve aumento significativo de progesterona na dose de 200 pg/mL. Os autores sugeriram que a melatonina altera a taxa de absorção de colesterol ligado às lipoproteínas do soro, a taxa de metabolismo intracelular de lipoproteínas e a conversão do colesterol em progesterona ou alterando a taxa de síntese de novo de progesterona a partir de acetato.

2.3.1 Melatonina como antioxidante e anti-apoptótico

O estresse térmico (BERNABUCCI et al., 2002), bem como a manipulação *in vitro* e as condições de cultura expõem os oócitos e embriões ao estresse oxidativo, resultantes da exposição à luz, das concentrações elevadas de oxigênio e das concentrações incomuns de metabólitos e substratos (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006). Tais consequências sugerem a possibilidade de manipulações das defesas antioxidantes para minimizar os efeitos gerados tanto pela manipulação *in vitro* quanto pelo excesso de calor.

Os antioxidantes não enzimáticos, ou sequestradores de radicais livres removem EROS diretamente, em razão de sua capacidade doadora de elétrons, neutralizando assim o potencial tóxico das EROS (TOMAS-ZAPICO; COTOMONTES, 2005). Os radicais mais conhecidos gerados a partir de O₂ incluem a superóxido ânion radical (dióxido ou O₂), o radical hidroxila (OH) e óxido nítrico (NO) (REITER et al., 1997).

Tanto *in vivo* como *in vitro*, a melatonina tem mostrado potencial para reduzir a peroxidação lipídica e o dano oxidativo ao DNA nuclear (REITER, 1998). Os primeiros relatos da melatonina como potente captador de radicais livres foi por volta de 1993 e a partir daí muitos estudos foram realizados, confirmando esse potencial (ADRIAENS et al., 2006; POEGGELER et al., 1993; REITER, 2000; REITER et al., 2007; TAN et al., 2002). No entanto, estudos *in vitro* indicam que dependendo da concentração, a melatonina poderá apresentar atividade antioxidante ou pró-oxidante (VIJAYALAXMI et al., 2004).

Por ser altamente eletro-reativa (DOMINGUES et al., 2012), a melatonina age primariamente como doador de elétrons e detoxifica EROS eletro deficientes (VIJAYALAXMI et al., 2004). O potencial antioxidante está relacionado tanto com a neutralização de EROS e ERNS como com o estímulo de enzimas antioxidantes (SAIJA et al., 2002; TAMURA et al., 2009), que

incluem a superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase (TAMURA et al., 2008; TOMAS-ZAPICO; COTOMONTES, 2005). A ativação de enzimas antioxidantes e a diminuição da atividade de enzimas pró-oxidantes protegem o DNA nuclear e os lipídios de membrana dos danos oxidativos, melhorando a capacidade de defesa antioxidante total do organismo (REITER et al., 1997; SCHAFFAZICK et al., 2005). Essas sucessivas ações são classificadas como a cascata antioxidante da melatonina (TAN et al., 2013).

Em razão da sua natureza anfifílica, a melatonina pode chegar a qualquer compartimento celular, incluindo a membrana, citoplasma e mitocôndrias, com facilidade (FU et al., 2014). Essa propriedade a torna interessante para as pesquisas, uma vez que seu potencial protetor pode ser explorado em qualquer ambiente celular.

Fu et al. (2014), objetivando explorar os efeitos da melatonina sobre a proliferação e apoptose das células da granulosa de ovinos cultivadas sob estresse térmico, confirmaram seu papel antioxidante e antiapoptótico. A eficiência na formação de colônias (EFC) foi maior, houve redução na apoptose das células e regulação positiva da expressão do gene Bcl-2 e negativa do gene p53, quando adicionada a dose 10^{-7} M de melatonina ao meio de cultivo. Os autores cogitaram que a melatonina pode regular diretamente a Bcl-2 ou, indiretamente, via regulação da p53, consequentemente inibindo a liberação de Citocromo C. Tal mecanismo está diretamente ligado a apoptose da célula.

Os efeitos da melatonina, bem como seu mecanismo de ação sobre a maturação de oócitos e o desenvolvimento do embrião ainda carecem de maior entendimento. Essas lacunas devem tornar-se pontos de partida para novas pesquisas, uma vez que o potencial da melatonina como um agente antioxidante nesses tecidos é extraordinária (CRUZ et al., 2014).

2.3.2 Efeitos na maturação de oócitos e cultivo de embriões *in vitro*

A inclusão de melatonina ao meio de maturação de oócitos ou ao meio de cultivo de embriões tem sido avaliada. Os oócitos maturados em meio contendo 0; 0,01 e 1 μM de melatonina durante 24 h, não apresentaram diferença na taxa de maturação, que foi de 72,24; 73,11 e 70,68%, respectivamente (FARAHAVAR et al., 2010). No entanto, mais oócitos maturados na presença de 100 μM de melatonina permaneceram no estágio de metáfase I (MI), comparado com as demais adições (21,32 vs 17,67, 15,68, 16,53). Os autores concluíram que a melatonina em altas concentrações pode afetar a maturação meiótica no estágio de MI, mas é improvável algum efeito tóxico para oócitos bovinos.

Da mesma forma, El-Raey et al. (2011) concluíram que a melatonina pode exercer seus efeitos positivos sobre a progressão de MI para a fase MII mediante a neutralização dos radicais livres em meio MIV ou por mecanismos de sinalização de receptores desconhecidos, uma vez que a taxa de oócitos mantidos na fase de MI no grupo controle foi maior em relação ao grupo tratado com melatonina. Neste experimento, a suplementação de melatonina foi realizada ao meio MIV na concentração de 10 e 50 ng/mL e afetou a progressão nuclear de oócitos de bovinos, resultando em alta porcentagem de oócitos em MII após 22 horas de MIV.

Takada et al. (2010) sugeriram a substituição das gonadotrofinas no meio MIV de oócitos bovinos pela melatonina. Os autores demonstraram que, apesar de a melatonina na concentração de 10^{-9} M não surtir efeito nas taxas de maturação nuclear, clivagem e blastocistos, a mesma pode ser adicionada ao meio MIV de forma a substituir as gonadotrofinas, visto que produziu taxas de desenvolvimento dos embriões comparáveis àqueles tratados com FSH + LH. Em outro estudo, Takada et al. (2012) verificaram que a adição de melatonina ao meio MIV de oócitos reduziu os danos no DNA das células do *cumulus* sem

afetar a taxa de clivagem e a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos.

Ishizuka et al. (2000) cultivaram embriões de ratos num meio fisiológico com ou sem a melatonina. A adição de melatonina na concentração 10^{-4} M aumentou as taxas de embriões que atingiram o estágio de duas células, no entanto não houve efeito na taxa de blastocisto. Na concentração de 10^{-8} M houve aumento da taxa de desenvolvimento a partir de quatro células até blastocisto. Na concentração de 10^{-6} M observou-se efeito promotor em todos os estádios de desenvolvimento (duas células até blastocisto). Esses dados indicam que a melatonina é capaz de estimular o desenvolvimento inicial do embrião após a fertilização *in vitro*.

Para examinar o efeito da melatonina no desenvolvimento de embriões bovinos, Papis et al. (2007) cultivaram os prováveis zigotos em meios contendo 10^{-4} M ou 0 M de melatonina sob duas tensões de oxigênio (20% ou 7%). Os autores demonstraram que, dependendo da tensão de O₂, em um período relativamente curto (48 horas) de cultivo *in vitro* com melatonina, pode haver efeitos significativos sobre a taxa de desenvolvimento e, até certo ponto, na qualidade (número de células) dos embriões. Sob a tensão de O₂ de 20% houve maior taxa de blastocistos (69% vs 51% no grupo controle) e clara tendência de maior número de células. Da mesma forma, em trabalho realizado com suínos, a melatonina na concentração de 10^{-9} M teve efeito positivo na taxa de clivagem e no número de células/blastocisto, que pode ser explicado pelo efeito antiapoptótico causado pela melatonina (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007).

Tian et al. (2014), trabalhando com as concentrações 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11} M observaram efeito positivo na taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número médio de células/blastocisto o quando a melatonina foi adicionada ao

meio MIV de oócitos bovinos nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-9} M. Os autores verificaram ainda redução nas taxas de clivagem e de blastocisto, à medida que a concentração aumentou para 10^{-3} M. Isso indica que as altas concentrações de melatonina podem adiar a maturação citoplasmática do oócito e, assim, influenciar o desenvolvimento do embrião.

Ascari (2015) conduziu estudo com objetivo de avaliar os feitos da adição de melatonina ao meio de maturação sob a condição de incubação convencional e sob choque térmico. O autor confirmou que a adição de melatonina ao meio MIV nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-6} M, em ambas as condições de incubação, reduziu a produção de EROS e na concentração de 10^{-4} M reduziu apoptose nas células da massa celular interna de embriões. No entanto, essas concentrações não influenciaram a taxa de maturação nuclear (MII), a fragmentação de DNA (Tunel-positivo), atividade de enzimas caspases e a atividade mitocondrial dos oócitos, assim como o desenvolvimento embrionário.

Os mecanismos pelos quais a melatonina pode influenciar a maturação e o cultivo *in vitro* são múltiplos (WANG et al., 2014). Cruz et al. (2014) sugeriram que a melatonina está envolvida na proteção de células da granulosa e na eliminação de EROS dos oócitos, induzindo a síntese e atividade de enzimas antioxidantes e impedindo a indução da via mitocondrial de apoptose.

Esses dados mostram que os efeitos da melatonina são dependentes de sua concentração. A melatonina tem se mostrado atóxica ou de baixa toxicidade *in vivo* e *in vitro* (REITER, 1998). No entanto, alguns estudos mostraram efeitos prejudiciais com doses maiores de melatonina. Rodriguez-Osorio et al. (2007) observaram que a dose de 10^{-3} M reduziu as taxas de clivagem e de blastocisto e Papis et al. (2007) observaram efeitos deletérios na taxa de blastócitos quando

adicionada melatonina na concentração de 10^{-4} M no cultivo com 7% de O₂. Concentrações fisiológicas de EROS são necessárias para o reinício da meiose (RAMALHO-SANTOS et al., 2009; TAKAMI et al., 1999) e, portanto, a melatonina adicionada em altas dose pode ter efeitos prejudiciais.

Com isso, os efeitos benéficos da melatonina na melhoria dos resultados da produção *in vitro* devem ser ainda testados e explorados. Mais estudos acerca da concentração de melatonina a ser adicionada aos meios de maturação e seus efeitos sobre a qualidade dos oócitos e a competência de desenvolvimento a blastocistos são necessários.

2.4 Genes relacionados à competência oocitária e ao estresse térmico

In vivo, oócitos passam por alterações estruturais e moleculares, relacionadas com sua competência de desenvolvimento, que são importantes para o desenvolvimento do embrião (DIELEMAN et al., 2002). *In vitro*, os oócitos são removidos dos folículos e espontaneamente retomam a meiose e não são necessariamente competentes para o desenvolvimento embrionário. A contribuição do oócito é crucial para o desenvolvimento embrionário, contribuindo não somente com metade do material genético, mas também com praticamente todo o citoplasma do zigoto que será formado, fornecendo transcritos e proteínas necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial (SOUSA; WATSON; SCHULTZ, 1998).

