



PEDRO HENRIQUES LIMA

**ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO
IN VITRO: EFEITOS SOBRE AS TAXAS DE PRODUÇÃO E
QUALIDADE DE BLASTOCISTOS**

**LAVRAS – MG
2018**

PEDRO HENRIQUES LIMA

**ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS
SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO *IN VITRO*: EFEITOS SOBRE AS TAXAS DE
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE BLASTOCISTOS**

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

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Coorientador

**LAVRAS - MG
2018**

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

Lima, Pedro Henriques.

Adição de melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico *in vitro*: efeitos sobre as taxas de produção e qualidade de blastocistos / Pedro Henriques Lima. – 2018. 59 p. : il.

Orientadora: Nadja Gomes Alves.

Coorientador: José Camisão de Souza.

Dissertação (Mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Produção *in vitro* de embriões. 2. Choque térmico. 3. Massa celular interna. I. Alves, Nadja Gomes. II. Souza, José Camisão de. III. Título.

PEDRO HENRIQUES LIMA

**ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS
SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO *IN VITRO*: EFEITOS SOBRE AS TAXAS DE
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE BLASTOCISTOS**

**ADDITION OF MELATONIN TO THE MATURATION MEDIUM OF BOVINE
OOCYTES SUBJECTED TO HEAT SHOCK: EFFECTS ON THE PRODUCTION
RATE AND QUALITY OF BLASTOCYSTS**

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

APROVADA em 27 de abril de 2018.

Prof. Dr. José Camisão de Souza UFLA

Prof. Dr. Alan Maia Borges UFMG

Profa. Dra. Jasmin UFRJ

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

**LAVRAS - MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais e às minhas irmãs, pelo apoio e amizade de sempre. Vocês tornaram possível a realização deste projeto!

Agradeço a toda minha família pelo carinho.

À minha orientadora, Nadja Gomes Alves, pela orientação, confiança, paciência, ensinamentos e pela amizade.

Ao meu coorientador José Camisão de Souza, pelo apoio, amizade, oportunidades e contribuições de sempre.

Ao Alan Maia Borges, pela parceria e receptividade no laboratório de FIV da UFMG. Agradeço a todos do laboratório, em especial, à Ana Carolina Leite e à Eliane Beatriz Magalhães, pela amizade e por todos os ensinamentos.

À Jasmin, pela receptividade e pelo auxílio nas imagens e nas análises dos embriões.

Agradeço a todos os meus amigos, e um agradecimento especial ao Jesus Sanches que me auxiliou durante todo o mestrado.

Agradeço ao Grupo NUTRAN pela ajuda e parceria, particularmente, ao Ivan, à Fabiane e à Débora que me auxiliaram nessa reta final.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Veterinárias e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

RESUMO GERAL

O estresse térmico por calor aumenta a produção de radicais livres, o que contribui para diminuição da qualidade dos oócitos e dos embriões. Assim, a adição de antioxidantes, como a melatonina, ao meio de maturação *in vitro* (MIV), tem o potencial de reduzir os prejuízos causados pela alta temperatura. O objetivo foi avaliar os efeitos da adição de melatonina ao meio MIV de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico sobre as taxas de produção e qualidade de blastocistos. Os oócitos utilizados, para a produção *in vitro* de embriões, foram provenientes de ovários de abatedouros e maturados sob choque térmico (12h a 41,0 °C seguido por 12h a 38,5 °C) em meio MIV sem melatonina (0 M) ou acrescido de melatonina nas concentrações 10^{-12} ; 10^{-9} ; 10^{-6} e 10^{-3} M. No controle positivo (não-estresse), os oócitos foram maturados na ausência de melatonina sob condição convencional (24h a 38,5 °C). No controle DMSO, os oócitos foram maturados em meio contendo 0,46% de DMSO (mesma concentração presente no tratamento 10^{-3} M), sob choque térmico. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, sendo os blocos constituídos pelos dias de coleta de ovários. Os tratamentos 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} M de melatonina e o controle não estresse não diferiram ($P > 0,05$) e resultaram em maior proporção ($P < 0,05$) de embriões com oito ou mais células, no dia 3 de cultivo (D3), em comparação aos tratamentos 10^{-12} e 0 M. A proporção de embriões com oito ou mais células no D3 foi maior ($P < 0,05$) no grupo controle DMSO quando comparado com os grupos 10^{-9} , 10^{-12} e 0 M. A produção de blastocistos, nos dias 7 (D7) e 8 (D8), bem como o número total de células, a proporção de células apoptóticas, em relação ao total de células e a proporção de células apoptóticas na massa celular interna (MCI) não foram influenciados ($P > 0,05$) pela adição de melatonina ou de DMSO ao meio MIV, assim como não foram influenciados pelo choque térmico (0 M vs controle não estresse). O tratamento 10^{-6} M resultou em maior proporção ($P < 0,05$) de células da MCI, em relação ao total de células, quando comparado aos tratamentos 10^{-9} , 10^{-12} , 0 M e DMSO, mas não diferiu ($P > 0,05$) dos tratamentos 10^{-3} M e controle não estresse. Por meio de análise de regressão logística, observou-se que a proporção de embriões com oito ou mais células no D3 aumentou, em função da concentração de melatonina ($P < 0,05$) e que a proporção de células da MCI aumentou, a partir da concentração 10^{-9} M, atingindo o máximo na concentração 10^{-4} M, seguido por redução até 10^{-3} M. Conclui-se que a adição de melatonina até 10^{-3} M ao meio MIV de oócitos sob choque térmico estimulou o desenvolvimento embrionário ao estágio de 16 células e que a proporção de células da MCI foi aumentada pela adição de melatonina na concentração 10^{-4} M ao meio MIV.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões. Choque térmico. Massa celular interna. Apoptose celular. Antioxidantes.

ABSTRACT

Heat stress increases the production of free radicals, which contributes to a decrease in the quality of oocytes and embryos. Thus, the addition of antioxidants, such as melatonin, to the *in vitro* maturation medium (IVM), has the potential to reduce damages from high temperatures. Addition of melatonin to the IVM medium of bovine oocytes submitted to heat shock on production rates and blastocyst quality was evaluated. Slaughterhouse derived oocytes were matured under heat shock (12 h at 41.0 °C followed by 12 h at 38.5 °C) in IVM medium without (0M) or with melatonin at 10^{-12} ; 10^{-9} ; 10^{-6} and 10^{-3} M concentrations. In the positive (non-stress) control, oocytes were matured in the absence of melatonin under conventional conditions (24 h at 38.5 °C). In the DMSO control oocytes were matured in medium containing 0.46% DMSO (same concentration as the 10^{-3} M treatment), under heat shock. Oocytes were randomly assigned to treatments blocked by days of ovarian collection. Greater proportions ($P < 0.05$) of embryos with eight or more cells on day 3 of culture (D3) were observed in the 10^{-3} , 10^{-6} and 10^{-9} M melatonin treatments and non-stress control compared to 10^{-12} and 0 M treatments. The proportion of embryos with eight or more cells in D3 was higher ($P < 0.05$) in the DMSO control compared to 10^{-9} , 10^{-12} e 0 M groups. Blastocyst production on days 7 (D7) and 8 (D8), total number of cells, apoptotic cells to total cell ratio and the proportion of apoptotic cells to the inner cell mass (ICM) ($P > 0.05$) did not change by the addition of melatonin or DMSO to the IVM medium nor by heat shock (0 M vs non-stress control). The 10^{-6} M treatment resulted in a greater proportion ($P < 0.05$) of ICM in relation to total cells compared to 10^{-9} , 10^{-12} , 0 M and DMSO treatments, but did not differ ($P > 0.05$) from the 10^{-3} M treatment and non-stress control. The greater the melatonin concentration the greater the proportion of embryos with eight or more cells in D3 increased ($P < 0.05$). The proportion of MCI cells increased from 10^{-9} M, peaking at 10^{-4} M, followed by a reduction at 10^{-3} M. In conclusion, the addition of melatonin up to 10^{-3} M in the MIV medium of oocytes under heat shock stimulated embryonic development to the 16-cell stage and the proportion of MCI cells was increased by the addition of 10^{-4} M melatonin to the IVM medium.

Key words: *In vitro* production of embryos. Heat shock. Inner cell mass. Cellular apoptosis. Antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
BE	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto expandido
CAT	Catalase
CCOs	Complexos cumulus-oophorus
CCs	Células do cumulus
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico D3 – Terceiro dia de cultivo
D7	Sétimo dia de cultivo
D8	Oitavo dia de cultivo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FIV – Fertilização <i>in vitro</i>	
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDP	Guanosina difosfato
GPx	Glutaciona peroxidase
GTP	Guanina trifosfato
HSPs	Proteínas do choque térmico
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
ICM	<i>Inner cell mass</i>
LH	Hormonioluteinizante
MAPKs	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MCI	Massa celular interna
MI	Metáfase I MII – Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>

MPF	Fator de promoção da maturação
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PIVE	Producao <i>in vitro</i> de embriões
ROR	Receptor retinoide órfão
RZR	Receptor retinoide Z
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxidodismutase
SOFaa	<i>SyntheticOviductFluidMedium</i>
TALP	<i>Tyrode´salbuminlactatepyruvate</i>
TMI	Íons provenientes de metais de transição
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling</i>
VG	Vesícula germinativa

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Estresse térmico na reprodução.....	12
2.2 Efeitos do choque térmico <i>in vitro</i> nos oócitos e embriões.....	13
2.3 Estresse oxidativo / nitrosativo e antioxidantes.....	15
2.4 Mecanismo fisiológico de ação da melatonina na reprodução.....	16
2.5 Melatonina na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	20
REFERÊNCIAS	23
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	31
ARTIGO 1 - ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS SOB CHOQUE TÉRMICO ALTERA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL E O NÚMERO DE CÉLULAS DA MASSA CELULAR INTERNA	31

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Temperaturas elevadas são as principais causas do estresse térmico na pecuária, gerando prejuízos à produção nacional durante todo o ano (NARDONE et al., 2010). Os bovinos de raças especializadas para a produção de leite são especialmente afetados pelo aumento da temperatura ambiental. Isso ocorre em razão da grande quantidade de calor metabólico gerado para a produção de leite, podendo causar o quadro de hipertermia e estresse térmico em locais com temperaturas superiores a 29 °C (ORTEGA et al., 2016). Fêmeas bovinas sob estresse térmico apresentam temperatura corporal acima da fisiológica (38- 39 °C), o que pode contribuir para a redução da fertilidade, como observado por menores taxas de concepção e de prenhez.

As causas da redução da fertilidade pelo estresse térmico envolvem o comprometimento da maturação oocitária, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial (LEROY et al., 2008). A diminuição da qualidade e da competência de desenvolvimento de oócitos expostos ao estresse térmico está relacionada ao aumento da fragmentação do DNA e da apoptose celular, à desorganização do citoesqueleto (ROTH; HANSEN, 2004, 2005), bem como ao estresse oxidativo (PAES et al., 2016). O estresse oxidativo, causado pelo acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROS) e de hidrogênio (ERNS), produz efeitos negativos pela redução do potencial de membrana das mitocôndrias, causando a ruptura dessas organelas (JOU et al., 2010; TAN et al., 2007), aumento da metilação das histonas, promovendo alterações na expressão gênica (CHERVONA; COSTA, 2012) e aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, que comprometem a morfologia e a fisiologia celular (TAMURA et al., 2013). O estresse oxidativo também é prejudicial ao desenvolvimento futuro do embrião, promovendo a diminuição do número de células totais e de células da massa celular interna (MCI) (LOREN et al., 2017). Portanto a adição de antioxidantes aos meios utilizados na produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido avaliada como forma de minimizar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo (PAPIS et al., 2007; TAN et al., 2007), uma vez que melhora a qualidade oocitária e, conseqüentemente, melhora o desenvolvimento embrionário (ZHAO et al., 2017).

Dentre diversos antioxidantes avaliados na PIVE, a melatonina tem despertado o interesse de muitos pesquisadores pelo seu potencial de atuar como um doador de elétrons capaz de detoxificar as espécies reativas, que são eletrodeficientes (GITTO et al., 2001;

POEGGELER et al., 1993; TAN et al., 2002, 2007; VIJAYALAXMI et al., 2004). Em adição, a melatonina estimula a atividade de enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2008), como a glutatona peroxidase e superóxido dismutase (RODRIGUEZ et al., 2004). Tem sido relatado ainda que a melatonina preserva a função e homeostase mitocondrial, prevenindo o estresse oxidativo mitocondrial, motivo pelo qual a apoptose e morte celular ocorrem (JOU et al., 2010; ZHAO et al., 2016). Por fim, diferente dos outros antioxidantes que são de natureza hidrofílica ou lipofílica, a melatonina é anfifílica e de pequeno tamanho, sendo capaz de atuar reduzindo o dano oxidativo em toda a célula, por atravessar facilmente as barreiras celulares (REITER et al., 2013).

