

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR O DESENVOLVIMENTO E
A CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

Autor: Thaisa Campos Marques
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini

GOIÂNIA
2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	THAISA CAMPOS MARQUES		
E-mail:	thaisacm@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor	ESTUDANTE		
Agência de fomento:	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	Sigla:	UFG
País:	BRASIL	UF:	GO CNPJ:
Título:	ALTERNATIVAS PARA MELHORAR O DESENVOLVIMENTO E A CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>		
Palavras-chave:	Melatonina; retirada do fluido da blastocle, vitrificação, apoptose celular, criotolerância de embriões bovinos.		
Título em outra língua:	ALTERNATIVES TO IMPROVE THE DEVELOPMENT AND THE CRIOTOLERANCE OF <i>IN VITRO</i> PRODUCED BOVINE EMBRYOS		
Palavras-chave em outra língua:	Melatonin, blastocoel collapse, vitrification, cell apoptosis, bovine embryo cryotolerance.		
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	23/02/2016		
Programa de Pós-Graduação:	PPGZ		
Orientador (a):	DRA. MARIA LUCIA GAMBARINI		
E-mail:	mlgambarini@hotmail.com		
Co-orientador (a):*	DR. BENEDITO DIAS DE OLIVEIRA FILHO DR. CARLOS FREDERICO MARTINS		
E-mail:	bdoliveirafilho@hotmail.com; carlos.martins@embrapa.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Thaísa Campos Marques
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 02/03/2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

THAISA CAMPOS MARQUES

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR O DESENVOLVIMENTO E
A CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

Tese apresentada para obtenção do título de
doutora em Zootecnia junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração

Produção Animal

Linha de Pesquisa

Interface entre desempenho produtivo,
reprodutivo, aspectos genéticos e
ambientais na produção animal

Orientadora

Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini

Comitê de Orientação

Benedito Dias de Oliveira Filho – UFG
Carlos Frederico Martins – Embrapa Cerrados/CTZL

GOIÂNIA

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Marques, Thaisa Campos

Alternativas para melhorar o desenvolvimento e a criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro [manuscrito] / Thaisa Campos

Marques. - 2016.

xxiii, 113 f.: il.

Orientador: Prof. Dra. Maria Lúcia Gambarini; co-orientador Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho; co-orientador Dr. Carlos Frederico Martins.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) , Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Melatonina. 2. Retirada do fluido da blastocela. 3. Vitrificação. 4. Apoptose celular. 5. Criotolerância de embriões bovinos. I. Gambarini, Dra. Maria Lúcia, orient. II. Oliveira Filho, Dr. Benedito Dias de , co orient. III. Título.

THAISA CAMPOS MARQUES

Tese defendida e aprovada em **23/02/2016** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Karen Martins Leão – IFGoiano/Rio Verde-GO



Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi – UNICAMP/SP



Dr. Marcos Fernando Oliveira e Costa – Embrapa Cerrados



Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto – EVZ/UFG

RESUMO

O tratamento com melatonina e a retirada do fluido da blastocela de blastocistos tem sido sugeridos como potentes opções para melhorar o desenvolvimento e a viabilidade embrionária após a criopreservação de embriões de bovinos. O presente estudo testou essas alternativas com o objetivo de melhorar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Em primeiro lugar, os efeitos da melatonina (MEL) foram avaliados em três concentrações no meio de maturação (MIV) e/ou meio de cultivo (CIV) (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). Os resultados mostraram que MEL 10^{-9} no MIV pode melhorar significativamente a taxa de clivagem. No entanto, quando aplicado durante o CIV, MEL 10^{-9} resultou em melhores taxas de blastocistos, reduzido número de células apoptóticas (NCA), maior expressão de genes antioxidantes sem alterar a expressão de genes anti-apoptóticos e relacionados ao metabolismo e placentação. Depois, o tratamento de MEL com melhor resultado no primeiro experimento (MEL 10^{-9} M no CIV) foi combinado com a retirada do fluido da blastocela (RFB) imediatamente antes da vitrificação. Foram investigadas a qualidade e sobrevivência de embriões. Este estudo confirmou que independente da RFB, a suplementação MEL no CIV melhorou a re-expansão e eclosão dos embriões vitrificados. No entanto, embriões cultivados sem MEL necessitou de maior período de recultivo para sua total re-expansão. Embriões produzidos com MEL tiveram similar NCA, independentemente da vitrificação e RFB. A RFB não afetou a qualidade do embrião em termos de expressão de genes envolvidos no metabolismo, estresse oxidativo, reparo celular, placentação e implantação. Portanto, esta investigação conclui que: (i) na concentração de 10^{-9} M, MEL utilizada no CIV melhorou a qualidade e desenvolvimento do embrião e, minimizou o estresse oxidativo e a apoptose celular; (ii) os embriões cultivados com MEL, vitrificados e re-cultivados podem ser transferidos em menor tempo; (iii) a RFB beneficiou a eclosão quando os embriões foram cultivados com MEL no CIV; (iv) embriões produzidos com MEL no CIV apresentaram melhor qualidade e viabilidade, independentemente da RFB. Esta informação tem um valor potencial para pesquisas sobre criotolerância embrionária.

Palavras-chave: Melatonina; retirada do fluido da blastocela; vitrificação; apoptose celular; criotolerância de embriões bovinos.

ABSTRACT

Melatonin treatment and blastocoel collapse had been suggested to be potent options to enhance embryo development and viability after cryopreservation of bovine embryos. The present study tested these alternatives with the aim to improve cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. First, the effects of melatonin (MEL) were evaluated at three concentrations in Maturation Media (IVM) and/or Culture Media (IVC) (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). The results showed that MEL 10^{-9} in IVM could improve slightly the cleavage rate. However, when applied during IVC, MEL 10^{-9} resulted in improved blastocysts rates and reduced numbers of apoptotic cells (NAC), a higher expression of antioxidative genes without changing the expression metabolism-related, placentation and anti-apoptotic genes. After, the MEL treatment giving the best result in first experiment (MEL 10^{-9} M in IVC) was combined with blastocoel collapse (BC) immediately before vitrification. The survival and embryo quality were investigated. This experiment confirmed that independent of BC, MEL supplementation in IVC enhanced re-expansion and hatching rates of vitrified embryos. However, embryos cultured without MEL required more time during re-culture for all expansion. Embryos produced with MEL had similar NAC irrespective of vitrification and BC. BC did not affect embryo quality, in terms of the expression of genes involved in metabolism, oxidative stress, cell repair, placentation and implantation. Therefore, this research concluded that: (i) at 10^{-9} M concentration, MEL used during IVC improved embryo quality and development, and it minimized the oxidative stress and apoptosis in cells; (ii) embryos cultured with melatonin, vitrified and re-cultured can be transferred in less time; (iii) the blastocoel collapse benefited hatching when embryos were cultured with MEL in IVC; (iv) embryos cultured in IVC with MEL showed better quality and viability, and independently of BC. This information has a potential value for researchs on embryo cryotolerance.

Keywords: Melatonin; blastocoel collapse; vitrification; cell apoptosis; bovine embryo cryotolerance.

Ao meu esposo Marcus Vinícius, pelo amor e apoio.

Aos meus pais, pelo incentivo e amor incondicional.

À minha irmã Cristhiane, pelo exemplo de dedicação.

Aos meus sobrinhos-afilhados Felipe e Lucas, pela alegria.

Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos guias espirituais pela oportunidade de evoluir, pela concessão de paciência e sabedoria, não apenas neste período, mas em todos os momentos da minha trajetória nesta encarnação.

Aos meus pais pela vida, amor e apoio incondicionais. Pela luta em nos fornecer a melhor educação, privando-os de seus próprios sonhos. Pelo incentivo de seguir outros caminhos, seja na carreira acadêmica, na pesquisa, na produção rural ou como veterinária autônoma.

Ao meu esposo Marcus Vinícius pelo amor, companheirismo, carinho, incentivo e respeito. Agradeço imensamente tudo o que dividimos juntos até hoje. Nossa união se mostrou mais forte neste período tão difícil, pois sei que viveu intensamente meu Doutorado, abdicando da sua própria vida para estar junto de mim. Te amo!

À minha irmã Cristhiane pela amizade, pelo exemplo de dedicação na carreira acadêmica e como mãe dos meus amados sobrinhos-afilhados Felipe e Lucas que me trouxeram tantas alegrias neste período de aprimoramento profissional.

À tia Idelma pela amizade e pelos conselhos de incentivo e esperança de um mundo melhor.

Aos familiares e amigos que me apoiaram e entenderam a minha ausência.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PGZ) pela oportunidade da realização do Doutorado.

À minha orientadora Maria Lúcia Gambarini pelo acolhimento, orientação, ensinamentos e amizade dedicados.

Ao meu co-orientador professor Benedito Dias de Oliveira Dias pelos conselhos e dicas quanto ao profissionalismo.

Ao meu co-orientador Carlos Frederico Martins por abrir meus horizontes, pelas oportunidades de conhecer novas técnicas e pesquisadores da área. Pela sua calma e otimismo de que “Tudo no final dá certo”.

Aos amigos e funcionários do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL), em especial à Carol pela colaboração e amizade nos momentos que precisei.

À Dra. Margot Dode pela abertura de portas ao Cenargen e discussão do meu projeto. À Ana Luisa pela amizade e troca de experiências pessoais e profissionais. À Ligiane pela colaboração e profissionalismo.

À Embrapa Arroz e Feijão, em especial ao pesquisador Marcos Fernando, por ter cedido o laboratório de reprodução para a realização de parte dos meus experimentos. Pelo interesse nos resultados e dicas quanto ao meu projeto.

Aos frigoríficos JBS de Goiânia, JBS de Senador Canedo, Frigonorte e União Alimentos por autorizarem a coleta de ovários para a realização deste projeto.

À Raquel Puelker, da empresa Progest, pela parceria e carinho com meu projeto.

À Elisa Caroline pela amizade e dedicação à profissão. Diuturnamente dividimos muito mais que resultados, mas a nossa vida. Obrigada pelo apoio de sempre!

Aos alunos de pós-graduação, em especial ao Tiago Diesel, pela amizade construída, pela colaboração, ensinamentos e troca de experiências.

Aos alunos de graduação e estagiários do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da UFG, em especial ao Eduardo, Francine, Rodrigo e Rafael, que me acompanharam desde o início do projeto e se dedicaram integralmente à minha causa.

Aos professores Manoel Biancardi e Fernanda Alcântara, por permitirem que fizéssemos nossas análises de fluorescência no Laboratório de Histofisiologia do Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB3) da UFG.

À professora Karen Leão pela amizade, companheirismo, profissionalismo e conselhos.

À amiga Patricia Antonio pela amizade construída, pela divisão de problemas, pelas risadas e choros, pela ajuda e pelos momentos bons que passamos juntas.

À amiga de longa data Jamile, atual professora da Universidade Federal de Sergipe, que tanto me aconselhou e me ajudou no período de doutoramento.

Aos meus clientes de assessoria veterinária, pela compreensão e estímulo.

Enfim, a todos que presenciaram meus estudos, agradeço de coração pelo apoio e peço desculpas pelas minhas falhas e ausência nesta fase tão importante da minha vida.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Características da produção <i>in vitro</i> de embriões.....	2
2.2 Criopreservação de embriões.....	3
2.2.1 Vitrificação de embriões.....	4
2.3 Estresse oxidativo.....	5
2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS).....	5
2.3.2 Controle antioxidante da produção de EROS.....	6
2.3.2.1 Sistema glutathione redutase/peroxidase.....	7
2.3.3 Uso de antioxidantes na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	8
2.4 Melatonina.....	8
2.4.1 Melatonina como antioxidante.....	9
2.4.2 Melatonina na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	11
2.4.2.1 Adição de melatonina ao meio de maturação.....	11
2.4.2.2 Adição de melatonina ao meio de cultivo de embriões.....	13
2.4.2.3 Adição de melatonina ao meio de recultivo após aquecimento embrionário.....	14
2.5 Retirada do fluido da blastocle.....	15
2.6 Técnicas de avaliação da qualidade ovocitária e embrionária.....	16
2.6.1 Espécies reativas de oxigênio e glutathione.....	16
2.6.2 Potencial da membrana mitocondrial (PMM).....	17
2.6.3 Análise TUNEL.....	17
2.6.4 Expressão de genes.....	18
2.6.4.1 Metabolismo celular.....	19
2.6.4.2 Estresse oxidativo.....	20
2.6.4.2.1 Proteção enzimática celular.....	20
2.6.4.2.2 Proteínas de choque térmico.....	20

2.6.4.2.3 Reparo celular.....	21
2.6.4.2.4 Implantação.....	22
2.6.4.2.5 Placentação.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Gerais.....	24
3.2 Específicos.....	24
4. REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA MELATONINA NA REDUÇÃO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	46
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	48
Composição dos meios.....	48
Preparação da solução estoque de Melatonina.....	48
Seleção de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	49
Fecundação <i>in vitro</i>	49
Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	50
Mensuração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) e glutathione (GSH)....	50
Mensuração do potencial da membrana mitocondrial (PMM).....	51
Análise de células apoptóticas.....	51
Preparo de amostras, extração de RNA e produção do cDNA.....	52
Delineamento experimental.....	54
Análises estatísticas.....	55
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 3 - RETIRADA DO FLUIDO DA BLASTOCELE ASSOCIADA À MELATONINA NO MEIO DE CULTIVO MELHORA A VIABILIDADE DE	

EMBRIÕES BOVINOS VITRIFICADOS.....	72
RESUMO.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Soluções e composição de meios.....	74
Seleção de ovócitos, maturação, fecundação e cultivo in vitro de embriões.....	76
Retirada do fluido da blastocele.....	77
Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões.....	77
Detecção de células apoptóticas.....	78
Preparo de amostras, extração de RNA e produção do cDNA.....	79
Delineamento experimental.....	80
Análises estatísticas.....	81
RESULTADOS.....	82
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	89
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	96
ANEXO B – CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS OVÓCITOS.....	98
ANEXO C – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i> DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO.....	99
ANEXO D – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN</i> <i>VIVO</i> DE ACORDO COM A QUALIDADE MORFOLÓGICA.....	100
ANEXO E – PREPARO DA MELATONINA.....	101
ANEXO F – PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E GLUTATIONA EM OVÓCITOS E EMBRIÕES.....	103
ANEXO G – PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL EM OVÓCITOS.....	105
ANEXO H – PROTOCOLO TUNEL PARA EMBRIÕES.....	107

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - Reações químicas da ação protetora da glutathiona via dismutação do peróxido de hidrogênio..... 7
- FIGURA 2 - Estrutura química da melatonina..... 10
- FIGURA 3 - Transformação da melatonina pela atividade antioxidante. EROS=espécies reativas de oxigênio; CYP450=citocromo P450; AMK=N-acetil-5-metoxikinuramina; AFMK=N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina; AMMC=3-acetamidometil-6-metoxicinnolinona; AMNK=N¹-acetil-5-metoxi-3-nitrokinuramina..... 10

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Concentrações de glutathiona (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROS) em ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas sem melatonina (Controle) e suplementados com melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). O experimento foi replicado três vezes (n = 152). $P < 0,001$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00..... 57
- FIGURA 2 - Potencial da membrana mitocondrial (PMM) em ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas sem melatonina (Controle) e suplementados com melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). As análises foram realizadas em triplicata (n = 140). $P < 0,001$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00..... 57
- FIGURA 3 - Concentrações de glutathiona (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROS) em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* com melatonina a 10^{-9} M. O experimento foi realizado em duplicata (n = 60). $P < 0,05$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00..... 59
- FIGURA 4 - Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) dos genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), estresse oxidativo (SOD2, HSPB1) e placentação (KRT8) em blastocistos em D7 (3 pools com 15 Bl cada um) cultivados sem melatonina (Controle) e

com melatonina a 10^{-9} M na maturação (MIV+M10 ⁻⁹), no cultivo (CIV+M10 ⁻⁹) ou em ambos (MIV/CIV+M10 ⁻⁹). ^{a, b} $P < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).....	60
---	----

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Procedimento da retirada do fluido da blastocele: (A) O embrião é posicionado e mantido na pipeta Holding, (B) a micropipeta com bisel é inserida na região do trofoectoderma para não lesionar a massa celular interna e (C) o fluido da cavidade da blastocele é aspirado.....	77
FIGURA 2 - Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) dos genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 <i>pools</i> com 15 Be cada um) de embriões produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10 ⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M10 ⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).....	84
FIGURA 3 - Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) dos genes relacionados ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 <i>pools</i> com 15 Be cada um) de embriões produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10 ⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M10 ⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).....	85
FIGURA 4 - Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) do gene relacionado ao reparo celular (MSH6), implantação (FOSL1) e placentação (KRT8) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 <i>pools</i> com 15 Be cada um) de embriões produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10 ⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M10 ⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).....	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Informação para primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise PCR quantitativo em tempo real.....	53
TABELA 2 - Desenvolvimento embrionário bovino <i>in vitro</i> sob efeito da melatonina suplementada ao meio de maturação em diferentes concentrações (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M)	56
TABELA 3 - Desenvolvimento embrionário bovino <i>in vitro</i> sob efeito da melatonina suplementada ao meio de cultivo em diferentes concentrações (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M)	58
TABELA 4 - Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA) de embriões produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de diferentes concentrações de melatonina no meio de cultivo (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M) detectados pela técnica TUNEL	58
TABELA 5 - Efeito da melatonina a 10^{-9} M ao meio de maturação e/ou cultivo no desenvolvimento embrionário bovino <i>in vitro</i>	59
TABELA 6 - Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA) de embriões produzidos <i>in vitro</i> com suplementação de melatonina a 10^{-9} M detectados pela técnica TUNEL.....	60

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Informação para primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise PCR quantitativo em tempo real.....	80
TABELA 2 - Taxa de re-expansão de blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i> sem melatonina (Controle), suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M 10^{-9} RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas.....	82
TABELA 3 - Taxa de eclosão de blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i> sem melatonina (Controle), suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo com a retirada do fluido da blastocele	

(CIV+M10 ⁻⁹ RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24, 48 e 72 horas.....	83
TABELA 4 - Média do número total de células (NCT) e número de células apoptóticas (NCA) de blastocistos expandidos (frescos e vitrificados) produzidos <i>in vitro</i> na ausência (Controle) e presença de melatonina a 10 ⁻⁹ M no meio de cultivo (CIV+M10 ⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocèle (CIV+M10 ⁻⁹ RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACTB	β-Actin
APEX1	Apurinic/aprimidinic exonuclease 1
AQP3	Aquaporin 3
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Ataxia-telangiectasia and Rad3
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-XL	BCL2-like 1
Be	Blastocistos eclodidos
BSA	Albumina sérica bovina
CCO	Complexo cumulus-ovócito
CDH1	E-Cadherin Type 1
cDNA	DNA complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CIV+M10 ⁻⁷	Meio de cultivo <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻⁷ M
CIV+M10 ⁻⁹	Meio de cultivo <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻⁹ M
CIV+M10 ⁻¹¹	Meio de cultivo <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻¹¹ M
CO ₂	Dióxido de carbono
CTZL	Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira
D0	Dia zero

D3	Dia três
D7	Dia sete
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DNMT1a	DNA Methyl-Transferase 1
DNMT3A	DNA Methyl-transferase 3a
EEF1A2	Eukaryotic translation elongation fator 1 alpha 2
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
FOSL1	FOS-like antigen 1
FOSL2	FOS-like antigen 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDF9	Growth differentiation factor-9
GPx	Glutathione peroxidase
GPx4	Glutathione peroxidase 4
GSH	Glutathione na forma reduzida
GSSG	Glutathione na forma oxidada
H2DCFDA	Diacetato de 6-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS1/2	Hyaluronan synthase 1/2
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HSP1A1	Heat shock 70kDa protein 1A
HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1
ICB3	Instituto de Ciências Biológicas 3

IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IIK7	N-butanoyl2-(2-methoxy-6H-isoindolo[2,l-a]indol-11-yl)ethanamine
KRT8	Keratin 8
KTR18	Keratin 18
LH	Hormônio luteinizante
LRA	Laboratório de Reprodução Animal
M	Molar
MARF1	Meiosis arrest female 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]
mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MIV/CIV+M10 ⁻⁹	Meio de maturação <i>in vitro</i> e meio de cultivo <i>in vitro</i> suplementados com melatonina a 10 ⁻⁹ M
MIV+M10 ⁻⁷	Meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻⁷ M
MIV+M10 ⁻⁹	Meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻⁹ M
MIV+M10 ⁻¹¹	Meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com melatonina a 10 ⁻¹¹ M
mL	Mililitro
MLH1	MutL homolog 1
mM	Milimolar
MMR	Sistema de reparo de erros do DNA
MRE11A	Meiotic recombination 11 homolog A
MSH2	Bos taurus mutS homolog 2
MSH6	Bos taurus mutS homolog 6
MT1	Receptor para melatonina 1
MT2	Receptor para melatonina 2
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NCA	Número de células apoptóticas
ng	Nanograma

nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NTC	Número total de células
OCC	Occludin
OH	Hidroxila
p53	Tumor protein p53
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-PVA	0,1% de álcool polivinílico em tampão fosfato-salino
PBS-PVP	0,1% de polivinilpirrolidona em tampão fosfato-salino
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
pM	Picomolar
PMM	Potencial da membrana mitocondrial
PMS2	Mismatch repair endonuclease
PPGZ	Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
PTX3	Pentraxin
RFB	Retirada do fluido da blastocle
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT-Qpcr	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
SDHA	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
SLC2A1	Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
SLC2A3	Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
SOD	Superóxido dismutase

SOD1	Superoxide Dismutase 1
SOD2	Superoxide Dismutase 2
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
U	Unidade
UFG	Universidade Federal de Goiás
v/v	Volume por volume

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de técnicas de produção, incluindo as biotecnologias ligadas à reprodução animal, contribuiu para o Brasil se destacar como um dos principais produtores e exportadores de carne bovina, incrementar a produção leiteira ^{1,2} e tornar-se líder na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) ³.

A PIVE permite a formação de um novo indivíduo por meio da interação do espermatozoide com o ovócito fora do trato reprodutivo feminino ⁴. Esta biotecnologia tem sido empregada comercialmente na bovinocultura no intuito de acelerar a produção de fêmeas leiteiras, obter animais com bom rendimento de carcaça para produção de carne de qualidade e acelerar o ganho genético em rebanhos de elite. Dentre as vantagens da PIVE estão: o aumento do número de embriões produzidos em menor período de tempo, a utilização de fêmeas pré-púberes, gestantes e não cíclicas e o melhor aproveitamento do sêmen sexado ⁵. Já as principais limitações incluem o baixo desenvolvimento dos embriões até blastocisto, a menor resistência dos embriões à criopreservação, as perdas embrionárias e fetais após a transferência, os problemas no período periparto (distocias, mortalidade natal e pós-natal) e a ocorrência de alterações congênitas ⁶.

Apesar dos recentes avanços biotecnológicos, pesquisas têm sido direcionadas para melhorar a eficiência da PIVE em relação à maturação, fecundação, desenvolvimento embrionário e criopreservação ⁷⁻¹⁴.

Um dos principais obstáculos para a comercialização de embriões produzidos *in vitro* é a baixa eficiência da criopreservação devido à menor criotolerância desses embriões quando comparada com embriões produzidos *in vivo* ^{15,16}. Dessa forma, inovações na tecnologia de criopreservação de embriões criam incipientes perspectivas para um novo ciclo de expansão da PIVE no Brasil, assim como a abertura de mercados externos ¹⁷.

Deste modo, a baixa criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* é uma consequência do sistema de produção. A exposição a altas concentrações de oxigênio ambiente e consequentemente à ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) ^{18,19}, promove lesões nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso ²⁰ e altera a expressão de alguns genes ²¹. Além disso, o processo de criopreservação aumenta a atividade das

EROS que, associada à presença de água na cavidade blastocel, pode prejudicar a qualidade dos blastocistos durante a criopreservação devido à formação de cristais de gelo ²². Em decorrência disso, a média de gestação e nascimentos de embriões criopreservados é menor do que aqueles não criopreservados devido à morte embrionária precoce ²³.

Neste contexto, estudos têm relatado que a adição de antioxidantes tais como vitamina C ⁷, mio-inositol ⁸, resveratrol ^{9,10} e melatonina ²⁴ ao meio de maturação e/ou cultivo melhora a eficiência do desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*. Pesquisas recentes demonstraram que o uso da melatonina em algumas etapas do sistema de produção *in vitro* ¹² e a retirada do fluido da blastocel melhoram a criotolerância e a sobrevivência embrionária após o aquecimento ¹³.

Embora seja conhecida a ação benéfica da melatonina e da retirada do fluido da blastocel no processo de criotolerância embrionária, a associação entre estas duas estratégias ainda não foi testada. Levando em conta estes aspectos, nossa hipótese é que a associação da suplementação da melatonina e a retirada do fluido da blastocel melhora a criopreservação e, conseqüentemente a sobrevivência de embriões bovinos vitrificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da produção *in vitro* de embriões

Para a formação de um novo indivíduo no processo de PIVE são necessárias etapas de colheita e maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias fora do útero animal, ao contrário da clássica transferência de embriões ²⁵.

Embriões produzidos *in vitro* geralmente possuem menor número de células ²⁶ e ultraestrutura diferente dos produzidos *in vivo*, pois apresentam mais lipídeos, menos microvilosidades e mais debris celulares ^{27,28}. Estudos de quantificação de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) mostraram redução na taxa de expressão de diversos genes de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, sugerindo que falhas nos processos de transcrição e tradução reflitam em qualidade inferior desses embriões em relação aos embriões produzidos *in vivo* ²⁹.

Assim, essas diferenças acarretam em menor taxa de prenhez após a transferência a fresco ⁵ e menor criotolerância do embrião produzido *in vitro* devido ao sistema de cultivo, estágio de desenvolvimento, qualidade do embrião e método de criopreservação ³⁰⁻³².

Além disso, a criopreservação no sistema PIVE é fundamental, visto que a produção de ovócitos por doadora pode variar consideravelmente ³³, o que dificulta a estimativa de produção de embriões e o número de receptoras necessárias. Atualmente, mesmo utilizando os protocolos de transferência de embriões em tempo fixo, as receptoras devem ser sincronizadas antes da aspiração folicular ³⁴. O uso do número ótimo de receptoras por doadora determina a produção de prenhez com menor custo ³⁵.

2.2 Criopreservação de embriões

Os métodos de criopreservação podem ser por congelamento lento ou vitrificação e resultam em prole saudável, apesar dos embriões sofrerem consideráveis danos morfológicos e funcionais ³⁶. Ambos são baseados em dois fatores principais: crioprotetores (etilenoglicol, dimetilsulfóxido, glicerol e outros) e velocidades de congelação-descongelação.

A criopreservação de blastocistos é um desafio em virtude das suas características inerentes, tais como: 1) permeabilização lenta do crioprotetor no blastocisto, em grande parte devido à forma multicelular; 2) zona pelúcida que atua como uma barreira fisiológica para a penetração dos crioprotetores e 3) presença da blastocle que pode ser inadequadamente desidratada durante a criopreservação. Por conseguinte, existe maior probabilidade de danos pela formação de cristais de gelo resultante do processo de criopreservação inadequado ³⁷.

A movimentação da água e dos crioprotetores ocorre através da membrana celular dos embriões por difusão simples ou facilitada. A difusão facilitada depende de canais de membrana constituídos por proteínas como a aquaporina e sua expressão ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário. Logo, embriões mais desenvolvidos como blastocistos expandidos apresentam proporcionalmente mais canais e maior permeabilidade aos crioprotetores do que ovócitos e embriões menos desenvolvidos como mórulas e blastocistos iniciais ³⁸.

Outro fator associado à baixa criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* seria a maior quantidade de lipídio citoplasmático destes embriões ³⁹⁻⁴². Apesar de não estar claro por que e como ocorre esse acúmulo de lipídios, há evidências de que pode ser influência da adição de soro fetal bovino ao meio de cultura ou pelo resultado de anormalidades no metabolismo de energia do embrião, o que também afeta as propriedades de estabilidade da membrana celular ^{32,43}. Embora o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos possa prejudicar a criotolerância, também apresentam um papel fisiológico importante, uma vez que são potenciais reservatórios de energia para o desenvolvimento pré-implantação inicial, antes da ativação do genoma embrionário ⁴⁴.

O processo de criopreservação também reduz o número total de células embrionárias viáveis, sendo que o método de vitrificação promove danos específicos na massa celular interna, mas não altera o número de células do trofoectoderma após o aquecimento ⁴⁵. Contudo, a utilização de soro no meio de cultivo como fonte proteica aumenta o número de células do trofoectoderma e reduz a criotolerância embrionária ^{40,46}.

A extensão da injúria da criopreservação depende de fatores como tamanho e tipo celular, permeabilidade de membranas, qualidade e sensibilidade dos blastômeros ⁴⁷.