Alguns mRNAs e proteínas se acumulam durante o crescimento dos oócitos, como o fator promotor de maturação (MPF), mos e ciclina A2, que estão envolvidos na progressão meiótica e no controle do ciclo celular (WICKRAMASINGHE; ALBERTINI, 1991). O MPF é uma molécula primária envolvida na progressão do ciclo celular meiótico e responsável pela indução da fase M em todas as células eucarióticas. Está relacionado à fosforilação de proteínas que dão origem ao envelope nuclear e àquelas envolvidas com a

condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001). A fosforilação e a desfosforilação de proteínas desempenham papéis fundamentais no ciclo celular meiótico dos ovócitos. O MPF e a proteína quinase ativada por mitógeno (*MAPK*) são os principais sistemas reguladores que impulsionam a progressão meiótica dos oócitos (ZHANG et al., 2011).

O reinício da meiose em oócitos de mamíferos é facilitado pelo MPF e acompanhado pela ativação de *MAPK*, que são fosforilados pela *MAPK* quinase (MEK) (ZHANG et al., 2011). O *MAPK* é uma serina-treonina quinase ativada pela fosforilação no início da maturação dos oócitos em várias espécies (WICKRAMASINGHE; ALBERTINI, 1991). É importante na manutenção da atividade do MPF, formação do fuso meiótico e manutenção e permanência do oócito em metáfase II (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001). *MAPK* retransmite vias, amplificam e integram sinais de uma gama diversificada de estímulos e provocam respostas fisiológicas adequadas, incluindo a proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, respostas inflamatórias e apoptose em células de mamíferos (ZHANG; LIU, 2002).

A ativação da cascata *MAPK* é realizada pela MEK, a qual sofre fosforilação pela ação da MOS. A MOS é uma serina/treonina quinase produto do proto-oncogene *c-MOS* expressa exclusivamente em células germinativas e que está envolvido na reorganização de microtúbulos e cromatina durante a meiose e ativação da via *MAPK* levando à interrupção da MII (COLL; FRENCH; CENTRE, 1996). Em síntese, a proteína MOS ativa a *MAPK* que controla os níveis de MPF, possibilitando a transição da fase do ciclo celular G2 para a mitose (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001).

Outros transcritos e proteínas são cruciais para a formação dos folículos, crescimento do oócito e progressão da meiose como o *zigote arrest 1 (ZARI)* e o *growth differentiation fator 9 (GDF9)*, os quais irão contribuir para fertilização e

o início do desenvolvimento embrionário e permitir que o embrião passe o período da transição materno-zigótica (TMZ). O TMZ é o período de desenvolvimento que abrange desde a fertilização até o controle do início da embriogênese, no qual há alteração da regulação por fatores derivados de oócitos para a regulação por produtos do genoma embrionário (TRIPURANI et al., 2011). Durante esse período, o desenvolvimento embrionário é suportado por RNAs maternos e proteínas sintetizadas durante a oogênese. A duração desse período depende da espécie considerada, em bovinos e ovinos até o estágio de 8 – 16 células (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990).

O *ZARI* é um gene materno importante na TMZ. Seu RNAm está presente em oócitos e embriões de uma célula, diminui acentuadamente no estágio de duas células e não pode ser detectado em estágios adicionais de desenvolvimento, nem em nenhum outro tecido além do ovário (BREVINI et al., 2004). Os embriões de *ZARI* knockout permanecem no estágio de uma célula e apresentam redução acentuada na síntese do complexo requerido para transcrição durante a transição materno-embriônica. Menos de 20% dos embriões progridem para o estágio de duas células e nenhum embrião se desenvolve ao estágio de quatro células (WU et al., 2003).

Um grande número de fatores de crescimento e diferenciação essenciais para o desenvolvimento está relacionado ao fator de transformação do crescimento β (TGF β). Dentre os membros dessa superfamília, destaca-se o *GDF9*, que é secretado pelos oócitos inclusos em folículos em crescimento (HREINSSON et al., 2002). O *GDF9* é um transcrito materno secretado no oócito, durante a foliculogênese e o alto nível de *GDF9* no fluido folicular está correlacionado com a maturação nuclear e a qualidade embrionária (GODE et al., 2011). Seu principal papel está relacionado com o crescimento das células da teca e da granulosa, bem como com a diferenciação e maturação do oócito (HREINSSON et al., 2002). No entanto, a janela relativamente longa da

expressão de GDF-9 durante o desenvolvimento de oócitos sugere que talvez o GDF-9 possa desempenhar múltiplos papéis regulatórios (MCGRATH; ESQUELA; LEE, 1995). Kathirvel, Soundian e Kumanan (2013). avaliando o comportamento do *GDF9* na maturação *in vitro* de oócitos de búfala observaram que durante a maturação de oócitos *in vitro*, o RNAm de *GDF9* apresentou redução significativa entre 0 h e 24 h de maturação, sendo que sua concentração se apresentou estável nas 12 primeiras horas de maturação.

O estresse térmico é capaz de alterar a expressão de genes. Mecanismos relacionados à interrupção na competência de desenvolvimento de oócitos não são inteiramente claros, assim, mudanças moleculares e celulares nos oócitos em resposta ao estresse térmico precisam ser investigadas (GENDELMAN et al., 2010). Gendelman e Roth (2012) observaram que a quantidade de transcritos associados à competência oocitária armazenados no citoplasma foram menores em oócitos submetidos ao choque térmico. O bloqueio no desenvolvimento embrionário pode ser decorrente da incapacidade de superar a repressão da cromatina e ativar a transcrição de importantes genes de desenvolvimento e / ou de reagir às lesões causadas pelo meio ambiente (MEIRELLES et al., 2004).

A resposta primária de proteção celular ao estresse compreende a atuação de proteínas conhecidas como HSPs (Heat Shock proteins) (CASTRO et al., 2013). O estudo pioneiro com as HSPs foi em 1962 quando células *Drosophila busckii* foram submetidas ao estresse térmico e químico e observou-se o aumento nos níveis de HSP (Ritossa 1962). As HSPs são proteínas maternas que auxiliam nos processos celulares que envolvem desde a montagem do citoesqueleto até o controle do ciclo celular (KREGEL, 2002). Em temperaturas normais estão envolvidas como dobramento e transporte de proteínas, renaturação de moléculas proteicas, regulação específica do estágio de desenvolvimento celular, controle do ciclo celular, estabilidade do citoesqueleto e respostas imunes. Em situações de choque térmico a síntese das HSPs e a

expressão de genes são reguladas pela ativação do fator de transcrição do choque térmico (*Heat shock factor* – HSF) (JU, 2005). Essa ativação é reversível e envolve a organização da molécula em trímeros ativos, que são translocados para o núcleo e posteriormente se ligam a domínios específicos do DNA, com ativação da transcrição dos genes de HSPs (FUJIMOTO; NAKAI, 2010).

As HSPs podem ser agrupadas em pequenas Hsp, *HSP40*, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100, de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD), determinados pelo método SDS-PAGE (FULLER et al., 1994). As Hsp70 estão envolvidas na tradução, dobramento, desdobração, translocação e degradação de proteínas, enquanto que as proteínas DnaJ / *HSP40* são importantes para esses processos, principalmente promovendo a atividade de hidrólise de ATP. Como a hidrólise de ATP é essencial para a atividade de Hsp70s, as proteínas DnaJ / *HSP40* determinam realmente a atividade de Hsp70s estabilizando sua interação com proteínas de substrato (QIU et al., 2006).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estresse térmico gera prejuízos econômicos por comprometer a produção e a reprodução dos bovinos, especialmente os de raças de origem europeia, sendo alvo de estudos em diversos países. Por ser um fator de grande impacto econômico, estratégias para mitigação dos efeitos do estresse térmico sobre a reprodução são continuamente desenvolvidas e avaliadas.

A temperatura elevada pode levar ao acúmulo de radicais livres e causar estresse oxidativo nos oócitos, comprometendo a sua competência de desenvolvimento. Assim, a adição de antioxidantes, como a melatonina, ao meio MIV pode auxiliar na mitigação dos efeitos do estresse térmico nos oócitos de bovinos. Embora existam pesquisas em que a melatonina foi adicionada ao meio MIV, ainda não se tem conhecimento sobre a melhor dose a ser adicionada, com vistas a favorecer a maturação, reduzir a apoptose e o estresse oxidativo. Ainda, na maioria dos estudos realizados, a ação da melatonina foi avaliada na MIV de oócitos sob condição convencional de maturação.

Assim, a avaliação dos efeitos citoprotetores da melatonina, bem como o conhecimento do comportamento de transcritos gênicos relacionados ao estresse e à competência de desenvolvimento de oócitos maturados sob choque térmico nos fornecerá informações sobre os mecanismos pelos quais a melatonina pode atuar. Espera-se que com a inclusão de melatonina ao meio de maturação, sob choque térmico, haja aumento na expressão de genes relacionados à competência de desenvolvimento dos oócitos e redução ou estabilidade de genes relacionados ao estresse.

REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, I. et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, Amsterdam, v. 228, n. 2/3, p. 333–343, Dec. 2006.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 3, p. 28, July 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 325–332, June 2006.
- AGGARWAL, A.; UPADHYAY, R. **Heat stress and animal productivity**. India: Springer India, 2013. 188 p.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, n. 2, p. 390–396, Feb. 2002.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in a hot climate. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 12, p. 2611–2616, Dec. 1999.
- ARÉCHIGA, C. F. et al. Effect of injection of b-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, n. 1, p. 65–76, July 1998.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 77, n. 7, p. 2044–2050, July 1994.
- ASCARI, I. J. **Efeito da adição do fator de crescimento semelhante à insulina-I e melatonina durante a maturação *in vitro* sobre a qualidade e a competência de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico**. 2015. 147 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- BADINGA, L. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating holstein cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 39, n. 4, p. 797–810, Apr. 1993.

BALÍK, A. et al. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. **Physiological Research**, Praha, v. 53, p. 153-166, 2004. Supplement.

BEATTY, D. T. et al. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 972–985, 2006.

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

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity Indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 90, n. 4, p. 1947–1956, Apr. 2007.

BREVINI, T. A. L. et al. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (*Zar1*) in bovine tissues, oocytes, and embryos. **Molecular, Reproduction & Development**, New York, v. 69, n. 4, p. 375–380, June 2004.

BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, A. et al. Melatonin in human pré ovulatory follicular fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 64, n. 4, p. 865-867, 1987.

CASTRO, S. V. et al. Proteínas de choque térmico hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 7, n. 4, p. 261–271, 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.

CHOI, T. Dimethyl sulfoxide inhibits spontaneous oocyte fragmentation and delays inactivation of maturation promoting factor (MPF) during the prolonged culture of ovulated murine oocytes in vitro. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 279–284, May 2011.

COLL, V.; FRENCH, K.; CENTRE, N. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. **Development**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 815-822, Mar. 1996.

COLLIER, R. J. et al. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 91, n. 2, p. 445–454, Feb. 2008.

CRUZ, M. H. C. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro***. 2016. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

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

CUNHA, M. C. R. V. da. **A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos**. 2014. 100 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

DIELEMAN, S. J. et al. Effects on *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 1, p. 5–20, Jan. 2002.

DOMINGUES, W. B. et al. **Efeito da suplementação de melatonina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos**. Pelotas: [s.n.], 2012. 4 p.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, Houndsmills, v. 27, n. 2, p. 101–110, July 2005.

EALY, A. D.; ARECHIGA, C. F.; BRAY, D. R. Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows 1. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 77, n. 12, p. 3601–3607, Dec. 1994.

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

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 & Development**, New York, v. 78, n. 4, p. 250–262, Apr. 2011.

FARAHAVAR, A. et al. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 17, p. 2579–2583, 2010.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 5, p. 836–848, Mar. 2009.

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**, Lancaster, v. 94, n. 5, p. 2383–2392, May 2011.