A hipótese deste estudo é de que os efeitos prejudiciais induzidos pelo choque térmico sejam amenizados pela adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, resultando em maior produção e melhor qualidade dos embriões produzidos. Portanto o experimento teve por objetivo avaliar a resposta a diferentes doses de melatonina adicionada ao meio de maturação de oócitos, sob choque térmico, nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos, na proporção de células na massa celular interna e de células apoptóticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse térmico na reprodução

A temperatura corporal dos animais homeotérmicos é mantida por um sistema termo regulatório, o qual evita que as condições ambientais causem o estresse térmico (AGGARWAL; UPADHYAY, 2013). O estresse térmico é causado por uma combinação de fatores como temperatura, umidade, radiação solar, movimentação do ar e precipitações (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007), alterando a temperatura corporal para além da temperatura ideal (HANSEN, 2009), que é de 38 a 39 °C nos bovinos (SMITH, 2009). As diferenças nas adaptações genéticas e fisiológicas determinam os prejuízos causados, tornando alguns animais mais e outros menos resistentes ao estresse térmico (HANSEN, 2013). Dessa forma, raças de *Bos indicus* e algumas *Bos taurus* 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., 2013). Esta diferença torna-se particularmente importante, para vacas de alta produção de leite, por possuírem maior demanda metabólica e maior produção de calor metabólico (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000).

O estresse térmico é um dos fatores responsáveis 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, 1965; HUSSAIN; FUQUAY; YOUNAS, 1992) e redução na taxa de concepção (JORDAN, 2003), que refletem diretamente sobre a eficiência reprodutiva. Essas alterações são consequências do impacto negativo do estresse térmico no desenvolvimento folicular, nos mecanismos endócrinos e hormonais e na capacidade de desenvolvimento do oócito e do embrião (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

Zeron et al. (2001), em trabalho com vacas e novilhas da raça holandesa, observaram menores taxas de concepção no verão (11 a 17%) comparadas com o inverno (38 a 45%), tanto em múltiparas quanto em primíparas. Segundo os autores, as diferenças relacionadas com a estação do ano, provavelmente, foram o resultado de mudanças no número de folículos e na qualidade de oócitos, visto que os efeitos estacionais afetaram todas as células foliculares (teca, granulosa, cumulus) e os oócitos. Al-Katanani, Paula-Lopes e Hansen (2002), trabalhando com vacas da raça holandesa, no inverno e no verão, observaram que a proporção de embriões clivados que se desenvolveram até blastocisto, no dia 8 após a inseminação, foi

menor no verão, indicando diminuição na competência dos oócitos. Diferenças entre as estações do ano, também, foram observadas por Ferreira et al. (2011), que relataram que a taxa de desenvolvimento de oócitos, a blastocistos foi comprometida pelo estresse térmico.

Dentre os fatores desencadeados pelo estresse térmico que comprometem a capacidade de desenvolvimento do oócito, pode-se citar a redução do diâmetro do folículo dominante e da produção de estradiol. A menor concentração de estradiol no sangue está associada à falha na luteólise, tornando a fase luteal mais longa, fato que compromete a qualidade e viabilidade do oócito ovulado (ORTEGA et al., 2016; PAES et al., 2016).

Segundo Wilson et al. (1998), a luteólise tardia é resultado da falha do estradiol, por baixa concentração em iniciar uma série de eventos endócrinos essenciais para a regressão do corpo lúteo. Dentre eles estão a expressão de receptores de ocitocina no endométrio e a ativação de enzimas associadas à síntese de $PGF2\alpha$. A liberação pulsátil da $PGF2\alpha$ ocorre, quando a ocitocina e o estrógeno se ligam aos seus respectivos receptores no útero, portanto baixas concentrações de estrógeno alteram padrões de síntese e liberação de $PGF2\alpha$.

Bovinos que foram submetidos ao estresse térmico apresentam regeneração completa dos ovários, ou seja, produção oocitária normal, três ou mais ciclos estrais após o término do período de estresse. Esse período é o mesmo gasto por um folículo pré-antral, cerca de 90% da população ovariana, para atingir o estágio pré-ovulatório, sugerindo que estes também tenham seu desenvolvimento prejudicado em altas temperaturas (MORBECK; TYLER; BRITT, 1991; PAES et al., 2016). Badinga et al. (1993) relataram que a exposição prolongada ao estresse térmico ambiental pode danificar células da granulosa e da teca, no estágio inicial da multiplicação e/ou diferenciação, causando efeitos negativos em longo prazo sobre os folículos ovarianos.

2.2 Efeitos do choque térmico *in vitro* nos oócitos e embriões

Os efeitos do estresse térmico em oócitos e embriões *in vivo* são recriados *in vitro* com eficiência pelo modelo do choque térmico (GENDELMAN et al., 2010). A exposição dos oócitos ao choque térmico, tanto na fase de vesícula germinativa (VG) como durante o período de maturação oocitária, pode comprometer a competência de desenvolvimento dos oócitos, diminuindo o número de estruturas capazes de gerar prenhez (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; GENDELMAN et al., 2010). No entanto os mecanismos celulares e os eventos moleculares relacionados à sobrevivência ou morte dos oócitos ainda não são bem esclarecidos (PAULA-LOPES et al., 2012).

A maturação oocitária envolve alterações no núcleo e no citoplasma e é necessária para que ocorra a fertilização e, posteriormente, o desenvolvimento embrionário (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). A exposição dos oócitos ao choque térmico afeta a maturação oocitária (MAYA-SORIANO et al., 2013), acelerando o processo e induzindo o envelhecimento precoce do oócito (ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2010; EDWARDS et al., 2005). Segundo Paula-Lopes et al. (2012), a intensidade dos prejuízos causados pelo estresse térmico é considerada uma função da temperatura e do tempo de exposição das estruturas. A exposição moderada ao choque térmico, ou seja, 40 °C, durante as primeiras 12 horas de MIV, reduziu a proporção de oócitos clivados, em relação aos oócitos maturados no D3, além de diminuir a taxa de produção de blastocisto no D8 de cultivo. Quando a temperatura de exposição esteve entre 42°C e 44°C, o desenvolvimento embrionário pré-implantação foi bloqueado.

Dentre as alterações causadas pelo choque térmico nos oócitos, estão a translocação prematura dos grânulos corticais do citoplasma para a membrana celular, comprometendo o processo da maturação citoplasmática e a fertilização (PAYTON et al., 2004), bem como alterações no citoesqueleto, como a desorganização do fusomeiótico, que prejudicam a maturação nuclear e diminuem a capacidade de desenvolvimento embrionário (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014; LI et al., 2016; ROTH; HANSEN, 2005). De acordo com Nabenishi et al. (2012), a exposição de oócitos a 41 °C, durante a primeira metade da MIV, reduz a proporção de oócitos que completam a maturação nuclear e, conseqüentemente, diminui a proporção da produção de blastocistos em relação aos oócitos maturados. Fragmentação do DNA celular, que é característica do processo de apoptose (FERREIRA et al., 2011) e diminuição da atividade mitocondrial (PAULA-LOPES et al., 2012), também, foram observados em oócitos expostos ao choque térmico. Ascari (2016) observou aumento da apoptose e redução da atividade mitocondrial em oócitos expostos ao choque térmico na MIV. Esses autores relacionaram essa observação à menor produção de embriões, ao menor número de células nos embriões produzidos, menor proporção de células na MCI em relação ao número de células totais e maior proporção de células apoptóticas em relação às células da MCI.

Outra causa do impacto negativo do estresse térmico no metabolismo celular é o aumento na liberação dos íons provenientes de metais de transição (TMI), sendo o Fe^{2+} , armazenado na forma de ferritina, o metal mais comum. Esses TMI têm alta capacidade de doar elétrons para o oxigênio e para o nitrogênio, formando as EROS e ERNS que causam

prejuízos celulares. O aumento na produção de EROS e ERNS pode causar desbalanço com os antioxidantes promovendo o quadro de estresse oxidativo (SLIMEN et al., 2016).

Assim, a adição de moléculas regulatórias como os antioxidantes é uma estratégia que pode melhorar as condições de maturação e cultivo *in vitro*, uma vez que mimetiza a fisiologia embrionária *in vivo* e, dessa forma, melhorou a eficiência de produção do sistema de PIVE (BLOCK; HANSEN, 2007; HANSEN, 2013).

2.3 Estresse oxidativo / nitrosativo e antioxidantes

As EROS e as ERNS são definidas como moléculas ou fragmentos moleculares que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita atômica ou molecular (TAMURA et al., 2009) e incluem radicais hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO^\cdot) (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006). O metabolismo celular tem como metabólitos as EROS e as ERNS, portanto suas sínteses ocorrem de maneira fisiológica (SORDILLO; AITKEN, 2009; TAMURA et al., 2009), inclusive, nas células embrionárias (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006). As baixas concentrações dessas espécies reativas são essenciais, para a sinalização celular em várias respostas biológicas, como a morte celular programada ou apoptose celular, proliferação celular e a expressão gênica. Entretanto, em concentrações excessivas, são responsáveis pelo desbalanço iônico que causa o quadro de estresse oxidativo, condição prejudicial à célula (WANG et al., 2017). As enzimas antioxidantes têm papel essencial no controle e neutralização das espécies reativas. Em condições fisiológicas, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é degradado a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) no citosol e nas mitocôndrias. Posteriormente, o H_2O_2 é removido pela catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx) e pela glutatona transferase (FISHER et al., 1991; JU et al., 2005).

Segundo Loren et al. (2017), existe dualidade em relação aos efeitos das EROS e das ERNS, uma vez que as EROS são essenciais, durante o processo de maturação e retomada da meiose de oócitos pré-ovulatórios, liberação de cálcio intracelular e no estímulo das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs). As ERNS, por sua vez, são necessárias para o desenvolvimento dos folículos antrais, maturação oocitária, ovulação e desenvolvimento embrionário inicial. Portanto o equilíbrio entre a produção de EROS e ERNS e a ação de antioxidantes são fatores importante para maturação dos oócitos e fertilização (TAMURA et al., 2009). A falha na manutenção da homeostase intracelular ocorre quando a capacidade

fisiológica de neutralização e eliminação das espécies reativas é excedida e tem, como consequência, o estresse oxidativo e/ou nitrosativo (LOREN et al., 2017). O estresse oxidativo e nitrosativo resulta em danos aos oócitos, durante o período pré-ovulatório, bem como durante o desenvolvimento embrionário (HANSEN, 2009; NABENISHI et al., 2012; ROTH et al., 2008).

O excesso das espécies reativas está associado a efeitos deletérios, como a destruição ou alteração na conformação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (MA, 2010). Em adição, causa efeitos diretos nas mitocôndrias, como a redução do potencial de membrana mitocondrial. Como consequência, ocorre o extravasamento de proteínas mitocondriais, incluindo o citocromo C, que ativa a cascata da caspase e promove a apoptose celular. Também ocorre o influxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citoplasma e, em seguida, para o interior da mitocôndria. O Ca^{2+} no interior da mitocôndria aumenta o metabolismo mitocondrial e, conseqüentemente, aumenta a produção das espécies reativas, tornando o processo cíclico e de importante prejuízo celular (ZHAO et al., 2016).

Nos oócitos e células da granulosa dos ovários, o estresse oxidativo causa danos (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; TAMURA et al., 2013), aumentando a peroxidação lipídica, que altera a conformação da membrana plasmática (CRUZ et al., 2014a), a oxidação de proteínas e danos ao DNA (TAMURA et al., 2013), além de induzir a apoptose celular (TAKAHASHI, 2012).

In vivo, tanto os oócitos quanto os embriões estão protegidos do estresse oxidativo em razão da presença de antioxidantes que estão presentes no fluido folicular e no oviduto. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade da adição de antioxidantes aos meios de PIVE, visando à melhor produção e desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2012). Porém, deve-se atentar que determinadas moléculas têm funcionamento de antioxidante em certas situações e passam a ser pró-oxidantes em situações distintas. Outro limitante para o uso de antioxidantes na PIVE é o fato de serem instáveis, sendo necessário, portanto, adicioná-los periodicamente aos meios de produção *in vitro*, para que a proteção dos oócitos e embriões às espécies reativas seja efetiva (HANSEN, 2013).

2.4 Mecanismo fisiológico de ação da melatonina na reprodução

A melatonina é um hormônio que tem funções conhecidas no controle do ritmo circadiano e na regulação sazonal da reprodução, além de exercer importantes funções

fisiológicas por suas propriedades imunomoduladoras e citoprotetoras. É um composto orgânico nitrogenado, conhecido como amina, derivado da descarboxilação enzimática do triptofano e tem em sua cadeia o radical *indol*, sendo, portanto, uma indolamina (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). A melatonina é produzida na glândula pineal, além de outros órgãos como a retina, glândula lacrimal extraorbital, trato gastrointestinal, pele e outros (REITER et al., 2013).