Assim, no intuito de melhorar a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* que são mais sensíveis à criotolerância que os produzidos *in vivo* ¹⁶ e buscar alternativas ao congelamento lento que é um processo demorado e necessita de uma máquina de congelação ⁴⁸, a vitrificação tornou-se o método mais eficiente para congelá-los, uma vez que expõe os embriões por um curto período de tempo a altas concentrações de crioprotetores ⁴⁹.

2.2.1 Vitrificação de embriões

A vitrificação é o método de criopreservação que proporciona rápida saída da maior parte da água presente dentro das células embrionárias, deixando-as suficientemente desidratadas e permeáveis aos crioprotetores. Durante o resfriamento, os crioprotetores formam uma solução viscosa que faz com que a água se solidifique em estado vítreo, sem a ocorrência de cristais de gelo ³⁶. Estudos recentes demonstraram que embriões vitrificados em estágio de desenvolvimento mais avançado apresentaram maiores taxas de sobrevivência ³⁰.

Dentre os vários dispositivos criados para reduzir o volume do crioprotetor tóxico e o contato rápido com o nitrogênio líquido, o mais usado atualmente para a vitrificação de embriões bovinos é o Cryotop⁵⁰. Este método utiliza uma haste de polipropileno para a deposição dos embriões e mostrou melhores taxas de eclosão 48 horas após o descongelamento, tanto em embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro*^{31,51}.

O processo de vitrificação aumenta a atividade de EROS, que promove lesões nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso²⁰. Além disso, altera a expressão de alguns genes, mas em menor extensão que o método lento²¹. Dentre as variáveis que reduzem a taxa de sobrevivência embrionária após a criopreservação, o número de células apoptóticas foi a que apresentou maior correlação^{52,53}. Quando se comparou a taxa de apoptose de blastômeros em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e vitrificados verificou-se aumento médio de 20,3% para 40,8%⁵², respectivamente.

2.3 Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os agentes antioxidantes é denominado estresse oxidativo ou desequilíbrio redox. Durante a criopreservação, embriões também estão susceptíveis a danos oxidativos²⁰. Dentre as principais causas da baixa eficiência da produção *in vitro* de embriões está a contínua e excessiva produção de EROS associada à depleção da concentração intracelular de glutathione (GSH)^{54,55}.

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS)

O termo "espécies reativas de oxigênio" é aplicado aos radicais livres e seus intermediários não-radicais. Os radicais livres são definidos como espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados. É esta camada de elétrons incompleta que confere a sua elevada reatividade. Os radicais livres podem ser gerados a partir de muitos elementos, mas os mais importantes em sistemas biológicos são aqueles envolvendo oxigênio e nitrogênio⁵⁶. Os radicais livres mais comuns do oxigênio são o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila⁵⁷.

Em condições basais, EROS são produzidas durante o metabolismo aeróbico e participam dos processos fisiológicos para a manutenção de várias funções biológicas^{56,57}.

Entretanto, a abundância de EROS pode ter efeitos deletérios sobre as funções celulares, pois ocorre desequilíbrio redox. Assim, na tentativa de tornarem-se estáveis, as células adquirem elétrons a partir de ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, hidratos de carbono ou qualquer molécula próxima, o que causa uma cascata de reações e resulta em danos celulares e até apoptose^{58,59}. Adicionalmente, as EROS agem como sinais no controle da expressão gênica para regular funções celulares⁶⁰.

Fisiologicamente, o equilíbrio entre EROS e antioxidantes orgânicos tem importante papel também em processos reprodutivos tais como foliculogênese, esteroidogênese ovariana, maturação do ovócito, ovulação, formação e função do corpo lúteo, luteólise, função das células germinativas, embriogênese, implantação embrionária, manutenção da gestação e início do parto^{30,57,61}. Reflexo disso é a presença das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase no oviduto de mamíferos, as quais auxiliam no controle da geração de EROS no trato genital, o que pode ser um fator determinante para o sucesso da fertilização e da implantação⁶²⁻⁶⁴.

A manutenção do equilíbrio redox intra e extracelular é fundamental para proporcionar ambientes adequados para a expressão metabólica e gênica durante o desenvolvimento embrionário⁶⁰.

2.3.2 Controle antioxidante da produção de EROS

A produção intracelular e a propagação de EROS são controladas por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos altamente complexos e integrados, que inibem a formação e a ação oxidativa das EROS e reparam os danos causados pelos metabólitos resultantes do desequilíbrio redox^{65,66}.

As células são protegidas contra danos oxidativos induzidos por EROS por vários antioxidantes não enzimáticos presentes na dieta tais como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno, ácido lipóico e compostos tióis (cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptanol)⁶⁷.

O sistema de proteção enzimático inclui a SOD que catalisa o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; as peroxirredoxinas que degradam o peróxido de hidrogênio; a catalase que age sobre o peróxido de hidrogênio produzindo

água e oxigênio; e o sistema glutathiona redutase/peroxidase que é o principal mecanismo de defesa contra as EROS ⁶⁸.

2.3.2.1 Sistema glutathiona redutase/peroxidase

A glutathiona, potente antioxidante, é considerada crucial para manter o equilíbrio redox intra e extracelular e está presente na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) ⁵⁷.

A ação protetora da glutathiona contra as EROS é facilitada pela interação de duas enzimas. A glutathiona peroxidase, uma enzima antioxidante contendo selênio, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peróxidos de lipídios na presença de GSH, que é convertida a GSSG. Esta é então reduzida pela glutathiona redutase na presença de fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADPH), a qual é gerada principalmente na via das pentoses fosfato (Figura 1). Qualquer desequilíbrio neste processo resultará em menor concentração intracelular de GSH, favorecendo o estresse oxidativo ⁶⁹.

Além da proteção contra lesões oxidativas em células e embriões, a GSH tem muitas funções importantes na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), transcrição, ciclos celulares, atividade das citoquinas e apoptose. Desta forma, exerce papel fundamental no processo de maturação dos ovócitos, na fertilização e na fase de desenvolvimento pré-implantação do embrião ⁶⁹.

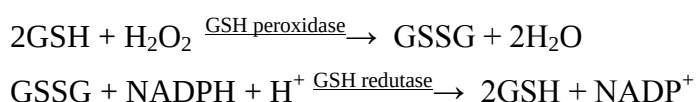


FIGURA 1 – Reações químicas da ação protetora da glutathiona via dismutação do peróxido de hidrogênio.
Fonte: Adaptado de Lubberda (2005)

O desenvolvimento embrionário é influenciado pela relação do estado redox intra e extracelular com a síntese de GSH e de DNA. A síntese e secreção de GSH no líquido tubário indica que o equilíbrio redox do ambiente intra e extracelular também é importante no desenvolvimento embrionário *in vivo* ⁶⁰, o que torna essencial a inclusão de antioxidantes no sistema *in vitro*.

2.3.3 Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões

A produção e a qualidade embrionária são afetadas principalmente pela qualidade do ovócito imaturo e pela composição do meio de maturação⁷⁰. A maturação ovocitária completa envolve a maturação nuclear, com extrusão do corpúsculo polar e reinício da meiose; maturação citoplasmática, onde ocorre rearranjo de organelas; e maturação molecular, com aumento na produção de RNAm e moléculas importantes para o futuro embrião⁷¹. Dessa forma, para que essas etapas ocorram fisiológica e cronologicamente corretas, o meio de maturação é vital para a maturação nuclear, clivagem e formação de blastocistos⁷⁰.

Durante o cultivo *in vitro*, os embriões ficam expostos a altas concentrações de oxigênio ambiente, o que afeta negativamente o desenvolvimento embrionário precoce^{18,19}. As condições do CIV expõem ovócitos, espermatozoides e embriões à ação das EROS, uma vez que sem a proteção da tuba uterina, a produção de antioxidantes é reduzida e ocorre o desequilíbrio redox^{18,67}, causando efeitos deterioradores no reparo do DNA, organização do fuso mitótico e maturação do ovócito¹⁹. Assim, é importante manter o equilíbrio do estado redox intracelular através do aumento do nível de GSH, proporcionando melhores condições para o desenvolvimento do embrião⁶⁰.

Baseado nas condições fisiológicas, uma estratégia para minimizar o estresse oxidativo é o cultivo dos embriões sob baixa tensão de oxigênio, visto que reduz a produção de radicais livres e melhora o desenvolvimento embrionário⁷²⁻⁷⁵.

A inclusão de antioxidantes ou eliminadores de radicais livres no meio de MIV^{76,77} e no meio CIV também pode reduzir o estresse oxidativo e promover melhores condições de desenvolvimento embrionário^{24,78} e também melhorar a resposta à criopreservação^{12,79}. Outra alternativa é a adição de antioxidantes aos meios de recultivo após a criopreservação para reduzir a produção de radicais livres e minimizar o estresse oxidativo gerado pelo sistema⁸⁰.

2.4 Melatonina

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é derivada do aminoácido triptofano e sintetizada pela glândula pineal e outros locais extra-pineais como olho e ovário⁸¹.

Embora a melatonina tenha várias ações fisiológicas importantes, incluindo o controle dos ritmos circadianos, indução do sono, regulação da reprodução sazonal e melhorar a resposta imune ⁸², a função mais básica está relacionada às suas ações antioxidantes que protegem os organismos de estresse oxidativo, incluindo o sistema reprodutor ⁸³. Tem sido utilizada com diversas finalidades terapêuticas no ser humano ^{82,84}, inclusive melhorar a qualidade ovocitária e embrionária em diversas espécies animais ^{8,11,78,85-90}.

As funções ovarianas podem ser influenciadas pela melatonina, tanto que a sua concentração no fluido folicular ovariano é maior que no plasma, sendo que na espécie bovina varia de 25 a 30 pg/mL, dependendo do diâmetro do folículo ⁷⁷. Esse composto altera a atividade esteroidogênica das células da granulosa e a função folicular através do aumento da expressão de RNAm de receptores de hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa ^{77,91}, exercendo portanto, um importante papel na ovulação e na produção de progesterona ⁹².

A verificação de que a melatonina atua livrando as células dos radicais livres tem ampliado a compreensão de seus mecanismos benéficos sobre a fisiologia reprodutiva. No processo de ovulação, por exemplo, a melatonina quando está presente na quantidade adequada pode atuar nas EROS, as quais são produzidas localmente durante o processo e parecem ter um papel essencial na ruptura do folículo. No entanto, o excesso de EROS neste momento da ovulação, também pode ser responsável por estresse oxidativo, fator que pode danificar as células da granulosa e ovócitos dentro do folículo ⁹³.

2.4.1 Melatonina como antioxidante

A melatonina atua diretamente sobre as EROS, estimula a ação de enzimas antioxidantes endógenas como a SOD, a glutathione redutase e a catalase, e inibe a ação de enzimas pró-oxidantes como a cicloxigenase ⁹⁴. Embora as ações diretas de eliminação de radicais livres da melatonina sejam realizadas sem a interação com receptores específicos, seus efeitos estimuladores sobre as enzimas antioxidantes são provavelmente mediados por receptores de membrana ou sítios de ligação nucleares ou no citosol ⁹⁵.

A estrutura química hidrofílica e hidrofóbica da melatonina que confere sua ação antioxidante (Figura 2). A presença do anel indol heterocíclico e as duas cadeias laterais proporcionam a capacidade de retirar radicais livres pela adição de radicais

A maior parte destes processos envolve mais de uma espécie reativa ao oxigênio por passo, de modo que uma molécula de melatonina poderia eliminar até 10 espécies de radicais antes do metabólito final ¹⁰².

A melatonina possui ainda ação reparadora sobre moléculas oxidadas porque aumenta as concentrações de enzimas de reparação de DNA como a APEX1 em condições de estresse oxidativo e nitrosativo ^{103,104}. Adicionalmente, combate os efeitos deletérios do envelhecimento das mitocôndrias pela manutenção da homeostase da GSH e produção de adenosina trifosfato (ATP) ^{103,105}, uma vez que o DNA mitocondrial é um alvo importante de radicais livres ¹⁰⁶.

2.4.2 Melatonina na produção *in vitro* de embriões

A atividade antioxidante e anti-apoptótica da melatonina no processo de produção *in vitro* de embriões tem sido alvo de estudos ^{99,101}. Dependendo das concentrações utilizadas pode melhorar o desenvolvimento pré-implantação e a criotolerância de embriões humanos ¹⁰⁷, camundongos ^{78,108}, ovinos ^{87,109}, suínos ⁸⁸, búfalos ⁸⁹, coelhos ⁹⁰ e bovinos ^{11,110}.

2.4.2.1 Adição de melatonina ao meio de maturação

O processo de maturação compreende uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o ovócito para a fecundação ¹¹¹. A maturação nuclear refere-se à retomada da primeira meiose (prófase I) até a fase de metáfase II ¹¹². Na maturação citoplasmática ocorrem processos complexos e eventos simultâneos como a síntese de proteínas ¹¹³, modificações moleculares ¹¹⁴, migração e reorganização de organelas no citoplasma ¹¹⁵. Somente após sofrer maturação completa o ovócito adquire competência, ou seja, torna-se capaz de ser fecundado, suportar o desenvolvimento embrionário e induzir a gestação ¹¹².

A produção de GSH afeta diretamente a maturação citoplasmática, pois tem importante papel na formação e estabilização do fuso mitótico em ovócitos maturados ¹⁹. A adição de melatonina ao meio de MIV está relacionada a elevadas concentrações de GSH e à melhor eficiência da maturação até a formação do blastocisto em camundongas ^{116,117} e em bovinos ⁷⁷.

A adição de melatonina ao meio de MIV para melhorar a produção de embriões produzidos *in vitro* tem sido reportada em camundongos ^{116,118}, suínos ¹¹⁹, ovinos ⁷⁶ e bovinos ^{120,121}. Protege as células do cumulus de danos no DNA ¹²², mas há variação nos resultados de desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos ^{77,122,123}. Nesta espécie, o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e o número de células por blastocisto pode variar dependendo da concentração de melatonina utilizada no meio de MIV ⁷⁷.

A maturação de complexo cumulus-ovócito (CCO) de camundongas necessita de baixa concentração de melatonina (10 nM) em comparação com ovócitos sem células do cumulus (10 a 100 μ M) ¹²⁴. Para ovócitos ovinos, a adição de 10^{-6} M de melatonina ao meio de MIV melhorou a maturação e a taxa de clivagem, mas na concentração de 10^{-5} M esse efeito não foi verificado ⁷⁶. Para ovócitos bovinos, as concentrações de 10^{-9} M e 10^{-7} M mostraram melhores resultados ⁷⁷.

Os receptores de membrana para melatonina estão presentes no sistema reprodutivo de mamíferos ⁸³. Em bovinos, receptores para a melatonina 1 (MT1) e 2 (MT2) podem ser identificados em ovócitos, células do cumulus, células da granulosa ⁷⁷, mas nos blastocistos somente MT1 é expresso ¹²². A maior parte da resposta no receptor MT1 ocorre em baixas concentrações de melatonina, mas a resposta mediada por MT2 ocorre em concentrações mais elevadas ¹²⁵. Consequentemente, estudos mostram que a suplementação de 10 ou 50 ng/mL de melatonina ao meio de MIV melhorou a maturação nuclear e a expansão das células do cumulus ¹²⁶.

Os efeitos benéficos da melatonina sobre a maturação do ovócito bovino são mediados por receptores de membrana tais como o agonista do receptor de melatonina (IIR7), enquanto o antagonista do receptor de melatonina (luzindol) bloqueia estes efeitos. Estudos têm mostrado que a suplementação de melatonina durante a maturação do ovócito bovino aumenta significativamente as expressões de genes associados à maturação ovocitária (GDF9, MARF1, DNMT1a) e de genes relacionados com a expansão das células do cumulus (PTX3, HAS1/2) ⁷⁷.

Adicionalmente, o conhecimento deste antioxidante no processo de maturação contribui para novas informações sobre criopreservação de ovócitos, uma vez que a suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de MIV diminuiu significativamente a produção de EROS e inibiu eventos apoptóticos de ovócitos bovinos vitrificados, aumentando o seu potencial de desenvolvimento ¹²⁷.

2.4.2.2 Adição de melatonina ao meio de cultivo de embriões

A manipulação de embriões durante o cultivo *in vitro* em concentrações de oxigênio aumenta o risco de exposição a quantidades elevadas de EROS e radicais livres que afetam negativamente o desenvolvimento embrionário precoce^{18,19}. A apoptose durante o desenvolvimento pré-implantação do embrião desempenha papel fundamental na eliminação de células defeituosas, mas pode induzir maior perda de células normais¹²⁸, parcialmente devido às condições de cultivo¹²⁹.

A melatonina tem sido relatada como fator chave para melhorar as condições de cultivo *in vitro* de embriões pré-implantação devido a sua capacidade de eliminar radicais livres⁷⁸, atuar como antioxidante⁷⁸ e como agente anti-apoptótico¹³⁰. A suplementação de melatonina no meio de CIV nas concentrações de 10 a 50 μM resultou em maior taxa de clivagem e de embriões bubalinos transferíveis, quando comparado com 5 μM e o tratamento controle⁸⁹. Para embriões de coelhos, a adição na concentração de 10^{-3} M aumentou a taxa de blastocistos, mas em menor concentração (10^{-6} M) as taxas de blastocisto e eclodibilidade 48 horas pós-inseminação foram mais altas⁹⁰.

Quando embriões bovinos foram cultivados com melatonina, foi necessário aumentar sua concentração (10^{-7} M) até o segundo dia de cultivo com posterior redução do terceiro ao sétimo dia de cultivo (10^{-9} M) para obter maior produção e eclodibilidade de blastocistos. Ambas concentrações produziram aumento no número de células por blastocisto em relação ao grupo controle, refletindo em melhor qualidade embrionária²⁴. Essa melhora na qualidade dos embriões cultivados em meio contendo melatonina relaciona-se com a redução da produção de EROS e da apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário⁷⁸.

Quando adicionada na concentração apropriada para o cultivo *in vitro*, a melatonina regula negativamente a expressão de genes pró-apoptóticos (p53, Bax, caspase-3) e positivamente a expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Gpx4, SOD1)^{10,78}. Assim, os embriões produzidos *in vitro* tornam-se mais habilitados para a implantação, aumentam as chances de sobrevivência pós-natal e, com isso, o número de crias por fêmea⁷⁸.

Os benefícios da adição da melatonina ao meio de CIV relacionam-se à cinética de desenvolvimento *in vitro* de embriões e à melhor a qualidade dos blastocistos, refletindo em maior criotolerância e sobrevivência embrionária após o aquecimento¹².

Embriões bovinos cultivados em meio contendo melatonina (10^{-7} M) apresentaram maiores taxas de eclosão e menor taxa de mortalidade até 72 horas do recultivo após o aquecimento, um indicativo de maior criotolerância ¹².

Um dos principais mecanismos envolvidos na criotolerância proporcionada pela melatonina é o de modificar a expressão de importantes genes envolvidos no desenvolvimento embrionário. Há aumento na expressão de genes requeridos para metilação celular (DNMT3A), proteínas de membrana (OCC) e conectividade celular (CDH1), além da redução da expressão do gene aquaporina (AQP3), o que conduz ao aumento da resistência à apoptose ¹².

2.4.2.3 Adição de melatonina ao meio de recultivo após aquecimento embrionário

A resistência do embrião à criopreservação, verificada pela qualidade e capacidade de sobrevivência após o aquecimento está diretamente relacionada ao sistema de PIVE ¹³¹. Uma alternativa para melhorar a sobrevivência embrionária pós-aquecimento é a adição de antioxidantes ao meio de CIV durante o recultivo ^{80,132,133}.

Antioxidantes exógenos aumentam a chance dos embriões, inclusive os de baixa qualidade, alcançarem o desenvolvimento até blastocisto. Entretanto, a inclusão de antioxidantes durante o CIV não é suficiente para manter o estado redox desses embriões durante o período crítico após o aquecimento, necessitando de nova fonte exógena de antioxidante durante esta fase ⁸⁰. Para embriões de camundongas ¹¹⁷ e ovinos ¹⁰⁹ a adição de melatonina ao meio durante o recultivo pós-aquecimento parece ser dose-dependente. Baixas concentrações de melatonina (10^{-9} M) melhoraram o desenvolvimento e qualidade dos embriões após vitrificação e propiciaram aumento do número de células da massa celular interna e do trofoectoderma. A quantidade de glutathione e a expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL aumentaram, sendo que o índice apoptótico foi reduzido nos tratamentos com 10^{-9} e 10^{-12} M. A ação da melatonina na redução do estresse oxidativo pode proteger os embriões produzidos *in vitro* vitrificados, exercendo efeito benéfico sobre o desenvolvimento do embrião após vitrificação ¹¹⁷.

Também para embriões ovinos o aumento de embriões viáveis após o cultivo pós-aquecimento foi verificado quando a concentração de melatonina foi baixa (10^{-9} M). Em altas concentrações (10^{-3} e 10^{-6} M) observou-se redução no número de células e baixas taxas de re-expansão e eclosão, assim como efeitos negativos sobre o metabolismo dos

embriões, os quais mostraram elevado índice apoptótico e oxidativo e baixa concentração de ATP¹⁰⁹.

2.5 Retirada do fluido da blastocela

Vários estudos têm demonstrado que as taxas de sobrevivência embrionária podem aumentar após a retirada do fluido da blastocela (RFB) antes da criopreservação^{13,134-137}. Blastocistos expandidos contêm a blastocela repleta de líquido, o que causa danos aos embriões por favorecer a formação de cristais de gelo durante a criopreservação³⁷ e reduzir as taxas de desenvolvimento embrionário¹³⁶. A redução da quantidade de fluido da blastocela antes da criopreservação reduz a formação de cristais de gelo e minimiza as injúrias celulares causadas durante a criopreservação^{37,138}. Estudos com embriões humanos, após vitrificação e aquecimento, mostraram que a taxa de sobrevivência de blastocistos expandidos com blastocelas intactas foi inferior àquela de blastocistos iniciais devido à substituição incompleta de água por crioprotetores na blastocela¹³⁴. A redução artificial do fluido da blastocela com o auxílio de uma micropipeta imediatamente antes da vitrificação elevou a taxa de sobrevivência e a taxa de gestação de blastocistos expandidos humanos^{135,136,139}. Além disso, pesquisas^{13,137,140} relatam que a retirada do fluido da blastocela também favorece a sobrevivência embrionária após o recultivo.

Em bovinos, a RFB de blastocistos produzidos *in vitro* e oriundos de transferência nuclear de células somáticas, tanto em fase de eclosão ou já eclodidos, aumentou a taxa de sobrevivência após a vitrificação e aquecimento e proporcionou aumento no número total de células com redução no número de células apoptóticas¹³. Análises feitas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), embriões bovinos expostos à redução do volume de líquido da blastocela diminuíram a expressão do gene pró-apoptótico Bax e aumentaram significativamente a expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL ($P < 0,05$). Além disso, as taxas de prenhez e nascimentos obtidas pela inovulação de blastocistos produzidos *in vivo* e criopreservados tanto pelo método lento quanto pela vitrificação foram maiores quando houve a RFB¹³⁷.

2.6 Técnicas de avaliação da qualidade ovocitária e embrionária

A maturação ovocitária é fundamental para o sucesso da fecundação e desenvolvimento do embrião ¹¹². Neste contexto, atividade metabólica da mitocôndria tem sido associada ao desenvolvimento ovocitário e embrionário ^{141,142}.

O estado oxidativo tem sido utilizado como metodologia para estimar o risco de danos oxidativos e disfunções associadas ao desenvolvimento do embrião. Sua detecção e mensuração, direta ou indireta, tais como a geração de espécies reativas de oxigênio, quantidade de glutathione intracelular, danos ao DNA ou expressão de genes, ajudam a desenvolver estratégias para prevenir ou minimizar as disfunções oxidativas durante o desenvolvimento embrionário ^{9,60,143}.

2.6.1 Espécies reativas de oxigênio e glutathione

A avaliação do estresse oxidativo pela mensuração da concentração de glutathione e EROS em ovócitos e embriões frescos e vitrificados tem sido relatada em diversas espécies ^{9,18,117,143-146}. Elevadas concentrações de GSH e baixa produção de EROS estão associadas com melhor desenvolvimento e viabilidade embrionária ^{9,143}.

Sondas constituídas por derivados de fluoresceína e calceína reduzidas são permeáveis às células e servem como indicadores de EROS. Formas quimicamente reduzidas e acetiladas de 2,7-diclorofluoresceína e calceína são não fluorescentes até que os grupos acetato são removidos por esterases intracelulares e a oxidação ocorra dentro da célula. A oxidação destas sondas pode ser detectada pelo aumento da fluorescência com um citômetro de fluxo, fluorímetro, leitor de microplacas ou microscópio de fluorescência, utilizando fontes de excitação e filtros apropriados para a fluoresceína ¹⁴⁷. Como os corantes são suscetíveis à foto-oxidação, sempre que possível condições de pouca luz devem ser utilizadas para aplicações de microscopia de fluorescência ¹⁴⁸.

As sondas fluorescentes para detecção de GSH foram concebidas para passar livremente através da membrana celular. No entanto, uma vez dentro da célula são transformados em produtos de reação celular impermeáveis. Contêm um grupo clorometil ou bromometil, que reage com grupos tiol, utilizando uma reação mediada por glutathione-S-transferase. Na maioria das células, as concentrações de glutathione são elevadas e

glutathiona-transferase é ubíqua. As células carregadas com a fluorescência são observadas sob espectros de emissão de 464 nm e excitação de 371 nm ¹⁴⁹.

2.6.2 Potencial da membrana mitocondrial (PMM)

A maturação ovocitária é caracterizada por vários eventos sincronizados e interdependentes no citoplasma e no núcleo ¹¹¹. Durante este processo, as mitocôndrias sofrem numerosas alterações, incluindo distribuição dentro do citoplasma, mudança na função metabólica e aumento no número de cópias do DNA mitocondrial ¹⁵⁰. Além disso, o estado metabólico de mitocôndrias, que se reflete em grande parte na magnitude do potencial da membrana mitocondrial e na produção de ATP, também está associada com a qualidade dos ovócitos. Dessa forma, o aumento no PMM é um passo essencial para a maturação de ovócitos ¹⁵¹, uma vez que uma maior produção de ATP produz taxas significativamente maiores de desenvolvimento até blastocisto ¹¹⁵.

Assim, como o status e a atividade das mitocôndrias são fatores determinantes na qualidade do ovócito, a relação entre tratamentos durante a maturação *in vitro* e o estado mitocondrial tem sido relatada ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

O PMM mensurado pelo indicador de fluorescência da atividade mitocondrial ^{153,154} possibilita a relação entre um bom desenvolvimento ovocitário e embrionário e a atividade metabólica da mitocôndria ^{141,142}, visto que é menor em ovócitos imaturos do que o observado em ovócitos maturados ¹⁴².

A sonda MitoTracker® Orange CMTMRos contém uma porção clorometil moderadamente reativa com tiol para identificação de mitocôndrias. Após incubação, a sonda se difunde passivamente através da membrana plasmática e se acumula nas mitocôndrias ativas. Desta forma, a intensidade de fluorescência da atividade mitocondrial pode ser observada sob espectros de emissão de 576 nm e excitação de 554 nm ¹⁵⁵.

2.6.3 Análise TUNEL

O desenvolvimento embrionário pré-implantação é um processo dinâmico, que envolve naturalmente a proliferação celular, diferenciação e apoptose ¹⁵⁶. A apoptose é uma forma de morte celular programada e tem importante papel no desenvolvimento embrionário e na homeostase. Caso ocorra de forma desproporcional em relação aos

blastômeros intactos, pode reduzir a viabilidade e o potencial de desenvolvimento do embrião^{128,157}. Dessa forma, a apoptose é uma das principais variáveis para a avaliação da saúde do embrião¹⁵⁸, e por ser a resposta celular final em condições sub-ótimas e diferentes tipos de estresse que o embrião pode sofrer durante o processo de congelamento e descongelamento¹⁵⁷. Sua ocorrência em grande número é também um importante indicador dos danos causados pela criopreservação aos embriões bovinos¹³⁸.

A reação de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) permite a detecção *in situ* de células apoptóticas por identificação de extensos fragmentos de ácido desoxirribonucleico DNA gerados por atividade desoxirribonuclease (DNase) endógena durante o processo apoptótico¹⁵⁹. É o método mais frequentemente usado para a detecção de células apoptóticas em diferentes estágios de embriões mamíferos com base na observação morfológica de características comuns da apoptose, incluindo a condensação ou a fragmentação do núcleo ou a determinação da presença de produtos específicos de degradação de DNA¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

2.6.4 Expressão de genes

O desenvolvimento pré-implantacional de embriões *in vitro* é caracterizado por uma série de eventos, além de ser uma fase de grande sensibilidade e muito influenciada pelo ambiente de cultivo¹⁶². Este dinâmico processo de controle do desenvolvimento embrionário inicial é regulado pela expressão diferencial de genes ou pelo padrão de expressão de genes¹⁶³.