FU, Y. et al. Effects of melatonin on the proliferation and apoptosis of sheep granulosa cells under thermal stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 11, p. 21090–21104, Nov. 2014.

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 277, n. 20, p. 4112–4125, Oct. 2010.

FULLER, K. J. et al. Cancer and the heat shock response. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1884–1891, 1994.

GANDOLFI, T. A. L. B.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, Apr. 2001.

GANGWAR, P. C.; BRANTON, C.; EVANS, D. L. Reproductive and physiological responses of holstein heifers to controlled and natural climatic conditions. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 48, p. 222–227, Feb. 1964.

GENDELMAN, M. et al. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction Research**, Cambridge, v. 140, n. 1, p. 73–83, 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 1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 1–9, Jan. 2012.

GODE, F. et al. Influence of follicular fluid *GDF9* and *BMP15* on embryo quality. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 7, p. 2274–2278, June 2011.

GUZELOGLU, A. et al. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 66, n. 1/2, p. 15–34, Apr. 2001.

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

HANSEN, P. J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, p. 322–333, 2013a.

_____. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, Nov. 2009.

HANSEN, P. J. et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: Causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, n. 1, p. 91–103, Jan. 2001.

HANSEN, P. J. Physiology and endocrinology symposium: maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: is there a prepartum-postpartum nexus? **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 1639–1649, Apr. 2013b.

HAO, Y. et al. Gene expression profiling of human blastocysts from *in vivo* and “rescue IVF” with or without melatonin treatment. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 16, n. 2, p. 1278–1288, Aug. 2017.

HE, C. et al. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte’s quality under *in vitro* conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 6, p. 939, June 2016.

HREINSSON, J. G. et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 87, n. 1, p. 316–321, Jan. 2002.

HUSSAIN, S. M. I.; FUQUAY, J. W.; YOUNAS, M. Estrous cyclicity in non

lactating and lactating holsteins and Jerseys During a Pakistani Summer 1. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 2968–2975, 1992.

ISHIZUKA, B. et al. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 28, n. 1, p. 48–51, Jan. 2000.

JORDAN, E. R. Effects of heat stress on reproduction. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p. E104–E114, June 2003. Supplement.

JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling Cytoplasm. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p. 79–90, 2005.

KATHIRVEL, M.; SOUNDIAN, E.; KUMANAN, V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (*GDF9*) and Bone transcripts during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus – oocyte complexes. **Springer Plus**, Switzerland, v. 2, n. 1, p. 206, May 2013.

KORKMAZ, A.; REITER, R. J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? **Journal of Pineal Research**, New York, v. 44, n. 1, p. 41–44, Jan. 2008.

KORKMAZ, A.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R. J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. **Gene**, Amsterdam, v. 503, n. 1, p. 1–11, July 2012.

KREGEL, K. C. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 92, n. 5, p. 2177–2186, May 2002.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 1, p. 393–417, Jan. 2013.

LI, X. et al. Dimethyl sulfoxide perturbs cell cycle progression and spindle organization in porcine meiotic oocytes. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0158074, June 2016.

LI, Y. et al. Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 59, n. 3, p. 365–375, Oct. 2015.

LIMA, R. S. D. E. **O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa.** 2012. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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

MANDELKER, L.; VAJDOVICH, P. (Ed.). **Studies on veterinary medicine.** New York: Springer, 2011. 260 p.

MARTELLO, L. S. et al. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas ou não a sombreamento e aspersão na pré-ordenha. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Ondina, v. 14, n. 3, p. 406–414, jul./set. 2013.

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**, Los Altos, v. 79, n. 2, p. 299–305, Jan. 2013.

MCGRATH, A.; ESQUELA, F.; LEE, S. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor 9. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 9, n. 1, p. 131–136, Jan. 1995.

MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 13–20, July 2004.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, E. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 76, n. 9, p. 2812–2823, Sept. 1993.

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 & Development**, New York, v. 79, n. 1, p. 31–40, Jan. 2012.

O'BRIEN, M. D. et al. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 38, n. 2, p. 86–94, Feb. 2010.

PAPIS, K. et al. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 43, n. 4, p. 321–326, Nov. 2007.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle : differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of pre implantation embryos , reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperature. **Reproduction Research**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 285–294, Feb. 2003.

_____. Heat stress induced alteration in bovine oocytes : functional and cellular aspects. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 3, p. 395–403, July/Sept. 2012.

PAYTON, R. R. et al. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 57, n. 4, p. 481-91, Sept. 2011.

POEGGELER, B. et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 14, n. 4, p. 151–168, May 1993.

QIU, X. et al. The diversity of the DnaJ/HSP40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 63, n. 22, p. 2560–2570, Nov. 2006.

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, Oct. 2009.

RAY, D. E.; HALBACH, T. J.; ARMSTRONG, D. V. Season and lactation number effects on milk production and reproduction of dairy cattle in Arizona. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 11, p. 2976–2983, Nov. 1992.

REITER, R. et al. Pharmacological actions of melatonin oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences**, Oxford, v. 60, n. 25, p. 2055–2271, 1997.

_____. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 54, n. 1, p. 1–9, 2007.

_____. Mini review melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 445–456, Sept. 2009.

REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **News Physiology Science**, Maryland, v. 15, p. 246–250, Oct. 2000.

_____. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 359–384, Oct. 1998.

RENSIS, F. de; GARCIA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F. Seasonal heat stress: clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 84, n. 5, p. 659–666, Sept. 2015.

RENSIS, F. de; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, Los Altos, v. 60, n. 6, p. 1139–1151, Oct. 2003.

RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 93, n. 1, p. 170–179, Jan. 2010.

RITOSSA F. Discovery of the heat shock response. **Cell Stress Chaperones**, New York, v. 1, n. 2, p. 97-98, June 1966.

ROCHA, A et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, n. 3, p. 657-665, Feb. 1998.

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

ROTH, Z. et al. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 6, p. 887–897, Oct. 2008.

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. 235–44, Feb. 2005.

_____. 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.

ROY, K.; S.; COLLIER, R. J. Regulation of acclimation to environmental stress. In: COLLIER, R. J. COLLIER, J. L. (Ed.). **Environmental physiology of livestock**. Amsterdam: Wiley-Blackwell, 2012. p. 49–63.

SAIJA, A. et al. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 53, n. 2, p. 209–215, Mar. 2002.

SALIMI, M. et al. The effect of melatonin on maturation, glutathione level and expression of HMGB1 gene in brilliant cresyl blue (BCB) stained imma. **Cell Journal**, Tehran, v. 15, n. 4, p. 294–301, Nov. 2014.

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide : pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, Apr. 2003.

SCHAFFAZICK, 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**, New York, v. 47, n. 4, p. 318–323, Nov. 2009.

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

SILVA, I. J. O. da et al. Efeitos da climatização do curral de espera na produção de leite de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 2036–2042, set./out. 2002.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1/3, p. 104–109, Mar. 2009.

SOUSA, P. A. D. E.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, n. 1, p. 112–121, Sept.

1998.

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. **Reserach in Veterinary Science**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 124–127, Feb. 2012.

_____. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 393–398, ago. 2010.

TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, Tokyo, v. 11, n. 1, p. 37–47, Jan. 2012.

TAKAMI, M. et al. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 276, n. 4, p. E684–E688, Apr. 1999.

TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 40, n. 1, p. 1–11, Jan. 2014.

_____. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 291–303, Apr. 2008.

_____. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, New York, v. 92, n. 1, p. 328–343, July 2009.

_____. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, Tokio, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2013.

_____. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 25, n. 3, p. 135–141, Oct. 1998.

_____. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 5, p. 5, Jan. 2012.

TAN, D. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current**

Topics in Medicinal Chemistry, Hilversum, v. 2, n. 2, p. 181–197, Feb. 2002.

_____. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, New York, v. 42, n. 1, p. 28–42, Jan. 2007.

_____. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 54, n. 2, p. 127–138, Mar. 2013.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 26, n. 1, p. 90–100, May 1990.

TIAN, X. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 57, n. 3, p. 239–47, Oct. 2014.

TOMAS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 39, n. 2, p. 99–104, Sept. 2005.

TRIPURANI, S. K. et al. A novel functional role for the oocyte-specific. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 152, n. 3, p. 1013–1023, Mar. 2011.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 1, p. 51–75, Jan. 2001.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, Washington, v. 78, n. 3, p. 687–721, July 1998.

_____. Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 149–153, Feb. 1995.

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

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, n. 4, p. e93641, 2014.

WANG, J. et al. Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 137, n. 2, p. 181-189, Feb. 2006.

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

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 6, p. 2131–2144, June 2003.

WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. Cell cycle control during mammalian oogenesis. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 28, p. 125–153, 1991.

WILSON, S. J. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 8, p. 2124–2131, Aug. 1998a.

_____. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 8, p. 2132–2138, Aug. 1998b.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, p. 535-547, July 2000.

WU, X. et al. Zygote arrest 1 (*ZARI*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 2, p. 187–191, Feb. 2003.

ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 3, p. 447–454, Mar. 2001.

ZHANG, D. et al. Regulation of maternal gene expression by MEK/*MAPK* and

MPF signaling in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 57, n. 1, p. 49-56, Feb. 2011.

ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK Signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 9–18, Mar. 2002.

ZHOU, D. et al. Effects of dimethyl sulfoxide on asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. **BMC Developmental Biology**, London, v. 14, p. 28, June 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO 1 - MELATONINA PROTEGE OÓCITOS BOVINOS CONTRA
O CHOQUE TÉRMICO E INFLUENCIA A EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO**

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE OÓCITOS BOVINOS EM
CHOQUE TÉRMICO: PROTEÇÃO E ASPECTOS MOLECULARES**

**Short Title: MELATONINA PROTEGE OÓCITOS EM CHOQUE
TÉRMICO**

Artigo que segue as normas e formato do periódico *Reproduction**

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

1 **RESUMO**

2

3 O efeito da adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de
4 oócitos bovinos sob choque térmico (CT) sobre sua qualidade e expressão
5 de genes específicos foi avaliado. Oócitos provenientes de ovários de
6 abatedouro foram maturados em meio MIV nas concentrações 0; 10^{-12} ; 10^{-9} ;
7 10^{-6} e 10^{-3} M de melatonina sob CT ou na ausência de melatonina sob
8 condição convencional (NS). A taxa de maturação não foi influenciada pela
9 melatonina e não diferiu entre os tratamentos 0 M e NS. As concentrações
10 10^{-3} e 10^{-9} M de melatonina reduziram a taxa de maturação em relação ao
11 NS. A taxa de apoptose não foi influenciada pela melatonina, mas foi maior
12 no 0 M do que no NS. A taxa de apoptose do NS não diferiu do 10^{-3} M. A
13 produção de EROS foi menor nos tratamentos 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M e maior
14 nos tratamentos 0 e 10^{-12} M. A atividade mitocondrial foi menor no
15 tratamento 10^{-3} M em comparação aos demais tratamentos sob CT e maior
16 em oócitos do tratamento 0 M em comparação ao NS. A atividade
17 mitocondrial dos tratamentos 10^{-12} , 10^{-9} e 10^{-6} M de melatonina não diferiu
18 do NS. Houve subexpressão dos genes *C-MOS* nos tratamentos 10^{-9} e 10^{-12}
19 M de melatonina e de *MAPK* no 10^{-12} M. Os tratamentos 10^{-3} ; 10^{-6} e 10^{-9} M

20 de melatonina apresentaram superexpressão do gene *GDF9*. Conclui-se que
21 a melatonina é capaz de proteger os oócitos contra prejuízos causados pelo
22 CT, sendo a concentração 10^{-6} Ma mais eficiente.