A presença de melatonina no fluido folicular de humanos (BRZEZINSKI et al., 1987), suínos (SHI; TIAN; ZHOU, 2009) e bovinos (TIAN et al., 2014) fornece indícios de sua atuação no desenvolvimento folicular. Adriaens et al. (2006) observaram a presença de receptores de melatonina, nas células da granulosa, sugerindo sua ação na maturação oocitária. Segundo Itoh et al. (1999), a melatonina presente no fluido folicular não é proveniente somente do sangue, mas também da síntese do próprio ovário, células da granulosa, células do cumulus e oócitos.

Em hamsters, Tamura et al. (1998) observaram que a melatonina possui efeito direto na esteroidogênese folicular, principalmente nas células da teca, visto que sua ação ocorre pela diminuição da síntese de AMPc nos folículos pré-ovulatórios. Em estudos realizados com ratas, Soares et al. (2003) descreveram a importância da melatonina na foliculogênese, ovulação e regulação do ciclo estral, uma vez que a expressão dos receptores MT1 foi reduzida em ratas, durante o metaestro, quando comparadas com ratas, durante o proestro, alteração promovida pela diferença na concentração de estradiol. Adriaens et al. (2006) observaram efeitos distintos da melatonina na foliculogênese e na oogênese quando adicionada em diferentes concentrações ao meio de cultivo *in vitro* de folículos de ratas. Houve maior concentração de progesterona, quando se adicionaram 100 μ M e 1mM de melatonina, redução na concentração de androstenediona na dose de 100 μ M e redução da concentração de estradiol quando se adicionaram 1 ou 2 mM. Dessa forma, os autores sugeriram efeito direto da melatonina, nas células da teca, promovendo alterações na esteroidogênese.

As ações da melatonina são diversas e dependem do tipo e local da sua ligação, podendo se ligar aos receptores na membrana plasmática (MT1 e MT2) e aos receptores citosólicos MT3 (CRUZ et al., 2014b), às moléculas citoplasmáticas, como a calmodulina (MACCHI; BRUCE, 2004) e aos sítios de ligações nucleares como o receptor retinoide Z (RZR) e o receptor retinoide órfão (ROR) (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005). Os receptores MT1 e MT2 pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e têm

como via de ação a inibição da formação do cAMP por meio da diminuição da atividade da adenilato ciclase (VON GALL et al., 2002). Os receptores MT1 estão localizados no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, no ovário e nas células de Leydig, modulando as funções reprodutivas e metabólicas. Os receptores MT2 estão localizados, em sua maioria, no cérebro, mas também podem ser detectados na retina (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005), miométrio, testículos e células da granulosa (SOARES et al., 2003).

Quando a melatonina se liga aos receptores MT1 e/ou MT2, a proteína G (composta pelas subunidades α , β e γ) está inativa e sua subunidade α está ligada à guanina difosfato (GDP). Após a ligação da melatonina aos receptores, a subunidade α da proteína G perde afinidade pelo GDP e aumenta a afinidade pela guanina trifosfato (GTP), tornando a proteína G ativa. Após ser ativada, ocorre a dissociação da proteína G em duas subunidades, a subunidade α e o complexo $\beta + \gamma$. Como consequência, ocorrerá a redução nos níveis de AMPc pela inibição de adenilatosintase, resultando na diminuição da atividade da proteína quinase (TAMURA et al., 2009). A diminuição da atividade da proteína quinase protege a célula contra a translocação dessa proteína para o citoesqueleto, em que fosforilaria a vimentina, proteína que compõe o citoesqueleto, evitando, assim danos aos microfilamentos (ANTON-TAY et al., 1998).

Os receptores MT3 pertencem ao grupo das redutases e estão envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que evitam as reações de transferência de elétrons das quinonas (MOR et al., 1999; PANDI-PERUMAL et al., 2006). Os receptores MT3 estão localizados no fígado, rins, cérebro, oócitos e ovários e distribuídos, em todo o sistema nervoso e tecidos periféricos nos animais vertebrados, porém suas vias de ação ainda não estão completamente elucidadas (VINCENT et al., 2010).

A ação da melatonina nas moléculas citoplasmáticas é representada pela interação com a calmodulina. A melatonina age de forma antagônica ao complexo Ca^{2+} /calmodulina competindo pelos seus receptores e, portanto modula as ações do Ca^{2+} intracelular. Isso ocorre pelo fato de que a melatonina e a calmodulina terem conformações filogenéticas semelhantes (BENÍTEZ-KING; ANTÓN-TAY, 1993).

Estudos têm sugerido o uso da melatonina como captador de radicais livres e antioxidante do sistema reprodutivo (ADRIAENS et al., 2006; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; TAMURA et al., 2009, 2013). Em contraste a outros antioxidantes, que são de natureza hidrofílica ou lipofílica, a melatonina é anfifílica e atravessa facilmente todas as barreiras morfofisiológicas. Desse modo, é capaz de reduzir o dano oxidativo, em toda a célula,

incluindo a membrana, citoplasma e mitocôndrias (REITER et al., 2013). As EROS neutralizadas pela melatonina são o oxigênio singlete, o óxido nítrico, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxilo. Nas ERNS, a melatonina age neutralizando o ácido nítrico e o peroxinitrito (LOREN et al., 2017).

Em adição, a melatonina age estimulando enzimas que estão envolvidas na metabolização das espécies reativas em moléculas menos nocivas. Nesse contexto, foi observado o aumento na concentração e atividade da superóxido desmutase (SOD), da glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione redutase, comprovando sua função antioxidante (TAMURA et al., 2009). A melatonina aumenta as concentrações celulares de glutathione, porque estimulam a enzima limitante para sua biossíntese, γ - glutamylcisteína sintetase (ROCHA et al., 2011). Ainda nesse contexto, segundo Mayo et al. (2002), a expressão de genes relacionados à síntese dessas enzimas antioxidantes aumentou, quando se administrou a melatonina na cultura *in vitro* de células neurais, sendo importante, portanto, na expressão gênica, que regula o estresse oxidativo e nitrosativo.

Além da redução dos danos do estresse oxidativo, a melatonina apresenta-se como importante agente antiapoptótico e se relaciona de forma direta com a viabilidade embrionária. Os mecanismos envolvidos estão relacionados à capacidade de diminuir a expressão de genes pró-apoptóticos, como o P53, BAX e a Caspase-3, além de aumentar a expressão de genes antiapoptóticos como o BCL-2. Essas enzimas pró-apoptóticas estão localizadas no citoplasma e passam para o interior das mitocôndrias, por aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, causando a apoptose (MARQUES et al., 2018). Além de alterar a expressão dos genes relacionados à apoptose, a melatonina tem a capacidade de neutralizar as EROS que causam aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e, por esses motivos, é considerada um agente antiapoptótico (JOU et al., 2010). Nesse contexto, Roth e Hansen (2004) concluíram que oócitos maturados nas temperaturas de 40 a 41°C apresentaram maior índice apoptótico, quando comparados com os submetidos à MIV convencional. Em adição, Paiva (2017) concluiu que o índice apoptótico do tratamento sob choque térmico, em que se adicionou a melatonina na concentração de 10^{-3} M, não diferiu do tratamento em que se realizou a MIV de maneira convencional.

A apoptose é um fenômeno fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento normal dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo*. Por meio de análises específicas, a apoptose celular pode ser identificada, a partir do estágio de seis células em embriões produzidos *in vitro* e a partir de 21 células em embriões produzidos *in vivo*. Em adição,

quando comparados, há maior incidência de células apoptóticas em embriões produzidos *in vitro* do que naqueles produzidos *in vivo*. Portanto a PIVE afeta o processo de regulação da fragmentação de DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (GJORRET, 2003).

Segundo Byrne et al. (1999), embriões de mamíferos apresentam maior concentração de células apoptóticas na MCI do que nas células do trofoblasto (10% vs < 3%). No estágio de desenvolvimento inicial (2 a 8 células), os autores não detectaram apoptose, porém, no estágio de 9 a 16 células, 30% das estruturas apresentaram pelo menos uma célula apoptótica e, no estágio de mórula, 50% das estruturas possuíam células apoptóticas. A variação do número de células apoptóticas variou, de acordo com o número de células do blastocisto, sendo que com um menor número de células (< 100 células) a variação foi maior (0 a 10%) do que quando comparada com blastocistos com mais células (> 100 células, variação de 0 a 6%).

2.5 Melatonina na produção *in vitro* de embriões

A adição de antioxidantes aos meios de PIVE é foco de inúmeros trabalhos pela necessidade de suplementar moléculas que sejam capazes de neutralizar as espécies reativas, geradas pelo metabolismo celular. A concentração de oxigênio utilizada *in vitro* altera a produção de EROS e ERNS, visto que quanto maior for a concentração maior a produção dessas espécies reativas e, conseqüentemente, maior o desequilíbrio oxidativo e nitrosativo (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003). Embriões cultivados *in vitro* têm proteção insuficiente contra o estresse oxidativo e nitrosativo e, como consequência, apresentam danos severos que comprometem a competência embrionária e diminuem as taxas de implantação e de prenhez. Dessa forma, a adição de antioxidantes aos meios de cultivo *in vitro* é a estratégia mais utilizada para amenizar esses danos (SU et al., 2015). Antioxidantes enzimáticos, como a superóxido desmutase e a catalase, vitaminas como a vitamina E e outros, como o resveratrol e a melatonina, são exemplos dos antioxidantes que têm importância na PIVE (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003). O uso da melatonina na PIVE apresenta resultados, de certa forma contraditórios, fato que deixa clara a necessidade de novos estudos, para que a dose a ser utilizada e a etapa em que deve ser adicionada sejam estabelecidas. Considerando o potencial da melatonina e a possibilidade de minimizar os efeitos tóxicos gerados pela produção de espécies reativas, o seu uso em sistemas de cultivo *in vitro* de oócitos e embriões de diferentes espécies, submetidos ou não ao choque térmico, tem sido avaliado (ADRIAENS et al., 2006; ASCARI, 2016; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; PAIVA, 2017; SHI; TIAN; ZHOU, 2009; TAKADA et al., 2012; TAMURA et al., 2009).

Na avaliação da maturação oocitária, o uso da melatonina apresentou efeitos positivos em embriões de várias espécies, como camundongos (TAMURA et al., 2008), suínos (SHI; TIAN; ZHOU, 2009), ovinos (VÁZQUEZ et al., 2010), humanos (WEI et al., 2013) e bovinos (REMIÃO et al., 2016). Sob condição convencional de maturação, El-Raey et al. (2011) observaram efeitos positivos da melatonina sobre a progressão de metáfase I (MI), para a fase de metáfase II (MII), uma vez que o número de oócitos mantidos na fase de MI foi maior no grupo controle, quando comparado com o grupo tratado com 10 e 50 ng/mL de melatonina no meio de MIV. Da mesma forma, Takada et al. (2012) concluíram que a adição de melatonina ao meio de MIV de oócitos foi capaz de reduzir os danos no DNA das células do *cumulus*, aumentando as taxas de clivagem e o desenvolvimento oocitário. Tian et al. (2014) observaram efeito positivo na taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número médio de células/blastocisto, quando a melatonina foi adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos, nas concentrações de 10^{-7} M e 10^{-9} M. Takada et al. (2010), entretanto não observaram efeito na maturação nuclear e nas taxas de clivagem e de blastocistos com a adição 10^{-9} M de melatonina ao meio MIV de oócitos bovinos. Aqueles autores concluíram, porém que a melatonina pode ser utilizada como substituta às gonadotrofinas, uma vez que produziu taxas de produção embrionária comparáveis àquelas dos grupos tratados com FSH e LH. Da mesma forma, Rodrigues-Cunha et al. (2016) concluíram que a melatonina foi eficiente em aumentar a taxa de retomada da meiose, uma vez que não diferiu dos grupos tratados com gonadotrofinas. Isso ocorreu, porque, para que o fator de promoção da maturação (MPF) seja ativado, os níveis de AMPc necessitam estar baixos e a melatonina tem como ação celular principal a redução da concentração de AMPc.