O conhecimento em nível molecular das vias de controle de expressão de genes nos embriões auxilia nas respostas de muitos questionamentos e também permite quantificar o que realmente está acontecendo¹⁶⁴.

Dentre as ferramentas utilizadas para análise do padrão de expressão de genes, a transcrição reversa quantitativa em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) é uma das técnicas de quantificação com maior acurácia, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, sendo o método mais usado atualmente para a detecção e quantificação^{165,166}.

Dado a grande sensibilidade que o RT-qPCR possui em detectar pequenas mudanças na abundância de genes transcritos nos blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, é necessária a normalização dos dados utilizando genes de controle endógeno conhecidos

constitutivos ou “*housekeeping genes*”¹⁶⁶. Para aumentar a acurácia e minimizar os erros, recomenda-se a utilização de no mínimo três genes de referência¹⁶⁷. Estes precisam ser validados, pois o padrão de expressão de genes de embriões produzidos *in vitro* é influenciado pelas condições de cultivo e pelo método de produção do embrião (fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática, transferência nuclear). Para embriões produzidos *in vitro*, os genes constitutivos utilizados como referência que apresentam maior estabilidade são: HMBS/SF3A1, HPRT1, GAPDH, ACTB, H2A, PPIA, SDHA, EEF1A2, YWHA2, respectivamente¹⁶⁶.

2.6.4.1 Metabolismo celular

A glicose é o principal substrato energético para o embrião após a compactação. Evidências indicam que o metabolismo do embrião e captação de glicose podem ser afetadas pelo sistema de cultivo devido a mudanças no padrão de genes transportadores de glicose 1 (SLC2A1) e 3 (SLC2A3)^{11,168}.

O gene SLC2A1 (*Bos taurus* solute carrier family 2, member 1) está localizado em células do trofoectoderma em blastocistos bovinos¹⁶⁹ e envolvido no metabolismo celular e no transporte de glicose ao longo das membranas basolaterais¹⁷⁰. Uma expressão mais elevada de SLC2A1 e melhor qualidade morfológica estão relacionadas em embriões bovinos produzidos *in vitro*¹⁷¹ e cultivados com melatonina¹¹. Estudos demonstraram menor expressão do SLC2A1 foi encontrada em embriões partenogênicos¹⁷² e em blastocistos produzidos *in vitro* criopreservadas por vitrificação e congelamento lento em comparação a embriões frescos. Sugere-se que sua menor expressão reduza a disponibilidade de glicose para o metabolismo embrionário pós-descongelamento e, consequentemente a qualidade dos embriões²¹.

SLC2A3 (*Bos taurus* solute carrier family 2, member 3) é um marcador muito sensível para as condições de sub-ótimas de cultivo e que está associado com a má qualidade dos embriões¹⁷¹. Este gene foi mais expresso em embriões produzidos *in vitro* que *in vivo*¹⁷³. Adicionalmente, uma forte tendência para a maior expressão de SLC2A3 em embriões bovinos criopreservados foi observada em embriões pós-eclosão de 14 dias quando comparados com embriões frescos *in vitro* e *in vivo*¹⁷⁴.

2.6.4.2 Estresse oxidativo

2.6.4.2.1 Proteção enzimática celular

Os genes da família da enzima superóxido dismutase (SOD) estão relacionados com a proteção enzimática celular. É expresso quando há aumento na produção de EROS para catalisar o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio ⁶⁸.

A adição de antioxidantes na PIVE tem relacionado o aumento de SOD com melhor qualidade embrionária ¹⁷⁵. Fischer et al. ¹⁷⁶ relataram que a melatonina aumenta a expressão de importantes enzimas antioxidantes como a SOD que protegem o DNA contra danos oxidativos.

A melhor eficiência de implantação de embriões cultivados com melatonina foi associada com o aumento da expressão do gene de SOD durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões ⁷⁸.

A atividade da SOD1 aumentou em embriões frescos e vitrificados de coelhos e bovinos cultivados com melatonina, contribuindo para a melhor qualidade e viabilidade embrionária ^{24,175}.

A suplementação do MIV com peroxiredoxin 2, uma proteína importante no início do desenvolvimento embrionário, aumentou a competência e o potencial desenvolvimento dos ovócitos e a qualidade dos embriões, incrementou a atividade mitocondrial e alterou a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário antioxidante (SOD2) e atividade mitocondrial ¹⁷⁷.

A expressão do gene SOD2 (*Bos taurus* superoxide dismutase 2) está relacionada com a atividade mitocondrial e a produção de EROS. Estudos têm mostrado que o aumento das EROS em embriões produzidos *in vitro* ocasiona um aumento na expressão de SOD2 sem afetar a qualidade do embrião ¹⁷⁸.

Como o processo de criopreservação eleva as concentrações de EROS ²⁰, o aumento na expressão de SOD2 ocorre como proteção contra condições adversas no meio, permitindo um melhor desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* ¹⁷⁴.

2.6.4.2.2 Proteínas de choque térmico

Grande parte da mudança na função celular que leva à termotolerância envolve ativação de genes para proteínas de choque térmico e de outras proteínas ¹⁷⁹.

Essas proteínas de proteção como a HSPB1, HSP1A1 e HSPA5 interagem com outras proteínas para prevenir a sua agregação e para assegurar a localização celular adequada¹⁸⁰.

HSPB1 não é essencial no desenvolvimento embrionário e na manutenção de tecidos sob condições fisiológicas. No entanto, sob condições de estresse, atua em sinergia com HSPA1 no desenvolvimento da termotolerância, sendo fundamental na proteção celular contra a apoptose¹⁸¹.

Embriões bovinos em estágio de mórula submetidos a 40°C aumentaram a expressão do gene HSPB1 em comparação com o grupo mantido em cultivo a 38,5° C¹⁸².

Expressão elevada de HSP1A1 foi detectada em embriões produzidos *in vitro* quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. É provavelmente benéfica para os embriões em desenvolvimento, pois pode protegê-los e ser indicativo de maior qualidade dos embriões produzidos *in vitro*¹⁷⁴.

A expressão de HSPA5 é uma reposta induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (ER) e necessária para a proliferação celular e proteção da massa celular interna durante o desenvolvimento de embrião de ratas¹⁸³. Maior quantidade de RNAm de HSPA5 foi observada em células do cumulus de ratas submetidas a elevadas concentrações de ácido palmítico como indutor de estresse e foi relacionada com a restauração do retículo endoplasmático liso e da homeostase celular¹⁸⁴.

A expressão de HSPA5 também está associada ao câncer de mama de alto grau, assim como eventos metastáticos¹⁸⁵. Na doença de Alzheimer, HSPA5 desempenha um papel de suporte para a progressão da fosforilação e da neurodegeneração. Assim, HSPA5 representa um alvo para a terapêutica contra o câncer, vírus e Alzheimer¹⁸⁶.

2.6.4.2.3 Reparo celular

Os organismos vivos sofrem constantes danos no DNA por diversos agentes ambientais, incluindo raios ultravioleta e radiação ionizante. Para minimizar estes danos específicos existe uma maquinaria enzimática trabalhando¹⁸⁷.

O sistema de reparo de erros do DNA (MMR) é um mecanismo de pós-replicação responsável por corrigir pequenas falhas de inserção/deleção e trocas de base única no DNA. É constituído por um complexo de proteínas formado por MSH2, MLH1, PMS2, MSH3 e MSH6. O sistema de reconhecimento de erros MutSa e MutSb é formado

pelos respectivos heterodímeros hMSH2/hMSH6 e hMSH2/hMSH3. O complexo MutSa participa de reparos de bases únicas e pequenos erros de inserção/deleção, no entanto o complexo MutSb reconhece inserção/deleção maiores que um par de base. Estes complexos interagem com um complexo de duas proteínas do MMR multirrelacionadas MLH1-PMS2. Estas observações sugerem que mutações no MSH3 ou MSH6, isoladas ou combinadas, podem resultar em defeitos no MMR e levar a predisposição ao câncer¹⁸⁸.

MMR é essencial para prevenir instabilidades do tipo microssatélite pós-replicação, visto que células com o sistema de reparo defeituoso têm altas taxas de mutação e formação de tumores. Dependendo do dano ao DNA, o sistema de reparos pode interromper o ciclo celular e induzir apoptose como resposta a químicos carcinogênicos e estresse oxidativo¹⁸⁹.

A quebra da dupla fita de DNA é mais propensa a causar a falha do sistema de reparo devido a falta da fita complementar. Este DNA lesado pode ocasionar a parada do ciclo celular e apoptose ou causar instabilidade cromossomal e carcinogênese quando há acúmulo de reparos errados¹⁸⁷.

O sistema de reparos no DNA de gametas é de extrema importância. A resposta é similar aos múltiplos danos no DNA e inclui MSH6, MRE11A, PCNA e ATR, sendo que a expressão é reduzida em ovócitos humanos velhos^{190,191}.

Estudos recentes demonstraram que zigotos com a primeira clivagem rápida (29,5 horas pós-inseminação) têm um maior potencial de desenvolvimento até blastocisto viável quando comparado a zigotos com clivagem tardia (46 horas pós-inseminação). Diferenças nos padrões de expressão de genes estão associadas direta ou indiretamente na regulação do ciclo celular, resposta a danos no DNA, controle da transcrição e fatores de desenvolvimento pré-implantacional como o gene MSH6¹⁹².

2.6.4.2.4 Implantação

Membros da família da proteína FOS (FOS, FOSB, FOSL1 e FOSL2) estão envolvidos em processos de invasão celular mediante controle de genes que afetam a locomoção celular, particularmente em células cancerígenas, mas também na biologia do trofoblasto¹⁹³⁻¹⁹⁵.

A proteína FOSL1 (Fos-like antigen 1) faz parte da proteína de ativação 1 (AP-1) do complexo do fator de transcrição. Está envolvida numa variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose celular ^{193,194}.

Embora tenha sido demonstrado que a ativação desregulada de AP-1 causa a formação de tumores, a maior expressão de RNAm de FOSL1 e a detecção da proteína Fra-1 pode ser mais preditivos de atividade oncogênica ¹⁹⁴.

A expressão de FOSB está presente no trofoblasto extraviloso e altos níveis são detectados no sinciciotrofoblasto. No entanto, é a FOSL1 que participa da regulação da invasão do trofoblasto em espécies com placentação hemocorial ¹⁹³. A via de sinalização PI3K/AKT/FOSL1 está relacionada ao comportamento invasivo do trofoblasto e a remodelagem vascular. FOSL1 mostra atuação integral direta no estabelecimento do reconhecimento materno-fetal ¹⁹⁶. Alterações na expressão do FOS e FOSL1 implicam em invasão desordenada do trofoblasto e complicações obstétricas associadas à placenta ¹⁹³.

O fator de transcrição FOSL1 foi encontrado com expressão acentuada em embriões vitrificados, sugerindo esta ser uma via de ativação de proteção celular ou apoptose induzida por danos celulares ¹⁹⁷.

2.6.4.2.5 Placentação

A queratina, proteína do filamento intermediário das células epiteliais faz parte da família de proteínas do citoesqueleto e são expressas de forma coordenada em pares específicos em vários epitélios. A KRT18 é uma proteína do citoesqueleto que é encontrada junto com a KRT8 no epitélio simples, formando um heterodímero, que forma os filamentos intermediários ¹⁶⁴.

As queratinas do tecido epitelial tem envolvimento nas funções de suporte estrutural, citoarquitetura, resposta ao estresse, regulação de vias de sinalização da apoptose, síntese de proteínas, distribuição organelas e vesículas ¹⁹⁸, tamanho e proliferação celular ^{199,200}.

A expressão do gene da queratina é amplamente estudada no câncer, doenças genéticas em humanos e ratos e dão indícios que mudanças na expressão de determinadas queratinas têm impacto direto na formação do tumor ¹⁹⁹. As proteínas KRT8 e KRT18 são essenciais para manutenção da integridade estrutural, mas também atuam em funções não

mecânicas como a modulação da adesão das células epiteliais e a motilidade durante o desenvolvimento e formação de tumores²⁰¹.

Estudos também demonstram a importância das queratinas no desenvolvimento embrionário pré-implacional e no estabelecimento da gestação. As primeiras queratinas sintetizadas no embrião parecem modular o comportamento celular durante o desenvolvimento. A expressão da proteína KRT18 foi detectada em mórula, sendo que no estágio de blastocisto é predominantemente expresso nas células do trofoectoderma e pouca ou nenhuma expressão na massa celular interna. O KRT18 é detectado nos locais de contato célula-célula no trofoectoderma e está envolvido na sua diferenciação¹⁶⁴.

A expressão de KRT8 é maior em células do cumulus de embriões que cessaram seu desenvolvimento (2 a 8 células ou ovócitos de baixo potencial de desenvolvimento) quando comparada com células do cumulus de embriões de alto potencial de desenvolvimento, ou seja, que desenvolveram até estágio de blastocisto²⁰².

A expressão de KRT8 é menor em embriões produzidos *in vivo* do que *in vitro*²⁰³ e é maior em biópsias de blastocistos que resultaram em reabsorção quando comparado a embriões que levaram a gestação a termo²⁰⁴.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar o efeito da adição de melatonina aos meios de maturação e/ou cultivo sobre a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* e criopreservados, expostos ou não à retirada do fluido da blastocele.

3.2 Específicos

- ✓ Adequar a melhor concentração de melatonina para o meio de maturação e para o meio de cultivo (Capítulo 2);
- ✓ Estudar o efeito da melatonina sobre a qualidade ovocitária e/ou embrionária (Capítulo 2);
- ✓ Verificar em qual etapa do processo PIVE a adição de melatonina é mais benéfica - maturação e/ou cultivo (Capítulo 2);

- ✓ Avaliar o desempenho de embriões produzidos *in vitro* com melatonina no processo de vitrificação (Capítulo 3);
- ✓ Estudar o efeito interativo da adição de melatonina no sistema PIVE e a retirada do fluido da blastocle sobre as taxas de sobrevivência e apoptose celular após vitrificação embrionária (Capítulo 3);
- ✓ Verificar o efeito da melatonina sobre a expressão de genes relacionados à qualidade embrionária (Capítulo 3).

4. REFERÊNCIAS

1. BRASIL, Ministério da Agricultura P e A. Projeções do agronegócio: Brasil 2013/2014 - 2023/24. Projeções de Longo Prazo. [Internet]. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014. p. 100. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/projecoes-do-agronegocio>
2. IBGE IB de G e E. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária Junho de 2015 [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2014. p. 47. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/>
3. IETS. IETS 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. International Embryo Transfer Society (IETS) [Internet]. 2014. p. 1–13. Available from: www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf
4. Martins C de M. Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*. Universidade de São Paulo; 2007.
5. Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches B V, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2015 Feb 6];71(4):690–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995895>
6. Van Wagtendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2015 Feb 6];65(5):914–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253322>
7. Hu J, Cheng D, Gao X, Bao J, Ma X, Wang H. Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Nov 22];47(6):873–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239270>

8. Unfer V, Raffone E, Rizzo P, Buffo S. Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous in vitro fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 Oct 9];27(11):857–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463230>
9. Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Sep 30];31(2):229–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24305840>
10. Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Sep 30];101(2):577–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314921>
11. Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Apr [cited 2014 Oct 13];56(3):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666110>
12. Wang F, Tian X, Zhou Y, Tan D, Zhu S, Dai Y, et al. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Oct 11];9(4):e93641. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Min S-H, Lee E, Son H-H, Yeon J-Y, Koo D-B. Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Cryobiology* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Sep 30];66(2):195–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376491>
14. Cheuquemán C, Arias ME, Risopatrón J, Felmer R, Álvarez J, Mogas T, et al. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and *in vitro* produced bovine embryos. *Andrologia* [Internet]. 2015;47(6):604–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/and.12308>
15. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* [Internet]. 2006 May [cited 2015 Jun 27];65(8):1551–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229883>
16. Camargo LSA, Boite MC, Wohlrres-Viana S, Mota GB, Serapiao RV, Sa WF, et al. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;63(3):256–

62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.09.135>
17. Viana, João Henrique M., Figueiredo ACS. Estatísticas da produção E transferência de embriões em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. *O Embrião*. 2015;16–8.
 18. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. 2004;62(7):1186–97.
 19. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy M a., Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*. 2006;86(3):503–12.
 20. Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;93(8):2602–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>
 21. Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* [Internet]. 2011 Nov [cited 2015 Feb 6];76(8):1433–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835456>
 22. Li L, Zhang X, Zhao L, Xia X, Wang W. Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(3):229–36.
 23. Alexopoulos NI, Maddox-Hyttel P, Tveden-Nyborg P, D’Cruz NT, Tecirlioglu TR, Cooney M a., et al. Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: Implications for embryonic loss. *Reproduction*. 2008;136:433–45.
 24. Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Apr [cited 2014 Nov 10];56(3):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666110>
 25. Gonçalves, PBD; Visintin, JA; Oliveira, MAL; Montagner, MM; Costa L. Produção in vitro de Embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1st ed. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p. 195–226.
 26. De la Fuente R, King WA. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote* [Internet]. 1997 Nov [cited 2015 Jun 27];5(4):309–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9563679>
 27. Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2002;62(3):320–7.

28. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(2):234–48.
29. Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel O V, Smith GW, et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Sep 19];131(4):651–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595716>
30. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(2):1141–7.
31. Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, et al. In-straw Cryoprotectant Dilution for Bovine Embryos Vitrified Using Cryotop. *J Reprod Dev.* 2011;57(4):437–43.
32. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LCO, Junior AM, et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote.* 2012;22(July):1–8.
33. Pontes JHF, Melo Sterza F a, Basso a C, Ferreira CR, Sanches B V, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jun [cited 2014 Sep 17];75(9):1640–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334055>
34. Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology.* 2011;76(9):1583–93.
35. Beltrame RT, Quirino CR, Barioni LG, de Lima VFMH. Simulação e análise econômica da produção in vivo e in vitro de embriões em bovinos. *Pesqui Agropecu Bras.* 2010;45(12):1513–20.
36. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6):779–96.
37. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod.* 2002;17(3):744–51.
38. Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y -i., et al. Pathway for the Movement of Water and Cryoprotectants in Bovine Oocytes and Embryos. *Biol Reprod.* 2011;85(4):834–47.
39. Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture

- systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2002 Jan [cited 2015 Jun 27];61(1):57–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774376>
40. Crosier a E, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod*. 2001;64(5):1375–85.
 41. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65(1):228–35.
 42. Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta a. EM, Portugal P V., Bessa RJB, et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim Reprod Sci*. 2007;98(3-4):293–301.
 43. Dinnyes A, Nedambale TL. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Jun 28];21(1):45–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152745>
 44. Sturmey RG, Reis a., Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim*. 2009;44(SUPPL. 3):50–8.
 45. Gómez E, Muñoz M, Rodríguez a., Caamaño JN, Facal N, Díez C. Vitrification of Bovine blastocysts produced in Vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reprod Domest Anim*. 2009;44:194–9.
 46. Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2008 May 5 [cited 2015 Jun 28];69(8):1013–21. Available from: <http://www.theriojournal.com/article/S0093691X08000666/fulltext>
 47. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65:236–44.
 48. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2014 Nov 17];67(1):73–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055564>
 49. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:357–64.
 50. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(5):608–14.
 51. Diógenes, M.N., Sprícigo, J.F.W. Dode MAN. Vitreficação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. *Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia*

de Embriões. Foz do Iguaçu/PR; 2012. p. 495.

52. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;75(7):1211–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>
53. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LCO, Junior AM, et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote* [Internet]. 2014 May [cited 2015 Jun 28];22(2):124–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784438>
54. Yoon AS, Choi S, Sim B, Kim J, Mun S, Jeong P, et al. Developmental Competence of Bovine Early Embryos Depends on the Coupled Response Between Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress Developmental Competence of Bovine Early Embryos Depends on the Coupled Response Between Oxidative and Endoplasmic Reticulu. 2014;
55. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) Concentrations Vary With the Cell Cycle in Maturing Hamster Oocytes , Zygotes , and Pre-Implantation Stage Embryos. 2003;112(August 2002):106–12.
56. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;25(3):287–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
57. Al-Gubory KH, Fowler P a., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1634–50.
58. Agarwal, Ashok, Gupta, Sajal, Sekhon, Lucky, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1375–403.
59. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.
60. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* [Internet]. 2012;58(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450278>
61. Cruz MHC, Leal CL V, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2014 Oct 15 [cited 2014 Sep 26];82(7):925–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107629>
62. Lapointe J, Bilodeau J-F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 2003;68(4):1157–64.
63. Roy M, Gauvreau D, Bilodeau JF. Expression of superoxide dismutases in the

- bovine oviduct during the estrous cycle. *Theriogenology*. 2008;70(5):836–42.
64. El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;89(1):1–6.
 65. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213–9.
 66. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
 67. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7(2):175–89.
 68. Crocomo, Letícia Ferrari, Marques Filho, Wolff Camargo, Landim-Alvarenga, Fernanda da Cruz, Bicudo SD. Produção de embriões in vitro: Estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e Zootec*. 2012;19(4):470–9.
 69. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005;5(1):5–17.
 70. Blanco MR, Demyda S, Moreno Millán M, Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnol Mol Biol Rev [Internet]*. 2011;6(7):155–65. Available from: <http://www.academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/F83296011816>
 71. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55(6):1241–54.
 72. Mantikou, E, Bontekoe, S, vanWely, M, Seshadri, S, Repping, S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod Update [Internet]*. 2013;19(3):209. Available from: <http://humupd.oxfordjournals.org/>
 73. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*. 2009;24(2):300–7.
 74. Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2461–5.
 75. Gomes Sobrinho DB, Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Silva LFI, Massaro FC, et al. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol [Internet]*. 2011;9(1):143. Available from: <http://www.rbej.com/content/9/1/143>
 76. Casao a, Abecia J a, Cebrián-Pérez J, Muiño-Blanco T, Vázquez MI, Forcada F.

- The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. *Spanish J Agric Res* 2010. 2010;8(1):35–41.
77. Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Oct [cited 2014 Oct 8];57(3):239–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070516>
 78. Wang F, Tian X, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Liu G. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Oct 14];55(3):267–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772689>
 79. Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, et al. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2014 Oct 2 [cited 2014 Oct 13]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304491>
 80. Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; Which is the most important? *J Assist Reprod Genet*. 2009;26:355–64.
 81. Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan D-X, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res* [Internet]. 2006 Mar [cited 2014 Oct 11];40(2):101–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441546>
 82. Kostoglou-Athanassiou I. Therapeutic applications of melatonin. *Ther Adv Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Feb [cited 2014 Oct 24];4(1):13–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3593297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 83. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan D-X, Sugino N, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril* [Internet]. 2009 Jul [cited 2014 Oct 13];92(1):328–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804205>
 84. Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem* [Internet]. 2010 Jan;17(19):2070–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423309>
 85. Batioğlu AS, Sahin U, Gürlek B, Öztürk N, Unsal E. The efficacy of melatonin administration on oocyte quality. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Oct 13];28(2):91–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21770829>
 86. Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, et al. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women

- undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2014 May [cited 2014 Oct 13];30(5):359–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24628045>
87. Vázquez MI, Abecia J a, Forcada F, Casao a. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Sep 1 [cited 2014 Sep 30];74(4):618–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570337>
 88. Shi J-M, Tian X-Z, Zhou G-B, Wang L, Gao C, Zhu S-E, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J Pineal Res* [Internet]. 2009 Nov [cited 2014 Oct 13];47(4):318–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19817971>
 89. Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Nov 10];44(1):12–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507802>
 90. Mehaisen GMK, Saeed AM. In vitro development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin. *Zygote* [Internet]. 2013 Aug 28 [cited 2014 Nov 22];23:111–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23985360>
 91. Woo MMM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PCK. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4789–97.
 92. Maganhin CC, Fuchs LFP, Simões RS, Oliveira-Filho RM, de Jesus Simões M, Baracat EC, et al. Effects of melatonin on ovarian follicles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Sep 30];166(2):178–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102587>
 93. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [Review]. *Endocr J*. 2013;60(1):1–13.
 94. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski M a., Anisimov S V., Vesnushkin GM, Vinogradova I a. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2006;1757(5-6):573–89.
 95. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*. 2005;39(2):99–104.
 96. Tan D, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):181–97.
 97. Martinez GR, Almeida E a, Klitzke CF, Onuki J, Prado FM, Medeiros MHG, et al. Measurement of melatonin and its metabolites: importance for the evaluation of their biological roles. *Endocrine*. 2005;27(2):111–8.

98. Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: The resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res.* 2009;47(2):109–26.
99. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Nov 22];54(3):245–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998574>
100. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011;51(1):1–16.
101. Johns JR, Platts J a. Theoretical insight into the antioxidant properties of melatonin and derivatives. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2014 Oct 21 [cited 2014 Nov 10];12(39):7820–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164170>
102. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007;42(1):28–42.
103. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* [Internet]. 2009 Sep [cited 2014 Nov 9];81(3):445–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439728>
104. Nagai R, Watanabe K, Wakatsuki A, Hamada F, Shinohara K, Hayashi Y, et al. Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta. *J Pineal Res* [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Feb 2];45(3):271–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18373555>
105. Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, et al. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res.* 2009;47(2):192–200.
106. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Herrera F, Antolı I. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. 2004;1–9.
107. Eryilmaz OG, Devran A, Sarikaya E, Aksakal FN, Mollamahmutoğlu L, Cicek N. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Sep 30];28(9):815–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3169684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Gao C, Han HB, Tian XZ, Tan DX, Wang L, Zhou G Bin, et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *J Pineal Res.* 2012;52(3):305–11.
109. Succu S, Pasciu V, Manca ME, Chelucci S, Torres-Rovira L, Leoni GG, et al. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine

- embryos. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2014 May [cited 2014 Sep 30];81(8):1058–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24612696>
110. Zhao X-M, Min J-T, Du W-H, Hao H-S, Liu Y, Qin T, et al. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. *Zygote* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Jan 24];23(4):525–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24869483>
 111. Gottardi FP, Mingoti GZ. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprodução Anim Bras Reprod Anim*. 2009;33(2):82–94.
 112. Mingoti GZ. Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides. Universidade de São Paulo; 2000.
 113. Sirard M a., Richard F, Mayes M. Controlling Meiotic resumption in bovine oocytes: A review. *Theriogenology*. 1998;49(2):483–97.
 114. Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok a. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod*. 2000;62(2):292–302.
 115. Stojkovic M, Machado S a, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*. 2001;64(3):904–9.
 116. Salimi M, Sc M, Salehi M, Ph D, Farahani, Reza Masteri, Abadi MDM, Novin, Marefat Ghaffari, Nourozian M, et al. The Effect of Melatonin on Maturation , Glutathione Level and Expression of HMGB1 Gene in Brilliant Cresyl Blue (BCB) Stained Immature Oocyte. *Cell J*. 2014;15(4):294–301.
 117. Dehghani-Mohammadabadi M, Salehi M, Farifteh F, Nematollahi S, Arefian E, Hajjarizadeh A, et al. Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2014 Apr [cited 2014 Sep 30];31(4):453–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419931>
 118. Wei D, Zhang C, Zhang C, Xie J, Song X, Yin B, et al. Supplementation with low concentrations of melatonin improves nuclear maturation of human oocytes in vitro. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Sep 30];30(7):933–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3725229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 119. Kang J-T, Koo O-J, Kwon D-K, Park H-J, Jang G, Kang S-K, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res* [Internet]. 2009 Jan

- [cited 2014 Oct 13];46(1):22–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494781>
120. Sampaio R V, Conceição SDB, Miranda MS, Sampaio LDFS, Ohashi OM. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 30];10:1–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 121. Cebrian-Serrano a, Salvador I, Raga E, Dinnyes a, Silvestre M a. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Sep 30];48(5):738–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458773>
 122. Takada L, Martins Junior A, Mingoti GZ, Balieiro JCC, Cipolla-Neto J, Coelho L a. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res Vet Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Mar [cited 2014 Sep 30];92(1):124–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167539>
 123. Tsantarliotou MP, Attanasio L, Rosa A De, Boccia L, Pellerano G, Gasparrini B. The effect of melatonin on bovine in vitro embryo development. *Ital J Anim Sci*. 2007;6:488–9.
 124. Bahadori MH, Ghasemian F, Ramezani M, Asgari Z. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. *Iran J Reprod Med* [Internet]. 2013 Jan;11(1):11–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3941378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 125. Jin X, Gall C Von, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, et al. Targeted Disruption of the Mouse Mel 1b Melatonin Receptor. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):1054–60.
 126. El-Raey M, Geshi M, Somfai T, Kaneda M, Hirako M, Abdel-Ghaffar AE, et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Oct 13];78(4):250–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21381146>
 127. Zhao X-M, Hao H-S, Du W-H, Zhao S-J, Wang H-Y, Wang N, et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J Pineal Res* [Internet]. 2015 Oct 20 [cited 2016 Jan 24];In press. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485053>
 128. Byrne a T, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil*. 1999;117(1):97–105.
 129. Hao Y, Lai L, Mao J, Im G-S, Bonk A, Prather RS. Apoptosis and in vitro

- development of preimplantation porcine embryos derived in vitro or by nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2003;69(2):501–7.
130. Wang SJ, Liu WJ, Wu CJ, Ma FH, Ahmad S, Liu BR, et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). *Theriogenology* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2014 Sep 30];78(7):1517–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980085>
 131. Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*. 2001;56(01):1–16.
 132. Succu S, Pasciu V, Manca ME, Chelucci S, Torres-Rovira L, Leoni GG, et al. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;81(8):1058–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.032>
 133. Dehghani-Mohammadabadi M, Salehi M, Farifteh F, Nematollahi S, Arefian E, Hajjarizadeh A, et al. Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:453–61.
 134. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: Clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*. 2003;18(2):384–91.
 135. Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod*. 2004;19(12):2884–8.
 136. Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3246–52.
 137. Min S-H, Kim J-W, Lee Y-H, Park S-Y, Jeong P-S, Yeon J-Y, et al. Forced collapse of the blastocoele cavity improves developmental potential in cryopreserved bovine blastocysts by slow-rate freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Sep 16];49(4):684–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942049>
 138. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*. 2006;14(2):125–31.
 139. Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod*. 2003;18(1):137–9.