23 **Palavras chave:** Apoptose, atividade mitocondrial, estresse oxidativo,
24 maturação nuclear, Transcritos gênicos.

25

26 **ABSTRACT**

27

28 The effect of melatonin addition to the *in vitro* maturation (IVM) medium of
29 bovine oocytes subjected to heat shock (HS) on its quality and expression of
30 specific genes was evaluated. Oocytes from ovaries obtained in a
31 slaughterhouse were matured in IVM medium in the concentrations 0; 10^{-12} ;
32 10^{-9} ; 10^{-6} e 10^{-3} M of melatonin under HS or in the absence of melatonin
33 in conventional condition (NS). Maturation rate was not influenced by
34 melatonin and it did not differ between treatments 0 M and NS. The
35 concentrations 10^{-3} and 10^{-9} M of melatonin reduced the maturation rate in
36 comparison to NS. Apoptosis rate was not influenced by melatonin, but it
37 was greater in 0 M than in NS. Apoptosis rate in NS did not differ from 10^{-3}
38 M. ROS production was lower in the treatments 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M and
39 greater in the treatments 0 and 10^{-12} M. Mitochondrial activity in treatments
40 10^{-12} , 10^{-9} e 10^{-6} M of melatonin did not differ from NS. There was
41 subexpression of genes c-MOS in the treatments 10^{-9} and 10^{-12} M of
42 melatonin and MAPK in the treatment 10^{-12} M. The treatments 10^{-3} ; 10^{-6}
43 and 10^{-9} M of melatonin presented super expression of GDF-9 gene.
44 Concluding, melatonin is able to protect oocytes from the damage caused by
45 HS, being the concentration 10^{-6} M the most efficient.

46

47 **Keywords:** gene transcripts, apoptosis, nuclear maturation,
48 mitochondrial activity, oxidative stress.

49

50 **Introdução**

51

52 Estudos *in vivo* e *in vitro* sustentam a visão de que os oócitos
53 bovinos são suscetíveis ao estresse térmico em vários estágios de
54 desenvolvimento folicular (RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-
55 GATIUS, 2015; ROTH, 2017). Diminuição da qualidade e da
56 competência de desenvolvimento de oócitos expostos ao choque térmico
57 foi relacionada às alterações celulares, diminuição da maturação nuclear,
58 apoptose (ROTH; HANSEN, 2004), desorganização do cito esqueleto
59 (JU, 2005; ROTH; HANSEN, 2004) e alterações na transcrição de genes
60 envolvidos no crescimento celular, ciclo celular e morte celular
61 programada (PAYTON et al., 2011). A exposição de oócitos a
62 temperaturas elevadas também pode levar à formação e ao acúmulo de
63 espécies reativas de oxigênio (EROS), causando estresse oxidativo
64 (TAMURA et al., 2013). O estresse oxidativo possui efeito tóxico direto
65 nas células, resultando em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas,
66 danos ao DNA (TAMURA et al., 2013) e indução da apoptose
67 (TAKAHASHI, 2012).

68 Os efeitos deletérios causados pela elevada temperatura e pelo

69 estresse oxidativo sobre a função dos oócitos podem ser reduzidos pela
70 adição de moléculas termoprotetoras e antioxidantes, como a
71 melatonina, ao meio MIV. Por ser altamente eletro-reativa
72 (DOMINGUES et al., 2012), a melatonina age como doadora de
73 elétrons, detoxifica EROS eletrodeficientes (VIJAYALAXMI et al.,
74 2004) e estimula enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2009). A
75 ativação de enzimas antioxidantes e a diminuição da atividade de
76 enzimas pró-oxidantes protegem o DNA nuclear e os lipídios de
77 membrana dos danos oxidativos (REITER et al., 1997; SCHAFFAZICK
78 et al., 2005). Em adição, a melatonina pode preservar a função
79 mitocondrial (JOU et al., 2010) e prevenir apoptose celular, por inibir a
80 ativação das caspases (BAYDAS et al., 2005).

81 Recentemente, foi demonstrado que a melatonina reduziu os efeitos
82 negativos do choque térmico durante a maturação de oócitos bovinos,
83 resultando em maior taxa de blastocistos (CEBRIAN-SERRANO et al.,
84 2013), menor produção de EROS e menor número de células apoptóticas
85 na massa celular interna de blastocistos (ASCARI, 2015). No entanto,
86 outros autores (ORTEGA et al., 2016) não verificaram efeito da
87 melatonina sobre o desenvolvimento de embriões cultivados sob choque

88 térmico, embora a produção de EROS tenha sido reduzida. Os resultados
89 divergentes podem estar relacionados às diferentes concentrações de
90 melatonina adicionada aos meios, à temperatura e tensão de oxigênio
91 utilizadas na maturação e cultivo, bem como à genética dos animais.

92 Estudos demonstraram que a expressão de genes relacionados à
93 maturação oocitária (SALIMI et al., 2014; TIAN et al., 2014) foi
94 aumentada pela suplementação de melatonina ao meio MIV em condição
95 convencional de maturação. No entanto, o efeito da melatonina sobre a
96 expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e à termotolerância
97 de oócitos maturados sob choque térmico ainda não foi avaliado. Assim,
98 o objetivo deste estudo foi verificar se os efeitos deletérios da exposição
99 de oócitos de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* ao choque térmico, durante
100 a maturação são modificados pela melatonina. O efeito de diferentes
101 concentrações de melatonina (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M) foi testado, por
102 meio da avaliação da taxa de maturação nuclear, índice apoptótico,
103 atividade mitocondrial e produção de EROS, bem como sobre a
104 abundância de transcritos gênicos relacionados ao desenvolvimento
105 oocitário e embrionário (*C-MOS*, *GDF9*, *MAPK* e *ZARI*) e às defesas
106 frente ao choque térmico (*HSP40*).

107 Material e métodos

108 Os métodos e procedimentos descritos a seguir foram aprovados
109 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal
110 de Lavras, registrado sob o número de protocolo 037 16.

111

112 Coleta de complexos cumulus oócitos (CCOs)

113

114 O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite no
115 município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para a coleta dos CCOs
116 foram coletados ovários de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*)
117 provenientes de abatedouro.

118 Os ovários foram coletados aproximadamente 15 minutos após o
119 abate dos animais, no momento da evisceração e depositados em
120 recipiente térmico contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), acrescido
121 de estreptomicina (0,05g por litro de água destilada, *Sigma-Aldrich*®,
122 St. Louis, MO, USA), à temperatura de 37°C. O tempo decorrido entre a
123 coleta dos ovários e sua chegada ao laboratório foi no máximo de 1,5
124 horas.

125 No laboratório, os ovários foram lavados e mantidos a 37°C em

126 banho-maria até aspiração folicular. Folículos ovarianos com 3 a 8 mm
127 de diâmetro foram aspirados utilizando agulhas de 18 G (1,20 X 40 mm)
128 acoplada a uma seringa estéril de 10 mL. O conteúdo aspirado foi
129 depositado em cálice cônico estéril imerso em banho-maria (37°C). Após
130 15 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado
131 lavado em meio TALP-HEPES (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO, USA)
132 e vertido em placa de Petri descartável de 100 x 20 mm. Os oócitos
133 foram quantificados e classificados com base nas características das
134 células do *cumulus* e do citoplasma. Foram selecionados para a
135 maturação os CCOs com mais de três camadas de células compactas do
136 *cumulus* e citoplasma regular e CCOs com uma a três camadas de
137 células do *cumulus*, e citoplasma regular ou apresentando granulações
138 finas.

139

140 *Delineamento experimental e tratamentos*

141

142 O efeito de diferentes concentrações de melatonina adicionada ao
143 meio MIV na maturação nuclear, ocorrência de apoptose, produção de
144 EROS, atividade mitocondrial e expressão dos genes *C-MOS*, *MAPK*,

145 *ZARI*, *GDF9* e *HSP40* foi avaliado. O delineamento foi em blocos ao
146 acaso, sendo os blocos constituídos pelos dias de coleta de ovários. Em
147 cada dia de coleta, os oócitos foram distribuídos equitativamente aos
148 diferentes tratamentos e direcionado a alguma análise.

149 Foram avaliadas as concentrações 0; 10^{-12} ; 10^{-9} ; 10^{-6} e 10^{-3} M de
150 melatonina (M5250 – *Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO, USA) sob
151 choque térmico (12 horas a 41,5°C e 7% CO₂ seguido por 12 horas a
152 38,5° C e 5% CO₂) e um tratamento sem adição de melatonina na
153 condição convencional de maturação (24 h a 38,5°C e 5% CO₂, grupo
154 não estresse - NS). A melatonina foi diluída em dimetilsulfóxido
155 (DMSO, *Sigma-Aldrich* ®), sendo que a concentração de DMSO no
156 grupo 10^{-3} M foi de 0,46%. Os demais tratamentos foram realizados por
157 diluição seriada. Assim, a fim de verificar possível influência do
158 diluente da melatonina nas variáveis analisadas, foi realizada maturação
159 de um grupo de oócitos em meio contendo 0,46% de DMSO (mesma
160 concentração do tratamento 10^{-3} M) sob choque térmico.

161

162 Maturação oocitária in vitro

163

164 A maturação foi realizada em meio MIV (Bioklone Reprodução
165 animal, Jaboticabal, Brasil) com ou sem adição melatonina, sob choque
166 térmico ou condição convencional de maturação, como descrito no item
167 Delineamento Experimental e Tratamentos.

168 Os oócitos selecionados foram lavados uma vez, em meio TALP-
169 HEPES e, duas vezes, no meio de maturação conforme os tratamentos.

170 A maturação foi realizada em microgotas de meio MIV cobertas com
171 óleo mineral, em placas de Petri descartáveis de 35 x 10 mm,
172 obedecendo sempre a proporção de 5uL de meio para cada oócito. As
173 placas foram montadas com no mínimo 1,5 horas de antecedência à
174 maturação e colocadas na estufa para estabilização.

175

176 Fragmentação de DNA e maturação de oócitos bovinos

177

178 Para a análise da fragmentação de DNA e da maturação oocitária
179 foram realizadas seis repetições e utilizados 140 ± 36 oócitos por
180 repetição. Após a maturação, os CCOs foram desnudados em meio

181 TALP-HEPES em vórtex por 5 minutos e lavados uma vez em meio
182 PBS (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO, USA), contendo 0,1% de PVA
183 (tampão fosfato salina – álcool polivinílico - *Sigma-Aldrich*®) aquecido
184 a 37°C. Os oócitos desnudos foram, então, imersos em paraformaldeído
185 a 4% por 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram lavados em PBS-
186 PVA e armazenados a 4°C em tubos tipo eppendorf com 500µL de PBS-
187 PVA.

188 Os oócitos foram processados para o ensaio de TUNEL (*Terminal*
189 *deoxynucleotidy ltransferase-mediatedd UTP nickend labeling*),
190 utilizado para identificar fragmentos de DNA, característicos do
191 processo de apoptose. Para tanto, foi utilizado o kit comercial
192 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI,
193 EUA). Os oócitos foram permeabilizados em solução de Triton X-100
194 (0,2%, *Sigma-Aldrich*®) em solução PBS-BSA por 15 minutos, lavados
195 e equilibrados em tampão de equilíbrio por 15 minutos. Em seguida,
196 foram incubados em tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima
197 *recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase* (rTdT) e corante de
198 fluoresceína-12- desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), por 1 hora a 37°C
199 em atmosfera umidificada. No controle negativo, os oócitos foram

200 incubados na ausência da enzima rTdT. No controle positivo, os oócitos
201 foram incubados com tampão de equilíbrio, enzima DNase (para
202 promover a degradação do DNA nas células, mimetizando o processo de
203 morte celular) e a enzima fluoresceína-12-dUTP.