Utilizando o modelo de choque térmico, Ortega et al. (2016) concluíram que os embriões do grupo no qual se adicionou 1 μ M de melatonina no meio de CIV apresentaram menor concentração de EROS, quando comparado com os embriões do grupo em que não se adicionou a melatonina, porém o desenvolvimento até o estágio de blastocisto não foi influenciado pela melatonina. Ascari (2016), em trabalho com a adição de melatonina aos meios de MIV sob condição convencional ou choque térmico, concluiu que a concentração de 10^{-4} M foi capaz de reduzir a taxa de apoptose, na massa celular interna, melhorando, dessa forma, a qualidade dos embriões produzidos. Nas concentrações 10^{-4} M e 10^{-6} M, a adição de melatonina, em ambas condições de maturação *in vitro*, reduziu a produção de EROS nos oócitos. Em contrapartida, as concentrações 10^{-4} M e 10^{-6} M não influenciaram a taxa de

maturação nuclear, a fragmentação de DNA, a atividade de enzimas caspases, a atividade mitocondrial em oócitos e nem o desenvolvimento embrionário.

Ishizuka et al. (2000) realizaram cultivo de embriões de ratos com e sem a adição de melatonina e concluíram que a concentração de 10^{-4} M aumentou as taxas de embriões que atingiram o estágio de duas células, porém não alterou as taxas de produção de blastocistos. Em outro estudo, a melatonina suplementada ao meio de CIV de embriões de suínos, na concentração de 10^{-9} M, teve efeito positivo na taxa de clivagem e no número de células dos blastocistos, porém, na concentração de 10^{-3} M, as taxas foram menores, mostrando que os resultados dependem da concentração adicionada (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007). Papis et al. (2007), trabalhando com a adição de 10^{-4} M de melatonina no meio de CIV de embriões suínos, concluíram que o efeito da melatonina foi dependente da concentração de O₂ utilizada no cultivo. Quando a concentração de O₂ foi de 7%, a taxa de produção de blastocisto foi menor, no grupo em que foi adicionada a melatonina, comparada com o grupo controle. Já na concentração de 20% de O₂ houve maior produção de blastocisto no grupo tratado com melatonina, quando comparado com o grupo controle. Embriões bovinos produzidos *in vitro* com a presença de melatonina no meio de CIV apresentaram maior expressão de genes relacionados à prevenção da apoptose, maior concentração de enzimas antioxidantes, maior número de células da MCI, menos células apoptóticas e maior viabilidade, após transferência, quando comparados com o grupo controle (SU et al., 2015).

Altas concentrações ou longos períodos de exposição à melatonina dessensibilizam seus receptores pelo efeito de *downregulation* (GERDIN et al., 2003). Dessa forma, os diferentes resultados observados com o uso de melatonina podem ser explicados pelas diferentes composições dos meios utilizados na produção *in vitro* de embriões (TAKADA et al., 2012).

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.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 325–332, June 2006.
- AGARWAL, A.; UPADHYAY, R. **Heat stress and animal productivity**. Haryana: Springer, 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.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 3/4, p. 939–949, Feb. 2003.
- ANDREU-VÁZQUEZ, C. et al. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 293–299, Nov. 2010.
- ANTON-TAY, F. et al. In vitro stimulation of protein kinase C by Melatonin. **Neurochemical Research**, New York, v. 23, n. 5, p. 601–606, May 1998.
- ASCARI, I. J. **Adição do fator de crescimento semelhante à insulina-i ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico**. 2016. 120 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- 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.
- BENÍTEZ-KING, G.; ANTÓN-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, Basel, v. 49, n. 8, p. 635–641, Aug. 1993.
- BLOCK, J.; HANSEN, P. J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 9, p. 1518–1529, June 2007.
- 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.
- BRZEZINSKI, A. et al. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 64, n. 4, p. 865–867, Apr. 1987.

- BYRNE, A. T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 117, n. 1, p. 97–105, Sept. 1999.
- 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.
- CHERVONA, Y.; COSTA, M. The control of histone methylation and gene expression by oxidative stress, hypoxia, and metals. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 53, n. 5, p. 1041–1047, Sept. 2012.
- CROCOMO, L. F. et al. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 470–479, 2012.
- CRUZ, M. H. C. et al. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. **Theriogenology**, Los Altos, v. 82, n. 7, p. 925–932, July 2014a.
- _____. 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. 2014b.
- DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, Houndsmills, v. 27, n. 2, p. 101–110, July 2005.
- 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 and Development**, New York, v. 78, n. 4, p. 250–262, Apr. 2011.
- FERREIRA, R. M. et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of dairy science**, Lancaster, v. 94, n. 5, p. 2383–2392, May 2011.
- FISHER, P. R. et al. Oxidative metabolism and heat shock-enhanced chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Cell Science**, London, v. 99, p. 741–750, 1991.
- 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, n. 2, p. 222–227, Feb. 1965.
- GENDELMAN, M. et al. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, Cambridge, v. 140, n. 1, p. 73–82, July 2010.

GERDIN, M. J. et al. Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT 1 and hMT 2 melatonin receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 304, n. 3, p. 931–939, Mar. 2003.

GITTO, E. et al. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, n. 10, p. 1393–1401, Oct. 2001.

GJORRET, J. O. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 4, p. 1193–1200, Oct. 2003.

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

_____. 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. 2013.

HUSSAIN, S. M. I.; FUQUAY, J. W.; YOUNAS, M. Estrous cyclicity in nonlactating and lactating holsteins and jersey's during a pakistani summer. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 11, p. 2968–2975, Nov. 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.

ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 402–408, May 1999.

JORDAN, E. R. Effects of heat stress on reproduction. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 3, p. 104–114, Feb. 2003.

JOU, M. J. et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 48, n. 1, p. 20–38, Jan. 2010.

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

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 11, n. 3, p. 150–158, set. 2014.

LEROY, J. et al. Reduced fertility in high-yielding dairy cows : are the oocyte and embryo in danger ? Part I. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 612–622, Oct. 2008.

- LI, Y. et al. Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2016.
- LOREN, P. et al. Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: Impact on gamete handling and in vitro embryo production in humans and other mammals. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1–17, June 2017.
- MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 125, n. 3, p. 376–393, Mar. 2010.
- MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, v. 25, n. 3/4, p. 177–195, Sept./Dec. 2004.
- MARQUES, T. et al. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 226–236, Feb. 2018.
- 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.
- MAYO, J. C. et al. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, n. 10, p. 1706–1713, Oct. 2002.
- MOR, M. et al. Melatonin. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 6, p. 501–518, 1999.
- MORBECK, D.; TYLER, H. D.; BRITT, J. H. Duration of estrus cycles subsequent to two injections of prostaglandin F₂ alpha given at a 14-day interval in nonlactating. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 7, p. 2342–2346, July 1991.
- NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 79, n. 1, p. 31–40, Jan. 2012.
- NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 130, n. 1/3, p. 57–69, May 2010.
- ORTEGA, M. S. et al. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, p. v. 99, n. 11, p. 9152–13, Nov. 2016.
- PAES, V. M. et al. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 4, p. 994–1003, Sept. 2016.
- PAIVA, F. A. P. **Efeito da melatonina na maturação in vitro sobre a expressão gênica e a qualidade de oócitos bovinos sob choque térmico**. 2017. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin: nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, Oxford, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, July 2006.

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

_____. Physiology and endocrinology symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 3, p. 1143–1153, 2013.

PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro 1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1303–1308, Oct. 2004.

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.

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

REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 63, p. 70–81, Aug. 2016.

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.

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

RODRIGUES-CUNHA, M. C. et al. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 7, p. 1685–1694, Oct. 2016.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 36, n. 1, p. 1–9, Jan. 2004.

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. 235–244, Feb. 2005.

_____. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation 1. **Biology of Reproduction**, Boca Raton, v. 71, n. 6, p. 1898–1906, Dec. 2004.

SHI, J.-M.; TIAN, X.-Z.; ZHOU, G.-B. 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.

SLIMEN, I. B. et al. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 100, n. 3, p. 401–412, 2016.

SMITH, B. **Large animal internal medicine**. 4. ed. Saint Louis: Elsevier, 2009. 1872 p.

SOARES, J. M. et al. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 306, n. 2, p. 694–702, Aug. 2003.

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

SU, J. et al. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 59, n. 4, p. 455–468, Nov. 2015.

TAKADA, L. et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. **Research in Veterinary Science**, 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**, New York, v. 11, n. 1, p. 37–47, Jan. 2012.

TAMURA, H. et al. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, Amsterdam, 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**, Houndsmills, 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.

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

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. 239–247, Oct. 2014.

TOMÁS-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.

VÁZQUEZ, M. I. et al. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, n. 4, p. 618–626, Sept. 2010.

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

VINCENT, L. et al. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 48, n. 3, p. 222–229, Apr. 2010.

VON GALL, C. et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 234–238, Mar. 2002.

WANG, L. et al. Theriogenology peroxiredoxin 5 is essential for in vitro development of bovine SCNT embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 92, p. 156–166, Apr. 2017.

WEI, D. et al. Supplementation with low concentrations of melatonin improves nuclear maturation of human oocytes in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 7, p. 933–938, July 2013.

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. 2124–31, Aug. 1998.

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.

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.

ZHAO, X. M. et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 60, n. 2, p. 132–141, Mar. 2016.

ZHAO, J. et al. Melatonin protect the development of preimplantation mouse embryos from sodium fluoride-induced oxidative injury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 133–141, Sept. 2017.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO 1 - ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE MATURAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS SOB CHOQUE TÉRMICO ALTERA O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO INICIAL E O NÚMERO DE CÉLULAS DA MASSA CELULAR
INTERNA**

(VERSÃO PRELIMINAR)

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

RESUMO

Os efeitos da adição de melatonina (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M) ao meio MIV de oócitos bovinos sob choque térmico na produção e qualidade de embriões foram avaliados. Oócitos também foram maturados em condição convencional (não-estresse – NS) ou sob choque térmico em meio com DMSO. A proporção de embriões com oito ou mais células no D3 aumentou em função da concentração de melatonina; foi maior nos tratamentos 10^{-3} M, 10^{-6} M e NS do que nos tratamentos 10^{-12} e 0 M; e no DMSO do que nos tratamentos 10^{-9} , 10^{-12} e 0 M. A produção de blastocistos em D7 e D8, o número de células e a proporção de células apoptóticas nos blastocistos e a proporção de células apoptóticas na massa celular interna (MCI) não diferiram entre os tratamentos. A proporção de células da MCI aumentou a partir da concentração 10^{-9} M atingindo o máximo com 10^{-4} M, seguido por redução até 10^{-3} M; e foi maior no tratamento 10^{-6} M do que nos tratamentos 10^{-9} , 10^{-12} , 0 M e DMSO. Conclui-se que a melatonina até 10^{-3} M na MIV de oócitos sob choque térmico estimula o desenvolvimento embrionário e na concentração 10^{-4} M aumenta a proporção de células da MCI.

PALAVRAS CHAVE: produção in vitro de embriões, choque térmico, massa celular interna apoptose celular, antioxidantes.

ABSTRACT

The effects of adding melatonin (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} and 10^{-3} M) to the MIV medium of bovine oocytes under heat shock on embryo production and quality were evaluated. Oocytes were also matured in conventional (non-stress-NS) condition or under heat shock on DMSO medium. The proportion of embryos with eight or more cells in D3 increased as a function of melatonin concentration; was higher in the 10^{-3} M, 10^{-6} M and NS treatments than in the 10^{-12} and 0 M treatments; and DMSO than in the 10^{-9} , 10^{-12} and 0 M treatments. The production of D7 and D8 blastocysts, the number of cells and the proportion of apoptotic cells in the blastocysts, and the proportion of apoptotic cells in the inner cell mass (ICM) did not differ between treatments. The proportion of ICM increased from the 10^{-9} M concentration peaking at 10^{-4} M, followed by reduction to 10^{-3} M; and was greater in the 10^{-6} M treatment than in the 10^{-9} , 10^{-12} , 0 M and DMSO treatments. It is concluded that melatonin up to 10^{-3} M in the IVM of oocytes under thermal shock stimulates embryonic development and in the 10^{-4} M concentration increases the proportion of ICM.

KEYWORDS: *in vitro* production of embryos, heat shock, inner cell mass apoptosis, antioxidants.

1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico pelo calor tem efeitos negativos em diversos órgãos de bovinos, sendo responsável pela diminuição da fertilidade. O estresse térmico está associado a falhas na secreção hormonal (Al-Katanani *et al.* 2002), no desenvolvimento folicular (De Rensis *et al.* 2017), na fertilização (Roth 2017), na qualidade e competência de desenvolvimento dos oócitos (Ortega *et al.* 2016) e nas funções endometriais e embrionárias (Paula-Lopes *et al.* 2012). A redução da viabilidade dos oócitos submetidos ao estresse térmico pode estar relacionada às menores taxas de maturação nuclear (De Rensis *et al.* 2017), aumento da fragmentação do DNA (Takada *et al.* 2012) e da apoptose celular (Roth and Hansen 2004), desorganização do citoesqueleto (Belhadj Slimen *et al.* 2016) e redução da atividade mitocondrial (Roth and Wolfenson 2016). Segundo Li *et al.* (2016), outro fator que resulta na diminuição da viabilidade oocitária pela exposição ao estresse térmico é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS), que podem resultar no estresse oxidativo, comprometendo a morfologia e a fisiologia celular.