140. Iriarte YF, Morillo MJL, Lizana EO, Laso A. Pp-12 Artificial Collapse of Human Blastocysts, Before Vitrification, Improves Survival and Pregnancy Rates. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Sep 30];24:S9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472648312601448>
141. Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2001;16(5):909–17.
142. Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod*. 2002;17(2):393–406.
143. Kwak S-S, Cheong S-A, Jeon Y, Lee E, Choi K-C, Jeung E-B, et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Jul 1 [cited 2014 Sep 30];78(1):86–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445189>
144. Hara H, Yamane I, Noto I, Kagawa N, Kuwayama M, Hirabayashi M, et al. Microtubule assembly and in vitro development of bovine oocytes with increased intracellular glutathione level prior to vitrification and in vitro fertilization. 2013;22(April):476–82.
145. Morado S, Cetica P, Beconi M, Thompson JG, Dalvit G. Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. *Reproduction*. 2013;145(5):471–8.
146. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote* [Internet]. 2012 Aug [cited 2014 Sep 30];20(3):249–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729376>
147. Oksvold MP, Skarpen E, Widerberg J, Huitfeldt HS. Fluorescent histochemical techniques for analysis of intracellular signaling. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2002;50(3):289–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850432>
148. Afzal M, Matsugo S, Sasai M, Xu B, Aoyama K, Takeuchi T. Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2003 May 16 [cited 2016 Feb 2];304(4):619–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727198>
149. Barhoumi R, Bowen JA, Stein LS, Echols J, Burghardt RC. Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. *Cytometry* [Internet]. 1993;14(7):747–56. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cyto.990140707/asset/990140707_ftp.pdf?v=1&t=gm91j23i&s=b8819c38adcd52f43a8a88002fc793de1ea028da

150. Bentov Y, Esfandiari N, Burstein E, Casper RF. The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. *Fertil Steril* [Internet]. American Society for Reproductive Medicine; 2010;93(1):272–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.988>
151. Van Blerkom J, Davis P. Mitochondrial signaling and fertilization. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(11):759–70.
152. Zhang W, Liu Y, An Z, Huang D, Qi Y, Zhang Y. Mediating effect of ROS on mtDNA damage and low ATP content induced by arsenic trioxide in mouse oocytes. *Toxicol Vitro* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;25(4):979–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.009>
153. Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J Reprod Dev* [Internet]. 2014 Apr 24;60(2):92–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3999399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
154. Santos ECS, Sato D, Lucia T, Iwata H. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote* [Internet]. 2013;23(3):352–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199413000610
155. Poot M, Zhang YZ, Kramer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 1996;44(12):1363–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985128>
156. Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod*. 2002;66(4):1169–77.
157. Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;91(5 SUPPL.):2087–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.049>
158. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod*. 1997;56(5):1088–96.
159. Antunes G, Chaveiro a., Santos P, Marques a., Jin HS, da Silva FM. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(1):26–32.
160. Jurisicova a, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(2):93–8.
161. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(10):919–25.

162. Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*. 2008;69(1):17–22.
163. Steuerwald N, Barritt J a, Adler R, Malter H, Schimmel T, Cohen J, et al. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote* [Internet]. 2000;8(3):209–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014500>
164. Goossens K, Van Soom A, Van Poucke M, Vandaele L, Vandesompele J, Van Zeveren A, et al. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. *BMC Dev Biol*. 2007;7:64.
165. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75–85.
166. Luchsinger C, Arias ME, Vargas T, Paredes M, Sánchez R, Felmer R. Stability of reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data in bovine blastocysts produced by IVF, ICSI and SCNT. *Zygote* [Internet]. 2014;22(4):505–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731783>
167. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
168. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-Regulated Gene Expression in Bovine Blastocysts 1. *Liver*. 2004;1119(May):1108–19.
169. Wrenzycki C, Niemann H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2003 Dec [cited 2016 Feb 3];7(6):649–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748963>
170. Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 1992 Jan [cited 2016 Feb 3];4(5):547–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1299829>
171. Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, et al. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2016 Feb 3];68(2):223–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559924>
172. Gómez E, Caamaño JN, Bermejo-Alvarez P, Díez C, Muñoz M, Martín D, et al. Gene expression in early expanded parthenogenetic and in vitro fertilized bovine blastocysts. *J Reprod Dev* [Internet]. 2009;55(6):607–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700929>

173. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJM, Vos PLAM, Zeinstra EC, van der Weijden GC, et al. In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Feb 3];17(8):775–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476204>
174. Machado GM, Ferreira a. R, Pivato I, Fidelis a., Spricigo JF, Paulini F, et al. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2013;80(11):936–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22230>
175. Mehaisen GMK, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: morphological and molecular aspects. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Jan 24];10(10):e0139814. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4595475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
176. Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Sep 14];54(3):303–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23110400>
177. Fakruzzaman M, Ghanem N, Bang J Il, Ha AN, Lee KL, Sohn SH, et al. Effect of peroxiredoxin II on the quality and mitochondrial activity of pre-implantation bovine embryos. *Anim Reprod Sci*. 2015;159:172–83.
178. Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TCD, Franco MM, Dode MAN. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2008 Mar 3 [cited 2016 Feb 3];104(2-4):132–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350772>
179. Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Feb 4];21(8):681–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338849>
180. Luft JC, Dix DJ. Hsp70 expression and function during embryogenesis. [Internet]. *Cell stress & chaperones*. 1999. p. 162–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=312930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
181. Showell C, Conlon FL. Decoding development in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*. 2007;45(6):418–26.
182. Sakatani M, Bonilla L, Dobbs KB, Block J, Ozawa M, Shanker S, et al. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reprod Biol*

- Endocrinol [Internet]. Reproductive Biology and Endocrinology; 2013;11(1):3. Available from: <http://www.rbej.com/content/11/1/3>
183. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006;26(15):5688–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847323>
 184. Wu LL, Russell DL, Norman RJ, Robker RL. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m), and embryo development. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2012;26(4):562–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383462>
 185. Chen H-A, Chang Y-W, Tseng C-F, Chiu C-F, Hong C-C, Wang W, et al. E1A-Mediated Inhibition of HSPA5 Suppresses Cell Migration and Invasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2014;2:889–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25212833>
 186. Booth L, Roberts JL, Dent P. HSPA5/Dna K May Be a Useful Target for Human Disease Therapies. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2015;34(3):153–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689303>
 187. Zhang Y, Rohde LH, Wu H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Curr Genomics* [Internet]. 2009;10(4):250–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2709936/pdf/CG-10-250.pdf>
 188. Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, et al. The DNA Mismatch Repair Genes Msh3 and Msh6 Cooperate in Intestinal. *Cancer Res*. 2000;60:803–7.
 189. Hardman R a, Afshari C a, Barrett JC. Involvement of Mammalian MLH1 in the Apoptotic Response to Peroxide-induced Oxidative Stress Involvement of Mammalian MLH1 in the Apoptotic Response to Peroxide-induced Oxidative Stress. *Cancer Res*. 2001;61:1392–7.
 190. Menezo Y, Russo G, Tosti E, Mouatassim S El, Benkhalifa M. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(11):513–20.
 191. Albertini DF. Vanishing returns on the investment that is the ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(3):283–4.
 192. Orozco-Lucero E, Dufort I, Robert C, Sirard MA. Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. *Mol Reprod Dev*. 2014;81(1):31–41.
 193. Renaud SJ, Kubota K, Rumi MAK, Soares MJ. The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. *J Biol Chem*. 2014;289(8):5025–39.

194. Young MR, Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene*. 2006;379(1-2):1–11.
195. Tkach V, Tulchinsky E, Lukanidin E, Vinson C, Bock E, Berezin V. Role of the Fos family members, c-Fos, Fra-1 and Fra-2, in the regulation of cell motility. *Oncogene*. 2003;22(32):5045–54.
196. Kent LN, Rumi M a. K, Kubota K, Lee D-S, Soares MJ. FOSL1 Is Integral to Establishing the Maternal-Fetal Interface. *Mol Cell Biol*. 2011;31(23):4801–13.
197. de Oliveira Leme L, Dufort I, Spricigo JFW, Braga TF, Sirard M-A, Franco MM, et al. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro–produced bovine embryos. *Theriogenology* [Internet]. 2016;85(4):724–33.e1. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15005580>
198. Gu LH, Coulombe PA. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(1):13–23.
199. Pallari H-M, Eriksson JE. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE*. 2006;2006(366):pe53.
200. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2021–32.
201. Galarneau L, Loranger A, Gilbert S, Marceau N. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Exp Cell Res*. 2007;313(1):179–94.
202. Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA. Individual bovine invitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2015;83(2):228–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.019>
203. Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griesse J, et al. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *Reproduction*. 2009;137(3):415–25.
204. El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, et al. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics*. 2006;28:84–96.
205. Khan SN, Shaeib F, Najafi T, Kavdia M, Gonik B, Saed GM, et al. Diffused Intra-Oocyte Hydrogen Peroxide Activates Myeloperoxidase and Deteriorates Oocyte Quality. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(7):e0132388. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132388>
206. Ganji R, Nabiuni M, Faraji R. Development of mouse preantral follicle after in vitro culture in a medium containing melatonin. *Cell J* [Internet]. 2015;16(4):546–53. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4297493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
207. Ren L, Wang Z, An L, Zhang Z, Tan K, Miao K, et al. Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Jan 24];30(12):2892–911. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385791>
 208. Li Y, Zhang Z, He C, Zhu K, Xu Z, Ma T, et al. Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. *J Pineal Res* [Internet]. 2015;59(3):365–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12268>
 209. Holm, P, Schmidt, MH, Greve, T, Callesen H. 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*. 1999;52:683–700.
 210. Parrish, J J, Krogenaes, A, Susko-Parrish L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* [Internet]. 1995;44:859–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727781>
 211. Park S-H, Yu I-J. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on reactive oxygen species and glutathione of porcine oocytes, apoptosis of cumulus cells, and embryonic development. *Zygote* [Internet]. 2013;21(3):305–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23171604>
 212. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001;29(9):2002–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
 213. R statistical software version 3.0.2 [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>
 214. He C, Wang J, Li Y, Zhu K, Xu Z, Song Y, et al. Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. *J Pineal Res* [Internet]. 2015;58(3):300–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12216>
 215. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*. 2014;131–46.
 216. Baba, Kenkichi, Benleulmi-Chaachoua, Abla, Journé, Anne-Sophie, Kamal, Maud, Guillaume, Jean-Luc, Dussaud, Sébastien, Gbahou, Florence, Yettou, Katia, Liu, Cuimei, Contreras-Alcantara, Susana, Jockers, Ralf, Tosini G. Heteromeric MT1 /MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function. *Sci Signal* [Internet]. 2014;6(296):1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867265/pdf/nihms536842.pdf>
 217. Giancesini C, Hiragaki S, Laurent V, Hicks D, Tosini G. Cone Viability Is Affected

- by Disruption of Melatonin Receptors Signaling. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2016;57(1):94–104. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.15-18235>
218. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* [Internet]. 2008 Apr [cited 2014 Oct 13];44(3):280–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339123>
 219. Ge H, Tollner TL, Hu Z, Da M, Li X, Guan H, et al. Impaired mitochondrial function in murine oocytes is associated with controlled ovarian hyperstimulation and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(7):945–52.
 220. Reiter RJ, Tan D, Manchester LC, Qi W. Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen Species. A Review of the Evidence. *Cell Biochem Biophys*. 2001;34(2):237–56.
 221. Liebermann J, Matthews JM, Pawlowska E, Sanchez SR, Feinberg E, Sipe C. Is there any benefit in artificial collapse of human blastocysts prior to vitrification? *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Sep [cited 2014 Sep 30];98(3):S66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028212009697>

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA MELATONINA NA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

RESUMO

Técnicas modernas de reprodução animal permitiram ao Brasil tornar-se líder na produção de embriões bovinos. No entanto, um dos problemas da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a produção de espécies reativas de oxigênio. Para minimizar seus efeitos, antioxidantes geralmente são utilizados durante o processo. Estudos recentes demonstraram que a melatonina, devido a sua ação antioxidante, poderia melhorar a qualidade e criotolerância embrionária. Contudo, ainda não está claro qual é a melhor concentração e da fase da PIVE em que é mais necessária. Neste intuito, avaliou-se os efeitos da melatonina no meio de maturação e cultivo *in vitro* no desenvolvimento embrionário bovino sob diferentes concentrações (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). A melatonina a 10^{-9} M adicionada ao meio de cultivo aumentou a taxa de blastocistos de melhor qualidade com menor número de células apoptóticas. Além disso, verificou-se maior expressão de genes antioxidantes (SOD2), sem alteração na expressão de genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), placentação (KRT8) e expressão de genes ligados ao estresse celular (HSPB1). Esta mesma concentração adicionada no meio de maturação proporcionou melhor taxa de clivagem e um aumento quantitativo no número de embriões produzidos. Ao associar a melatonina a 10^{-9} M ao meio de maturação e cultivo, houve redução na taxa de blastocistos e aumento no número de células apoptóticas. Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a concentração ótima de melatonina e a etapa da produção *in vitro* de embriões que ela é utilizada interferem diretamente no desenvolvimento e na qualidade embrionária, sendo fundamental no cultivo *in vitro* para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário; PIVE; apoptose celular; SOD2.

INTRODUÇÃO

Em condições basais, as espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas durante o metabolismo aeróbico e participam dos processos fisiológicos para a manutenção

de várias funções biológicas e reprodutivas, atuando desde a capacitação espermática, na fertilização e durante a gestação ^{1,2}. Entretanto, a abundância de EROS pode ter efeitos deletérios sobre as funções celulares, pois ocorre desequilíbrio redox ³. As células são protegidas contra danos oxidativos induzidos por EROS por vários antioxidantes não enzimáticos ⁴ e enzimáticos tais como a glutatona (GSH) e a superóxido dismutase (SOD) ⁵.

Durante o cultivo *in vitro*, os embriões ficam expostos às altas concentrações de oxigênio ambiente, o que afeta negativamente o desenvolvimento embrionário precoce ^{6,7}. Nestas condições, ovócitos, espermatozoides e embriões são expostos às EROS, uma vez que, sem a proteção da tuba uterina, a produção de antioxidantes é reduzida e ocorre desequilíbrio redox ^{4,6}, causando efeitos deterioradores no reparo do DNA, na organização do fuso mitótico e na maturação do ovócito ⁷. Assim, é importante manter o equilíbrio do estado redox intracelular, proporcionando melhores condições para o desenvolvimento do embrião ³.

O estado oxidativo tem sido utilizado como metodologia para estimar o risco de danos oxidativos e disfunções associadas ao desenvolvimento do embrião. A detecção e mensuração do estresse oxidativo, direta ou indireta, utilizando medidas tais como a geração de EROS, quantidade de GSH intracelular, danos ao DNA ou expressão de genes ajudam a desenvolver estratégias para prevenir ou minimizar as disfunções oxidativas durante o desenvolvimento embrionário ^{3,8,9}.

A inclusão de antioxidantes ou eliminadores de radicais livres ao meio de maturação ^{10,11} e ao meio de cultivo pode reduzir o estresse oxidativo e promover melhores condições de desenvolvimento embrionário ^{12,13}. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) tem sido alvo de estudos para a produção *in vitro* de embriões humanos ^{14,15} e de animais como camundongos ^{12,16,17}, ovinos ¹⁸, suínos ^{19,20}, búfalos ²¹, coelhos ^{22,23} e bovinos ^{11,13,24,25}, pois atua diretamente sobre as EROS, estimula a ação de enzimas antioxidantes endógenas como a SOD, a glutatona redutase e a catalase, e inibe a ação de enzimas pró-oxidantes como a cicloxigenase ²⁶.

Entretanto, os resultados da atividade antioxidante e anti-apoptótica da melatonina no processo de PIVE variam, pois dependem da concentração e do momento que este antioxidante é adicionado.

Dessa forma, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de melatonina ao meio de maturação e/ou cultivo *in vitro* no desenvolvimento embrionário bovino por meio

da mensuração da taxa de blastocistos, glutational, espécies reativas de oxigênio, potencial da membrana mitocondrial, apoptose dos blastômeros e expressão de genes relacionados ao metabolismo, estresse oxidativo e placentação nos embriões produzidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de maturação, fecundação, CAP e cultivo utilizados neste estudo foram adquiridos da empresa Progest Biotecnologia em Reprodução e Saúde Animal Ltda, visto que cada lote é previamente testado com ovários de abatedouro.

Composição dos meios

Meio de maturação – Meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina (Gibco[®], Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA) e suplementado com 10% soro fetal bovino (v/v), 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL hormônio luteinizante (Lutropin-V[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 1 mg/mL hormônio folículo estimulante (Folltropin[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 75 µg/mL amicacina e 1mM cistamina.

Meio de fecundação – TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL albumina sérica bovina (BSA)-livre de ácidos graxos, 0,2 mM piruvato, 30 µg/mL heparina, 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina e 75 µg/mL amicacina.

Meio CAP – Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2 mM piruvato e 75 µg/mL amicacina.

Meio de cultivo – SOFaa ²⁷ suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 2,5% soro fetal bovino (v/v), 5 mg/mL BSA-livre de ácido graxo, 75 µg/mL amicacina.

Preparação da solução estoque de Melatonina

Para os Experimentos 1 e 2, utilizou-se solução estoque a 0,01mM e, 1µM para o Experimento 3. Ambas foram produzidas pela diluição da melatonina (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) em água milliQ e armazenadas a -20°C protegidas da luz. As

concentrações desejadas foram obtidas através da adição de solução estoque ao meio de maturação e/ou de cultivo no momento do uso (ANEXO E).

Seleção de ovócitos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos de raças azebuadas foram coletados em abatedouros locais e transportados em solução salina (0,9%) a 35°C para o laboratório e processados em até 4 horas. No laboratório, os complexos cumulus ovócitos (CCO's) foram aspirados de folículos com 3 a 8 mm de diâmetro com o auxílio de seringas e agulhas 40x12mm, armazenados em tubos cônicos de poliestireno com capacidade de 15 mL e mantidos em banho-maria a 36°C por 10 minutos para decantação.

Grupos de 30 a 35 CCO's com qualidade grau 1 e 2, segundo Stojkovic et al. ²⁸ (ANEXO B), foram selecionados e incubados em gotas de 200 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placa de petri (Corning, Nova Iorque, Estados Unidos da América), por 22 a 24 horas em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

Fecundação *in vitro*

Após o período de maturação, os CCO's foram lavados em meio de fecundação e transferidos para placas com gotas de 200 µL do mesmo meio e cobertas com óleo mineral.

Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se sêmen comercial convencional congelado de touro da raça Nelore com fertilidade *in vitro* conhecida e testada. Após descongelação em banho-maria a 35°C por 30 segundos, motilidade e vigor foram avaliados, depositado sobre a coluna de gradiente Percoll 45-90% ²⁹ e centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. O sedimento de espermatozoides foi ressuspensionado em 1 mL de meio CAP e novamente centrifugado a 9000 rpm por 3 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 100 µL de meio de fecundação. A motilidade e o vigor foram avaliados após descongelação e processamento do sêmen. Cada gota foi fertilizada com a concentração final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides vivos/mL. Após a fertilização, as placas foram incubadas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 18 horas.

Cultivo *in vitro* dos embriões

Os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados por sucessivas pipetagens, lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de cultivo sob óleo mineral por sete dias a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

Após 72 horas de cultivo, avaliou-se a taxa de clivagem e a metade do meio de cultivo de cada gota foi substituída. A qualidade morfológica dos embriões de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, ANEXO D) e a taxa de blastocistos foram avaliadas após sete dias (D7), sendo o dia zero (D0) o dia da FIV.

Mensuração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) e glutathiona (GSH)

A concentração intracelular de EROS e GSH foi mensurada em ovócitos após 24 horas de maturação com retirada das células do cumulus (Experimento 1) e em blastocistos de sete dias (Experimento 3), de acordo com metodologia previamente descrita por Park e Yu ³⁰ com algumas modificações detalhadas a seguir.

Para avaliação de EROS e GSH utilizou-se o Diacetato de 6-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA, Molecular Probes®, Eugene, OR) e 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxycoumarina (Cell Tracker™ Blue CMF₂HC, Molecular Probes®, Eugene, OR), respectivamente.

Os ovócitos e os embriões foram lavados em 0,1% de álcool polivinílico em tampão fosfato-salino (PBS-PVA) e incubados a 38,5°C no escuro por 30 minutos com 10 mM H2DCFDA e 10 mM Cell Tracker Blue. Após incubação, as estruturas foram lavadas novamente com PBS-PVA, depositadas sobre lâminas de vidro com ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) e cobertas com lamínula para observação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão) nos filtros com comprimento de onda de 460 nm para EROS e 370 nm para GSH.

As imagens das estruturas foram salvas em formato TIFF por meio de câmera acoplada (Olympus SC30, Tóquio, Japão) ao microscópio de epifluorescência, sendo padronizado o tempo de exposição e intensidade luminosa. A intensidade da fluorescência dos ovócitos e embriões foi analisada individualmente pelo software Image J (versão 1.46; National Institutes of Health, Bethesda, MD) e normalizada para o grupo controle e

definida como valor numérico 1.0. A intensidade de fluorescência relativa das estruturas foi considerada diretamente proporcional às concentrações de EROS e GSH.

Mensuração do potencial da membrana mitocondrial (PMM)

No Experimento 1, o potencial da membrana mitocondrial dos ovócitos após 24 horas de maturação *in vitro* foi mensurado por meio do indicador de fluorescência da atividade mitocondrial (tiol-clorometil) de acordo com metodologia anteriormente descrita por Santos et al.³¹. Os ovócitos foram desnudados, lavados em PBS-PVA e mantidos a 38,5°C durante 30 min em PBS/PVA com $C_{24}H_{24}Cl_2N_2O$ a 0,5 μ M (MitoTracker Orange CMTMRos[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Na sequência, os ovócitos foram lavados em PBS/PVA, fixados em paraformaldeído 3,7% por 24 horas a 4°C, protegidos de luz. Posteriormente, foram novamente lavados em PBS/PVA, depositados em lâminas de vidro com ProLong[®]Gold (Molecular Probes, Eugene, OR), cobertos por lamínula e examinados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão) com o filtro de comprimento de onda de 550 nm. A obtenção das imagens e a análise da intensidade de luz emitida por cada ovócito foram realizadas como previamente descrito para EROS e GSH.

Análise de células apoptóticas

A apoptose dos blastômeros foi detectada pela técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) por meio do conjunto comercial *In Situ* Cell Death Detection (Roche, Mannheim, Germany). Os grupos foram preparados de acordo com metodologia do fabricante: tratamentos, controle positivo e controle negativo. Os blastocistos (D7) foram lavados em 0,1% de polivinilpirrolidona em tampão fosfato-salino (PBS-PVP) e depois fixados em paraformaldeído 3,7% diluído em PBS-PVP por 1 hora em temperatura ambiente. Logo depois, foram incubados em solução permeabilizadora de membrana (PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e citrato de sódio) por 1 hora a 4°C. Em seguida, o grupo controle positivo foi incubado em solução DNase por 1 hora em câmara úmida a 37°C, enquanto que os demais grupos permaneceram em PBS-PVP sob placa aquecedora a 37°C. Posteriormente, os grupos foram incubados para reação TUNEL (grupos tratados e positivo em solução

enzimática e marcadora (1:9); grupo negativo apenas na solução marcadora) por 1 hora em câmara úmida a 37°C protegida da luz. A seguir, todos os grupos foram incubados em solução Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) durante 10 minutos, protegidos de luz. Utilizou-se ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) durante a montagem das lâminas e lamínulas para observação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão). Entre cada etapa, os grupos foram lavados em três gotas de PBS-PVP, permanecendo 2 minutos na última gota. O núcleo das células TUNEL positivas, ou seja, com DNA fragmentado, foram visualizadas em verde fluorescente no filtro de comprimento de onda de 450 nm. O núcleo de todas as células foi corado com azul fluorescente no filtro de comprimento de onda 365 nm. Todas as células marcadas em ambos os filtros foram contadas para mensuração do número total de células e número de células apoptóticas dos embriões de cada grupo.

Preparo de amostras, extração de RNA e produção do cDNA

Os blastocistos (D7) foram lavados em PBS sem cálcio e magnésio e transferidos com 2 µL deste PBS e 4 µL de RNAlater (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para microtubos de polipropileno livre de DNase e RNase de 0,5 mL. Após incubação a 4°C durante 12 horas, procedeu-se o armazenamento a -20°C até a extração do RNA.

A viabilidade embrionária foi avaliada pela expressão de cinco genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), estresse oxidativo (HSPB1, SOD2) e à placentação (KRT8), pelo método de transcrição reversa quantitativa em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Para mensuração da expressão dos genes analisados foram utilizados três *pools* de 15 blastocistos para cada tratamento.

O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O volume total de RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA por meio do conjunto comercial First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) – SuperScript® III (200 U/µL) e primer Oligo-dT (0,5 µg/µL) no volume final de 40 µL. As reações foram realizadas a 65°C por 5 minutos e 50°C por 50 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85°C por 5 minutos. A análise do qPCR foi realizada usando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (76 – 110%)

por cálculos usando as curvas padrões relativas do programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL usando cDNA correspondente a 0,5 embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e anelamento a 60°C por 30 segundos. O nome, a sequência e concentração do primer, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Informação para primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise PCR quantitativo em tempo real

Gene	Sequência do Primer	Tamanho de amplicon (bp)	Concentração do Primer (nM)	GeneBank N° de acesso/referência
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2
SLC2A1	F: CAG GAG ATG AAG GAG GAG AGC R: CAC AAA TAG CGA CAC GAC AGT	258	250	BT029806
SLC 2A3	F: ACT CTT CAC CTG ATT GGC CTT GGA R: GGC CAA TTT CAA AGA AGG CCA CGA	145	300	NM_174603.3
KRT8	F: TGT GAA GAA GAT TGA GAC CCG CGA R: AAA CCT CAG GTC TCC TGT GCA GAT	160	300	X12877 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
SOD2	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT	135	300	NM_201527
HSPB1	F: CTG GAC GTC AAC CAC TTC R: GGA CAG AGA GGA GGA GAC	180	250	NM_001025569.1

GAPDH=glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SLC2A1=Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1; SLC2A3=Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3; KRT8=Keratin 8; SOD2=Bos taurus superoxide dismutase 2; HSPB1=Bos taurus heat shock 27kDa protein 1. F: *primer forward*; R: *primer reverse*

O nível de expressão dos três genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -Actin (ACTB) e Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) foi submetido ao programa de análise GeNorm, que indicou o GAPDH como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl³².

Delineamento experimental

Experimento 1 - Efeito da melatonina adicionada ao meio de maturação no desenvolvimento embrionário bovino in vitro

Após a seleção, 1.028 CCO's oriundos de quatro coletas, foram aleatoriamente distribuídos em quatro diferentes condições de maturação. Os grupos de 30 a 35 CCO's foram colocados em gotas de 200 µL de meio de maturação sem adição de melatonina (Controle) e suplementado com diferentes concentrações de melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M), representadas pelos tratamentos: MIV+M 10^{-7} , MIV+M 10^{-9} e MIV+M 10^{-11} , respectivamente. Todas as gotas foram fecundadas e posteriormente cultivadas por sete dias. No terceiro dia de cultivo (D3), avaliou-se a taxa de clivagem de todos os grupos e a metade do meio de cultivo de cada gota foi substituída. Após sete dias de cultivo, avaliou-se a taxa e a qualidade morfológica dos blastocistos, segundo a IETS.