204 Após o período de incubação, os oócitos foram transferidos para
205 lâmina e corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em
206 Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) e recobertos
207 com lamínula para observação em microscópio de epifluorescência
208 (Motic, BA400). Em cada oócito foi observada a presença de DNA
209 íntegro ou fragmentado, visualizados em filtro verde com fluorescência
210 na faixa de excitação emissão 492-495/517-527 nm. A taxa de maturação
211 foi realizada por meio de observação do oócitos em fase de metáfase II
212 (extrusão do corpúsculo polar) visualizados em filtro azul com
213 fluorescência na faixa de excitação emissão 340/488nm.

214

215 Atividade mitocondrial e produção de EROS em oócitos bovinos

216

217 Para a análise de atividade mitocondrial, foram realizadas três
218 repetições com 133 ± 18 oócitos/repetição e para análise da produção de

219 EROS foram realizadas quatro repetições com 130 ± 20
220 oócitos/repetição. Após a MIV os CCOs foram desnudados em meio
221 TALP-HEPES em vórtex por 5 minutos e lavados uma vez em meio
222 PBS contendo 0,1% de PVA (tampão fosfato salina- álcool polivinílico)
223 aquecido a 37°C. Os oócitos foram incubados em 200 μ L do meio PBS-
224 PVA contendo 50 nM do MitoTrackerRed CMX-Ros (M7512 – Termo
225 Fisher Scientific, Califórnia, EUA) durante 30 minutos à 38,5°C. Em
226 seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 200 μ L de PBS-
227 PVA e incubados em PBS-PVA, contendo 10 μ M de diacetato de 2',7'-
228 diclorofluoresceína (DCFDA, *Sigma-Aldrich*®) durante 15 minutos. Ao
229 final da incubação, os oócitos foram lavados quatro vezes em meio PBS-
230 PVA e as lâminas preparadas para leitura em microscópio de
231 fluorescência. As emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas
232 utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio de
233 fluorescência (Olympus BX53; Câmera: Olympus ccd DP72). A
234 intensidade emitida foi quantificada por meio do software Image J (1.49,
235 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

236 O MitoTrackerRed CMX Ros é um corante vermelho fluorescente
237 que mancha mitocôndrias nas células vivas e seu acúmulo é dependente

238 de potencial de membrana. Esse corante emite fluorescência na faixa de
239 excitação/emissão 579/599 nm. O DCFDA é permeável à membrana e,
240 portanto, é capaz de se difundir facilmente nas células. Dentro da célula,
241 os grupos acetato são hidrolisados por esterase intracelular, formando o
242 composto 2',7'- diclorofluoresceína (DCHF), impermeável à membrana
243 celular. O DCHF, em presença de EROs, é rapidamente oxidado e
244 transformado em diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescência na
245 faixa de excitação/emissão 492-495/517-527 nm.

246

247 *Análise quantitativa da expressão gênica em oócitos*

248

249 Oócitos desnudos dos tratamentos avaliados foram rapidamente
250 congelados em nitrogênio líquido em meio PBS acrescido de 0,1% de
251 álcool polivinil e armazenados a -80°C para posterior extração do RNA
252 total. A extração e a transcrição reversa do RNA foram realizadas
253 utilizando-se os kits comerciais Micro Kit RNAeasy (Qiagen, Valencia,
254 CA, USA) e Superscript III kit (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) em
255 *pools* de 10 estruturas. A quantificação do RNA e do cDNA das
256 amostras foi realizada pelo Nanodrop 1000. As análises dos tratamentos

257 foram realizadas em triplicata. A amplificação para a quantificação
258 relativa foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real. As
259 reações foram feitas utilizando-se kit comercial com SYBR Green
260 (Power Sybr Green, Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), de
261 acordo com as recomendações do fabricante. As reações contendo
262 cDNA, par de primers, Master Mix (Applied Biosystem) e 0,1U Taq
263 DNA polimerase (Applied Biosystem), em um volume final de 25 μ L,
264 foram incubadas a 95°C por 15 min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15
265 segundos, anelamento a temperatura específica para cada primer (Tabela
266 1) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles
267 negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a
268 reação de amplificação. As reações foram feitas em placas ópticas de
269 reação de 96 poços (Applied Biosystems), seladas com filme adesivo
270 óptico (Applied Biosystems). As amostras foram então incubadas no
271 termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
272 (Applied Biosystems).

273 Os primers utilizados para avaliar a expressão dos genes alvos e dos
274 genes endógenos (*B-ACTINA* e *YWHAZ*) foram desenhados utilizando o
275 programa Primer3 a partir de sequências obtidas do banco de dados do

276 GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A eficiência dos primers para cada
277 reação foi determinada pelo software LinReg PCR[®] e considerada no
278 cálculo da quantificação relativa. A análise dos resultados do PCR
279 quantitativo foi realizada utilizando o software REST[®], sendo que os
280 resultados foram expressos relativos a um calibrador. Para avaliação da
281 expressão, foi utilizado como calibrador oócitos do tratamento NS.

282

283 **Análise Estatística**

284 Inicialmente foram considerados sete tratamentos (DMSO; 0; 10^{-12} ; 10^{-9} ;
285 10^{-6} ; 10^{-3} M de melatonina e NS) na análise dos dados para verificar se
286 havia efeito do tratamento DMSO sobre qualquer das variáveis
287 analisadas. Como não houve diferença na análise de qualquer das
288 variáveis entre o tratamento DMSO e o tratamento 0 M melatonina, a
289 análise foi refeita excluindo o tratamento DMSO.

290 As análises foram realizadas por modelos lineares mistos
291 generalizados pelo procedimento GLIMMIX do software SAS[®]
292 (Statistical Analysis System, versão 9.3, SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA).
293 As taxas de maturação e de apoptose foram analisadas considerando a
294 distribuição binomial e função de ligação logit. A produção de EROS e a

295 atividade mitocondrial foram analisadas considerando-se distribuição
296 Gamma e função de ligação Log.

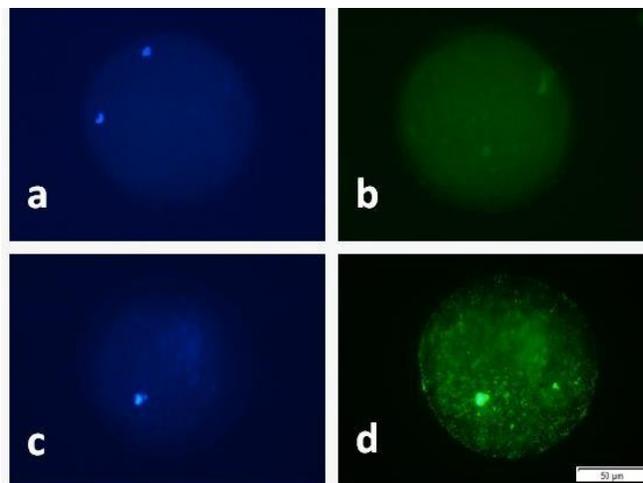
297 A eficiência do primer foi calculada utilizando-se o programa
298 LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os resultados do grupo
299 endógeno e alvos foram analisados pelo software REST[®] (PFAFFL;
300 HORGAN; DEMPFLER, 2002), considerando nível de significância
301 menor ou igual a 5%.

302 **Resultados**

303 Os oócitos foram classificados em maturados ou não maturados,
304 apoptóticos ou não apoptóticos (Para imagem representativa veja
305 Figura 1). Não houve diferença ($P > 0,05$) na porcentagem de oócitos
306 que atingiram metáfase II entre os tratamentos 0 M de melatonina sob
307 choque térmico e o tratamento sob condição convencional (Figura 2a).
308 Sob a condição de choque térmico, não foi observado efeito ($P > 0,05$)
309 da adição de melatonina ao meio MIV sobre a taxa de maturação,
310 quando comparado ao grupo controle (0 M). No entanto, a maior
311 concentração de melatonina (10^{-3} M) e a concentração 10^{-9} M reduziram
312 ($P < 0,05$) a taxa de maturação, em relação ao tratamento com 10^{-12} M e
313 à condição de maturação convencional (Controle não estresse - NS).

315 A taxa de apoptose dos oócitos maturados sob choque térmico na
316 ausência de melatonina (0 M) foi maior ($P < 0,05$) do que a observada
317 nos oócitos maturados sob condição convencional (Figura 2b). Sob
318 choque térmico, não houve efeito da adição de melatonina ao meio
319 MIV na taxa de apoptose de oócitos ($P > 0,05$). No entanto, a taxa de
320 apoptose no tratamento com adição de 10^{-3} M de melatonina na
321 condição de choque térmico não diferiu ($P > 0,05$) da observada sob
322 condição de maturação convencional (NS).

323



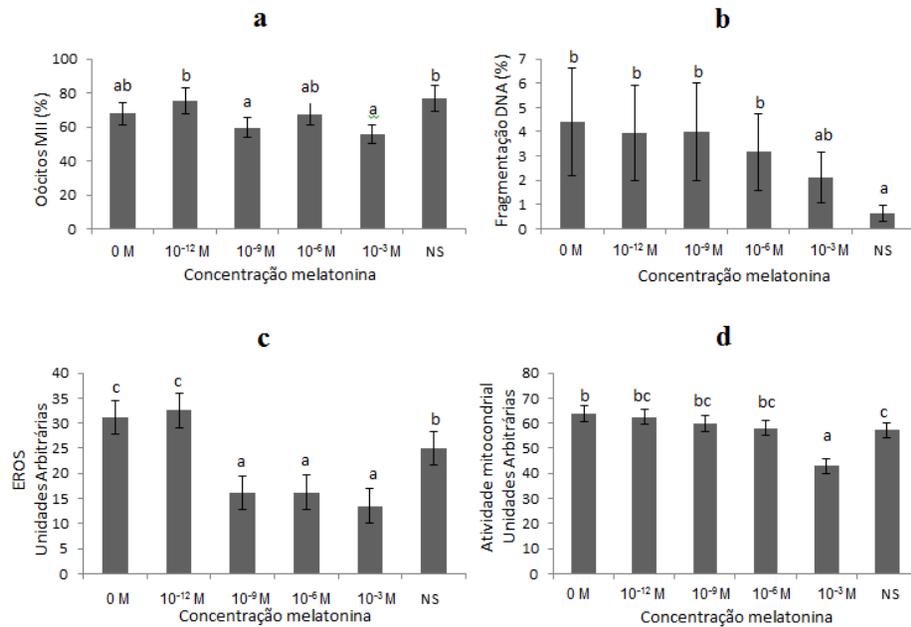
324

325 Figura 1. Imagens representativas da coloração nuclear (a e c) e
326 apoptose (b e d) de oócitos bovinos após a maturação. São apresentados
327 oócitos maturados (a) e não maturados (c), TUNEL negativo (não
328 apoptóticos - b) e TUNEL positivo (apoptóticos - d). Observe que o
329 DNA foi visualizado com fluorescência azul após a coloração com
330 DAPI, enquanto a cromatina TUNEL-positiva é marcada em verde. Em
331 b observa-se ausência de fluorescência na cromatina.

332 A maturação de oócitos sob choque térmico na ausência de
333 melatonina (0 M) e com 10^{-12} M resultou em maior produção de EROS,
334 inclusive em comparação aos oócitos maturados sob condição
335 convencional ($P < 0,05$) (Figura 2c). A produção de EROS foi menor
336 ($P < 0,05$) pelos oócitos maturados sob choque térmico na presença de
337 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M de melatonina.