As alterações causadas tanto pelo estresse térmico quanto pelo estresse oxidativo podem ser amenizadas com a adição de termoprotetores e antioxidantes, como a melatonina, ao meio de maturação *in vitro* (MIV). A melatonina é um antioxidante que age principalmente na neutralização das EROS e das ERNS por meio do estímulo das enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, superóxido desmutase e a catalase, que atuam neutralizando as espécies reativas e diminuindo os efeitos negativos do estresse oxidativo (Rodriguez *et al.* 2004). Em contraste com maioria dos antioxidantes conhecidos, a melatonina tem características multifuncionais devido a sua natureza anfifílica, que a permite atravessar todas as barreiras morfofisiológicas,

exercendo seus efeitos em diversos tecidos (Fu *et al.* 2014). A presença de melatonina no fluido folicular de bovinos (Tian *et al.* 2014), bem como a existência de receptores para este hormônio nas células da granulosa sugerem sua ação na maturação oocitária (Adriaens *et al.* 2006). Em adição, a melatonina pode prevenir apoptose em oócitos e embriões, aumentando o potencial de desenvolvimento ao estágio de blastocistos (Zhao *et al.* 2016; Wang *et al.* 2017) e a proporção de células da massa celular interna (MCI) em relação ao número total de células do embrião (Su *et al.* 2015).

Utilizando o modelo de choque térmico, que mimetiza *in vitro* os prejuízos causados pelo estresse térmico *in vivo*, Cebrian-Serrano *et al.* (2013) observaram que a adição de 10^{-4} M de melatonina na MIV resultou em maior taxa de produção de blastocistos, quando comparada com a maturação na ausência do antioxidante. Ascari (2016) concluiu que a adição de melatonina ao meio MIV nas concentrações de 10^{-6} M e 10^{-4} M não influenciou o desenvolvimento embrionário, mas na concentração de 10^{-4} M reduziu a taxa de apoptose na MCI, melhorando, portanto, a qualidade embrionária. Em contrapartida, Ortega *et al.* (2016) concluíram que a adição de 10^{-6} M de melatonina ao meio de cultivo *in vitro* sob choque térmico diminuiu a concentração de EROS em blastocistos, porém não foi capaz de melhorar a taxa de clivagem e o desenvolvimento até o estágio de blastocistos.

Apesar dos recentes estudos, ainda não há consenso sobre a concentração de melatonina que adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos seja capaz de mitigar os efeitos causados pelo estresse térmico, resultando em maior produção de embriões de melhor qualidade. Assim, objetivou-se nesse estudo avaliar a produção de embriões e a qualidade de blastocistos produzidos a partir de oócitos maturados sob choque térmico, em meios contendo diferentes concentrações de melatonina (0, 10^{-12} M, 10^{-9} M, 10^{-6} M e 10^{-3} M). A adição de melatonina ao meio de

MIV pode ser eficiente em reduzir os prejuízos causados pelo choque térmico em oócitos bovinos, melhorando o desenvolvimento inicial e a qualidade dos embriões produzidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ÉTICA

Os métodos e procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), registrado sob o número de protocolo 037 16.

2.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a não ser que seja especificado de outra forma.

2.3. LOCAL DO EXPERIMENTO

A produção in vitro de embriões (PIVE) foi realizada na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (Laboratório de Células Embrionárias) e as análises de apoptose celular (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling - TUNEL) e imunocitoquímica na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa (NUMPEX - Bio).

2.4. COLETA DE COMPLEXOS CUMULUS OÓCITO (CCOS)

Os ovários de vacas predominantemente mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* foram coletados em abatedouro local e transportados para o laboratório no período máximo de quatro horas após o abate, em solução fisiológica

(0,9% NaCl) aquecida a 36 °C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica e os folículos de 3 a 8 mm aspirados utilizando agulhas (40 x 12 mm) acopladas a seringas de 5 mL. O conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico estéril imerso em banho-maria (37 °C) e, após 10 minutos de sedimentação do conteúdo celular, o sobrenadante foi descartado e o precipitado avaliado com o auxílio de estereomicroscópio em placa de Petri descartável de 100 x 20 mm (Sartedt, Nümbrecht, Alemanha), contendo meio de lavagem TCM-199 bicarbonato (Nutricell, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA), 22 µg/mL de piruvato (P5280 Sigma, St. Louis, MO, USA) e 83,4 µg/mL de amicacina (Sulfato de Amicacina – Nova Farma, Anápolis, GO). Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram classificados com base nas características do citoplasma (homogeneidade, coloração e presença de granulações) e número de camadas de células do *cumulus*. Foram selecionados para a MIV os CCOs que apresentaram graus 1 e 2 (contendo mais de três camadas de células e citoplasma uniforme), conforme a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow and Seidel 1999). Em seguida, os CCOs foram lavados duas vezes em meio TCM-199 HEPES (Nutricell, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SFB, 83,4 µg/mL de amicacina e 22 µg/mL de piruvato. Antes de serem submetidos à maturação, os oócitos foram lavados uma vez em meio de MIV, composto de TCM-199 bicarbonato suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche Inc, Belleville, ON, Canada), 5 g/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche Inc, Belleville, ON, Canada), 10 µg/mL de estradiol (E2758 Sigma), 22 µg/mL de piruvato, 83,4 µg/mL de amicacina e acrescido ou não de melatonina (M5250–Sigma) diluída em dimetilsulfóxido - DMSO (D2650 Sigma).

2.5. MATURAÇÃO OOCITÁRIA IN VITRO

Após as lavagens, os CCOs foram submetidos à MIV em gotas de 70 µL de meio, cobertas por óleo mineral, em placas de Petri de 60 x 16 mm (Sartedt, Nümbrecht, Alemanha) incubadas em estufa com 95% de umidade e 5% de CO₂ em ar atmosférico quando em temperatura de 38,5°C e, com 95% de umidade e 7% de CO₂ quando a 41,0 °C.

Foram avaliadas as concentrações de 0, 10⁻¹²; 10⁻⁹; 10⁻⁶ e 10⁻³ M de melatonina adicionada ao meio MIV sob a condição de choque térmico (12 horas a 41,0 °C e 7% CO₂ seguido por 12 horas a 38,5 °C e 5% CO₂). No tratamento 10⁻³ M de melatonina a concentração de DMSO foi de 0,46% e os demais tratamentos foram obtidos por diluição seriada. Foi realizado um tratamento no qual os oócitos foram maturados em meio MIV sem adição de melatonina, na condição convencional de maturação (24 horas a 38,5 °C e 5% CO₂, grupo controle-não estresse). Adicionalmente, a fim de verificar possível influência do diluente DMSO nas variáveis avaliadas, foi realizado um tratamento no qual os oócitos foram maturados em meio MIV contendo 0,46% de DMSO, que corresponde à mesma concentração presente no tratamento 10⁻³ M, sob choque térmico (12 horas a 41,0 °C e 7% CO₂ seguido por 12 horas a 38,5 °C e 5% CO₂ - grupo controle-DMSO). Os meios foram preparados com, no mínimo, 2 horas de antecedência à MIV.

Em cada dia de coleta de ovários (repetições), os CCOs graus I e II foram agrupados e distribuídos aleatoriamente aos tratamentos. Foram preparadas duas placas que comportaram os seis tratamentos submetidos ao choque térmico (sendo uma gota por tratamento em cada placa) e outra placa com o controle positivo (duas gotas para MIV convencional), totalizando sete tratamentos e 14 gotas, por repetição. Realizou-se 12 repetições e 205 ± 30 oócitos foram maturados por repetição. No total,

2456 oócitos foram maturados, distribuídos aos sete tratamentos (361 no 10^{-3} M, 354 no 10^{-6} M, 340 no 10^{-9} M, 378 no 10^{-12} M, 354 no 0 M, 328 no controle não-estresse e 341 no controle-DMSO).

2.6. PREPARO DO SÊMEN E FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Após 24 horas de MIV os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen de uma mesma partida de um único touro provado da raça Holandesa, previamente testado na PIVE. O sêmen foi submetido às análises de motilidade e vigor em microscopia de campo claro com aumento de 400x. A determinação da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se diluição de 1:20. O descongelamento da palheta de sêmen foi realizado em descongelador automático (Cito Products Incorporated Watertown, Wisconsin, EUA) a 37 °C por 30 segundos. Para lavagem e seleção espermática, a dose de sêmen foi depositada cuidadosamente sobre a superfície do gradiente descontínuo de Percoll (17-0891-02 GE Healthcare, Chicago, EUA), sendo uma coluna de 90% de Percoll (350 µL) e outra de 45% (350µL). O microtubo cônico contendo o gradiente de Percoll e o sêmen descongelado foi centrifugado em microcentrífuga por seis minutos a 656,7 x g (equivalente a 2020 RPM). Em seguida, 200 µL do pellet, resultante da centrifugação do Percoll, foram retirados e adicionados a 500 µL de meio de capacitação TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate) - SÊMEN (Solução q.s.p. 100 mL - NaCl 0,582g (S7653 Sigma), KCl 0,023g (P9333 Sigma), NaH₂PO₄ 0,0035g (S8282 Sigma), MgCl₂.6H₂O 0,008 g (M2393 Sigma), NaHCO₃ 0,210 g (S5761 Sigma), CaCl₂.2H₂O 0,03 g (C7902 Sigma), Lactato de sódio 310,4 µL (L4263 Sigma), Vermelho Fenol 0,001g (P5530 Sigma), HEPES 0,238 g (H4034 Sigma), água Milli-Q para completar os 100 mL) previamente estabilizado em estufa com

5% de CO₂ a 38 °C. O tubo foi submetido à centrifugação novamente por dois minutos a 417,2 x g (equivalente a 1610 RPM). O sobrenadante foi novamente descartado e 100 µL do precipitado contendo o sêmen foram ressuspensos em 40µL do meio FIV (FERT-TALP), suplementado com amicacina 83,4µg/mL (Sulfato de Amicacina – Nova Farma, Anápolis, GO), penicilamina 27µg/mL (P4875 Sigma,), hipotaurina 1µg/mL (H1384 Sigma), epinefrina 0,3µg/mL (E4250 Sigma), albumina sérica bovina (BSA) 5µg/mL (A3803 Sigma), piruvato 22µg/mL e heparina 10µg/mL (HEPAMAX-S, Blau Farmacêutica, Cotia, Brasil), totalizando 140µL de meio FIV com os espermatozoides já selecionados. Para a inseminação foram adicionados 7 µL desse meio FIV contendo sêmen em cada gota. Foi utilizada a concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL, em gotas de 70µL de meio FIV cobertas com óleo mineral. O processo de FIV foi realizado por um período de 18 a 22 horas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, sendo o dia da fecundação considerado o dia zero (D0).

2.7. DESNUDAMENTO E CULTIVO IN VITRO DOS EMBRIÕES

Ao fim da FIV, os presumíveis zigotos foram debridados das células do cumulus, utilizando-se micropipeta automática e, posteriormente, foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em gotas de 70 µL de meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOFaa), adaptado de Holm *et al.* (1999) e suplementado com 2,5% de SFB, 5 µg/mL de BSA, 22 µg/mL de piruvato e 83,4 µg/mL de amicacina. Foram avaliados a taxa de clivagem dos embriões no dia três de cultivo (D3), a proporção de embriões que atingiram mais de oito células no D3, o número e o estágio de desenvolvimento dos embriões nos dias sete (D7) e oito de cultivo (D8) conforme a classificação proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow and

Seidel 1999). No D8 todas as estruturas foram lavadas em PBS-PVA, fixadas em paraformaldeído 4% em câmara úmida por uma hora e, em seguida, armazenadas a 4 °C em microtubos com 1000 µL de PBS-PVP para posterior análise.

2.8. IMUNOCITOQUÍMICA E ÍNDICE APOPTÓTICO EMBRIONÁRIO (TUNEL)

A qualidade embrionária foi avaliada por meio do número total de células, proporção de células da massa celular interna (MCI), proporção de células apoptóticas em relação ao total de células e proporção de células apoptóticas em relação às células da MCI, em blastocistos expandidos (BX) em D8. Foram realizadas as análises de imunocitoquímica para quantificar a MCI, e de TUNEL para quantificar as células com fragmentação do DNA em apoptose (células TUNEL positivas). Para realização dessas análises, foram formados quatro grupos de três repetições cada, totalizando as 12 repetições. Foram avaliados 15 BX no tratamento 10^{-3} M de melatonina, 14 no 10^{-6} M, 19 no 10^{-9} M, 21 no 10^{-12} M, 22 no 0 M, 14 no tratamento não-estresse e 31 no controle DMSO. Em cada embrião foram realizadas todas as análises descritas.