A mensuração de espécies reativas de oxigênio e glutatona foi realizada em ovócitos após 24 horas de maturação com retirada das células do cumulus, utilizando 38 ovócitos por tratamento, provenientes de três coletas.

Para estimar o potencial de desenvolvimento embrionário mediante avaliação do potencial da membrana mitocondrial, foram realizadas três coletas, totalizando 140 ovócitos grau 1 e 2, que foram divididos aleatoriamente entre os tratamentos e maturados por 24 horas.

Experimento 2 - Efeito da melatonina adicionada ao meio de cultivo no desenvolvimento embrionário bovino in vitro

Após maturação e fecundação, os possíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente em quatro diferentes condições de cultivo. Os grupos (30 a 35 estruturas) foram transferidos para gotas de 200 µL de meio de cultivo sem melatonina (Controle) e suplementado com diferentes concentrações de melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M), representadas pelos tratamentos: CIV+M 10^{-7} , CIV+M 10^{-9} , CIV+M 10^{-11} , respectivamente. Após 72 horas (D3), avaliou-se a taxa de clivagem de todos os grupos e a metade do meio de cultivo contendo as concentrações especificadas foi substituída. Após sete dias de cultivo (D7), avaliou-se a taxa e a qualidade morfológica dos blastocistos grau I e II, segundo a IETS. Este experimento utilizou um total de 900 ovócitos grau 1 e 2, provenientes de três coletas.

As análises de espécies reativas de oxigênio e glutatona utilizaram 15 blastocistos de sete dias (grau I e II) por tratamento, provenientes de duas coletas.

O número total de células e o número de células apoptóticas dos blastocistos (D7) foram avaliados pela técnica TUNEL. Esta análise foi realizada a partir de duas coletas, totalizando 20 embriões grau I e II de cada tratamento.

Experimento 3 - Efeito da melatonina adicionada ao meio de maturação e cultivo no desenvolvimento embrionário bovino in vitro

Após avaliação de desenvolvimento embrionário e análises do potencial da membrana mitocondrial e células apoptóticas, os melhores resultados obtidos nos Experimentos 1 (MIV+M10⁻⁹) e Experimento 2 (CIV+M10⁻⁹) foram associados ao meio de maturação e cultivo (MIV/CIV+M10⁻⁹) para comparação com o grupo controle. Devido às variações intrínsecas do sistema de PIVE, os tratamentos MIV+M10⁻⁹ e CIV+M10⁻⁹ foram incluídos neste experimento. No dia três do cultivo (D3), avaliou-se a taxa de clivagem de todos os grupos e a metade do meio de cultivo contendo as concentrações especificadas de melatonina foi substituída. Após sete dias de cultivo (D7), avaliou-se a taxa e a qualidade morfológica dos blastocistos segundo a IETS. Este experimento utilizou 839 ovócitos grau 1 e 2, oriundos de três coletas, que foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos.

A apoptose celular e o número total de células dos blastocistos (D7) de cada tratamento foram avaliados pela técnica TUNEL. Esta análise utilizou 64 embriões grau I e II provenientes de duas coletas.

A viabilidade embrionária foi analisada pela expressão de cinco genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), estresse oxidativo (HSPB1, SOD2) e à placentação (KRT8), pelo método de reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo (RT-qPCR). Esta avaliação usou três *pools* de 15 blastocistos grau I e II para cada tratamento, oriundos de três coletas.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R versão 3.0.2³³ a 5% de significância.

Os dados que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, ou foram submetidos à transformação logarítmica (espécies reativas de oxigênio, glutathiona, potencial da membrana mitocondrial) ou comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (abundância relativa da expressão gênica). A média do número total de células, número de células apoptóticas, potencial da membrana mitocondrial foi comparada entre os tratamentos pelo teste de Tukey. As variáveis taxa de clivagem, blastocistos e qualidade embrionária entre os tratamentos foram comparadas pelo teste qui-quadrado. Os dados quantitativos foram apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média) e os qualitativos em porcentagem.

RESULTADOS

Experimento 1

A adição de melatonina ao meio de maturação nas concentrações 10^{-9} e 10^{-11} M aumentou significativamente ($P < 0,05$) a taxa de clivagem embrionária, mas não possibilitou melhora na taxa de blastocistos. Entretanto, a qualidade morfológica dos blastocistos foi reduzida na concentração 10^{-11} M ($P < 0,05$; Tabela 2).

TABELA 2 - Desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* sob efeito da melatonina suplementada ao meio de maturação em diferentes concentrações (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M)

Tratamentos	Nº de ovócitos	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocisto (%)	Qualidade de Blastocistos (%)	
				Grau I	Grau II
Controle	254	75,6 (192/254) ^b	39,8 (101/254)	40,6 (41/101) ^{ab}	38,6 (39/101) ^b
MIV+M 10^{-7}	260	74,6 (194/260) ^b	36,2 (94/260)	27,7 (26/94) ^b	36,2 (34/94) ^b
MIV+M 10^{-9}	253	88,9 (225/253) ^a	42,3 (107/253)	43,0 (46/107) ^a	34,6 (37/107) ^b
MIV+M 10^{-11}	261	83,1 (217/261) ^a	44,4 (116/261)	10,3 (12/116) ^c	69,0 (80/116) ^a

^{a,b,c} Na mesma coluna ($P < 0,05$) pelo teste Qui-quadrado. Experimento realizado em quadruplicata.

Na Figura 1 estão os dados relativos às quantidades de GSH e EROS detectadas após 24 horas de maturação. Os ovócitos submetidos ao tratamento MIV+M 10^{-9} mostraram quantidade significativamente maior de GSH ($P < 0,001$), enquanto que o tratamento MIV+M 10^{-7} apresentou a menor quantidade de EROS ($P < 0,001$).

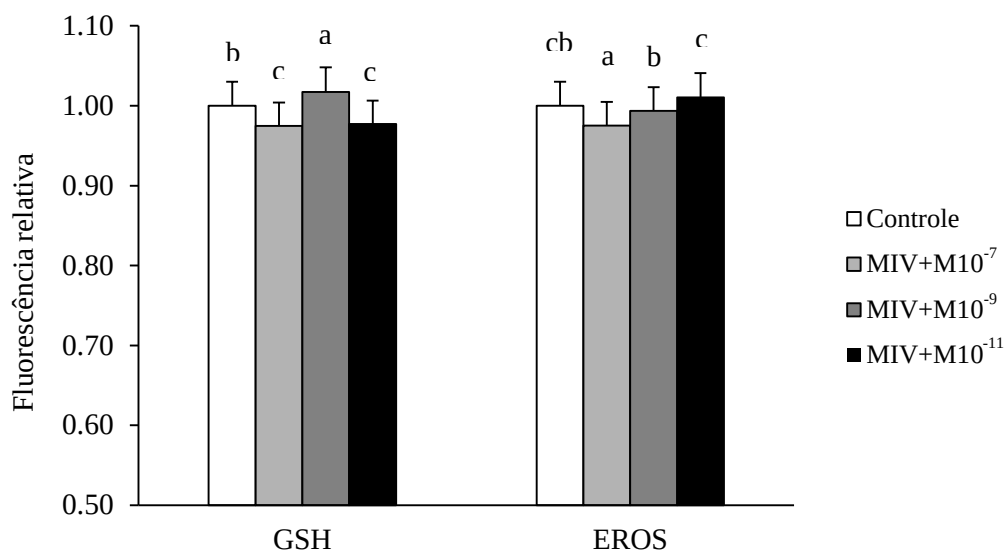


FIGURA 1 - Concentrações de glutatona (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROS) em ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas sem melatonina (Controle) e suplementados com melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). O experimento foi replicado três vezes ($n = 152$). $P < 0,001$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.

O grupo MIV+M10⁻⁹ e controle apresentaram maior PMM e diferiram dos demais tratamentos ($P < 0,001$; Figura 2).

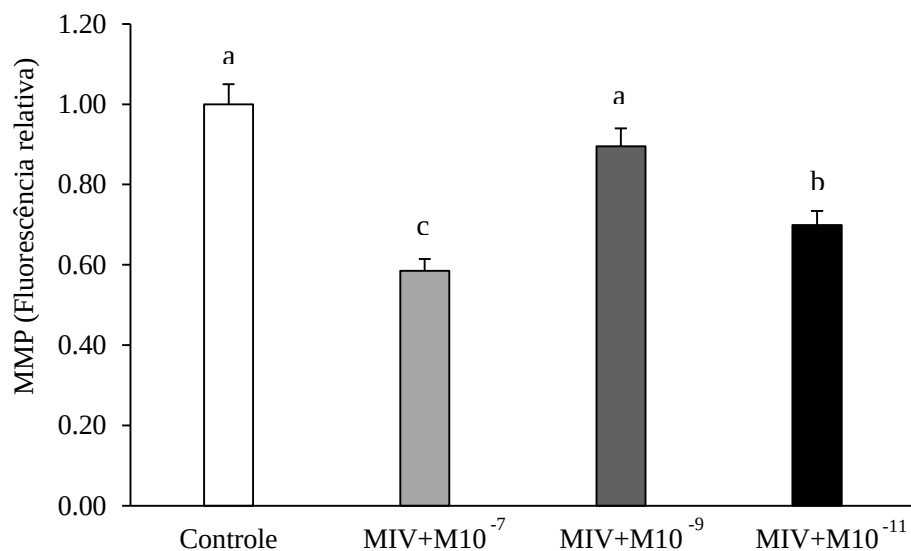


FIGURA 2 - Potencial da membrana mitocondrial (PMM) em ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas sem melatonina (Controle) e suplementados com melatonina (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M). As análises foram realizadas em triplicata ($n = 140$). $P < 0,001$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.

Experimento 2

A suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo aumentou a taxa de clivagem e de blastocistos, sendo superior ao CIV+M10⁻⁷ e CIV+M10⁻¹¹ na clivagem e, ao controle e CIV+M10⁻¹¹ na produção de blastocistos ($P < 0,05$). Além disso, porcentagem de embriões com a qualidade grau I foi maior nos tratamentos CIV+M10⁻⁷ e CIV+M10⁻⁹ ($P < 0,05$; Tabela 3).

TABELA 3 - Desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* sob efeito da melatonina suplementada ao meio de cultivo em diferentes concentrações (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M)

Tratamentos	Nº de ovócitos	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocisto (%)	Qualidade de Blastocistos (%)	
				Grau I	Grau II
Controle	221	79,6 (176/221) ^{ab}	37,1 (82/221) ^{bc}	39,9 (32/82) ^c	34,1 (28/82)
CIV+M10 ⁻⁷	223	75,8 (169/223) ^{bc}	43,5 (97/223) ^{ab}	56,7 (55/97) ^{ab}	28,9 (28/97)
CIV+M10 ⁻⁹	228	84,2 (192/228) ^a	47,4 (108/228) ^a	57,4 (62/108) ^{ab}	27,8 (30/108)
CIV+M10 ⁻¹¹	228	70,6 (161/228) ^c	31,1 (71/228) ^c	50,7 (36/71) ^{bc}	35,2 (25/71)

^{a,b,c} Na mesma coluna ($P < 0,05$) pelo teste Qui-quadrado. Experimento realizado em triplicata.

A análise TUNEL de blastocistos apresentou menor NCA na concentração de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo em relação ao controle ($P < 0,05$), mas não alterou o NTC em nenhum dos tratamentos (Tabela 4).

TABELA 4 - Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA) de embriões produzidos *in vitro* com suplementação de diferentes concentrações de melatonina no meio de cultivo (0, 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M) detectados pela técnica TUNEL

Tratamentos	Nº de blastocistos	NTC	NCA	NCA/NTC (%)
Controle	20	115,9 $\pm$ 4,0	6,1 $\pm$ 0,6 ^b	5,26 ^b
CIV+M10 ⁻⁷	20	115,1 $\pm$ 3,8	6,3 $\pm$ 0,5 ^b	5,47 ^b
CIV+M10 ⁻⁹	20	103,3 $\pm$ 4,1	3,8 $\pm$ 0,6 ^a	3,68 ^a
CIV+M10 ⁻¹¹	20	111,4 $\pm$ 4,0	5,1 $\pm$ 0,6 ^{ab}	4,58 ^{ab}

^{a,b} Na mesma coluna ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas em duplicata.

Experimento 3

Ao associar os resultados que se destacaram na produção de embriões nos Experimentos 1 e 2, observou-se maior taxa de blastocisto ($P < 0,05$) com melhor

qualidade (grau I; $P = 0,0219$) quando a concentração 10^{-9} M foi adicionada apenas ao meio de cultivo (Tabela 5).

TABELA 5 - Efeito da melatonina a 10^{-9} M ao meio de maturação e/ou cultivo no desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*

Tratamentos	Nº de ovócitos	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocisto (%)	Qualidade Blastocistos (%)	
				Grau I	Grau II
Controle	216	83,3 (180/216)	41,7 (90/216) ^b	35,6 (32/90) ^b	34,4 (31/90)
MIV+M10 ⁻⁹	201	86,6 (174/201)	47,3 (95/201) ^{ab}	44,2 (42/95) ^b	31,6 (30/95)
CIV+M10 ⁻⁹	216	82,9 (179/216)	52,8 (114/216) ^a	52,6 (60/114) ^a	28,9 (33/114)
MIV/CIV+M10 ⁻⁹	206	79,6 (164/206)	42,2 (87/206) ^b	46,0 (40/87) ^b	36,8 (32/87)

^{a,b} Na mesma coluna ($P < 0,05$) pelo Teste Qui-quadrado. Experimento realizado em triplicata.

A concentração de GSH dos blastocistos foi maior no grupo CIV+M10⁻⁹ quando comparado ao grupo MIV+M10⁻⁹. Contudo, a produção de EROS do grupo suplementado simultaneamente no meio de maturação e cultivo (MIV/CIV+M10⁻⁹) foi superior aos demais tratamentos ($P < 0,05$; Figura 3).

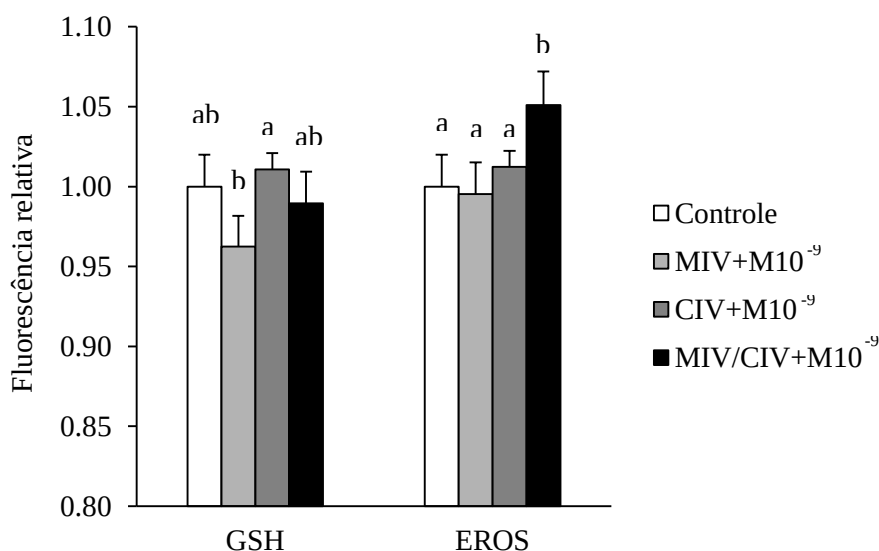


FIGURA 3 – Concentrações de glutathiona (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROS) em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* com melatonina a 10^{-9} M. O experimento foi realizado em duplicata ($n = 60$). $P < 0,05$ (dados transformados em Log (x), teste de Tukey). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.

Quando a melatonina foi adicionada aos meios na mesma concentração (10^{-9} M), a análise TUNEL detectou menor NCA nos blastocistos produzidos *in vitro* com

suplementação no meio de cultivo quando comparado aos demais tratamentos ($P < 0,05$; Tabela 6).

TABELA 6 - Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA) de embriões produzidos *in vitro* com suplementação de melatonina a 10^{-9} M detectados pela técnica TUNEL

Tratamentos	Nº de blastocistos	NTC	NCA	NCA/NTC (%)
Controle	16	135,0 $\pm$ 7,2	6,5 $\pm$ 0,6 ^b	4,81 ^b
MIV+M10 ⁻⁹	15	130,6 $\pm$ 6,7	5,3 $\pm$ 0,6 ^b	4,06 ^b
CIV+M10 ⁻⁹	18	116,6 $\pm$ 5,0	3,0 $\pm$ 0,5 ^a	2,57 ^a
MIV/CIV+M10 ⁻⁹	15	130,2 $\pm$ 7,3	5,4 $\pm$ 1,0 ^b	4,15 ^b

^{a,b} Na mesma coluna ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas em duplicata.

O gene SOD2 obteve maior abundância relativa de RNAm no grupo tratado com melatonina a 10^{-9} M no cultivo que no grupo controle. A expressão de genes relacionados ao metabolismo celular (SLC21, SLC2A3), estresse oxidativo (HSPB1) e placentação (KRT8) não diferiu entre os tratamentos (Figura 4).

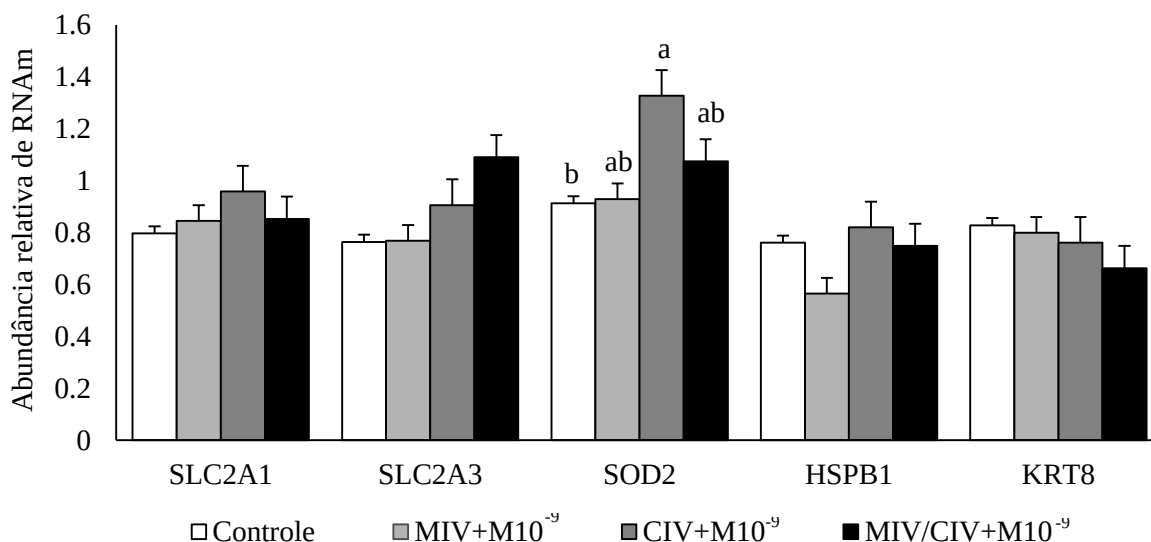


FIGURA 4 - Abundância relativa de RNAm (média $\pm$ erro padrão) dos genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), estresse oxidativo (SOD2, HSPB1) e placentação (KRT8) em blastocistos em D7 (3 *pools* com 15 Bl cada um) cultivados sem melatonina (Controle) e com melatonina a 10^{-9} M na maturação (MIV+M10⁻⁹), no cultivo (CIV+M10⁻⁹) ou em ambos (MIV/CIV+M10⁻⁹). ^{a, b} $P < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).

DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi o benefício da melatonina, quando adicionada ao meio de cultivo na concentração 10^{-9} M, no aprimoramento da PIVE pela melhora significativa na quantidade e preservação da qualidade de embriões. A maior expressão do gene SOD2, associado à alta concentração de glutathione, fortalecem a afirmação a respeito do impacto da melatonina sobre o combate de EROS durante o desenvolvimento embrionário, confirmado pelo aumento na taxa de embriões com qualidade grau I devido a significativa redução no NCA.

A melatonina na concentração apropriada propiciou a manutenção do equilíbrio redox do ambiente intracelular permitindo que a expressão metabólica e gênica favorecesse o desenvolvimento embrionário. No entanto, o contrário também foi observado em decorrência do excesso ou insuficiência da melatonina, seja pela inadequada concentração ou pelo momento da PIVE em que foi adicionada. Estes dados fornecem informações adicionais da ampla função da melatonina, assim como seu potencial papel crioprotetor em ovócitos e embriões produzidos *in vitro*, uma vez que esta aptidão para a produção de embriões de alta qualidade possibilitará maior sobrevivência pós-criopreservação e consequente aumento no número de gestações.

Durante o cultivo *in vitro*, os embriões são expostos a um ambiente de alta tensão de oxigênio ⁷ e estão sujeitos a ação das EROS devido a ausência da proteção da tuba uterina ^{4,6}. Assim, as defesas antioxidantes inatas em embriões cultivados *in vitro* são insuficientes para proteger contra o estresse oxidativo que, em excesso provocam danos nos embriões pré-implantação ^{6,7}. Este conhecimento foi determinante para a condução de pesquisas a cerca de uso de antioxidantes e moléculas que atuem na proteção contra a ação das EROS. A melatonina tem diversos efeitos fisiológicos ligados à sua ação hormonal ou regulatória, mas seu uso na produção *in vitro* de embriões é devido a capacidade de eliminar radicais livres, atuar como antioxidante e como agente anti-apoptótico. Estudos utilizando melatonina ao meio de cultivo têm sido relatados como fator chave para melhorar as condições de cultivo *in vitro* de embriões pré-implantação ^{12,34}.

A suplementação de melatonina apenas no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) aumentou 26,6% e 25,1% a taxa de blastocistos de melhor qualidade em relação ao grupo controle e ao grupo MIV/CIV+M 10^{-9} , respectivamente, e também apresentou o menor NCA entre os grupos. A maior expressão do gene anti-apoptótico SOD2 em relação ao

grupo controle, associada à GSH presente nos ovócitos, controlaram os efeitos das EROS durante o desenvolvimento embrionário, além de propiciar uma reserva de GSH em embriões pré-implantação. Assim como neste estudo, outras pesquisas com embriões bovinos cultivados com melatonina na mesma concentração obtiveram maior produção e eclodibilidade de blastocistos, refletindo em melhor qualidade embrionária ¹³. Estudos *in vivo* com ratas que receberam injeção intraperitoneal de melatonina demonstraram que a concentração de melatonina utilizada na produção *in vitro* de embriões coincide com a concentração necessária para a implantação de blastocistos, uma vez que o receptor de membrana para melatonina MT2 é expresso no útero no início da gestação ³⁵. Assim, os benefícios da adição da melatonina ao meio de CIV relacionam-se à cinética de desenvolvimento *in vitro* de embriões e à melhor a qualidade dos blastocistos ³⁶. Sugere-se que a ação da melatonina está muito além da função antioxidante, ritmo circadiano e controle sazonal da reprodução, regulando também processos fisiológicos locais como a ovulação ³⁵.

Além da proteção de agentes não enzimáticos contra os danos oxidativos induzidos pelas EROS, as células são protegidas por um sistema enzimático que inclui a superóxido dismutase (SOD), responsável por transformar o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio ^{37,38}. A melatonina atua a favor deste sistema, como captadora de radicais livres, eliminando diretamente as EROS ^{39,40}, aumentando a expressão de genes de enzimas antioxidantes como a SOD e GSH ⁴¹ e inibindo a ação de enzimas pró-oxidativas para reduzir estresse oxidativo celular ⁴⁰.

A associação da melatonina a 10^{-9} M no meio de maturação e cultivo (MIV/CIV+M 10^{-9}) resultou em menor taxa de blastocistos e maior NCA que o grupo suplementado com melatonina apenas durante o cultivo. Assim como neste estudo, Wang et al. ¹³ verificaram que a associação de altas concentrações de melatonina no meio de maturação e cultivo reduziu a produção de blastocistos bovinos. Três hipóteses podem ser avaliadas para o aumento de EROS no MIV/CIV+M 10^{-9} : i) decorrente da falha na metilação da citosina do DNA com consequente disfunção mitocondrial; ii) em virtude da indisponibilidade de receptores de membrana para melatonina durante o cultivo, uma vez que já haviam sido ocupados durante a maturação e, assim deixou de exercer uma de suas vias de atuação, dificultando a manutenção do equilíbrio redox; iii) consequente da lesão dos receptores pelas EROS durante o desenvolvimento embrionário, minimizando a ação da melatonina. De forma similar ao observado em camundongos em que a melatonina

modula a sensibilidade dos cones, células fotorreceptivas da retina, pela ativação dos receptores MT1 e MT2 ⁴², mas que durante o envelhecimento animal ocorre ruptura nestes receptores e, consequentemente, redução no número de fotorreceptores ⁴³.

A qualidade de embriões cultivados com melatonina em concentração ótima está intimamente relacionada com aumento da concentração de GSH ⁴¹ e redução na produção de EROS e apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário ¹². Tamura et al. ⁴⁴ sugerem que a interação da melatonina com EROS é um processo prolongado que envolve muitos dos seus metabólitos, o que faz da melatonina altamente eficaz na proteção de células de estresse oxidativo.

Dessa forma, embora a apoptose durante o desenvolvimento pré-implantação do embrião desempenhe papel fundamental na eliminação de células defeituosas, dependendo das condições de cultivo, pode induzir à maior perda de células normais ^{45,46}. Caso a apoptose ocorra de forma desproporcional, pode reduzir a viabilidade e o potencial de desenvolvimento do embrião ⁴⁵.

O processo da maturação é essencial para o desempenho da PIVE, pois é quando o ovócito torna-se capaz de ser fecundado, suportar o desenvolvimento embrionário e induzir a gestação ⁴⁷. Diante disso, esta pesquisa também avaliou diferentes concentrações de melatonina suplementadas no meio de maturação e de cultivo.

No Experimento 1, a suplementação de melatonina a 10^{-9} M e a 10^{-11} M no meio de maturação aumentou a taxa de clivagem em 17,6% e 9,9%, respectivamente. Similarmente, Tian et al. ¹¹ encontraram melhores resultados na maturação de ovócitos bovinos nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-9} M, assim como o aumento na expressão de genes relacionados à maturação ovocitária (GDF9, MARF1, DNMT1a) e à expansão das células do cumulus (PTX3, HAS1/2) devido a presença de receptores para melatonina encontrados nos ovócitos, células do cumulus e células da granulosa.

Não foi detectada diferença estatística da melatonina suplementada ao meio de maturação sobre a produção de blastocistos. No entanto, um aumento de 5,5% embriões proporcionado pelo tratamento MIV+M 10^{-9} com blastocistos de melhor qualidade em relação ao controle é representativo quanto ao resultado biológico de prenhez. Ao contrário, Sampaio et al. ⁴⁸ adicionaram este antioxidante em baixas concentrações (1 pM) e obtiveram resultados benéficos talvez porque a maior parte da resposta no receptor MT1 ocorre em baixas concentrações ⁴⁹.

Apesar do grupo MIV+M10⁻⁷ produzir menor quantidade de EROS, também apresentou menor PMM e GSH, o que contribuiu para menor taxa de clivagem e menor produção de blastocistos de grau I. Elevadas concentrações de glutathione estão relacionadas à melhor eficiência da maturação até a formação do blastocisto^{11,50}. Sabe-se que a manutenção do equilíbrio redox intracelular é fundamental para proporcionar ambientes adequados para a expressão metabólica e gênica durante o desenvolvimento embrionário³.

O PMM em ovócitos maturados foi maior no grupo MIV+M10⁻⁹ e controle. No entanto, foi incapaz de superar o estresse oxidativo gerado pelo sistema durante o desenvolvimento embrionário. A relação positiva entre PMM e ovócitos maturados foi observada neste estudo pelo grupo MIV+M10⁻⁹, assim como em pesquisas anteriores^{51,52}. É conhecido que EROS podem causar danos mitocondriais em ovócitos⁵³, prejudicando o desenvolvimento até blastocisto^{30,51}. Desse modo, o conhecimento deste antioxidante no processo de maturação contribui para novas informações sobre criopreservação de ovócitos, uma vez que EROS foram reduzidas em ovócitos maturados com 10⁻⁹ M deste antioxidante, aumentando o seu potencial de desenvolvimento²⁴.

No Experimento 2, ao testar as concentrações no meio de cultivo, verificou-se que melatonina a 10⁻⁹ M (CIV+M10⁻⁹) aumentou em 5,5% a taxa de clivagem e 21,7% a taxa de blastocistos em relação ao controle e reduziu o NCA. Observou-se também efeito negativo da melatonina ao reduzir a concentração para 10⁻¹¹ M, pois além de diminuir em 34,4% a taxa de blastocistos, elevou o NCA em relação a concentração ótima de 10⁻⁹ M. Pesquisas anteriores com embriões bovinos cultivados com melatonina na mesma concentração obtiveram maior produção e eclodibilidade de blastocistos, aumento no número de células por blastocisto comparado aos demais grupos, refletindo em melhor qualidade embrionária¹³. Este estudo, assim como em outros¹², mostra que este benefício está relacionado com a redução da produção de EROS e da apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário.