338 Oócitos maturados sob choque térmico na ausência de melatonina (0
339 M) apresentaram maior ($P < 0,05$) atividade mitocondrial do que os
340 maturados sob condição convencional (Figura 2d). A atividade
341 mitocondrial foi reduzida ($P < 0,05$) pela adição de melatonina na
342 concentração 10^{-3} M ao meio MIV, em comparação aos demais
343 tratamentos sob choque térmico. A atividade mitocondrial dos oócitos
344 maturados sob choque térmico com melatonina nas concentrações 10^{-12} ,
345 10^{-9} e 10^{-6} M não diferiu ($P > 0,05$) da observada na condição de
346 maturação convencional.

347



348

349 Figura 2. Efeito da adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro*
 350 sobre a taxa de maturação (a), taxa de apoptose (b), produção de EROS
 351 (c) e atividade mitocondrial (d) de oócitos submetidos ao choque
 352 térmico. Letras diferentes representam diferença entre tratamentos ($P <$
 353 0,05). NS – condição convencional de maturação.

354

355

356

Em relação aos oócitos maturados sob condição convencional,

357

houve subexpressão ($P < 0,05$) dos genes c-MOS nos tratamentos 10^{-9} e

358

10^{-12} M e MAPK no tratamento 10^{-12} M, enquanto houve

359

superexpressão ($P < 0,05$) do gene GDF 9 nos tratamentos 10^{-3} ; 10^{-6} e 10^{-

360

9 M de melatonina. O choque térmico e a presença de melatonina não

361

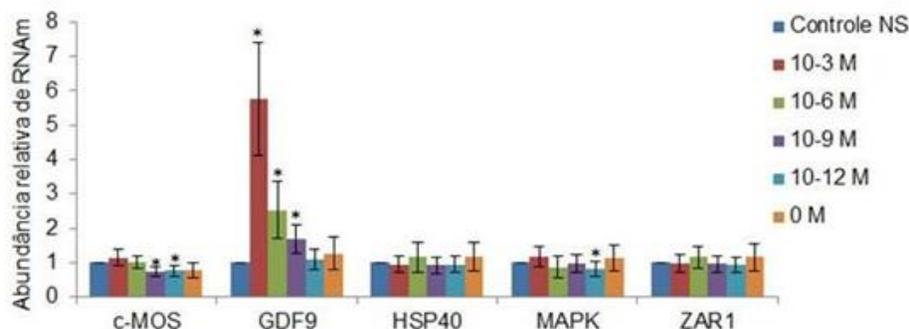
influenciaram a quantidade dos transcritos de HSP40 e ZAR1 ($P > 0,05$).

362

A quantificação de RNAm e cDNA e as curvas de dissociação estão

363 representadas no anexo.

364



365

366 Figura 3. Avaliação da abundância dos transcritos c-MOS, GDF9,
 367 HSP40, MAPK em oócitos maturados *in vitro* sob choque térmico (12
 368 h a 41,5°C e 7% CO₂ seguido por 12 h a 38,5°C e 5% CO₂). O
 369 tratamento sob condição convencional de maturação (24h a 38,5°C e
 370 5% CO₂ -NS) foi utilizado como calibrador. A presença de (*) indica
 371 diferença significativa (P < 0,05)

372

373

374 **Discussão**

375

376 A adição de melatonina ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos
 377 ao choque térmico não melhorou a taxa de maturação. No entanto, as
 378 concentrações 10⁻³ M e 10⁻⁹ M resultaram em menores taxas de
 379 maturação comparadas com o tratamento NS. Esse resultado pode estar
 380 relacionado ao efeito da melatonina na neutralização dos radicais livres,
 381 o que é corroborado por menor concentração de EROS em oócitos
 382 desses tratamentos em comparação aos oócitos do tratamento NS.

383 Concentrações fisiológicas de EROS são necessárias para o reinício da
384 meiose (RAMALHO-SANTOS et al., 2009; TAKAMI et al., 1999) e,
385 portanto, a melatonina adicionada em altas concentrações pode
386 comprometer a maturação nuclear. Contudo, a concentração
387 intermediária de 10^{-6} M de melatonina não reduziu a taxa de maturação
388 em relação ao NS e esse resultado não pode ser explicado com base na
389 concentração de EROS, que foi significativamente menor no tratamento
390 10^{-6} M.

391 Tanto a maturação nuclear quanto a citoplasmática são afetadas pela
392 exposição ao estresse térmico (MAYA-SORIANO et al., 2013). No
393 entanto, estudos apontam que a maturação citoplasmática é mais afetada
394 pelo estresse térmico do que a maturação nuclear (KRISHER, 2013), o
395 que ajuda a explicar a ausência de efeitos da melatonina sob choque
396 térmico. Edwards et al. (2005) observaram que os oócitos bovinos
397 maturados a 41°C não tiveram sua habilidade de progressão até a fase de
398 MII comprometida. Da mesma forma, a maturação nuclear de oócitos de
399 ratos não foi afetada até a temperatura de $40,7^{\circ}\text{C}$ (WANG et al., 2006).

400 O índice apoptótico não foi influenciado pela presença de melatonina
401 no meio MIV de oócitos maturados sob choque térmico. No entanto, a

402 adição de melatonina na concentração de 10^{-3} M resultou em índice
403 apoptótico semelhante à condição convencional de maturação. Tal fato
404 nos fornece indícios de que, sob choque térmico, a melatonina na
405 concentração de 10^{-3} M possui atividade antiapoptótica. Em trabalho
406 realizado por Roth e Hansen (2004), oócitos maturados nas temperaturas
407 de 40 e 4°C apresentaram maior índice apoptótico comparados com os
408 submetidos à maturação convencional. Os autores relataram que a
409 maturação na temperatura de 40 – 41°C é um estímulo à morte celular
410 programada em oócitos de mamíferos, comprometendo a função do
411 oócito e resultando em menor taxa de clivagem e menor porcentagem de
412 oócitos clivados e embriões que se desenvolvem até o estágio de
413 blastocistos. Esses dados corroboram os do presente estudo, uma vez
414 que a taxa de apoptose do grupo 0 M de melatonina foi maior em relação
415 ao NS.

416 Dentre as ações da melatonina, destaca-se sua capacidade
417 antioxidante, por ação direta na captação de radicais livres, em razão da
418 sua alta eletro-reatividade (DOMINGUES et al., 2012) e por estímulo a
419 enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2009). Sua capacidade
420 antioxidante foi confirmada no presente estudo, uma vez que houve

421 reduzida produção de EROS, quando a melatonina foi adicionada ao
422 meio MIV nas concentrações 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M. Por outro lado, houve
423 aumento na produção de EROS por oócitos maturados na condição de
424 choque térmico na ausência (0 M) de melatonina ou com 10^{-12} M.
425 Similarmente, Ortega et al. (2016) verificaram que a maior produção de
426 EROS por embriões bovinos cultivados sob choque térmico foi atenuada
427 pela adição de 10^{-6} M de melatonina ao meio.

428 As EROS são subprodutos da fosforilação oxidativa mitocondrial (AL-
429 GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; DUMOLLARD et al., 2009),
430 assim, o aumento na produção de EROS em oócitos maturados sob
431 choque térmico é condizente com o aumento observado na atividade
432 mitocondrial. Dados sugerem que células e tecidos expostos a elevadas
433 temperaturas gastam mais energia (STREFFER, 1982 apud NAGLE,
434 2011), que é produzida nas mitocôndrias, na forma de ATP
435 (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007; VAN BLERKOM;
436 DAVIS; LEE, 1995). Assim, aumento no conteúdo de ATP é sugestivo de
437 maiores atividades mitocondrial e metabólica (LEESE et al., 2008).
438 Aumento da atividade mitocondrial, indicado por aumento de ATP, foi
439 observado em oócitos bovinos maturados sob choque térmico por Nagle

440 (2011) e Payton et al. (2011). Ainda, a resposta primária de proteção
441 celular ao estresse compreende a atuação de proteínas conhecidas como
442 Heat Shock Proteins (HSPs). As HSPs estão envolvidas com o
443 dobramento e transporte de proteínas, renaturação de moléculas proteicas,
444 regulação específica do estágio de desenvolvimento celular, controle do
445 ciclo celular e estabilidade do citoesqueleto (JU, 2005). Esses processos
446 demandam energia (QIU et al., 2006), culminando assim em aumento da
447 atividade mitocondrial.

448 A reduzida atividade mitocondrial em oócitos maturados na presença
449 de 10^{-3} M de melatonina sugere que, sob choque térmico, essa dose
450 protege os oócitos contra danos oxidativos. López et al. (2009)
451 demonstraram em seu estudo com mitocôndrias de ratos que a
452 melatonina protegeu a função mitocondrial do dano oxidativo de
453 maneira dose-dependente, com conseqüente redução do potencial da
454 membrana mitocondrial e da produção de ânions superóxido.
455 Contrapondo com os resultados de EROS, confirmamos o potencial de
456 proteção dos oócitos pela melatonina frente ao choque térmico. O
457 choque térmico resultou em aumento da atividade mitocondrial e da
458 produção de EROS. Com a inclusão de melatonina em concentração

459 igual ou superior a 10^{-9} M, as EROS foram reduzidas e na concentração
460 de 10^{-3} M a atividade mitocondrial foi reduzida. Estudos demonstram
461 que a melatonina é capaz de preservar o potencial de membrana da
462 mitocôndria (LIU et al., 2015; WASEEM; TABASSUM; PARVEZ,
463 2016) e aumentar a eficiência da produção de ATP (AGIL et al., 2015).
464 No entanto, os mecanismos pelos quais a melatonina atua amenizando os
465 efeitos do choque térmico ainda precisam ser mais bem esclarecidos.

466 No presente trabalho, a adição de melatonina nas concentrações de
467 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M ao meio MIV sob choque térmico resultaram em
468 superexpressão de *GDF9* em relação aos oócitos maturados em condição
469 convencional. O *GDF9* é um transcrito materno relacionado à maturação
470 nuclear e à qualidade embrionária (GODE et al., 2011). Menor
471 expressão de *GDF9* foi associada à redução da competência de
472 desenvolvimento de oócitos (GENDELMAN et al., 2010), à diminuição
473 da proliferação das células da granulosa e ao crescimento anormal de
474 oócitos (DONG et al., 1996). Assim, se os níveis normais de *GDF9*
475 forem reduzidos, o desenvolvimento e a função das células do cumulus e
476 do oócito serão prejudicadas (LI; ALBERTINI, 2013). Nossos
477 resultados corroboram os de Tian et al. (2014), que relataram aumento

478 na expressão de *GDF9* quando oócitos bovinos foram maturados na
479 condição convencional com adição de 10^{-9} M de melatonina e
480 demonstram que a melatonina pode atuar na melhoria do potencial de
481 desenvolvimento de oócitos expostos à elevadas temperaturas, por meio
482 de maior expressão de *GDF9*.