Inicialmente, os BX foram submetidos a três lavagens de cinco minutos cada em PBS com 0,3% de Triton X-100 (T8787 Sigma). Após as lavagens foi realizado o bloqueio em 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por 30 minutos, e incubação durante a noite em geladeira com o anticorpo primário anti-SOX2, IgG de coelho (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). No dia seguinte, os embriões foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de Triton X-100 por cinco minutos e incubados com o anticorpo secundário cy3 anti-IgG de coelho (Jackson Immuno Research, WestGrove, PA, USA) diluído 1:800 em PBS-Triton 0,01%. Esta incubação foi feita em câmara úmida por 1 hora e 30 minutos à temperatura

ambiente. Em seguida, o material foi lavado com PBS e então submetido à análise de Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling (TUNEL) utilizando o kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) em solução salina fosfatada por 5 minutos, lavados e equilibrados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. No controle positivo, os embriões foram pré-incubados com enzima DNase, mimetizando o processo de morte celular. Em seguida, foram incubados em uma solução contendo tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. No controle negativo, os embriões foram incubados na ausência da enzima rTdT. Três novas lavagens com PBS-Triton 0,01% foram realizadas antes da adição de 0,1% de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) por 5 minutos, com a finalidade de marcar os núcleos celulares.

A captura das imagens foi executada em microscópio óptico de fluorescência Leica DMI 6000 (Wetzlar, Alemanha), utilizando objetiva de 20x. O número total de células, células da massa celular interna e células apoptóticas foram analisados utilizando-se o software LAS AF (2.6.3, Leica Microsystem, Alemanha). O número de células positivas para SOX-2 (número de células da MCI) e para TUNEL (número de células apoptóticas) foram calculadas em relação ao total de células coradas pelo DAPI. Foi avaliada também a proporção de células TUNEL-positivas contidas na MCI.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso com cinco tratamentos: 0 (controle negativo); 10^{-12} M; 10^{-9} M; 10^{-6} M e 10^{-3}

M melatonina adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos maturados sob choque térmico. Os blocos foram referentes aos dias de coleta de ovários e em cada dia de coleta os oócitos CCOs de graus 1 e 2 foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes tratamentos. Foram realizados o controle positivo (maturação dos oócitos na forma convencional, 24 horas a 38,5 °C, sem adição de melatonina ao meio MIV) e o controle DMSO (os oócitos foram submetidos ao choque térmico e foi adicionado DMSO na concentração de 0,46%).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de proporção e de contagens foram analisados utilizando-se modelos lineares generalizados. Para os dados de contagem foram efetuadas análises de *deviance*, considerando a distribuição Poisson, com função de ligação *log*. Para os dados de proporção também foram realizadas análises de *deviance*, mas considerando a distribuição binomial com função de ligação *logit*. Foi considerado o nível de significância de 5% para estabelecer diferença estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software SAS for Windows (SAS, 2008).

Com o objetivo de descrever os efeitos das diferentes concentrações de melatonina sob choque térmico, nas variáveis em que esse efeito foi significativo ($P < 0,05$), foram ajustadas equações de regressão. Os modelos de regressão foram ajustados utilizando modelos lineares generalizados, considerando as mesmas distribuições e funções de ligação já definidas. A variável independente, ou seja, a concentração de melatonina foi transformada da seguinte maneira:

$$X = \frac{1}{\log_{10}(-\log_{10}(\text{Concentração} + k))}$$

(1)

sendo que as concentrações foram 0 M, 10^{-12} M, 10^{-9} M, 10^{-6} M e 10^{-3} M e a constante k foi positiva e muito próxima de 0 (zero), ou seja, foi utilizado o valor 10^{-500} .

Dessa forma os valores transformados para as concentrações de melatonina foram: 0 M = 0, 10^{-12} M = 0,9266, 10^{-9} M = 1,0480, 10^{-6} M = 1,2851 e 10^{-3} M = 2,0959. Essa transformação foi necessária para garantir o ajuste adequado dos modelos de regressão.

5. RESULTADOS

A melatonina adicionada ao meio de MIV na concentração 10^{-3} M resultou em maior proporção de embriões com oito ou mais células, quando comparado aos tratamentos 10^{-12} M e 0 M ($P < 0,05$, Tabela 1). Os tratamentos com 10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-9} M de melatonina e o controle não-estresse não diferiram entre si quanto à proporção de embriões com oito ou mais células no D3 ($P > 0,05$). Na avaliação do efeito do choque térmico (0 M vs controle não-estresse), o tratamento não-estresse resultou em maior proporção de embriões com oito ou mais células ($P < 0,05$). O tratamento DMSO resultou em maior proporção de embriões com oito ou mais células, quando comparado aos tratamentos 0 M, 10^{-12} M e 10^{-9} M ($P < 0,05$), mas não diferiu dos tratamentos 10^{-6} M, 10^{-3} M e controle não-estresse ($P > 0,05$). As taxas de clivagem e a produção de blastocistos no D7 e D8 de cultivo não foram influenciadas pelas diferentes concentrações de melatonina, nem pelo choque térmico (0 M vs controle não-estresse) ou pelo DMSO ($P > 0,05$).

A equação ajustada que indica como se dá a alteração na proporção de embriões com oito ou mais células em D3, como função de diferentes concentrações de melatonina transformada, é apresentada na Figura 1. A proporção de embriões com oito ou

mais células aumentou diretamente com o aumento da concentração de melatonina, desde as menores doses, atingindo o máximo na concentração 10^{-3} M.

Tabela 1. Efeito da adição de melatonina e de DMSO ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sob choque térmico na produção de embriões e dados da produção *in vitro* convencional de embriões.

Parâmetro	Melatonina + Choque Térmico*					Controles *	
	0 M	10 ⁻¹² M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻³ M	DMSO + CT	Não - Estresse
	n ¹ = 354	n ¹ = 378	n ¹ = 340	n ¹ = 354	n ¹ = 361	n ¹ = 341	n ¹ = 328
Clivagem	67,1 ± 3,3	62,1 ± 3,4	67,0 ± 3,4	66,2 ± 3,4	67,1 ± 3,3	64,8 ± 3,5	72,0 ± 3,2
Embriões	n ² = 234	n ² = 232	n ² = 225	n ² = 232	n ² = 240	n ² = 218	n ² = 232
D3 ≥ 8 céls	18,6 ± 5,4 ^{bc}	18,5 ± 5,4 ^{bc}	19,5 ± 5,6 ^{acf}	24,5 ± 6,5 ^{abd}	26,3 ± 6,7 ^{ade}	28,8 ± 7,1 ^{de}	26,4 ± 6,8 ^{adef}
D7 Total	27,4 ± 4,3	24,5 ± 4,0	28,0 ± 4,3	23,5 ± 4,0	31,3 ± 4,5	30,4 ± 4,5	27,2 ± 4,3
D8 Total	21,8 ± 4,2	19,4 ± 4,0	24,6 ± 4,6	21,4 ± 4,2	24,2 ± 4,5	29,9 ± 5,1	21,9 ± 4,3

¹ Número de oócitos maturados; ² Número de embriões clivados no D3; DMSO + CT– dimetilsulfóxido sob choque térmico; Não-estresse - maturação convencional
Avaliadas a taxa de clivagem em relação número de oócitos maturados, proporção de embriões com oito ou mais células no D3 em relação ao número de embriões clivados, proporção de blastocistos (Bi + BL + BX + BE) no dia 7 e proporção de blastocistos (BL + BX + BE) no dia 8 em relação ao número de embriões clivados no D3.

* Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey-Kramer (P <0,05)

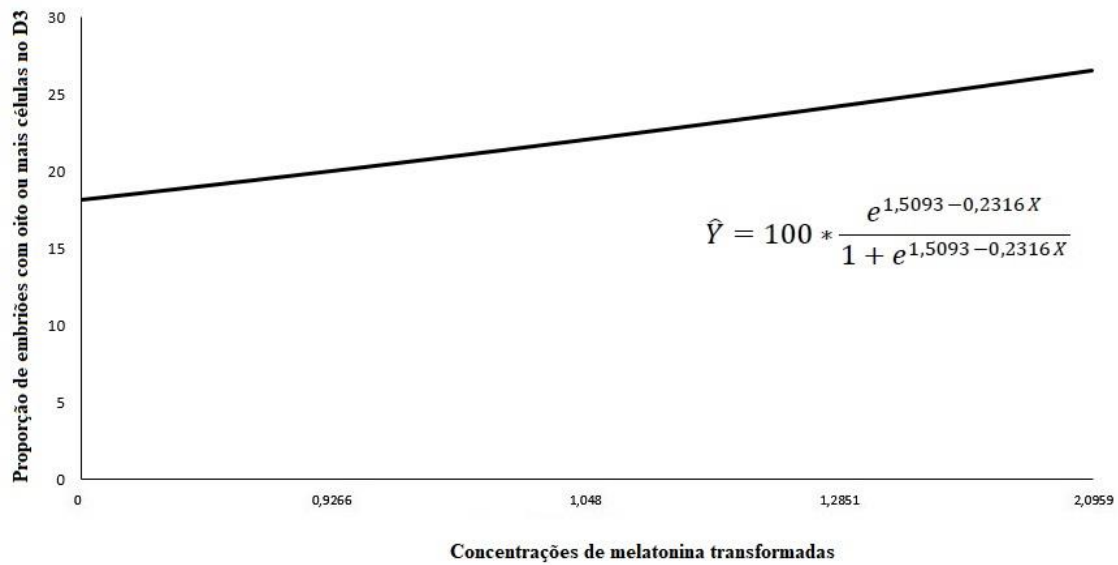


Figura 1. Proporção de embriões com oito ou mais células em relação ao número de clivados no dia 3 de cultivo (D3), como função das diferentes concentrações de melatonina adicionadas ao meio de MIV, considerando concentração de melatonina = $1/(\log_{10}(-\log_{10}(\text{concentração} + K)))$. Os valores 0; 0,9266; 1,0480; 1,2851 e 2,0959 correspondem às concentrações 0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M, respectivamente.

Os blastocistos foram avaliados pela contagem do total de células, pelas proporções de células apoptóticas em relação ao número total de células, células da MCI em relação ao número total de células e células apoptóticas em relação às células da MCI (Para imagens representativas vide Figura 3).

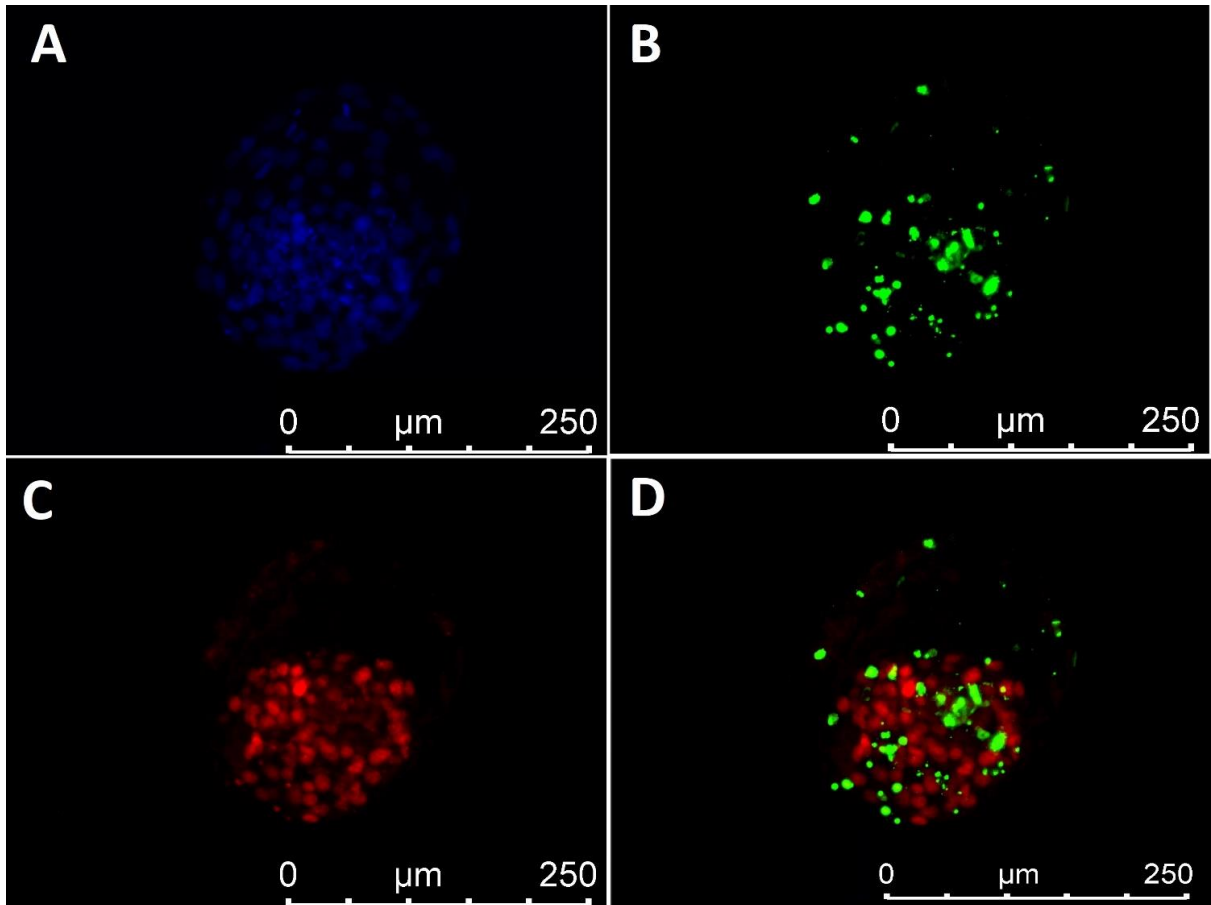


Figura 3. Imagens de um mesmo embrião, demonstrando (A) o total de células pela coloração *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), (B) as células apoptóticas pela técnica *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling* (TUNEL), (C) as células da massa celular interna (MCI) pela técnica de imunocitoquímica e (D) as células apoptóticas (TUNEL positivas) na MCI.