Os resultados deste estudo demonstraram que a adição de melatonina ao meio de maturação na concentração de 10⁻⁹ M protege as células do cumulus de danos no DNA⁵⁴, uma vez que controlou a produção de EROS nos ovócitos, melhorou a taxa de clivagem e a qualidade dos blastocistos. Além disso, a concentração de glutathione de ovócitos maturados foi aumentada, mantendo o equilíbrio do estado redox intracelular e proporcionando melhores condições para o desenvolvimento do embrião³.

Assim, quando adicionada na concentração apropriada para o cultivo *in vitro*, a melatonina regula negativamente a expressão de genes pró-apoptóticos (p53, Bax, caspase-3) e positivamente a expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Gpx4, SOD1) ^{12,55}. Portanto, os embriões produzidos *in vitro* tornam-se mais habilitados para a implantação, aumentam as chances de sobrevivência pós-natal e, com isso, o número de crias por fêmea ¹².

Em resumo, este trabalho mostra o importante papel da melatonina na redução do estresse oxidativo celular e mitocondrial, protegendo os blastômeros da morte celular por apoptose. Devido à ampla ação desta molécula, estes resultados podem estar além do seu potencial antioxidante, visto que não foram avaliadas todas as possibilidades da atuação da melatonina. Destaca-se que a concentração e a etapa do sistema de PIVE em que é adicionada são fundamentais para a manutenção do equilíbrio redox, uma vez que estão relacionados com a apoptose celular. A concentração ótima de 10^{-9} M suplementada ao meio de cultivo favoreceu quantitativa e qualitativamente o desenvolvimento embrionário devido a maior concentração de glutatona e expressão do gene SOD2 associadas a menor número de células apoptóticas. Estes dados fornecem informações adicionais quanto aos efeitos deletérios ocasionados pelo estresse oxidativo diretamente relacionados à qualidade embrionária. A melatonina apresentou atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo celular e a apoptose de blastômeros e, conseqüentemente aumentando a viabilidade embrionária. Pesquisas com os principais métodos de criopreservação destes embriões, assim como a adição de melatonina ao meio de recultivo, ainda precisam ser investigadas.

CONCLUSÃO

A melatonina adicionada ao meio de cultivo na concentração de 10^{-9} M mostrou-se eficiente na produção e qualidade de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* pela redução do estresse oxidativo, sem a necessidade de suplementar este antioxidante ao meio de maturação ou associado ao meio de cultivo.

REFERÊNCIAS

1. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol

- [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;25(3):287–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
2. Al-Gubory KH, Fowler P a., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1634–50.
 3. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* [Internet]. 2012;58(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450278>
 4. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):175–89.
 5. Crocomo, Letícia Ferrari, Marques Filho, Wolff Camargo, Landim-Alvarenga, Fernanda da Cruz, Bicudo SD. Produção de embriões in vitro: Estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e Zootec.* 2012;19(4):470–9.
 6. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology.* 2004;62(7):1186–97.
 7. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy M a., Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril.* 2006;86(3):503–12.
 8. Kwak S-S, Cheong S-A, Jeon Y, Lee E, Choi K-C, Jeung E-B, et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Jul 1 [cited 2014 Sep 30];78(1):86–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445189>
 9. Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Sep 30];31(2):229–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24305840>
 10. Casao a, Abecia J a, Cebrián-Pérez J, Muiño-Blanco T, Vázquez MI, Forcada F. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. *Spanish J Agric Res* 2010. 2010;8(1):35–41.
 11. Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Oct [cited 2014 Oct 8];57(3):239–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070516>
 12. Wang F, Tian X, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Liu G. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst

- implantation in murine. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Oct 14];55(3):267–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772689>
13. Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Apr [cited 2014 Oct 13];56(3):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666110>
 14. Eryilmaz OG, Devran A, Sarikaya E, Aksakal FN, Mollamahmutoğlu L, Cicek N. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Sep 30];28(9):815–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3169684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Khan SN, Shaeib F, Najafi T, Kavdia M, Gonik B, Saed GM, et al. Diffused Intra-Oocyte Hydrogen Peroxide Activates Myeloperoxidase and Deteriorates Oocyte Quality. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(7):e0132388. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132388>
 16. Ganji R, Nabiuni M, Faraji R. Development of mouse preantral follicle after in vitro culture in a medium containing melatonin. *Cell J* [Internet]. 2015;16(4):546–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4297493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 17. Ren L, Wang Z, An L, Zhang Z, Tan K, Miao K, et al. Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Jan 24];30(12):2892–911. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385791>
 18. Vázquez MI, Abecia J a, Forcada F, Casao a. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Sep 1 [cited 2014 Sep 30];74(4):618–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570337>
 19. Shi J-M, Tian X-Z, Zhou G-B, Wang L, Gao C, Zhu S-E, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J Pineal Res* [Internet]. 2009 Nov [cited 2014 Oct 13];47(4):318–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19817971>
 20. Li Y, Zhang Z, He C, Zhu K, Xu Z, Ma T, et al. Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. *J Pineal Res* [Internet]. 2015;59(3):365–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12268>
 21. Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Nov 10];44(1):12–6.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507802>

22. Mehaisen GMK, Saeed AM. In vitro development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin. *Zygote* [Internet]. 2013 Aug 28 [cited 2014 Nov 22];23:111–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23985360>
23. Mehaisen GMK, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: morphological and molecular aspects. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Jan 24];10(10):e0139814. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4595475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Zhao X-M, Hao H-S, Du W-H, Zhao S-J, Wang H-Y, Wang N, et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J Pineal Res* [Internet]. 2015 Oct 20 [cited 2016 Jan 24];In press. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485053>
25. Zhao X-M, Min J-T, Du W-H, Hao H-S, Liu Y, Qin T, et al. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. *Zygote* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Jan 24];23(4):525–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24869483>
26. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski M a., Anisimov S V., Vesnushkin GM, Vinogradova I a. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2006;1757(5-6):573–89.
27. Holm, P, Schmidt, MH, Greve, T, Callesen H. 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.* 1999;52:683–700.
28. Stojkovic M, Machado S a, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.* 2001;64(3):904–9.
29. Parrish, J J, Krogenaes, A, Susko-Parrish L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* [Internet]. 1995;44:859–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727781>
30. Park S-H, Yu I-J. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on reactive oxygen species and glutathione of porcine oocytes, apoptosis of cumulus cells, and embryonic development. *Zygote* [Internet]. 2013;21(3):305–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23171604>
31. Santos ECS, Sato D, Lucia T, Iwata H. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote* [Internet].

- 2013;23(3):352–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199413000610
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001;29(9):2002–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
 33. R statistical software version 3.0.2 [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>
 34. Wang SJ, Liu WJ, Wu CJ, Ma FH, Ahmad S, Liu BR, et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). *Theriogenology* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2014 Sep 30];78(7):1517–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980085>
 35. He C, Wang J, Li Y, Zhu K, Xu Z, Song Y, et al. Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. *J Pineal Res* [Internet]. 2015;58(3):300–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12216>
 36. Wang F, Tian X, Zhou Y, Tan D, Zhu S, Dai Y, et al. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Oct 11];9(4):e93641. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 37. Roy M, Gauvreau D, Bilodeau JF. Expression of superoxide dismutases in the bovine oviduct during the estrous cycle. *Theriogenology*. 2008;70(5):836–42.
 38. El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;89(1):1–6.
 39. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Nov 22];54(3):245–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998574>
 40. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*. 2014;131–46.
 41. Gao C, Han HB, Tian XZ, Tan DX, Wang L, Zhou G Bin, et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *J Pineal Res*. 2012;52(3):305–11.
 42. Baba, Kenkichi, Benleulmi-Chaachoua, Abba, Journé, Anne-Sophie, Kamal, Maud, Guillaume, Jean-Luc, Dussaud, Sébastien, Gbahou, Florence, Yettou, Katia, Liu, Cuimei, Contreras-Alcantara, Susana, Jockers, Ralf, Tosini G. Heteromeric MT1/MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function. *Sci Signal* [Internet].

- 2014;6(296):1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867265/pdf/nihms536842.pdf>
43. Giancesini C, Hiragaki S, Laurent V, Hicks D, Tosini G. Cone Viability Is Affected by Disruption of Melatonin Receptors Signaling. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2016;57(1):94–104. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.15-18235>
 44. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* [Internet]. 2008 Apr [cited 2014 Oct 13];44(3):280–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339123>
 45. Byrne a T, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil*. 1999;117(1):97–105.
 46. Hao Y, Lai L, Mao J, Im G-S, Bonk A, Prather RS. Apoptosis and in vitro development of preimplantation porcine embryos derived in vitro or by nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2003;69(2):501–7.
 47. Mingoti GZ. Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides. Universidade de São Paulo; 2000.
 48. Sampaio R V, Conceição SDB, Miranda MS, Sampaio LDFS, Ohashi OM. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 30];10:1–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 49. Jin X, Gall C Von, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, et al. Targeted Disruption of the Mouse Mel 1b Melatonin Receptor. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):1054–60.
 50. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005;5(1):5–17.
 51. Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod*. 2002;17(2):393–406.
 52. Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J Reprod Dev* [Internet]. 2014 Apr 24;60(2):92–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3999399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 53. Ge H, Tollner TL, Hu Z, Da M, Li X, Guan H, et al. Impaired mitochondrial

- function in murine oocytes is associated with controlled ovarian hyperstimulation and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(7):945–52.
54. Takada L, Martins Junior A, Mingoti GZ, Balieiro JCC, Cipolla-Neto J, Coelho L a. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res Vet Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Mar [cited 2014 Sep 30];92(1):124–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167539>
 55. Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Sep 30];101(2):577–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314921>

CAPÍTULO 3 – RETIRADA DO FLUIDO DA BLASTOCELE ASSOCIADA À MELATONINA NO MEIO DE CULTIVO MELHORA A VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS VITRIFICADOS

RESUMO

O tratamento com melatonina e a retirada do fluido da blastocela (RFB) tem sido sugeridos como boas opções para melhorar o desenvolvimento e a viabilidade embrionária após a criopreservação de embriões bovinos. Investigou-se os efeitos da RFB antes da vitrificação de embriões produzidos *in vitro* com melatonina. As taxas de re-expansão após 2 e 24 horas, seguidas por taxas de eclosão após 24, 48 e 72 horas do aquecimento foram avaliados em três tratamentos: controle, suplementado com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e com retirada do fluido da blastocela (CIV+M 10^{-9} RFB). Para o número total de células e o número de células apoptóticas em blastocistos expandidos, os tratamentos frescos controle e CIV+M 10^{-9} foram acrescentados. Os dados confirmaram que, independente da retirada do fluido da blastocela, a suplementação de melatonina a 10^{-9} M ao meio de cultivo melhorou as taxas de re-expansão e eclosão às 24, 48 e 72 horas ($P < 0,05$). Além disso, mostrou que o grupo controle precisa de um período de 24 horas de recultivo para sua total re-expansão em relação aos grupos suplementados com melatonina ($P < 0,05$). O número de células apoptóticas apresentou-se similar nos grupos suplementados com melatonina, independente da vitrificação e da retirada do fluido da blastocela ($P > 0,05$), porém menor que os grupos sem melatonina. O procedimento da retirada do fluido da blastocela não afetou a qualidade embrionária quanto a expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2), reparo celular (MSH6), placentação (KRT8) e implantação (FOSL1) não foi alterada ($P > 0,05$). Esta pesquisa demonstrou efeito benéfico da suplementação de melatonina a 10^{-9} M ao meio de cultivo quanto à qualidade e viabilidade embrionária, independente da retirada do fluido da blastocela. Além disso, sugere novas informações para futuras pesquisas quanto à criotolerância de embriões produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Vitrificação; apoptose celular; criotolerância de embriões bovinos.

INTRODUÇÃO

Um dos principais obstáculos para a comercialização de embriões produzidos *in vitro* é a baixa eficiência da criopreservação pela menor criotolerância desses embriões quando comparada com os oriundos do sistema *in vivo* ¹. Assim, inovações na tecnologia de criopreservação de embriões possibilitam incipientes perspectivas para um novo ciclo de expansão da produção *in vitro* de embriões (PIVE) no Brasil, assim como a abertura de mercados externos ².

A baixa criotolerância do embrião produzido *in vitro* é uma consequência do sistema de produção, sendo que a presença de água na blastocela é um dos fatores que pode prejudicar a qualidade dos blastocistos durante a criopreservação por causa da formação de cristais de gelo ³.

Além disso, o processo de criopreservação aumenta a atividade de espécies reativas de oxigênio (EROS), o que promove lesões nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso ⁴ e altera a expressão de alguns genes ⁵. Em decorrência disso, a média de gestação e nascimentos de embriões vitrificados é menor do que não vitrificados devido a morte embrionária precoce ⁶.

Sabe-se que o desenvolvimento embrionário pré-implantação é um processo dinâmico, que envolve naturalmente a proliferação celular, diferenciação e apoptose ⁷. A apoptose é uma forma de morte celular programada e tem importante papel no desenvolvimento embrionário e na homeostase. Caso ocorra de forma desproporcional em relação aos blastômeros intactos, pode reduzir a viabilidade e o potencial de desenvolvimento do embrião ^{8,9}. Dessa forma, a apoptose é uma das variáveis mais importantes para a avaliação da saúde do embrião ¹⁰ e, por ser a resposta celular final em condições sub-ótimas e diferentes tipos de estresse que o embrião pode sofrer durante o processo de congelamento e descongelamento ⁹. Em bovinos, sua ocorrência em grande número é também um importante indicador dos danos causados pela criopreservação ¹¹.

Várias pesquisas têm mostrado que a adição de antioxidantes como a melatonina ¹² ao meio de maturação e/ou cultivo melhora a eficiência do desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*. Melatonina é um captador de radicais livres e um potente antioxidante, sendo que associada aos seus metabólitos, elimina diretamente as EROS ^{13,14}, aumenta a expressão de genes de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e glutatona (GSH) ¹⁵, além de inibir a ação de enzimas pró-oxidativas para reduzir

o dano celular oxidativo ¹⁶. Possui ainda ação reparadora sobre moléculas oxidadas e combate os efeitos deletérios do envelhecimento das mitocôndrias ^{17,18}, uma vez que o DNA mitocondrial é um alvo importante de radicais livres ¹⁶. Assim, seus benefícios no meio de cultivo relacionam-se à melhor qualidade dos blastocistos devido ao aumento da concentração de GSH ¹⁵ e redução na produção de EROS e apoptose celular durante o desenvolvimento do embrião ¹⁹, refletindo em maior criotolerância e sobrevivência embrionária após o aquecimento ²⁰.

Estudos recentes demonstraram que a retirada do fluido da blastocèle (RFB) melhora a criotolerância e a sobrevivência embrionária após vitrificação, possivelmente, em decorrência da redução no número de células apoptóticas ²¹ e na expressão do gene pró-apoptótico Bax e aumento da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL ²². Porém, não existe até o momento estudo que relacione a RFB com o cultivo embrionário *in vitro* adicionado de melatonina.

Tendo em vista estes aspectos, nossa hipótese é que a associação entre a retirada do fluido da blastocèle de embriões cultivados com melatonina melhora a qualidade embrionária. Dessa forma, avaliou-se o efeito retirada do fluido da blastocèle de embriões bovinos produzidos *in vitro* com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo sobre a qualidade embrionária após o procedimento de vitrificação e aquecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções e composição de meios

Os meios de maturação, fecundação, CAP e cultivo utilizados neste estudo foram adquiridos da empresa Progest Biotecnologia em Reprodução e Saúde Animal Ltda, visto que cada lote é previamente testado com ovários de abatedouro. As demais soluções foram preparadas no laboratório.

Solução estoque melatonina a 1μM

Diluição da melatonina (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) em água milliQ, congelada a -20°C, protegida da luz. A concentração de uso (10^{-9} M) foi obtida utilizando-se 2 μL da solução estoque em 1998 μL de meio de cultivo (ANEXO E).

Meio de maturação

Meio TCM 199 com sais Earle e L-glutamina (Gibco[®], Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino (v/v), 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL hormônio luteinizante (Lutropin-V[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 1 mg/mL hormônio folículo estimulante (Folltropin[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 75 µg/mL amicacina e 1mM cistamina.

Meio de fecundação

TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL albumina sérica bovina livre de ácido graxo, 0,2 mM piruvato, 30 µg/mL heparina, 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina e 75 µg/mL amicacina.

Meio CAP

Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2 mM piruvato e 75 µg/mL amicacina.

Meio de cultivo

SOFaa²³ suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 2,5% soro fetal bovino (v/v), 5 mg/mL albumina sérica bovina livre de ácido graxo, 75 µg/mL amicacina.

Soluções de vitrificação

Solução SM – meio HEPES tamponado com TCM-199 (GIBCO[®] BRL, Invitrogen) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil).

Solução SV1 – solução SM suplementado com 7,5% de etilenoglicol (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Solução SV2 – solução SM adicionada com 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,5 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Soluções de aquecimento

Solução SM – meio HEPES tamponado com TCM-199 (GIBCO[®] BRL, Invitrogen) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil).

Solução DV1 – solução SM suplementada com 1,0 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Solução DV2 – solução SM suplementada com 0,5 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Seleção de ovócitos, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões

Ovários bovinos foram coletados de um abatedouro local, mantidos em solução salina (0,9%) a 35°C, transportados ao laboratório e processados em até 4 horas. Folículos com 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com o auxílio de seringa e agulha 40x12 para a retirada dos complexos cumulus-ovócitos (CCO's). Estes foram armazenados em tubos cônicos e mantidos em banho-maria a 36°C por 10 minutos até a decantação.

Grupos de 35 CCO's com qualidade grau 1 e 2, segundo Stojkovic et al.²⁴, foram selecionados e incubados em gotas de 200 µL de meio de maturação a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação. Após 22-24 horas, os CCO's foram lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de fecundação cobertas com óleo mineral.

O sêmen de um touro de fertilidade conhecida foi descongelado a 35°C por 30 segundos, depositado sobre coluna de gradiente Percoll 45-90%²⁵ e centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. O sedimento de espermatozoides foi ressuspensionado em 1,0 mL de CAP e centrifugado a 9000 rpm por 3 minutos. O pellet formado foi diluído em 100 µL de meio de fecundação. Após observação da motilidade e do vigor, cada gota foi fertilizada com uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides vivos/mL. As placas foram incubadas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 18 horas.

Os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados, lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de cultivo sob óleo mineral por sete dias (D7) a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação. No dia 3, substituiu-se a metade do meio de cultivo de cada gota.

Retirada do fluido da blastocele

No sétimo dia de cultivo, grupos de cinco blastocistos expandidos cultivados com melatonina a 10^{-9} M foram levados ao microscópio (Elipse Ti, Nikon, Tóquio, Japão) acoplado ao micromanipulador Narishige (NT88 TB, Nikon, Tóquio, Japão) para RFB, mediante aspiração, com o auxílio de uma micropipeta de vidro com 30µm de diâmetro com ponta em bisel e uma micropipeta tipo Holding (Figura 1). Imediatamente após o procedimento, os embriões foram vitrificados e armazenados em nitrogênio líquido.

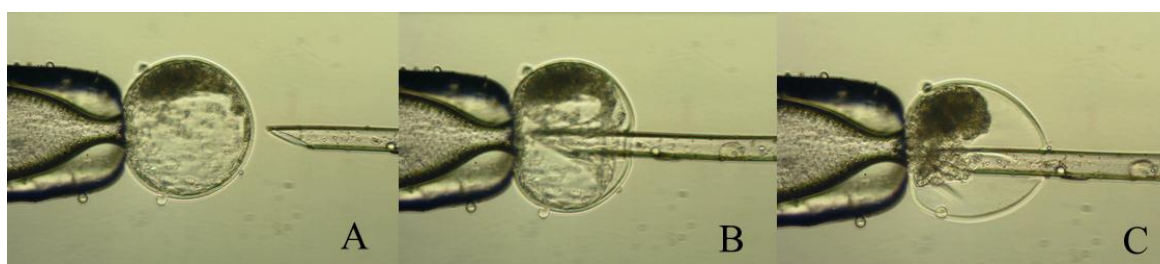


FIGURA 1 – Procedimento da retirada do fluido da blastocele: (A) O embrião é posicionado e mantido na pipeta Holding, (B) a micropipeta com bisel é inserida na região do trofoectoderma para não lesionar a massa celular interna e (C) o fluido da cavidade da blastocele é aspirado.

Fonte: Arquivo pessoal

Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões

Os blastocistos expandidos com sete dias de cultivo (grau I e II) foram criopreservados pela técnica de vitrificação em placa aquecedora a 36°C e método Cryotop²⁶, utilizando hastes Ingá-med[®] (Maringá-PR, Brasil) e armazenados em nitrogênio líquido. Primeiramente, os blastocistos foram depositados em uma gota de 70 µL de meio SM. Em seguida, passaram por três gotas de 70 µL de meio SV1, sendo três minutos em cada uma. Posteriormente, foram lavados em três gotas de 50 µL de meio SV2 por 40 a 90 segundos até o posicionamento dos embriões na haste com o mínimo de solução de vitrificação e imediatamente imergidos em nitrogênio líquido.

O aquecimento foi realizado sobre placa aquecedora a 39°C, imergindo-se a haste de vitrificação em uma gota de 500 µL de meio DV1 para a remoção dos embriões. Logo em seguida, estes foram transferidos para outra gota de 200 µL de DV1 por um minuto e posteriormente para uma gota de 200 µL de DV2 durante três minutos.

Imediatamente depois, passaram por duas gotas de 200 μ L de solução SM durante cinco minutos em cada uma.

Após o aquecimento, os blastocistos foram lavados três vezes e incubados em meio de cultivo sob óleo mineral em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 72 horas. A taxa de re-expansão foi avaliada após duas horas e 24 horas. A taxa de eclosão foi avaliada após 24, 48 e 72 horas.

Deteção de células apoptóticas

As células apoptóticas em blastocistos expandidos grau I e II (frescos e re-expandidos por 24 horas) foram detectadas pela técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) através do kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Os grupos foram preparados (tratamentos, controle positivo e controle negativo) e lavados em 0,1% de polivinilpirrolidona em tampão fosfato-salino (PBS-PVP) e depois fixados em paraformaldeído 3,7% diluído em PBS-PVP por 1 hora em temperatura ambiente. Logo depois foram incubados em solução permeabilizadora de membrana (PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e citrato de sódio) por 1 hora a 4°C. Em seguida, o grupo controle positivo foi incubado em solução DNase em câmara úmida a 37°C por 1 hora, enquanto que os demais grupos permaneceram em PBS-PVP em placa aquecida a 37°C. Posteriormente, os grupos foram incubados para reação TUNEL (grupos tratados e positivo em solução enzimática e marcadora (1:9); grupo negativo apenas em solução marcadora) em câmara úmida a 37°C por 1 hora, protegidos de luz. A seguir, todos os grupos foram incubados em solução Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) por 10 minutos, protegidos da luz. Utilizou-se ProLong[®] Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) durante a montagem das lâminas e lamínulas para observação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão). Entre cada etapa, os grupos foram lavados três vezes em PBS-PVP, permanecendo 2 minutos na última gota. O núcleo das células TUNEL positivas (DNA fragmentado) foi visualizado em verde fluorescente no filtro com comprimento de onda de 450 nm. Todos os núcleos foram corados com azul fluorescente no filtro com comprimento de onda de 365 nm. Todas as células marcadas em ambos os filtros foram contadas para mensuração da quantidade média de células normais e apoptóticas dos embriões de cada grupo.

Preparo de amostras, extração de RNA e produção do cDNA

A viabilidade embrionária foi avaliada pelo método de transcrição reversa quantitativa em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Foram estudados 9 genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2), ao reparo celular (MSH6), à implantação (FOSL1) e à placentação (KRT8). Grupos de cinco blastocistos foram transferidos com 2 µL de PBS sem cálcio e magnésio e 4 µL RNAlater (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para tubos de 0,5 mL. Após incubação por 12 horas a 4°C, procedeu-se o armazenamento a -20°C até a extração do RNA. No momento da análise, foram utilizados três *pools* de 15 blastocistos eclodidos (Be) após 48 horas do aquecimento de cada tratamento.

O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante. O volume total de RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA, usando o kit First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) – SuperScript® III (200 U/µL) e primer Oligo-dT (0,5 µg/µL) em volume final de 40 µL. As reações foram realizadas a 65°C por 5 minutos e 50°C por 50 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85°C por 5 minutos. A análise do qPCR foi realizada com Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). Para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (76 – 110%), as reações foram otimizadas por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL usando cDNA correspondente a 0,5 embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e então anelamento a 60°C por 30 segundos. O nome, a sequência e concentração do primer, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 1.

O nível de expressão dos três genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -Actin (ACTB) e Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) foi submetido ao programa de análise GeNorm, que indicou o PPIA como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de

cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl²⁷.

TABELA 1 – Informação para primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise PCR quantitativo em tempo real

Gene	Sequência do Primer	Tamanho de amplicon (bp)	Concentração do Primer (nM)	GeneBank N° de acesso/referência
PPIA	F:GCC ATG GAG CGC TTT GG R:CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T	65	300	NM_178320.2
SLC2A1	F: CAG GAG ATG AAG GAG GAG AGC R: CAC AAA TAG CGA CAC GAC AGT	258	250	BT029806
SLC 2A3	F: ACT CTT CAC CTG ATT GGC CTT GGA R: GGC CAA TTT CAA AGA AGG CCA CGA	145	300	NM_174603.3
KRT8	F: TGT GAA GAA GAT TGA GAC CCG CGA R: AAA CCT CAG GTC TCC TGT GCA GAT	160	300	X12877 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
SOD2	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT	135	300	NM_201527
HSPB1	F: CTG GAC GTC AAC CAC TTC R: GGA CAG AGA GGA GGA GAC	180	250	NM_001025569.1
HSPA5	F: CGT GGC CAC TAA TGG AGA TAC R: CTC TGT TGT CCT TCC GAA CAT	119	300	NM_001075148.1
HSP1A1	F:CAA GAT CAC CAT CAC CAA CG R:AAA TCA CCT CCT GGC ACT TG	219	300	NM_174550.1
FOSL1	F: GCT TCC TAG TAG AGC CAA AG R: GAA GAG GTG ATG AAG ACC ATA G	200	300	NM_001205985.1
MSH6	F: CCC AGG TGC TTA AAG GTA TG R: GGA CCA TGT CAG AAT CCA AG	186	300	NM_001192737.1

PPIA=Peptidylprolyl isomerase A; SLC2A1=Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1; SLC2A3=Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3; KRT8=Keratin 8; SOD2=Bos taurus superoxide dismutase 2; HSPB1=Bos taurus heat shock 27kDa protein 1; HSPA5=Bos taurus heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa); HSP1A1=Bos taurus heat shock 70kDa protein 1A; FOSL1=Bos taurus FOS-like antigen 1; MSH6=Bos taurus mutS homolog 6. F: primer forward; R: primer reverse

Delineamento experimental

Após maturação e fecundação, os possíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente em duas condições de cultivo. Os grupos (30 a 35 estruturas) foram transferidos para gotas de 200 μ L de meio de cultivo sem melatonina (Controle) e suplementado com melatonina na concentração de 10^{-9} M (CIV+M 10^{-9}). Após 72 horas (D3), 50% do meio de cultivo foi substituído de acordo com o tratamento. No sétimo dia de cultivo (D7), a metade dos blastocistos expandidos grau I e II do tratamento CIV+M 10^{-9} foi submetida à RFB (CIV+M 10^{-9} RFB). Em seguida, apenas os embriões grau I e II dos três grupos (Controle, CIV+M 10^{-9} e CIV+M 10^{-9} RFB) foram vitrificados e armazenados em nitrogênio líquido. Realizou-se 14 coletas, totalizando 618 embriões vitrificados.

Experimento 1 – Efeito da RFB associada à melatonina suplementada no meio de cultivo na viabilidade embrionária após vitrificação

A viabilidade embrionária foi avaliada após aquecimento e recultivo em meio de cultivo por 72 horas nos tratamentos: Controle, CIV+M10⁻⁹ e CIV+M10⁻⁹ RFB.

As taxas de re-expansão foram avaliadas após duas e 24 horas, seguidas por taxas de eclosão após 24, 48 e 72 horas do aquecimento. Nove repetições de aquecimento e recultivo foram realizadas para cada tratamento.

Experimento 2 – Efeito da RFB associada à melatonina suplementada no meio de cultivo na apoptose celular

O número total de células e o número de células apoptóticas foram determinados em blastocistos expandidos (grau I e II) de dois grupos frescos (Controle fresco, CIV+M10⁻⁹ fresco) e três vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas (Controle vitrificado, CIV+M10⁻⁹ e CIV+M10⁻⁹ RFB) pela técnica TUNEL. Utilizou-se 15 embriões de cada tratamento, oriundos de duas etapas de aquecimento e recultivo.