483 A concentração 10^{-9} e 10^{-12} M resultaram em subexpressão do gene
484 *C-MOS* e a concentração 10^{-12} M reduziu a expressão de *MAPK* em
485 relação aos oócitos maturados em condição convencional. A MOS é uma
486 serina/treonina quinase produto do proto-oncogene *C-MOS* expressa
487 exclusivamente em células germinativas e que está envolvida na
488 reorganização de microtúbulos e cromatina, durante a meiose e ativação
489 da via *MAPK* (VERLHAC et al., 1996). Em síntese, a proteína MOS
490 ativa a *MAPK* que controla os níveis de fator promotor de maturação
491 (MPF), possibilitando a transição da fase do ciclo celular G2 para a
492 mitose (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). O MPF é uma molécula
493 primária envolvida na progressão do ciclo celular meiótico e responsável
494 pela indução da fase M em todas as células eucarióticas (TROUNSON;
495 ANDERIESZ; JONES, 2001). Assim, a sub expressão desses genes
496 pode indicar comprometimento da progressão meiótica, como observado

497 em oócitos maturados sob choque térmico com 10^{-9} M melatonina.
498 Contudo, a progressão meiótica de oócitos maturados sem melatonina (0
499 M) ou com 10^{-12} M melatonina não foi menor do que a observada em
500 oócitos maturados na condição convencional, sugerindo o envolvimento
501 de outros fatores.

502 Nenhum efeito da melatonina e do estresse foi observado na
503 expressão dos genes *ZARI* e *HSP40*, em relação aos oócitos maturados
504 em condição convencional. O *ZARI* é um transcrito materno importante
505 na transição materno-zigótica, desempenhando papel no
506 desenvolvimento embrionário normal (WU et al., 2003). A ausência de
507 efeito nesse gene demonstra que a competência de desenvolvimento dos
508 oócitos não foi afetada pelas condições experimentais. As HSPs estão
509 relacionadas à resposta frente ao estresse (JU, 2005), sendo esperado que
510 houvesse aumento na sua expressão. A ausência de efeito nesse gene
511 pode ser justificada pela utilização de oócitos aspirados de ovários de
512 abatedouro oriundos de animais mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*).
513 Estudos têm mostrado que animais *Bos indicus* têm maior capacidade
514 termorregulatória do que *Bos taurus*, devido a uma série de diferenças
515 genéticas que lhes conferem melhor tolerância térmica (ROY;

516 COLLIER, 2012). Assim, em decorrência dos mecanismos de defesa
517 oriundos dos ganhos provenientes dos cruzamentos, a *HSP40* não foi
518 afetada.

519

520 **Conclusão**

521

522 A melatonina na concentração de 10^{-6} M demonstrou proteger
523 efetivamente os oócitos dos efeitos causados pelo choque térmico, como
524 demonstrado por taxa de maturação semelhante à observada em oócitos
525 maturados na condição convencional, menor produção de EROS e maior
526 expressão de *GDF9*. Embora a concentração 10^{-3} M de melatonina tenha
527 resultado em taxa de apoptose e expressão de *GDF9* semelhantes às
528 observadas em oócitos maturados na condição convencional, houve
529 redução na taxa de maturação, possivelmente em razão da redução
530 acentuada das EROS, demonstrando que essa concentração de
531 melatonina não favorece o desenvolvimento do oócito.

532 Embora pesquisas apontem diferentes formas de atuação da
533 melatonina na proteção celular, um dos mecanismos protetores mais
534 importantes observados no presente estudo foi a regulação da atividade

535 mitocondrial e a redução de EROS, provocando menor estresse
536 oxidativo nos oócitos. Novas investigações são necessárias a respeito de
537 sua ação nas células embrionárias, bem como dos mecanismos
538 moleculares envolvidos. Estudos utilizando oócitos de vacas leiteiras sob
539 estresse térmico tornam-se necessários a fim de avaliar se a melatonina
540 poderia ser utilizada com o propósito de mitigar os efeitos do mesmo.
541

542 **DECLARAÇÃO DE INTERESSE**

543

544 Os autores declaram que não existem conflitos de interesse perceptíveis

545 que prejudiquem a imparcialidade o trabalho apresentado.

546

547 **FINANCIAMENTO**

548

549 O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de

550 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação

551 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela

552 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

553 (FAPEMIG) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

554 (EMBRAPA).

555

556 **REFERÊNCIAS**

- 557 AGIL, A. et al. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in
558 diabetic obese rats. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 59, n. 1,
559 p. 70–79, Aug. 2015.
- 560
561 AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of
562 cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in
563 pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry &
564 Cell Biology**, Exeter, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, 2010.
- 565
566 ASCARI, I. J. **Efeito da adição do fator de crescimento semelhante à
567 insulina-I e melatonina durante a maturação in vitro sobre a
568 qualidade e a competência de oócitos bovinos submetidos ao choque
569 térmico**. 2015. 147 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade
570 Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- 571
572 BAYDAS, G. et al. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by
573 homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c
574 translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-
575 apoptotic protein levels. **Neuroscience**, Oxford, v. 135, n. 3, p. 879-886,
576 2005.
- 577
578 CEBRIAN-SERRANO, A. et al. Beneficial effect of melatonin on
579 blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes.
580 **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 738–746, Oct.
581 2013.
- 582
583 DOMINGUES, W. B. et al. **Efeito da suplementação de melatonina
584 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no
585 desenvolvimento in vitro de embriões bovinos**. Pelotas: [s.n.], 2012. 4 p.
- 586
587 DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early
588 ovarian folliculogenesis. **Nature**, London, v. 383, n. 6600, p. 531–535,
589 Oct. 1996.
- 590
591 DUMOLLARD, R. et al. Mitochondrial function and redox state in
592 mammalian embryos. **Seminars in Cell and Developmental Biology**,

- 593 London, v. 20, n. 3, p. 346-353, May 2009.
594
- 595 DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of
596 mitochondrial function in the oocyte and embryo. In: JUSTIN, C. S. J.
597 (Ed.). **Current topics in developmental biology**. New York: Academic
598 Press, 2007. p. 21-49.
599
- 600 EDWARDS, J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated
601 temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Journal of**
602 **Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 12, p. 4326–4333, Dec. 2005.
603
- 604 GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo:
605 cytoplasmic components and their effects on early development.
606 **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, Apr. 2001.
607
- 608 GENDELMAN, M. et al. Seasonal effects on gene expression, cleavage
609 timing, and developmental competence of bovine preimplantation
610 embryos. **Reproduction**, Cambridge, v. 140, n. 1, p. 73–82, July 2010.
611
- 612 GODE, F. et al. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on
613 embryo quality. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 7, p. 2274–
614 2278, June 2011.
615
- 616 JOU, M. J. et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial
617 levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability
618 transition and beyond in rat brain astrocytes. **Journal of Pineal**
619 **Research**, New York, v. 48, n. 1, p. 20-38, Jan. 2010.
620
- 621 JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress:
622 hints to molecular signaling Cytoplasm. **Animal Reproduction**, Belo
623 Horizonte, v. 2, n. 2, p. 79–90, 2005.
624
- 625 KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on
626 mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo
627 Alto, v. 1, p. 393-417, Jan. 2013.
628
- 629 LEESE, H. J. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo:
630 quietness revisited. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n.

631 2, p. 667-672, Dec. 2008.

632

633 LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell
634 interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature**
635 **Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 141–152, Mar.
636 2013.

637

638 LIU, L. F. et al. Effect of melatonin on oncosis of myocardial cells in the
639 myocardial ischemia/reperfusion injury rat and the role of the
640 mitochondrial permeability transition pore. **Genetics and Molecular**
641 **Research**, Ribeirao Preto, v. 14, n. 3, p. 7481–7489, July 2015.

642

643 LÓPEZ, A. et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative
644 damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and
645 superoxide anion production. **Journal of Pineal Research**, New York, v.
646 46n. 2, p. 188–198, Mar. 2009.

647

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

651

652 NAGLE, K. A. **Assessing mitochondrial activity in embryos from**
653 **heat-stressed ova**. 2011. 108 p. Thesis (Master of Science Degree) - The
654 University of Tennessee, Knoxville, 2011.

655

656 ORTEGA, M. S. et al. Modifications of embryonic resistance to heat
657 shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. **Journal**
658 **of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 11, p. 9152-9164, Nov. 2016.

659

660 PAYTON, R. R. et al. Impact of heat stress exposure during meiotic
661 maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA
662 populations. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 57,
663 n. 4, p. 481-91, Sept. 2011.

664

665 PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression
666 software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis
667 of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**,
668 London, v. 30, n. 9, p. e36, May 2002.

- 669 QIU, X. et al. The diversity of the DnaJ/*HSP40* family, the crucial
670 partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and Molecular Life Science**,
671 Basel, v. 63, n. 22, p. 2560–2570, Nov. 2006.
672
- 673 RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time
674 polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**,
675 Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62–66, Mar. 2003.
676
- 677 RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in
678 reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem
679 cells. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 553–572,
680 Oct. 2009.
681
- 682 REITER, R. et al. Pharmacological actions of melatonin oxygen radical
683 pathophysiology. **Life Sciences**, Oxford, v. 60, n. 25, p. 2055–2271,
684 1997.
685
- 686 RENSIS, F. de; GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Seasonal
687 Heat stress: clinical implications and hormone treatments for the fertility
688 of dairy cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 84, n. 5, p. 650–666, Sept.
689 2015.
690
- 691 ROTH, Z. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows—insights
692 into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annual Review of*
693 *Animal Biosciences*, Palo Alto, v. 5, p. 151–170, Feb. 2017.
694
- 695 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of
696 developmental competence of bovine oocytes by heat shock during
697 maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 6, p. 1898–
698 1906, Dec. 2004.
699
- 700 ROY, K.; S.; COLLIER, R. J. Regulation of acclimation to environmental
701 stress. In: COLLIER, R. J. COLLIER, J. L. (Ed.). **Environmental**
702 **physiology of livestock**. Amsterdam: Wiley-Blackwell, 2012. p. 49–63.
703
- 704 SALIMI, M. et al. The effect of melatonin on maturation, glutathione
705 level and expression of HMGB1 gene in brilliant cresyl blue (BCB)
706 stained imma. **Cell Journal**, Tehran, v. 15, n. 4, p. 294–301, Nov. 2014.