Não houve efeito ($P>0,05$) da adição da melatonina ao meio de MIV de oócitos sob choque térmico no número total de células, na proporção de células apoptóticas em relação ao total de células e na proporção de células apoptóticas na MCI (Tabela 2). No entanto, a proporção de células da MCI em relação ao número total de células foi maior no tratamento 10^{-6} M de melatonina quando comparado aos tratamentos 10^{-9} M, 10^{-12} M, 0 M e ao controle DMSO ($P<0,05$). A proporção de células na

MCI não diferiu entre os tratamentos 10^{-6} M, 10^{-3} M e o controle não-estresse ($P>0,05$). O choque térmico não influenciou a qualidade dos embriões, visto que não houve diferença entre os tratamentos 0 M e não-estresse em nenhuma das variáveis analisadas ($P>0,05$). Da mesma forma, a adição de 0,46% de DMSO ao meio MIV de oócitos sob choque térmico não influenciou a qualidade dos embriões, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos DMSO e 0 M de melatonina ($P>0,05$).

A equação ajustada que indica como se dá a alteração na proporção de células da MCI em relação ao número total de células nos blastocistos em D8, como função de diferentes concentrações de melatonina transformada, é apresentada na Figura 4. A proporção de células da MCI aumentou significativamente a partir da concentração 10^{-9} M, atingiu o máximo entre as concentrações 10^{-6} e 10^{-4} M, e em seguida diminuiu até atingir a concentração 10^{-3} M. Dessa forma, por meio da análise de regressão logística, é possível inferir que a concentração 10^{-4} M de melatonina resultou em maior proporção de células da MCI.

Tabela 2. Efeito da adição de melatonina e de DMSO ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sob choque térmico e da produção *in vitro* convencional de embriões sobre o número total de células e as proporções de células apoptóticas, células da massa celular interna (MCI) e células apoptóticas na MCI

Variável	Melatonina + Choque Térmico					Controles *	
	0 M	10 ⁻¹² M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻³ M	DMSO +CT	Não-Estresse
	n= 21	n= 21	n= 19	n= 14	n= 14	n= 30	n=14
Contagem							
Nº total células	93 ± 9	88 ± 8	85 ± 8	94 ± 9	89 ± 8	97 ± 9	89 ± 9
(%)							
Céls. apoptóticas¹	18,3 ± 4,5	11,6 ± 3,1	11,5 ± 3,1	19,6 ± 4,7	14,2 ± 3,7	13,6 ± 3,5	11,9 ± 3,2
Céls. MCI¹	26,3 ± 6,4 ^a	25,7 ± 6,3 ^a	21,9 ± 5,7 ^a	42,7 ± 8,1 ^b	33,1 ± 7,4 ^{ab}	25,5 ± 6,3 ^a	31,8 ± 7,2 ^{ab}
Céls. apoptóticas MCI²	42,3 ± 7,0	28,0 ± 5,8	36,5 ± 6,7	35,9 ± 6,3	40,2 ± 6,9	31,2 ± 6,0	28,9 ± 6,1

¹ Proporção em relação ao número total de células

² Proporção em relação ao número de células na MCI

DMSO + CT – dimetilsulfóxido sob choque térmico; Não-estresse - maturação convencional

n= número de embriões avaliados em cada tratamento.

* Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer (P<0,05).

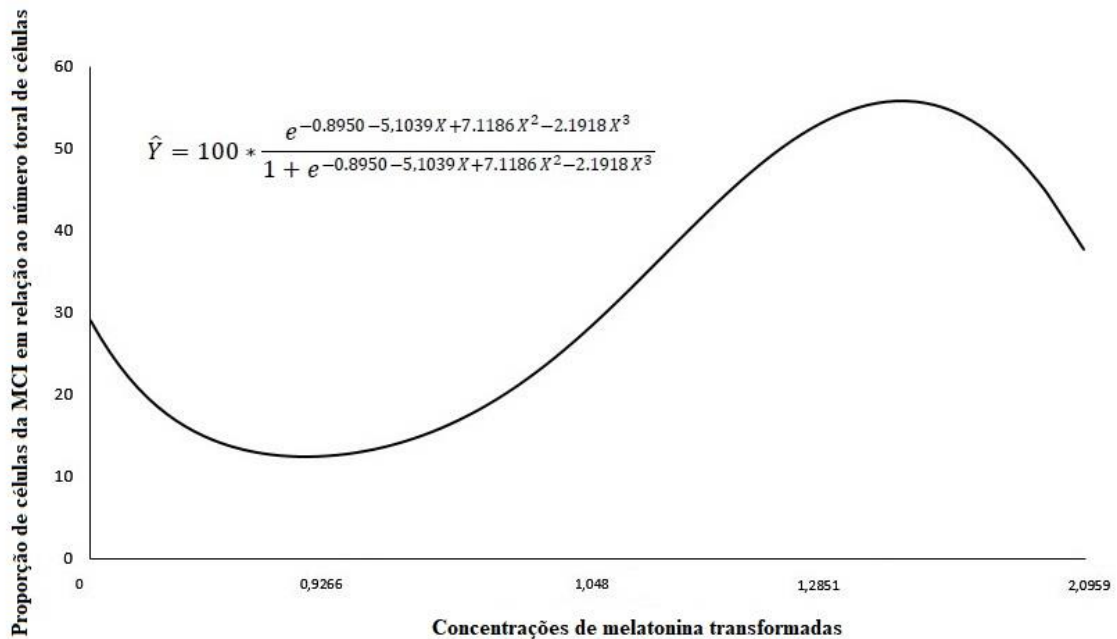


Figura 4. Proporção estimada de células da massa celular interna em relação ao número total de células nos blastocistos no dia 8 de cultivo, como função das diferentes concentrações de melatonina, considerando concentração de melatonina = $1/(\log_{10}(-\log_{10}(\text{concentração} + K)))$. Os valores 0; 0,9266; 1,0480; 1,2851 e 2,0959 correspondem às concentrações 0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o choque térmico em oócitos bovinos, durante o período de MIV, foi capaz de reduzir o desenvolvimento embrionário até o estágio de 16 células, como demonstrado pela maior proporção de embriões com oito ou mais células provenientes de oócitos maturados sob condição convencional (0 M melatonina vs não-estresse). Esse resultado corrobora estudo anterior, em que a maturação oocitária *in vitro* sob choque térmico resultou em menor proporção de embriões com oito ou mais células (Payton *et al.* 2004). O menor desenvolvimento de embriões produzidos à partir de oócitos submetidos ao choque térmico pode estar relacionado à reduzida

quantidade de mRNA materno e, portanto, à menor possibilidade de ativação do genoma no período denominado transição materno-zigótica (TMZ), que se inicia na fertilização e continua durante o desenvolvimento inicial do embrião (Tripurani *et al.* 2011). A ativação genômica ocorre justamente no estágio de oito células e é necessária para que o embrião seja capaz de sintetizar suas próprias proteínas e se desenvolver (Payton *et al.* 2004; Ferreira *et al.* 2009). Dentre as proteínas transcritas pelo embrião, as proteínas do choque térmico (HSPs) são essenciais para que a função celular de proteção contra o choque térmico seja realizada. Dessa forma, a maior ou menor expressão dos genes responsáveis pela transcrição das HSPs irá influenciar no desenvolvimento embrionário inicial (Zhang *et al.* 2011).

Os resultados sugerem que a melatonina na concentração 10^{-3} M na MIV foi eficiente em mitigar os prejuízos causados pelo choque térmico nas primeiras clivagens do embrião, como observado pela maior proporção de embriões com, no mínimo oito células, quando comparado ao tratamento com a mais baixa concentração de melatonina (10^{-12} M) e o tratamento sem melatonina (0 M); e como observado pelo aumento na proporção de embriões com oito ou mais células em função do aumento da concentração de melatonina na MIV. É interessante notar ainda que a proporção de embriões com no mínimo oito células nos tratamentos com adição de melatonina em concentração igual ou superior a 10^{-9} M não diferiu da observada no tratamento controle não-estresse, demonstrando assim a capacidade citoprotetora da melatonina. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de a melatonina estimular a atividade de enzimas antioxidantes (Tamura *et al.* 2009), além de atuar como antioxidante, reduzindo as EROS e as ERNS (Loren *et al.* 2017), que em altas concentrações resultam em danos celulares estruturais e funcionais (Combelles *et al.* 2009), como a peroxidação lipídica, oxidação protéica e danos ao DNA

(Tamura *et al.* 2014). Em adição, os metabólitos da melatonina, formados após sua reação com a molécula oxidante, também têm eficiência na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Galano *et al.* 2013). Assim, a melatonina contribui para a homeostase celular (Jou *et al.* 2007), além de reduzir a apoptose (Marques *et al.* 2018), efeitos que somados resultam em melhor desenvolvimento embrionário.

A maturação oocitária sob choque térmico com adição de 0,46% DMSO ao meio resultou em maior proporção de embriões com oito ou mais células, quando comparada com a maturação sob choque térmico sem melatonina ou com adição de 10^{-12} M e 10^{-9} M de melatonina. Efeito positivo da adição de DMSO em baixa concentração (50 μ M) na maturação de oócitos bovinos sobre desenvolvimento embrionário inicial foi também observado por (Tsuzuki *et al.* 1998). Esses resultados podem estar relacionados às funções biológicas citoprotetoras do DMSO. O DMSO é uma molécula anfipática comumente utilizada como solvente de diversas substâncias, além de ser um crioprotetor adicionado nos processos de vitrificação celular, tecidual e oocitária (Li, Wang, Song *et al.* 2016). O DMSO atua influenciando a diferenciação celular, apoptose, expressão de canais iônicos e metabolismo lipídico (Santos *et al.* 2003). Em adição, apresenta a capacidade de detoxicar radicais hidroxil (Yu and Quinn 1994), que se formam durante a respiração celular e causam danos ao DNA, favorecendo assim a maturação e o desenvolvimento de oócitos (Tsuzuki *et al.* 1998).

A taxa de produção de blastocistos é um parâmetro utilizado na avaliação das condições de cultivo *in vitro*, assim como de possíveis efeitos de reagentes adicionados aos meios. Os resultados do presente trabalho corroboram os obtidos por Ascari (2016), que adicionaram a melatonina durante a MIV de oócitos de vacas mestiças predominantemente *Bos taurus indicus*, sob choque térmico, e não observaram diferenças na taxa de produção de blastocistos. Assim, a ausência de efeitos da

melatonina na produção de blastocistos no D7 e D8 pode estar relacionada ao fato de terem sido utilizados os oócitos provenientes de ovários de vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), que são menos susceptíveis ao estresse térmico do que raças europeias (Eberhardt *et al.* 2009). Corroborando essas observações, Silva *et al.* (2013) relataram que os efeitos do estresse térmico são mais evidentes em oócitos e embriões de vacas *Bos taurus taurus*, em comparação aos de vacas *Bos taurus indicus*.