Experimento 3 – Efeito da RFB associada à melatonina suplementada no meio de cultivo na expressão de genes relacionados à qualidade embrionária

A expressão de nove genes foram verificados quanto a possíveis danos à qualidade embrionária provocados pelo procedimento da RFB de embriões cultivados com melatonina a 10⁻⁹ M após vitrificação. A análise utilizou três *pools* de 15 blastocistos eclodidos após 48 horas de recultivo em dois grupos (CIV+M10⁻⁹ e CIV+M10⁻⁹ RFB).

A avaliação incluiu genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2), ao reparo celular (MSH6), à implantação (FOSL1) e à placentação (KRT8).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R versão 3.0.2 (2014) ²⁸ a 5% de significância. Os dados de expressão gênica não

apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e foram comparados pelo Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. A média do número total de células e contagem de células apoptóticas foi comparada entre os tratamentos pelo teste de Tukey e apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média). As variáveis taxa de re-expansão e taxa de eclosão entre os tratamentos foram comparadas pelo teste qui-quadrado e apresentados em porcentagem.

RESULTADOS

Experimento 1

A re-expansão dos blastocistos foi afetada positivamente pelo cultivo *in vitro* com melatonina. Os grupos suplementados com melatonina, independente da RFB, não apresentaram diferença na taxa de re-expansão entre duas e 24 horas de recultivo ($P > 0,05$). Ao contrário, o controle apresentou taxa de re-expansão inferior, especialmente às duas horas ($P < 0,05$; Tabela 2). Observou-se também que ambos os grupos suplementados com melatonina no meio de cultivo melhoraram a taxa de re-expansão tanto após duas horas quanto às 24 horas de recultivo em relação ao grupo controle ($P < 0,05$; Tabela 2).

TABELA 2 – Taxa de re-expansão de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* sem melatonina (Controle), suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M 10^{-9} RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas

Tratamentos	Nº de blastocistos	Taxa de Re-expansão (%)	
		2 horas	24 horas
Controle	198	29,3 (58/198) ^{bB}	78,8 (156/198) ^{aB}
CIV+M 10^{-9}	215	86,7 (186/215) ^{aA}	89,7 (193/215) ^{aA}
CIV+M 10^{-9} RFB	205	89,3 (183/205) ^{aA}	87,7 (180/205) ^{aA}

^{a, b} Na linha, ^{A, B} na coluna ($P < 0,05$ pelo teste Qui-quadrado).

A RFB associada ao cultivo com melatonina propiciou melhora na eclosão embrionária. A taxa de eclosão às 24, 48 e 72 horas após o aquecimento foi superior no grupo suplementado com melatonina associado à RFB em relação aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Embora os grupos que não tiveram a blastocele removida obtiveram a mesma

taxa de eclosão às 24 horas ($P > 0,05$; Tabela 3), a melatonina melhorou a taxa de eclosão às 48 e 72 horas quando adicionada no meio de cultivo.

TABELA 3 – Taxa de eclosão de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* sem melatonina (Controle), suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M 10^{-9} RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24, 48 e 72 horas

Tratamentos	Nº de blastocistos	Taxa de eclosão (%)		
		24h	48h	72h
Controle	198	6,1% (12/198) ^b	18,7% (37/198) ^c	27,3% (54/198) ^c
CIV+M 10^{-9}	215	6,7% (14/215) ^b	37,9% (82/215) ^b	41,5% (89/215) ^b
CIV+M 10^{-9} RFB	205	20,3% (42/205) ^a	56,1% (115/205) ^a	66,8% (137/205) ^a

^{a,b,c} Na coluna ($P < 0,05$ pelo teste Qui-quadrado).

Experimento 2

Os grupos suplementados com melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (fresco, com ou sem a retirada do fluido da blastocele) obtiveram menor número de células apoptóticas em relação aos grupos controle fresco e vitrificado ($P < 0,05$). No entanto, a média do número total de células não apresentou diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 4).

TABELA 4 – Média do número total de células (NCT) e número de células apoptóticas (NCA) de blastocistos expandidos grau I e II (frescos e vitrificados) produzidos *in vitro* na ausência (Controle) e presença de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M 10^{-9}) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M 10^{-9} RFB), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas

Tratamentos	Nº de blastocistos	NCT	NCA	NCA/NTC (%)
Controle fresco	15	135,6 ± 5,5	7,8 ± 0,6 ^b	5,7 ^b
CIV+M 10^{-9} fresco	15	135,4 ± 5,6	3,4 ± 0,6 ^a	2,5 ^a
Controle vitrificado	15	139,8 ± 6,1	12,5 ± 0,6 ^c	8,9 ^c
CIV+M 10^{-9}	15	136,1 ± 5,6	4,9 ± 0,6 ^a	3,6 ^a
CIV+M 10^{-9} RFB	15	140,1 ± 5,8	3,7 ± 0,6 ^a	2,6 ^a

^{a, b, c} Na mesma coluna ($P < 0,05$ pelo teste de Tukey).

Experimento 3

O efeito da RFB de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo, imediatamente antes da vitrificação, foi avaliado em blastocistos eclodidos 48 horas após o aquecimento quanto ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3), ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2), ao reparo celular (MSH6), à implantação (FOSL1) e à placentação (KRT8).

A abundância relativa de RNAm para os genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3) não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$; Figura 2).

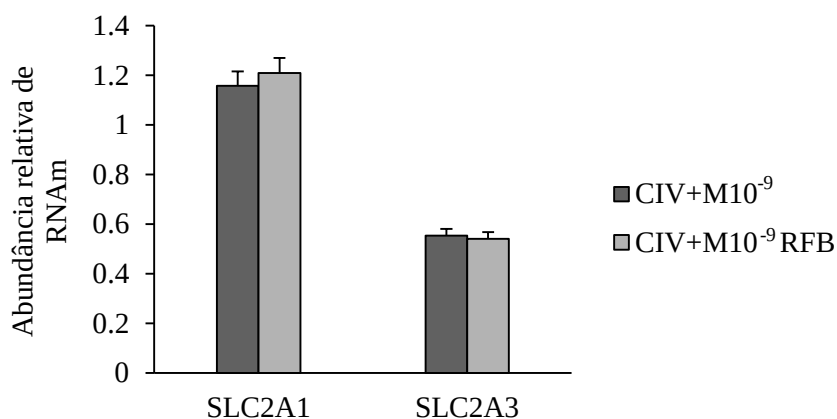


FIGURA 2 - Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) dos genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1, SLC2A3) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 *pools* com 15 Be cada um) de embriões produzidos *in vitro* com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocle (CIV+M10⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).

Da mesma forma, não houve diferença entre os tratamentos para os genes relacionados ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2), ao reparo celular (MSH6), implantação (FOSL1) e placentação (KRT8) com relação à abundância relativa de RNAm ($P > 0,05$; Figuras 3 e 4).

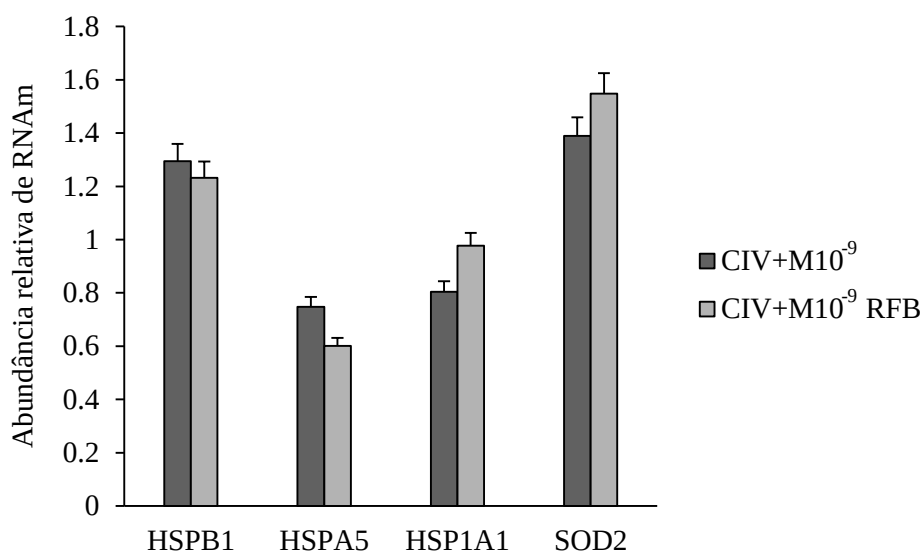


FIGURA 3 – Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) dos genes relacionados ao estresse oxidativo (HSPB1, HSPA5, HSP1A1, SOD2) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 *pools* com 15 Be cada um) de embriões produzidos *in vitro* com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M10⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).

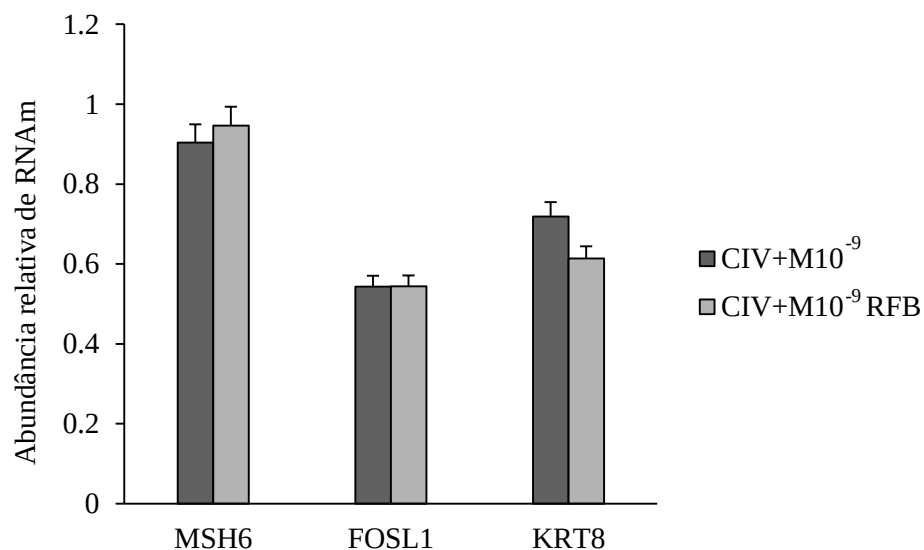


FIGURA 4 – Abundância relativa de RNAm (média±erro padrão) do gene relacionado ao reparo celular (MSH6), implantação (FOSL1) e placentação (KRT8) em blastocistos eclodidos até 48 horas após o aquecimento (3 *pools* com 15 Be cada um) de embriões produzidos *in vitro* com suplementação de melatonina a 10^{-9} M no meio de cultivo (CIV+M10⁻⁹) e com a retirada do fluido da blastocele (CIV+M10⁻⁹ RFB). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney).

DISCUSSÃO

O presente estudo, até onde vai o nosso conhecimento, é o primeiro a associar melatonina na produção *in vitro* de embriões e retirada do fluido da blastocle com o auxílio de micromanipulador. A RFB de embriões cultivados com melatonina a 10^{-9} M favoreceu a sobrevivência embrionária após vitrificação pelo aumento na taxa de eclosão associada a redução do NCA. Dados adicionais de expressão gênica mostraram que a qualidade de embriões tratados com melatonina a 10^{-9} M não é alterada pela RFB. Além disso, embriões tratados com melatonina obtiveram maior taxa de re-expansão em menor tempo de recultivo, independente da RFB. Estas informações são alternativas para melhorar a criotolerância e a viabilidade de embriões produzidos *in vitro* e fornecem novos parâmetros para as pesquisas em andamento.

Neste estudo, independente da RFB, a melatonina adicionada ao meio de cultivo a 10^{-9} M proporcionou um aumento médio de 66,7% nas taxas de re-expansão às duas horas e 11,2% às 24 horas de recultivo. Ao contrário, o tratamento sem a sua adição precisou de um maior período para a total re-expansão. Do mesmo modo, a eclosão embrionária média foi superior 77,4%, 60,2% e 49,6% às 24, 48 e 72 horas, respectivamente ao controle. Os dados deste experimento corroboram com os de Wang et al.²⁰ que observaram maiores taxas de eclosão e menor taxa de mortalidade até 72 horas de recultivo após o aquecimento quando embriões bovinos foram cultivados com melatonina a 10^{-7} M. Estes resultados foram comprovados em virtude do potente poder antioxidante da melatonina^{13,29} em proteger os embriões produzidos no sistema de cultivo *in vitro*¹². Provavelmente em consequência da melhor qualidade desses embriões, nesta pesquisa, a RFB não melhorou a taxa de re-expansão dos grupos com melatonina, mantendo semelhante o NCA. Estes efeitos positivos podem ser atribuídos às maiores concentrações de glutathione intracelular¹⁵, menor quantidade de espécies reativas de oxigênio¹⁹ e a maior expressão de genes anti-apoptóticos^{19,30} conferidos pela melatonina.

A RFB aumentou as taxas de eclosão até 72 horas. Sabe-se que a baixa criotolerância do embrião produzido *in vitro* é uma consequência do sistema de produção, sendo que a presença de água na blastocle é um dos fatores que prejudicam a qualidade dos blastocistos durante a criopreservação devido a formação de cristais de gelo³. Os resultados desta pesquisa, associados a outros recentemente divulgados^{21,22,31-33}, mostram que estes efeitos podem ser reduzidos após a RFB antes da criopreservação, minimizando

as injúrias celulares e, conseqüentemente aumentando a sobrevivência embrionária ^{11,34}. Provavelmente, o aumento da eclodibilidade embrionária foi provocado pela incisão causada pelo processo da RFB, a qual pode ter favorecido a entrada do crioprotetor que, associado à ausência da blastocele, pode ter levado a melhor desidratação das células embrionárias com menor formação de cristais de gelo ³⁴. Aliado a isto, pode ter ocorrido melhor difusão do crioprotetor, uma vez que blastocistos expandidos apresentam maior quantidade de canais na membrana celular que embriões menos desenvolvidos ³⁵. Por conseguinte, dentro deste contexto, há possibilidade de ocorrência de danos pela formação de cristais de gelo resultante do processo de criopreservação inadequado nos grupos que mantiveram a blastocele intacta, prejudicando a eclosão. Em contrapartida, esta incisão na zona pelúcia causada pela RFB pode ter facilitado a eclosão embrionária apenas pelo efeito da ruptura da barreira protetora. Independentemente disto, o fato é que o aumento nas taxas de eclosão proporcionam maiores chances de gestação ^{22,36}. Neste contexto, a RFB torna-se uma opção para doadoras de alto valor zootécnico e para a reprodução assistida humana, visto que necessita de um equipamento relativamente caro e mão de obra treinada.

Estudos com embriões humanos, após vitrificação e aquecimento, mostraram que as taxas de sobrevivência e gestação de blastocistos expandidos com blastoceles intactas foram inferiores àsquelas de blastocistos iniciais por causa da substituição incompleta de água por crioprotetores na blastocele ^{31-33,37}.

A criopreservação pode ser realizada por congelamento lento ou vitrificação e resulta em prole saudável, apesar dos embriões sofrerem consideráveis danos morfológicos e funcionais. O congelamento lento precisa de uma máquina de congelação e o processo é demorado. Já a vitrificação proporciona rápida desidratação das células, tornando-as suficientemente permeáveis à alta concentração de crioprotetores que, durante o resfriamento, formam uma solução viscosa que faz com que a água se solidifique em estado vítreo, sem a ocorrência de cristais de gelo ³⁸. Isto resulta em maior sobrevivência embrionária ^{26,39} e melhores taxas de eclosão 48 horas após o descongelamento, tanto em embriões bovinos produzidos *in vivo* quanto *in vitro* ^{40,41}.

Em bovinos, a RFB aumentou as taxas de sobrevivência e eclosão em ambos os métodos de congelamento, mas seu impacto foi maior na vitrificação de embriões produzidos *in vitro*, além de aumentar as taxas de prenhez e nascimentos de blastocistos produzidos *in vivo* ²². Esta técnica também propiciou elevação da taxa de sobrevivência em

blastocistos oriundos de transferência nuclear de células somáticas em fase de eclosão ou eclodidos ²¹.

Devido a importância no desenvolvimento e na sobrevivência embrionária ^{42,43}, o NTC e incidência de apoptose de blastocistos foram confirmados utilizando a técnica TUNEL. Os resultados mostraram que o NTC não foi alterado entre os tratamentos. Entretanto, verificou-se que os embriões suplementados com melatonina a 10^{-9} M ao meio de cultivo, independente da RFB, frescos ou vitrificados, apresentaram menor NCA em relação a ambos os grupos controle. Pesquisas anteriores relacionadas à PIVE e à transferência nuclear de células somáticas sem adição de antioxidantes relataram que a RFB possibilitou aumento no NTC e redução no NCA ^{21,22}. Análises feitas por RT-PCR mostraram que a expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL aumentou significativamente nos embriões bovinos expostos à RFB com redução na expressão do gene pró-apoptótico Bax ²².

Normalmente, o processo de criopreservação provoca redução no número total de células embrionárias viáveis, assim como a vitrificação promove danos específicos na massa celular interna, mas não altera o número de células do trofoectoderma após o aquecimento ⁴⁴. Contudo, a extensão da injúria da criopreservação depende de fatores como tamanho e tipo celular, permeabilidade de membranas, qualidade e sensibilidade dos blastômeros ⁴⁵. Um dos mecanismos fundamentais envolvidos na criotolerância proporcionado pela melatonina é o de modificar a expressão de importantes genes envolvidos no desenvolvimento embrionário. Há aumento na expressão de genes requeridos para metilação celular (DNMT3A), proteínas de membrana (OCC) e conectividade celular (CDH1), além da redução da expressão do gene aquaporina (AQP3), o que conduz ao aumento da resistência à apoptose ²⁰. Além disso, a melatonina adicionada na concentração apropriada no cultivo *in vitro*, reduz a expressão de genes pró-apoptóticos (p53, Bax, caspase-3) e aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Gpx4, SOD1) ^{19,30}. Assim, os embriões produzidos *in vitro* tornam-se mais habilitados para a implantação, aumentam as chances de sobrevivência pós-natal e, com isso, o número de crias por fêmea ¹⁹.

A qualidade dos embriões produzidos com melatonina e submetidos à RFB não foi afetada quanto ao seu metabolismo, estresse oxidativo, reparo celular, implantação e placentação, provavelmente em decorrência da proteção conferida pela melatonina. Trabalhos anteriores com RFB de embriões sem adição de antioxidantes não relatam sobre

a qualidade dos embriões, mas indicam maior expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-XL) e menor expressão de genes pró-apoptóticos (Bax) e maior número de prenhez e nascimentos ²².

Embriões cultivados com melatonina a 10^{-9} M associada à retirada do fluido da blastocele aumentaram a taxa de eclosão e mantiveram o número de células apoptóticas e a expressão de genes relacionados à qualidade embrionária, o que pode melhorar os índices de prenhez e nascimento. Similarmente, a melatonina suplementada ao meio de cultivo a 10^{-9} M proporcionou melhor sobrevivência embrionária, possibilitando a transferência em menor tempo. Assim, os dados deste estudo demonstram que a melatonina adicionada ao meio de cultivo proporciona melhor qualidade e viabilidade aos blastocistos, aumentando a criotolerância e a sobrevivência embrionária após o aquecimento, independente da retirada do fluido da blastocele. A avaliação da incisão da zona pelúcida sem a RFB na eclosão e viabilidade embrionária pós-criopreservação, assim como dados *in vivo*, precisam ser analisados. Adicionalmente, novas informações sobre associação de técnicas foram geradas para pesquisas relacionadas à criotolerância.

CONCLUSÃO

A retirada do fluido da blastocele associada à melatonina suplementada a 10^{-9} M no meio de cultivo favoreceu a eclosão de embriões vitrificados pelo método Cryotop.

REFERÊNCIAS

1. Camargo LSA, Boite MC, Wohlrres-Viana S, Mota GB, Serapiao RV, Sa WF, et al. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;63(3):256–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.09.135>
2. Viana, João Henrique M., Figueiredo ACS. Estatísticas da produção E transferência de embriões em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. *O Embrião*. 2015;16–8.
3. Li L, Zhang X, Zhao L, Xia X, Wang W. Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(3):229–36.
4. Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on

- reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;93(8):2602–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>
5. Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* [Internet]. 2011 Nov [cited 2015 Feb 6];76(8):1433–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835456>
 6. Alexopoulos NI, Maddox-Hyttel P, Tveden-Nyborg P, D’Cruz NT, Tecirlioglu TR, Cooney M a., et al. Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: Implications for embryonic loss. *Reproduction*. 2008;136:433–45.
 7. Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod*. 2002;66(4):1169–77.
 8. Byrne a T, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil*. 1999;117(1):97–105.
 9. Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;91(5 SUPPL.):2087–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.049>
 10. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod*. 1997;56(5):1088–96.
 11. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*. 2006;14(2):125–31.
 12. Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 Apr [cited 2014 Nov 10];56(3):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666110>
 13. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin’s metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Nov 22];54(3):245–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998574>
 14. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*. 2014;131–46.
 15. Gao C, Han HB, Tian XZ, Tan DX, Wang L, Zhou G Bin, et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *J Pineal Res*. 2012;52(3):305–11.

16. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Herrera F, Antolín I. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. 2004;1–9.
17. Reiter RJ, Tan D, Manchester LC, Qi W. Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen Species. A Review of the Evidence. *Cell Biochem Biophys*. 2001;34(2):237–56.
18. Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, et al. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res*. 2009;47(2):192–200.
19. Wang F, Tian X, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Liu G. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Oct 14];55(3):267–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772689>
20. Wang F, Tian X, Zhou Y, Tan D, Zhu S, Dai Y, et al. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Oct 11];9(4):e93641. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Min S-H, Lee E, Son H-H, Yeon J-Y, Koo D-B. Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Cryobiology* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Sep 30];66(2):195–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376491>
22. Min S-H, Kim J-W, Lee Y-H, Park S-Y, Jeong P-S, Yeon J-Y, et al. Forced collapse of the blastocoel cavity improves developmental potential in cryopreserved bovine blastocysts by slow-rate freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Sep 16];49(4):684–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942049>
23. Holm, P, Schmidt, MH, Greve, T, Callesen H. 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*. 1999;52:683–700.
24. Stojkovic M, Machado S a, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*. 2001;64(3):904–9.
25. Parrish, J J, Krogenaes, A, Susko-Parrish L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* [Internet]. 1995;44:859–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727781>

26. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2014 Nov 17];67(1):73–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055564>
27. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001;29(9):2002–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
28. R statistical software version 3.0.2 [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>
29. Tan D, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):181–97.
30. Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Sep 30];101(2):577–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314921>
31. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: Clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*. 2003;18(2):384–91.
32. Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod*. 2004;19(12):2884–8.
33. Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3246–52.
34. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod*. 2002;17(3):744–51.
35. Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y -i., et al. Pathway for the Movement of Water and Cryoprotectants in Bovine Oocytes and Embryos. *Biol Reprod*. 2011;85(4):834–47.
36. Liebermann J, Matthews JM, Pawlowska E, Sanchez SR, Feinberg E, Sipe C. Is there any benefit in artificial collapse of human blastocysts prior to vitrification? *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Sep [cited 2014 Sep 30];98(3):S66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028212009697>
37. Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced

- collapse of the blastocoele. *Hum Reprod.* 2003;18(1):137–9.
38. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6):779–96.
 39. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(2):1141–7.
 40. Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, et al. In-straw Cryoprotectant Dilution for Bovine Embryos Vitrified Using Cryotop. *J Reprod Dev.* 2011;57(4):437–43.
 41. Diógenes, M.N., Sprícigo, J.F.W. Dode MAN. Vitrificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. *Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.* Foz do Iguaçu/PR; 2012. p. 495.
 42. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;75(7):1211–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>
 43. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LCO, Junior AM, et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote* [Internet]. 2014 May [cited 2015 Jun 28];22(2):124–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784438>
 44. Gómez E, Muñoz M, Rodríguez a., Caamaño JN, Facal N, Díez C. Vitrification of Bovine blastocysts produced in Vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reprod Domest Anim.* 2009;44:194–9.
 45. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 2006;65:236–44.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Doutorado trouxe muito mais que uma realização profissional, mas uma evolução pessoal e espiritual. As experiências obtidas da convivência com professores, pesquisadores e alunos nos diversos laboratórios pelos quais passei, transformaram meu modo de agir e pensar. Os resultados que, nem sempre eram os esperados, aguçaram minha capacidade crítica para percepção e capacidade de análise de resultados. Muitas vezes, o sucesso da técnica estava em detalhes que os artigos não mencionavam, mas nada que o trabalho em equipe, a dedicação e a persistência (às vezes de vários meses) não resolvesse. As várias horas, dias e noites que passamos nos laboratórios, abdicando do convívio com amigos e familiares, deu-me de presente novas experiências e amizades. Aprendi a relevar, a respirar e a ser mais humilde antes de tomar qualquer atitude precipitada. Neste contexto, hoje sei da importância de um prévio planejamento experimental e de projetos piloto. Aliado a tudo isso, a pesquisa nos torna pessoas melhores porque nos desafia a cada resultado, principalmente quando são contraditórios aos nossos propósitos. Definitivamente, sem a parceria com outras instituições este projeto não teria sido executado. Percebi que existem muitas pessoas que têm vontade de crescer e colaborar para o desenvolvimento da pesquisa brasileira, assim como servem de lição para meus futuros passos, seja na vida profissional ou pessoal.

Capítulo 1 – O início foi angustiante, uma vez que meu primeiro projeto, apesar de financiado, não tinha um delineamento experimental bom e era baseado em falsas promessas. Foi muito desgastante para toda equipe e, assim foi perdido. Novas propostas em parceria com a Embrapa Cerrados surgiram para o projeto atual, desta vez com bases sólidas. A revisão de literatura sobre a melatonina e a retirada do fluido da blastocle faziam com que eu me empolgasse ainda mais. Entretanto, a falta de ovários próximos ao laboratório do CTZL dificultava a execução de tantos experimentos. Mas como sempre há solução para problemas, surgiu a possibilidade da execução no laboratório da Embrapa Arroz e Feijão e também da padronização do laboratório da UFG.

Capítulo 2 – Os três primeiros experimentos foram penosos, porquanto já havia perdido um ano de Doutorado com o antigo projeto. Intensas foram as coletas e a produção *in vitro* de embriões que não perdoava finais de semana, feriados ou datas comemorativas importantes. No momento da realização das análises de fluorescência que precisávamos captar imagens fotográficas, depois de três laboratórios sem sucesso, conseguimos nos

instalar no Laboratório de Histofisiologia do ICB3. Então, partimos para a execução das técnicas que os artigos mencionavam. Algumas conseguimos logo de imediato, outras depois de vários meses de persistência e uma sem sucesso. Finalmente, nosso estudo mostrou que dependendo da qualidade ovocitária e da concentração que a melatonina é adicionada aos meios de maturação e/ou cultivo há melhora na qualidade e viabilidade embrionária.

Capítulo 3 – A execução do terceiro e quarto experimentos somente se tornou possível pela colaboração de todos os envolvidos, uma vez que deveríamos coletar os ovários em Goiânia e produzir os embriões em Brasília. Estávamos em uma época de seca e entressafra para abate de fêmeas nos frigoríficos. Como sempre “no final tudo dá certo”, conseguimos coletar muitos ovários em quatro estabelecimentos em uma semana. A amizade, o profissionalismo e o entrosamento entre os envolvidos permitiram que quase tudo desse certo. Durante as últimas análises, os derradeiros embriões vitrificados degeneraram. Decepção e sentimento de fracasso, pois não achávamos a causa. Posteriormente, soubemos que a partida de CIV enviada veio com problemas devido ao BSA vencido. Entretanto, serviu de aprendizado, pois na afobação para terminar e defender, não testei a partida como havia feito nas outras repetições. Retomadas as novas coletas e análises, concluo que nossa hipótese de associação de duas técnicas para melhorar a criotolerância e a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro* foi satisfatória. Primeiro porque geramos novas informações sobre qualidade embrionária através da expressão de genes. Segundo porque criamos uma expectativa para novos trabalhos sobre esta associação quanto às taxas de prenhez e nascimento devido às melhores taxas de eclosão propiciadas pela retirada do fluido da blastocle de embriões produzidos com melatonina sem alteração no número de células apoptóticas.