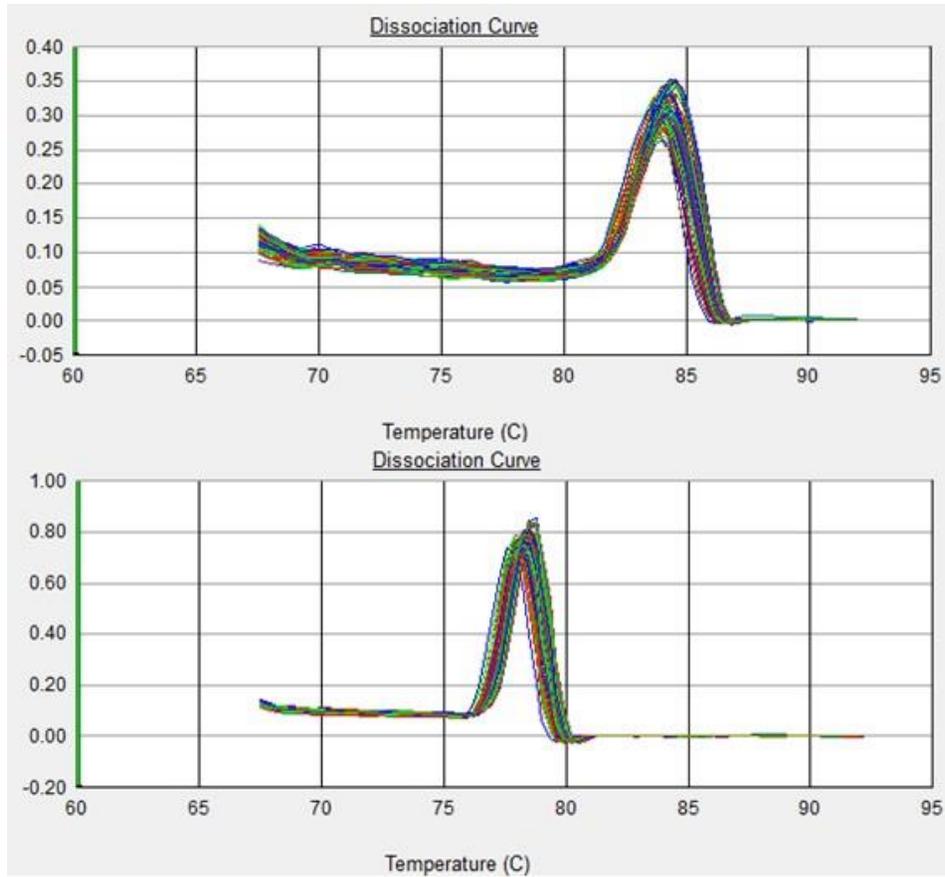
- 707
708 SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded
709 nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of**
710 **Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 289, n. 1/2, p. 209-213, Jan. 2005.
711
- 712 TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in
713 mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, Tokyo, v. 11, n. 1, p.
714 37–47, Jan. 2012.
715
- 716 TAKAMI, M. et al. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous
717 resumption of meiosis Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous
718 resumption of meiosis. **The American Journal of Physiology**,
719 Washington, v. 276, n. 4, p. E684–E688, Apr. 1999.
720
- 721 TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and
722 pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, New York, v.
723 92, n. 1, p. 328–343, July 2009.
724
- 725 _____. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle.
726 **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2013.
727
- 728 TIAN, X. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes
729 maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New
730 York, v. 57, n. 3, p. 239–47, Oct. 2014.
731
- 732 TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human
733 oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**,
734 Cambridge, v. 121, n. 1, p. 51–75, Jan. 2001.
735
- 736 VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W.; LEE, J. Fertilization and early
737 embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential
738 and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. **Human**
739 **Reproduction**, Oxford, v. 10, p. 415-424, Feb. 1995.
740
- 741 VERLHAC, M. H. et al. Mos is required for MAP kinase activation and
742 is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the
743 mouse. **Development**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 815-822, Mar. 1996.
744 VIJAYALAXMI, R. et al. Melatonin as a radioprotective agent: a review.

- 745 **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics,**
746 Elmsford, v. 59, n. 3, p. 639–653, July 2004.
747
- 748 WANG, J. et al. Effects of heat stress during in vitro maturation on
749 cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes.
750 **Reproduction**, Cambridge, v. 137, n. 2, p. 181-189, Feb. 2006.
751
- 752 WASEEM, M.; TABASSUM, H.; PARVEZ, S. Melatonin modulates
753 permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced KATP
754 channel inhibition in isolated brain mitochondria. **Mitochondrion**,
755 Amsterdam, v. 31, p. 1–8, Nov. 2016.
756
- 757 WU, X. et al. Zygote arrest 1 (ZAR1) is a novel maternal-effect gene
758 critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, New York,
759 v. 33, n. 2, p. 187–191, Feb. 2003.
760

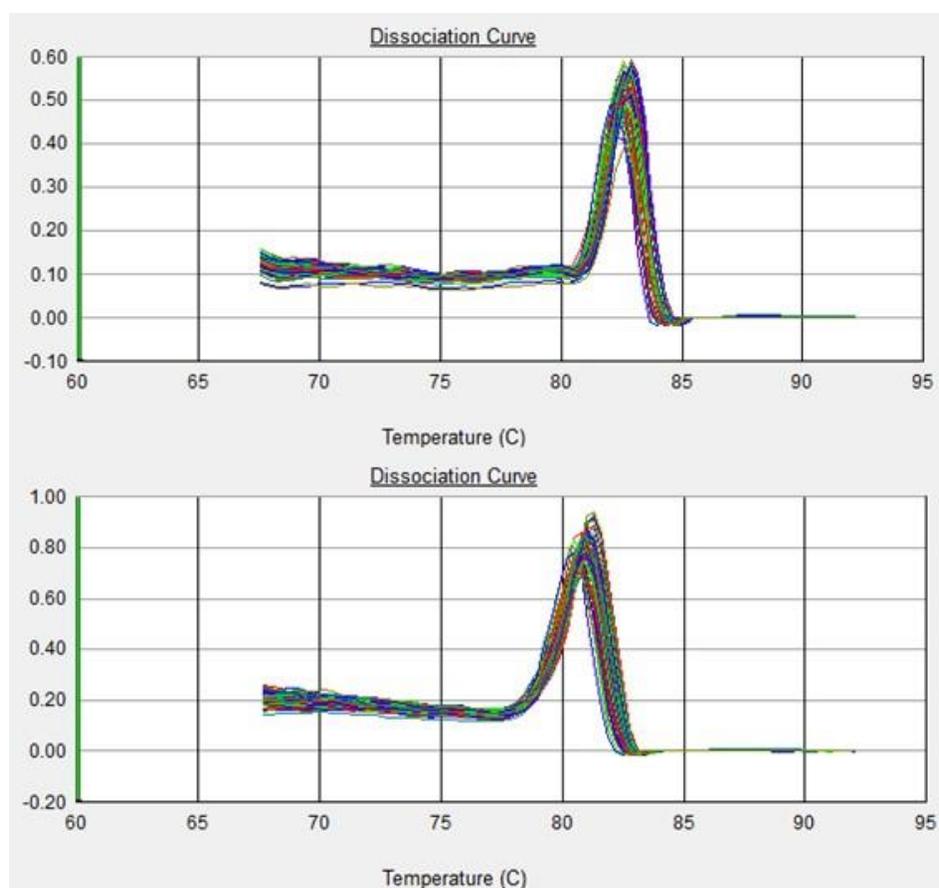
761 **ANEXOS**

762 **Anexo 1:** Quantificação de RNAm e cDNA de oócitos bovinos
 763 realizada com 1µL do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a
 764 transcrição reversa para cada tratamento e repetição.

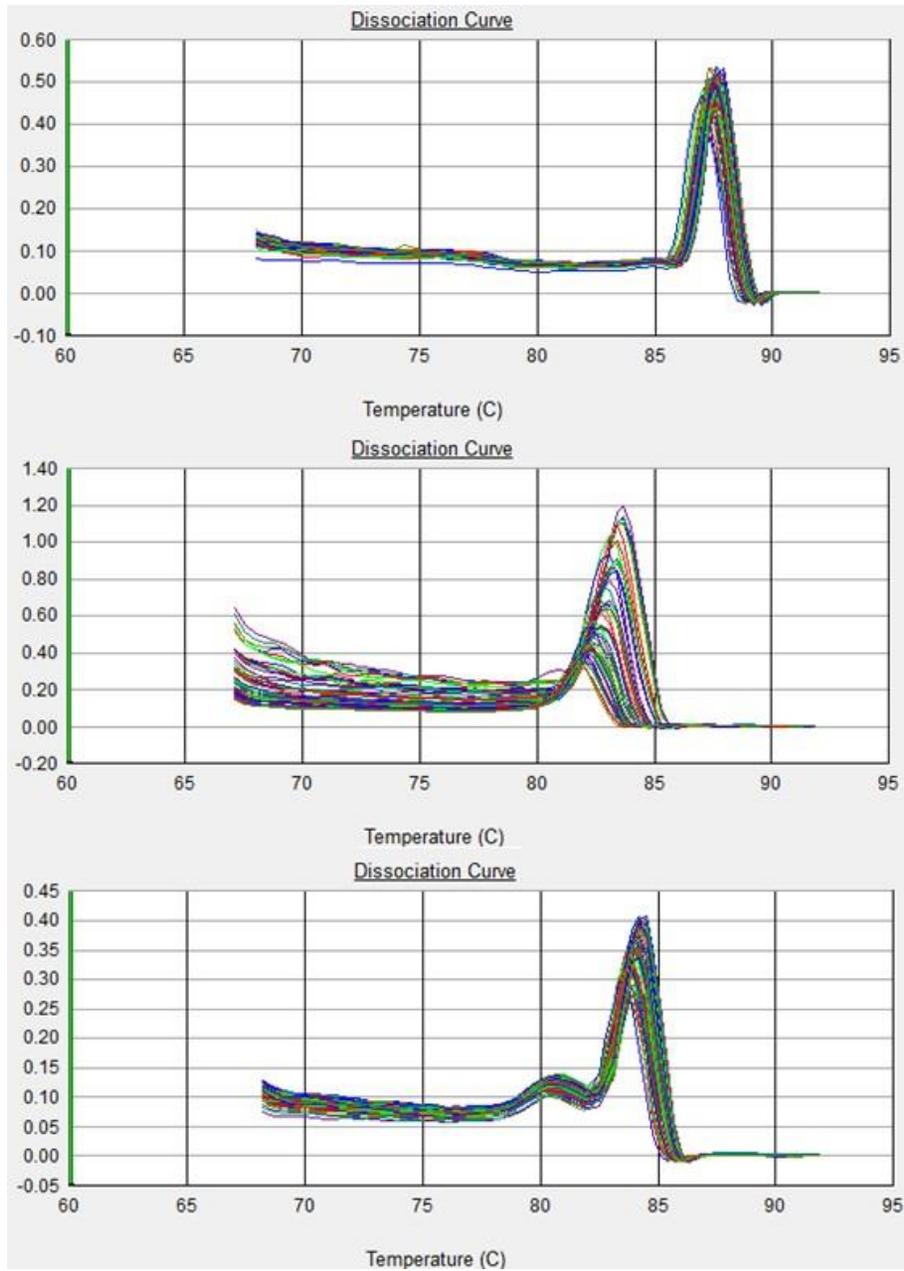
Tratamentos	Quantificação do RNAm	Quantificação do cDNA
0 M (Repetição 1)	3,8 ng/µL	673,1ng/µL
10 ⁻¹² M (Repetição 1)	11,5 ng/µL	651,5ng/µL
10 ⁻⁹ M (Repetição 1)	15,4 ng/µL	662,6ng/µL
10 ⁻⁶ M (Repetição 1)	4,9 ng/µL	656,4ng/µL
10 ⁻³ M (Repetição 1)	7,9 ng/µL	713,5ng/µL
0 M (Repetição 2)	8,0 ng/µL	602,1ng/µL
10 ⁻¹² M (Repetição 2)	5,7 ng/µL	603,5ng/µL
10 ⁻⁹ M (Repetição 2)	10,5 ng/µL	571,5ng/µL
10 ⁻⁶ M (Repetição 2)	5,33 ng/µL	611,1ng/µL
10 ⁻³ M (Repetição 2)	8,8 ng/µL	577,0ng/µL
0 M (Repetição 3)	5,9 ng/µL	751,4ng/µL
10 ⁻¹² M (Repetição 3)	8,8 ng/µL	710,2ng/µL
10 ⁻⁹ M (Repetição 3)	7,5 ng/µL	713,8ng/µL
10 ⁻⁶ M (Repetição 3)	5,4 ng/µL	722,8ng/µL
10 ⁻³ M (Repetição 3)	9,0 ng/µL	713,5ng/µL



Anexo 2: Curvas de dissociação dos genes endógenos, *YWHAZ* e β -*ACTINA*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 77,9°C e 82,8°C, respectivamente.



Anexo 3: Curvas de dissociação dos genes *MAPK* e *ZARI*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 82,3°C e 80,7°C respectivamente.



Anexo 4: Curvas de dissociação dos genes *C-MOS*, *GDF9* e *HSP40*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 86,2°C, 82,3°C e 83,22°C respectivamente.