A PIVE tem a qualidade dos oócitos e dos embriões como ponto crítico, sendo que o número médio de células nos blastocistos representa o sucesso ou fracasso nos processos mitóticos, influenciando diretamente a implantação embrionária (Tian *et al.* 2014). A qualidade embrionária pode ser avaliada, dentre outros parâmetros, pelo número total de células (Lonergan *et al.* 2006), proporção de células apoptóticas (Yuan *et al.* 2003), proporção de células da MCI em relação ao número total de células (Asaf *et al.* 2003) e proporção de células apoptóticas da MCI (Ascari 2016). No presente trabalho, a condição de choque térmico não alterou os parâmetros de qualidade avaliados. Estes resultados são corroborados por alguns autores (Lawrence *et al.* 2004; Roth and Hansen 2004; Soto and Smith 2009) que não observaram influência do choque térmico no número de células nos blastocistos. No entanto, (Ju *et al.* 2005) e (Zhandi *et al.* 2009) concluíram que a exposição de oócitos ao choque térmico reduziu o número total de células, mas não alterou a proporção de células da MCI em relação ao total de células.

No presente trabalho, os embriões provenientes de oócitos maturados em meio contendo 10^{-6} M de melatonina apresentaram maior proporção de células da MCI, quando comparados aos tratamentos com menores concentrações ou sem melatonina. Ainda, os resultados sugerem que a proporção de células da MCI atinge o máximo na concentração 10^{-4} M, com

subseqüente decréscimo até a concentração 10^{-3} M. A viabilidade embrionária tem sido relacionada com a proporção de células da MCI (Byrne *et al.* 1999). Em concordância com o presente trabalho, Su *et al.* (2015) concluíram que a adição de melatonina ao meio de cultivo *in vitro* de embriões resultou em embriões de melhor qualidade, uma vez que diminuiu as proporções de células apoptóticas e aumentou a proporção de células da MCI em relação ao número total de células. A proporção de células da MCI em relação ao número total de células, bem como a área ocupada pela MCI, são fatores de alta correlação com as taxas de implantação e manutenção da gestação (Ajduk and Zernicka-Goetz 2013). Em adição, Crosier *et al.* (2001) concluíram que embriões produzidos *in vitro* têm menor viabilidade quando comparado com embriões produzidos *in vivo*, porque apresentam menor proporção de células da MCI em relação ao total de células. As células da MCI são de extrema importância para a viabilidade embrionária e desenvolvimento pós-implantação, pelo fato de serem células pluripotentes e que darão origem ao embrião (Asaf *et al.* 2003).

Deve ser ressaltado que a concentração 10^{-4} M de melatonina, a qual de acordo com a análise da alteração na proporção de células da MCI em função das diferentes concentrações de melatonina, resultou em maior proporção de células na MCI, foi a mesma que em estudo anterior realizada por nossa equipe (Ascari 2016) reduziu apoptose na MCI. Tomados juntos, esses resultados sugerem que a melatonina na concentração de 10^{-4} M pode ser eficiente em reduzir os efeitos prejudiciais do choque térmico durante a MIV.

7. CONCLUSÃO

A adição de melatonina nas concentrações 10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-9} M ao meio de MIV de oócitos bovinos sob condições de choque térmico promoveu melhoria no desenvolvimento

embrionário no estágio de 8 a 16 células. A concentração 10^{-4} M parece ser a que tem potencial de proporcionar melhores resultados em termos de qualidade embrionária, quando adicionada ao meio de MIV de oócitos bovinos sob condições de choque térmico. Assim, a utilização da melatonina na PIVE é uma ferramenta que pode aumentar a viabilidade dos embriões produzidos. Essa estratégia tem um grande potencial para ser aproveitada, principalmente na MIV de oócitos provenientes de vacas de leite de raças especializadas, por serem animais com grande suscetibilidade ao estresse térmico.

8. DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse perceptíveis que prejudiquem a imparcialidade do trabalho apresentado.

9. FINANCIAMENTO

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo número nº427476/2016-0).

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriaens I., Jacquet P., Cortvrindt R., Janssen K., and Smitz J. (2006). Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* **228**, 333–343. doi:10.1016/j.tox.2006.09.018
- Ajduk A., and Zernicka-Goetz M. (2013). Quality control of embryo development. *Mol. Aspects Med.* **34**, 903–918. doi:10.1016/j.mam.2013.03.001
- Al-Katanani Y. M., Paula-Lopes F. F., and Hansen P. J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **85**, 390–396. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74086-1
- Asaf S., Leitner G., Furman O., Lavon Y., Kalo D., Wolfenson D., and Roth Z. (2003). Effects of Escherichia coli - and Staphylococcus aureus -induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. doi:10.1530/REP-13-0383
- Ascari I. J. (2016). Adição do fator de crescimento semelhante à insulina-i ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Universidade Federal de Lavras.
- Belhadj Slimen I., Najar T., Ghram A., and Abdrrabba M. (2016). Heat stress effects on livestock: Molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **100**, 401–412. doi:10.1111/jpn.12379

- Byrne A. T., Southgate J., Brison D. R., and Leese H. J. (1999). Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil.* **117**, 97–105. doi:10.1530/jrf.0.1170097
- Cebrian-Serrano A., Salvador I., Raga E., Dinnyes A., and Silvestre M. A. (2013). Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **48**, 738–746. doi:10.1111/rda.12154
- Combelles C. M. H., Gupta S., and Agarwal A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod. Biomed. Online* **18**, 864–880. doi:10.1016/S1472-6483(10)60038-7
- Crosier a E., Farin P. W., Dykstra M. J., Alexander J. E., and Farin C. E. (2001). Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biol. Reprod.* **64**, 1375–1385. doi:10.1095/biolreprod64.5.1375
- Eberhardt B. G., Satrapa R. A., Capinzaiki C. R. L., Trinca L. A., and Barros C. M. (2009). Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim. Reprod. Sci.* **114**, 54–61. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.008
- Ferreira E. M., Vireque A. A., Adona P. R., Meirelles F. V., Ferriani R. A., and Navarro P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**, 836–848. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.023
- Fu Y., He C. J., Ji P. Y., Zhuo Z. Y., Tian X. Z., Wang F., Tan D. X., and Liu G. S. (2014). Effects of melatonin on the proliferation and apoptosis of sheep granulosa cells under thermal stress. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 21090–21104. doi:10.3390/ijms151121090
- Galano A., Tan D. X., and Reiter R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* **54**, 245–257. doi:10.1111/jpi.12010
- Holm P., Booth P. J., Schmidt M. H., Greve T., and Callesen H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**, 683–700. doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4
- Jou M. J., Peng T. I., Yu P. Z., Jou S. Bin, Reiter R. J., Chen J. Y., Wu H. Y., Chen C. C., and Hsu L. F. (2007). Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J. Pineal Res.* **43**, 389–403. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00490.x
- Ju J. C., Jiang S., Tseng J. K., Parks J. E., and Yang X. (2005). Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* **64**, 1677–1689. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.03.025
- Lawrence J. L., Payton R. R., Godkin J. D., Saxton A. M., Schrick F. N., and Edwards J. L. (2004). Retinol Improves Development of Bovine Oocytes Compromised by Heat Stress During Maturation. *J. Dairy Sci.* **87**, 2449–2454. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73368-8
- Li X., Wang Y. K., Song Z. Q., Du Z. Q., and Yang C. X. (2016). Dimethyl sulfoxide perturbs cell cycle progression and spindle organization in porcine meiotic oocytes. *PLoS One* **11**, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0158074
- Li Y., Wang J., Zhang Z., Yi J., He C., Wang F., Tian X., Yang M., Song Y., He P., and Liu G. (2016). Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **7**, 1–10. doi:10.1186/s40104-016-0093-9
- Lonergan P., Fair T., Corcoran D., and Evans A. C. O. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos.

- Theriogenology* **65**, 137–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.028
- Loren P., Sánchez R., Arias M. E., Felmer R., Risopatrón J., and Cheuquemán C. (2017). Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: Impact on gamete handling and in vitro embryo production in humans and other mammals. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–17. doi:10.3390/ijms18061119
- Marques T., da Silva Santos E., Diesel T., Leme L., Martins C., Dode M., Alves B., Costa F., de Oliveira E., and Gambarini M. (2018). Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* **53**, 226–236. doi:10.1111/rda.13097
- Ortega M. S., Rocha-Frigoni N. A. S., Mingoti G. Z., Roth Z., and Hansen P. J. (2016). Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. *J. Dairy Sci.* 1–13. doi:10.3168/jds.2016-11501
- Paula-Lopes F. F., Lima R. S., Risolia P. H. B., and Ispada J. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes : functional and cellular aspects. *Anim Reprod* **9**, 395–403.
- Payton R. R., Romar R., Coy P., Saxton A. M., Lawrence J. L., and Edwards J. L. (2004). Susceptibility of Bovine Germinal Vesicle-Stage Oocytes from Antral Follicles to Direct Effects of Heat Stress In Vitro. *Biol. Reprod.* **71**, 1303–1308. doi:10.1095/biolreprod.104.029892
- De Rensis F., Lopez-Gatius F., García-Ispuerto I., Morini G., and Scaramuzzi R. J. (2017). Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology* **91**, 145–153. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.024
- Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolín I., Herrera F., Martín V., and Reiter R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **36**, 1–9. doi:10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x
- Roth Z. (2017). Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows — Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. 1–20. doi:10.1146/annurev-animal-022516-022849
- Roth Z., and Hansen P. J. (2004). Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation 1. *Biol. Reproduction* **71**, 1898–1906. doi:10.1095/biolreprod.104.031690
- Roth Z., and Wolfenson D. (2016). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Domest. Anim. Endocrinol.* **56**, S218–S227. doi:10.1016/j.domaniend.2016.02.013
- Santos N. C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., and Saldanha C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1035–1041. doi:10.1016/S0006-2952(03)00002-9
- Silva C. F., Sartorelli E. S., Castilho A. C. S., Satrapa R. A., Puelker R. Z., Razza E. M., Ticianelli J. S., Eduardo H. P., Loureiro B., and Barros C. M. (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* **79**, 351–357. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.10.003
- Soto P., and Smith L. C. (2009). BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 637–646. doi:10.1002/mrd.20986
- Stringfellow D. A., and Seidel S. M. (1999). ‘Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.’
- Su J., Wang Y., Xing X., Zhang L., Sun. H., and Zhang Y. (2015). Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Pineal Res.* 455–468. doi:10.1111/jpi.12275
- Takada L., Junior A. M., Mingoti G. Z., Balieiro J. C. C., Cipolla-Neto J., and Coelho L. A.

- (2012). Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res. Vet. Sci.* **92**, 124–127. doi:10.1016/j.rvsc.2010.11.004
- Tamura H., Nakamura Y., Korkmaz A., Manchester L. C., Tan D. X., Sugino N., and Reiter R. J. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil. Steril.* **92**, 328–343. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.016
- Tamura H., Takasaki A., Taketani T., Tanabe M., Lee L., Tamura I., Maekawa R., Aasada H., Yamagata Y., and Sugino N. (2014). Melatonin and female reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **40**, 1–11. doi:10.1111/jog.12177
- Tian X., Wang F., He C., Zhang L., Tan D., Reiter R. J., Xu J., Ji P., and Liu G. (2014). Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: A mechanistic approach. *J. Pineal Res.* **57**, 239–247. doi:10.1111/jpi.12163
- Tripurani S. K., Lee K. B., Wang L., Wee G., Smith G. W., Lee Y. S., Latham K. E., and Yao J. (2011). A novel functional role for the oocyte-specific transcription factor newborn ovary homeobox (NOBOX) during early embryonic development in cattle. *Endocrinology* **152**, 1013–1023. doi:10.1210/en.2010-1134
- Tsuzuki Y., Duran D. H., Kuroki Y., Uehara F., Ashizawa K., and Fujihara N. (1998). The Effects of Dimethyl-Sulfoxide on the in Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes and the subsequent development. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **11**, 307–310.
- Wang L., Zhang H., Wang Y., Wang F., Liu X., Wu Y., Hua S., Quan F., and Zhang Y. (2017). Theriogenology Peroxiredoxin 5 is essential for in vitro development of bovine SCNT embryos. *Theriogenology* **92**, 156–166. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.020
- Yu Z. W., and Quinn P. J. (1994). Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci. Rep.* **14**, 259–281. doi:10.1007/BF01199051
- Yuan Y. Q., Van Soom A., Coopman F. O. J., Mintiens K., Boerjan M. L., Van Zeveren A., De Kruif A., and Peelman L. J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* **59**, 1585–1596. doi:10.1016/S0093-691X(02)01204-9
- Zhandi M., Towhidi A., Nasr-Esfahani M. H., Eftekhari-Yazdi P., and Zare-Shahneh A. (2009). Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *J. Assist. Reprod. Genet.* **26**, 605–611. doi:10.1007/s10815-009-9364-0
- Zhang B., Peñagaricano F., Driver A., Chen H., and Khatib H. (2011). Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *J. Dairy Sci.* **94**, 4174–4182. doi:10.3168/jds.2010-4137
- Zhao, Hao H. S., Du W. H., Zhao S. J., Wang H. Y., Wang N., Wang D., Liu Y., Qin T., and Zhu H. Bin (2016). Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J. Pineal Res.* **60**, 132–141. doi:10.1111/jpi.12290