Todas as conclusões obtidas destes experimentos serviram de experiência e serão base para futuras pesquisas, *in vitro* e/ou *in vivo*.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 04 de maio de 2015.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 025/15

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** Alternativas para melhorar a qualidade de embriões *in vitro* à criotolerância
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** THAISA CAMPOS MARQUES
- ☐ **Pesquisadores Participantes:** Maria Lúcia Gambarini, Elisa Caroline da Silva Santos, Tiago Omar Diesel, Ariany Rafaella Neto Silva, Thiago Nogueira Marins
- ☐ **Unidade onde será realizado:** não consta a unidade da UFG onde será realizada. É relatada o setor de patologia Veterinária como depositário do material utilizado.
- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 06/04/2015

III - Objetivos e justificativa do projeto: Alternativas para melhorar a qualidade de embriões *in vitro* à criotolerância. Os ovários das fêmeas serão coletados em matadouro-frigorífico.

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** não se aplica
 - ☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Não vai haver manipulação do animal, os ovários de fêmeas bovinas serão obtidos de animais abatidos no Matadouro-Frigorífico JBS.
 - ☐ **Espécie e número total de animais utilizados:** não se aplica
 - ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** não se aplica
 - ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** não se aplica
 - ☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** não se aplica
 - ☐ **Método de eutanásia:** não se aplica
- Destino do animal:** não se aplica. Os ovários utilizados serão armazenados na câmara fria do Setor de Patologia Veterinária/UFG para serem posteriormente incinerados.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso I, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ☐ **Quanto a documentos:** documentação completa
- ☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Não se aplica. Coleta de material realizada no frigorífico após o animal ser abatido pelo frigorífico. Utilização de EPI.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em **30/07/2017**.

VII- Data da reunião: 04/05/2015

RENATA MAZARO:12343522812
2015.05.05 16:55:50 -03'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa

Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

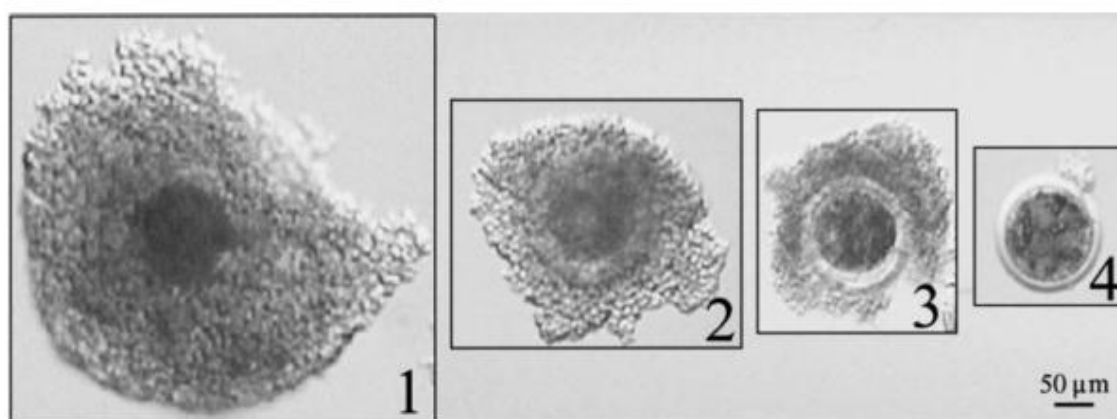
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

ANEXO B – CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS OVÓCITOS

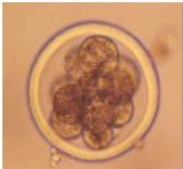
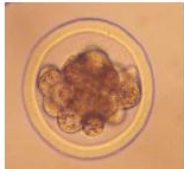
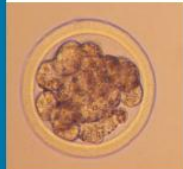
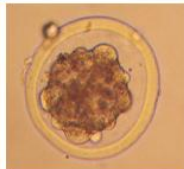
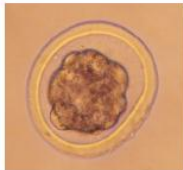
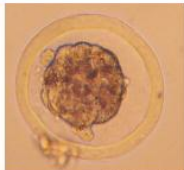
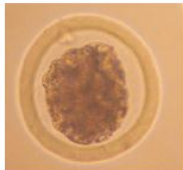
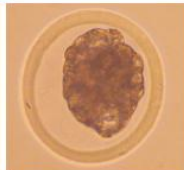
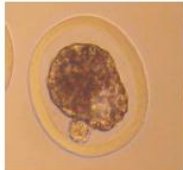
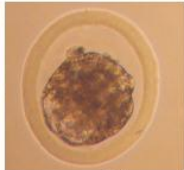
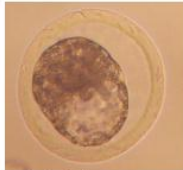
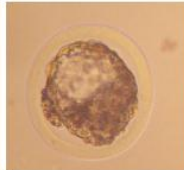
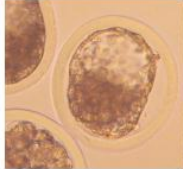
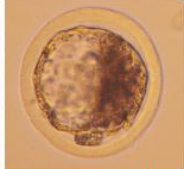
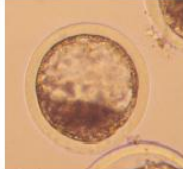
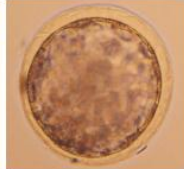
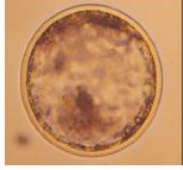
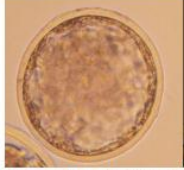
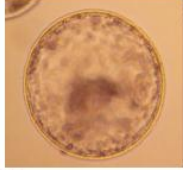
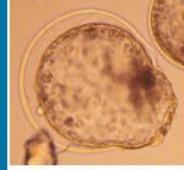
Fonte: Stojkovic, M, Machado, AS, Stojkovic, P, Zakhartchenko, V, Hutzler, P. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. *Biology of reproduction*. 2001; 64(3):904–9.

QUALIDADE	CARACTERÍSTICAS
Grau 1	Ovócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.
Grau 2	Ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas.
Grau 3	Ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, zona pelúcida coberta com 3 a 5 camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas.
Grau 4	Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.



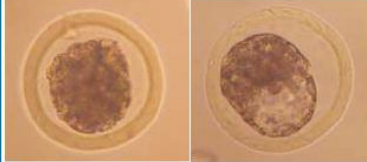
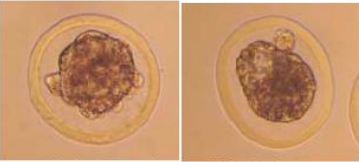
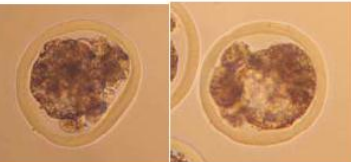
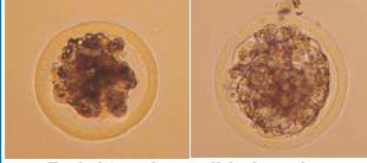
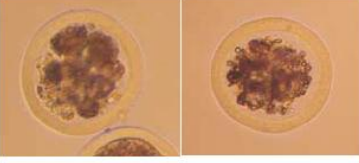
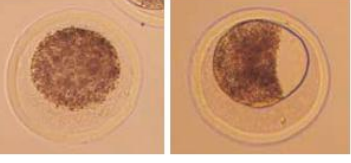
ANEXO C – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO

Fonte: Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)

				Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.
8 – 12 Células Código IETS: 2	8 – 12 Células Código IETS: 2	Mórula Código IETS: 3	Mórula Código IETS: 3	
				Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocel.
Mórula Compacta Código IETS: 4	Mórula Compacta Código IETS: 4	Mórula Compacta Código IETS: 4	Mórula Compacta Código IETS: 4	
				Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocel. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocel, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocel.
Blastocisto Inicial Código IETS: 5	Blastocisto Inicial Código IETS: 5	Blastocisto Inicial Código IETS: 5	Blastocisto Inicial Código IETS: 5	
				Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocel aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.
Blastocisto Código IETS: 6	Blastocisto Código IETS: 6	Blastocisto Código IETS: 6	Blastocisto Código IETS: 6	
				Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocel causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.
Blastocisto Expandido Código IETS:	Blastocisto Expandido Código IETS:	Blastocisto Expandido Código IETS:	Blastocisto Eclodido Código IETS: 8	

ANEXO D – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DE ACORDO COM A QUALIDADE MORFOLÓGICA

Fonte: Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)

 Embriões de qualidade excelente Código IETS: 1	 Embriões de qualidade boa Código IETS: 1	 Embriões de qualidade regular Código IETS: 2
Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, e estágio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.	Comentários: Embriões com uma ou poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração. Potencial de desenvolvimento semelhante ao embrião grau I, podendo também ser criopreservado.	Comentários: Embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.
 Embriões de qualidade pobre Código IETS: 3	 Embriões degenerados Código IETS: 4	 Oócitos não fecundados
Comentários: Extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.	Comentários: Embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, picnose, fragmentação e alterações de cor.	Comentários: Oócito sem sinais de clivagem, apresentando graus variados de retração, pulverização ou sedimentação do citoplasma. No menor aumento podem ser confundidos com mórula compacta ou Bi.

ANEXO E – PREPARO DA MELATONINA

→MELATONINA (Sigma M5250)

- ✓ Peso Molecular= 232,28g/mol
- ✓ Pureza: $\geq 98\%$
- ✓ Estocar a - 20°C
- ✓ Solubilidade (água): 1mg/mL

→OBSERVAÇÕES IMPORTANTES:

- ✓ Diluição conforme Dr. Reiter
 - Fazer solução Mãe/Stock para todo o experimento, pois diluir todos os dias leva ao erro.
 - Diluir em etanol, pois em DMSO pode influenciar de forma negativa no cultivo. (Diluímos em água milliQ, pois o frasco veio solúvel em água).
 - A diluição da solução estoque ou trabalho devem ser preparadas sob luz indireta.
 - A melatonina aliquoteada nunca deve ser reutilizada após descongelada. Descartar.

→PREPARO DAS SOLUÇÕES:

❖ Solução Mãe1 (10^{-3} M) → 10mL

- ✓ Pesar 0,0023228g e diluir em 200µL de água milliQ. Homogeneizar e em seguida adicionar 9800 µL de água MilliQ ou de meio de cultivo.

❖ Solução Mãe2 (10^{-5} M) → 2mL

- ✓ 20µL da solução Mãe1
- ✓ 1980 µL de água MilliQ ou de meio de cultivo.
- ✓ Aliquotar (20 µL) e congelar protegido da luz (USO: Experimentos 1 e 2)

❖ Stock (10^{-6} M) → 2mL

- ✓ 200µL da solução Mãe2 (10^{-5} M)
- ✓ 1800µL de água MilliQ ou de meio de cultivo.
- ✓ Aliquotar (10 µL) e congelar protegido da luz (USO: Experimentos 3 e 4)

❖ Solução de trabalho:**➤ Experimentos 1 e 2:**

- ✓ Sol. 10^{-7} M $\rightarrow$ 10 μ L sol. MÃE2 + 990 μ L de meio
- ✓ Sol. 10^{-9} M $\rightarrow$ 10 μ L sol. 10^{-7} + 990 μ L de meio
- ✓ Sol. 10^{-11} M $\rightarrow$ 10 μ L sol. 10^{-9} + 990 μ L de meio

➤ Experimentos 3 e 4:

- ✓ Sol. 10^{-9} M $\rightarrow$ 2 μ L sol. STOCK + 1998 μ L de meio
- ✓ Sol. 10^{-11} M $\rightarrow$ 10 μ L sol. 10^{-9} + 990 μ L de meio

ANEXO F – PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E GLUTATIONA EM OVÓCITOS E EMBRIÕES

→ EROS: CM-H₂DCFDA (C 400, molecular probes)

- Mw (peso molecular): 531,3
- Stock ROS: 0,0053g em 10 mL PBS/PVA (10^{-3} M).

→ GSH: CellTracker Blue CMF₂HC: (C12881, 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin; Molecular Probes)

- Mw: 246,6
- Stock GSH: 0,0025g em 10 mL de PBS/PVA (10^{-3} M).

➤ Solução PBS-PVA

Componente	Para 1L de H ₂ O milli-q
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	2,88g
PVA	2g

➤ Diluição das sondas em PBS/PVA – Solução de uso

- OBS.: Diluir no dia do uso. Preparar as placas com sondas sempre no mesmo dia, sempre próximo de sua utilização.
- Concentração de 10 μ M (para as duas sondas):
 - 980 μ L PBS/PVA de sonda
 - 10 μ L Stock GSH
 - 10 μ L Stock ROS

➤ Procedimento para a coloração:

1. Lavar os embriões/oócitos em 3 gotas de PBS/PVA (50 μ L) sem as sondas.
2. Preparo das sondas: 10 μ L de Stock GSH + 10 μ L de Stock ROS + 980 μ L de PBS/PVA.

3. Preparar placa com gotas de 100 μ L (PBS/PVA com as sondas), sob óleo mineral. Levar à estufa por 30 a 60 minutos para aquecer as sondas. (OBS.: Também podem ser preparados em eppendorf (250 μ L PBS/PVA com as sondas), protegido de papel alumínio).
4. Colocar as estruturas nas gotas preparadas e incubar durante 30 minutos em estufa.
5. Lavar novamente em 3 gotas de PBS/PVA (sem sonda). Colocar as estruturas na lâmina, utilizando vaselina nos cantos da lamínula e esmalte nas bordas para vedar e manter o formato das estruturas (Basta encostar a lamínula na gota). Cuidado: manter no escuro! (colocar em caixa fechada, até avaliação em microscópio de fluorescência).
6. Tirar foto de cada uma das estruturas através de microscópio de Fluorescência. Filtros para análise de GLUTATIONA: 370 nm (FILTRO VERDE – visualização em azul); ROS: 460 nm (FILTRO AZUL – visualização em verde).
7. Analisar as imagens através do software Image J. Utilizar grupo controle como padrão de coloração. Fazer média do nível de intensidade em pixels, no grupo controle para estabelecer uma quantidade padrão.
8. Estabelecer uma media em cada tratamento, da intensidade de fluorescência.
9. Referências:
 - Santos ECS, Sato D, Lucia T, Iwata H. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote*. 2013 Dec 20;1-8.
 - Takeo S, Kawahara-Miki R, Goto H, Cao F, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Iwata H. Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. *Mol Reprod Dev*. 2013 Jul;80(7):508-21. doi: 10.1002/mrd.22187.
 - Itami N, Kawahara-Miki R, Kawana H, Endo M, Kuwayama T, Iwata H. Age-associated changes in bovine oocytes and granulosa cell complexes collected from early antral follicles. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Aug;31(8):1079-88. doi: 10.1007/s10815-014-0251-y.
 - Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S, Takahashi M. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *J Reprod Dev*. 2007 Jun;53(3):605-14.

ANEXO G – PROTOCOLO ANÁLISE DE POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL EM OVÓCITOS

➤ **Mitotracker Orange CMTMRos- Special Packaging. Código: M-7510** (Life technologies)

- Peso molecular: 427,37
- Concentração final: 0,5 μ M
- Emissão/Excitação: 560 nm

➤ **Preparo das Soluções:**

1. PBS/PVA:

Componente	Para 1L de H ₂ O milli-q
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	2,88g
PVA	2g

2. PBS/PVA+ Mitotracker (Stock 1 mM):

Componente	Quantidade
Mitotracker	0,00213685 g
PBS/PVA	5 mL

*Aliquotar em 5 μ L. Estocar protegido da luz em freezer ou nitrogênio (< -20°C).

3. Paraformaldeído 20%

Componente	Quantidade
Paraformaldeído puríssimo Vetec 694	0,6
PBS aquecido (60°C)	3mL
OBS. Demora a diluir, tem que aquecer	

*Manter em geladeira. Preparado na semana do uso.

Diluição para Paraformaldeído 3,7%

Solução	Quantidade
Paraformaldeído 20%	2,775 mL
PBS/PVP	12,225 mL

*Manter em geladeira. Preparada na semana do uso.

➤ Técnica:

- Retirar 1 μL da solução stock e colocar em 2000 μL de PBS/PVA. (Concentração final de 0,5 μM).
- Preparar gotas de 100 μL em placa com óleo. Colocar na estufa para aquecer. (1h-1h30min).
- Adicionar os ovócitos nas gotas preparadas e levar novamente à estufa por 30 minutos. Lavar 3 vezes em gotas de PBS/PVA (50 μL).
- Retirar e fixar em paraformaldeído 3.7%. Colocar em placas 4 poços, cada poço com 400 μL . Placa protegida da luz. Manter em geladeira (24h).
- Ao final da fixação, lavar os ovócitos 3 vezes em gotas de PBS/PVA (50 μL).
- Preparar as lâminas:
 - 1) Na lâmina, colocar os ovócitos (n=5) com o mínimo de PBS/PVA. Com o auxílio da pipetinha, circundá-los com óleo mineral (para não espalharem). Adicionar aos embriões uma gota de 1 μL de *PROLONG@GOLD ANFIFADE MOUNTANT* (P10144-Life Technologies). Usar vaselina entre lâmina e lamínula para as células não amassarem ou estourarem. (Pressione levemente a lamínula até fazer uma bolha ao redor dos ovócitos). OBS.: Se for usar lâmina abaulada, não é necessário colocar o óleo mineral.
 - 2) Tirar as fotos dos ovócitos e analisar a fluorescência (Filtro 560nm).
 - 3) Mensurar a intensidade da atividade mitocondrial através do software ImageJ.

➤ Referência:

- Santos ECS, Sato D, Lucia Jr T, Iwata H. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote*. 2013 Dec 20:1-8.

ANEXO H – PROTOCOLO TUNEL PARA EMBRIÕES

→ KIT = In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein

(Roche: www.roche-applied-science.com)

- ✓ For detection and quantification of apoptosis at single cell level, based on labeling of DNA strand breaks (TUNEL technology): Analysis by fluorescence Microscopy or flow cytometry.
- ✓ Cat. No.:11684 795 910 Roche Diagnostics
- ✓ 1 Kit: 50 tests

→ MATERIAL

1. PBS
2. PVP (Polivinilpirrolidona) ou BSA (Bovine serum albumin)
3. Paraformaldeído puríssimo (Vetec 694)
4. Trizma Hydrochloride (Sigma T3253)
5. Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)
6. DNase
7. Triton X-100
8. Citrato de sódio
9. Hoeschst 33342
10. Kit TUNEL (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein - Roche)
11. ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR)
12. Água deionizada
13. Água Mili-q
14. Placas de petri ($\varnothing=60mm$)
15. Placas NUNC (quatro poços)
16. Lâminas
17. Lamínulas
18. Papel alumínio
19. Ponteiras 200 μ L e 1000 μ L
20. Câmara úmida (caixa para ponteiras com papel úmido no fundo e envolta por papel laminado – colocar em um banho-maria)

→ SOLUÇÕES BASE

1. PBS-PVP (1mg de PVP por mL de PBS) → Tampão de lavagem
2. Paraformaldeído 3,7% → Solução fixadora
3. Solução Tris-HCL (400mM) → Tampão usado na solução DNase
4. Solução $MgCl_2$ (50mM) → Usada na solução DNase
5. Solução Hoeschst (mãe)

→ MODO DE PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA O KIT

1. PBS/PVP ou PBS/BSA

Solução	Quantidade
PBS	50 mL
PVP (Polivinilpirrolidona) ou BSA (Bovine serum albumin)	0,05 g

Manter em geladeira. Preparada na semana do uso.

2. Solução de Fixação (Paraformaldeído 3,7%)

Paraformaldeído 20%

Componente	Quantidade
Paraformaldeído puríssimo vetec 694	0,6 g
PBS aquecido (60°C)	3 mL

OBS: Demora a diluir, tem que aquecer

Manter em geladeira. Preparado na semana do uso. Usar em temperatura ambiente.

Diluição para Paraformaldeído 3,7%

Solução	Quantidade
Paraformaldeído 20%	2,775 mL
PBS-PVP	12,225 mL

Manter em geladeira. Preparada na semana do uso.

3. Solução Tris-HCL 400mM (utilizada na solução DNase)

Componente	Quantidade
Trizma Hydrochloride sigma T3253	0,06304 g
Água Milli-q	1 mL

Manter em freezer a -20°C.

4. Solução $MgCl_2$ 50 mM

Componente	Quantidade
$MgCl_2$	0,001 g
Água Milli-q	1 mL

Manter em freezer a -20°C.

5. Solução DNase 50 U/mL (mãe)

Componente	Quantidade
DNase	0,0001g
Água milli-q	100 µL

Manter em freezer a -20°C.

6. Solução DNase

Componente	Concentração	Quantidade (50µL de solução)
Solução Tris-HCl	400 mM	5 µL
Solução MgCl ₂	50 mM	6 µL
Solução DNase mãe	50 U/mL	0,5 µL
Água Milli-q	-----	38,5 µL

Manipular no gelo. Não armazenar, preparar no momento do uso.

7. Solução permeabilizadora

Componente	Quantidade
Triton X-100 (0,5%)	75 µL
Citrato de sódio	0,015g
PBS-PVP aquecido (36-38°C)	14,925 mL
OBS: Aquecer para diluir o Triton X-100	

Manter em geladeira. Preparada na semana do uso.

8. Solução mix (Soluções do kit tunel)

Componente	Quantidade
Vial 1-tampa azul –solução enzimática	50 µl
Vial 2-tampa roxa-solução marcadora	450 µl

Preparar na hora da utilização (manipular no gelo). Não armazenar.

9. Solução Hoeschst (mãe)

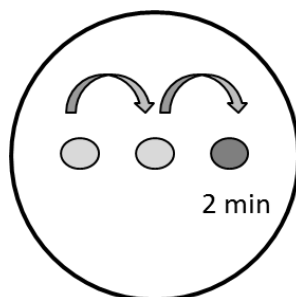
Componente	Quantidade
Hoeschst 33342	1 mg
Água deionizada	1 mL

* Aliquotar 9 µL e congelar em eppendorf (em -20°C) protegido da luz. Utilizar 1,5 mL de PBS/PVP para uso na técnica.

→ PREPARO DA TÉCNICA:

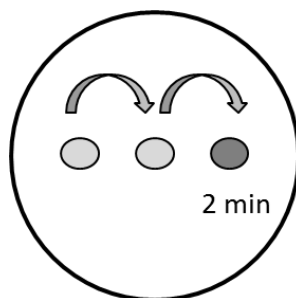
1. Lavar os embriões em PBS-PVP em uma gota de 100 µL.
2. Transferir para solução de fixação (Paraformaldeído – temperatura ambiente) em placas NUNC, contendo 400 µL de solução. Manter em temperatura ambiente por 1 hora (Pode deixar overnight na geladeira).

3. Lavar os embriões em 3 gotas de 100 μ L PBS-PVP. Deixar 2 minutos na última gota.

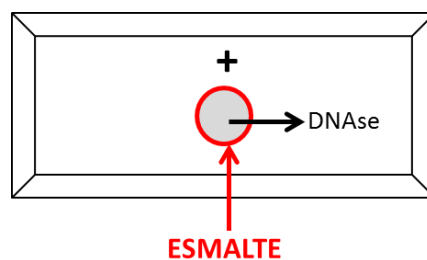


4. Transferir os embriões para solução permeabilizadora, 400 μ L (placa NUNC), por 1 hora em geladeira (2-8°C).

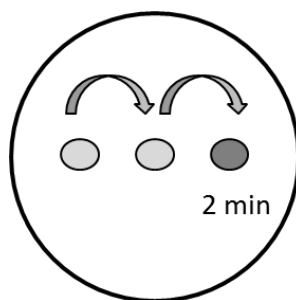
5. Lavar os embriões em 3 gotas de 50 μ L de PBS/PVP. Deixar 2 minutos na última gota.



6. Dividir os embriões em três grupos: controle positivo, controle negativo e amostra. Lavar o grupo positivo em uma gota de solução DNase para posteriormente incubá-lo em 10 μ L da mesma solução em lâmina (marcada com um círculo de esmalte). Preparar e manter a solução DNase sempre em gelo (todos componentes). A lâmina contendo os embriões e a solução DNase devem permanecer por 1h em câmara úmida a 37°C (caixa de ponteiros com papel úmido e envolta por papel laminado, dentro de um banho-maria).



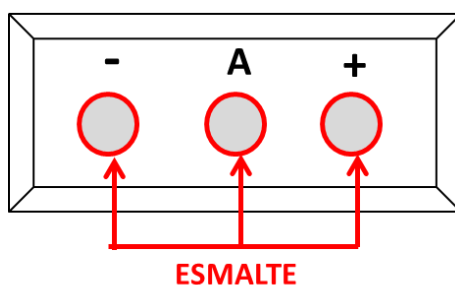
7. O grupo negativo e a amostra devem permanecer em PBS/PVP em placa nunc 400 μL em 37°C por 1 hora (mesa aquecedora ou estufa).
8. Lavar os grupos de embriões em 3 gotas de 50 μL de PBS/PVP, deixando 2 minutos na última gota. A partir desta etapa, manipular esta o grupo controle positivo sempre por último!



9. Reação TUNEL

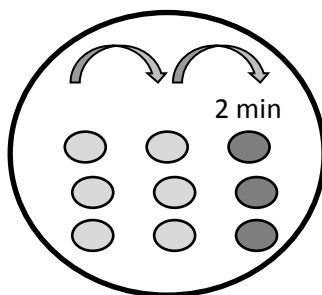
→ **MANIPULAR NO ESCURO!!**

- a. O grupo negativo deve ser lavado em uma gota de solução marcadora (tampa roxa-kit) e posteriormente incubado em 10 μL da mesma solução, em uma lâmina marcada com esmalte circular por 1 hora a 37°C , em câmara úmida. Manipular esta solução sempre em gelo e com a utilização de luvas.
- b. O grupo positivo e a amostra devem ser lavados em uma gota de solução mix (tampa roxa + tampa azul) e incubados em 10 μL da solução mix em uma lâmina marcada com esmalte circular, por 1 h em 37°C , em câmara úmida. Manipular esta solução sempre em gelo e com a utilização de luvas e no escuro. Passar o grupo positivo sempre por último!

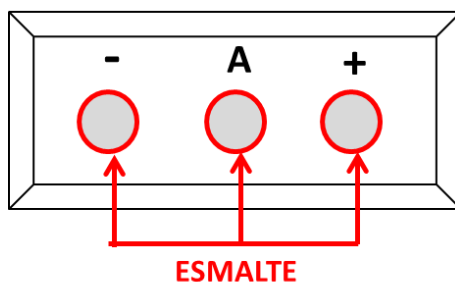


Obs.: O volume 10 μL das soluções Tunnel adicionado no interior dos círculos é suficiente para aproximadamente 10 embriões.

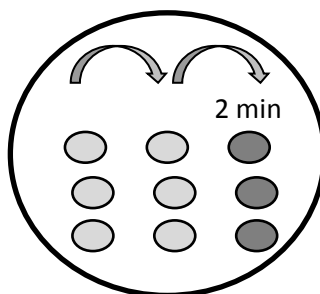
10. Lavar os grupos de embriões em 3 gotas de 50 μL de PBS/PVP, deixando 2 min na ultima gota, protegido da luz.



11. Incubar os embriões (todos os grupos) em solução Hoeschst por 10 min em gotas de 20 μL em lâminas com esmalte. Protegido da luz!

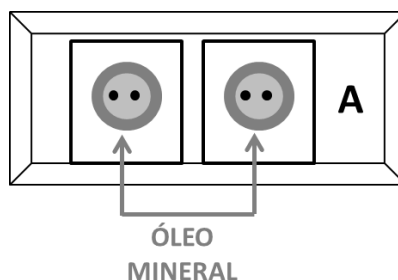


12. Lavar cada grupo de embriões em 3 gotas de 50 μL de PBS/PVP, deixando 2 min na ultima gota, protegido da luz.



13. Montar as lâminas de cada grupo para visualização. Colocar os embriões com o mínimo de meio possível em lâmina (separados para não se misturarem). Logo

em seguida, faça um círculo em volta dos embriões com óleo mineral, utilizando uma pipetinha (para o embrião não se mover). Marcar o local dos embriões com um círculo (no verso da lâmina) para facilitar a localização dos mesmos. Cobrir com lamínula e visualizar no microscópio de fluorescência.



Obs.: Para manter a fluorescência por um maior período, adicionar uma gotinha de ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) durante a montagem das lâminas e lamínulas. Pode deixar em geladeira, protegido da luz, por até 5 dias.

→ FILTROS

- ✓ VERMELHO (450 nm) – visualização do núcleo em coloração verde (corante FITC), que são as células túnel positivas: com DNA fragmentado.
- ✓ AZUL (365 nm) – visualização do núcleo com coloração azul (corante Hoeschst), que marca todo o material genético.

OBSERVAÇÃO: A Contagem das células é realizada na AMOSTRA. Sob o filtro Azul, contam-se todas as células coradas em azul (total de células) e com o filtro Verde, contam-se as células lesadas (cor verde). Os controles negativo e positivo apenas indicam o funcionamento e intensidade dos corantes. Basear na fluorescência do negativo para depois analisar o positivo e as amostras.