PATRÍCIA MONKEN DE ASSIS

**Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação
antioxidante**

São Paulo

2014

PATRÍCIA MONKEN DE ASSIS

Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Mayra Elena O. D'Ávila Assumpção

De acordo:

Orientadora

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca FMVZ USP.

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3030
FMVZ

Assis, Patrícia Monken
Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante /
Patrícia Monken de Assis. -- 2014.
105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profª. Drª. Mayra Elena O. D'Ávila Assumpção.

1. Estresse oxidativo. 2. Desenvolvimento. 3. Cultivo. 4. Caspase. 5. AFMK. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Melatonina no cultivo in vitro de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante", protocolado sob o nº2711/2012, utilizando 80 (oitenta) ovários bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Melatonin on in vitro culture of bovine embryos: dynamics and antioxidant properties", protocol number 2711/2012, utilizing 80 (eighty) bovine embryos, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 29 de agosto de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ASSIS, Patrícia Monken

Título: Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais agradeço, pelo apoio financeiro e emocional durante todo esse período, e por acreditar nos meus ideais e sonhos de carreira.

Aos meus amigos, pela paciência durante este período de total dedicação a este trabalho.

Agradeço, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e ao grupo do Departamento e do Programa de Pós Graduação de Reprodução Animal por disponibilizar suas facilidades e por proporcionar elementos para minha formação ao longo do curso de Mestrado.

Minha enorme gratidão aos meus colegas de laboratório, Adriano Siqueira, Camilla Mendes, Thaís Hamilton, Julia Baldrighi, Juliana Delgado, Marcelo Goissis, Mariana Giassetti, Robinson Worst, por todas as discussões construtivas que enriqueceram este trabalho, assim como, por tornar possível cada manipulação de FIV realizada. Leticia Castro, de uma forma ou de outra estava presente em todo esse trabalho, não sei como lhe agradecer, meu cérebro acessório.

Ao Frigorífico Angelelli Ltda. pela doação dos ovários que foram fundamentais para esta pesquisa. Em especial, ao Sr. João e Gilberto que tinham o cuidado semanal de preparar esse material para ser entregue no nosso laboratório.

Em especial a Profa. Mayra E. O. A. Assumpção que confiou em mim, me aceitou como sua orientada e me deu a liberdade para errar e acertar, sempre me direcionando para tornar possível este trabalho. E ao Prof. José Antônio Visintin, que no início de minha formação, me deu a oportunidade de vir a conhecer o Laboratório de FIV, clonagem e transgenia animal, onde tive a certeza de que iria seguir a carreira na Reprodução Animal.

Aos colaboradores, Rose, que me auxiliou nas análises de microscopia confocal, Profa. Dra. Maria Angélica Miglino por disponibilizar as facilidades de seu laboratório, Profa. Zulma Ferreira, que me auxiliou nas análises de HPLC e a Profa. Regina Markus (IB) por ceder as facilidades de seu laboratório. A Profa. Marcella Pécora Milazzotto por ceder e auxiliar nas análises de RT-PCR, do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução da Universidade Federal do ABC.

Ao grupo GNLF, pelas risadas, desabafos, e mais risadas, apoio moral, paciência e pela grande amizade construída graças a esse período.

“Nosso estado de mente positiva pode agir como antídoto para nossas tendências negativas e estados de desilusão... Ao aumentar a capacidade desse antídoto, quanto maior a sua força, maior a chance de reduzir a força das aflições mentais e emocionais, e você será ainda mais capaz de reduzir o efeito e influência desses fatores” Dalai Lama

RESUMO

ASSIS, P. M. **Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos**: dinâmica e ação antioxidante. [Melatonin on *in vitro* culture of bovine embryos: dynamics and antioxidant properties]. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

A melatonina (MEL) é uma indolamina lipofílica com conhecida ação antioxidante por via direta, através da formação e ação de seus metabólitos, dentre eles o N1-acetil-N2-formil-5 metoxikinuramina (AFMK), ou por ação via receptores de membrana (MT1 e MT2). No entanto, não se sabe a dose ideal para utilização e sua estabilidade nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) embrionário bovino. Neste trabalho, para avaliar se há perda de MEL para o sistema de CIV, determinou-se pela técnica de HPLC a concentração real de melatonina no meio CIV em sistema com e sem óleo mineral após a adição de diferentes doses iniciais de MEL (DM; 0, 25, 50, 100ng/ml), e assim, avaliadas em diferentes tempos de incubação (0, 24, 72 e 144 horas). Em seguida, avaliou-se a ação e consumo da melatonina no CIV de embriões submetidos ao estresse oxidativo induzido. A CIV foi realizada em atmosfera controlada (38,5°C, 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). No quinto dia de cultivo embriões, que apresentavam no mínimo 16 células, foram divididos aleatoriamente entre os grupos 0, 25, 50 e 100ng/ml de MEL, e todos receberam indução com 5µM de menadiona durante 24 horas. Após este período, o meio foi coletado para análise de HPLC (MEL e AFMK) e os embriões foram cultivados apenas com as DM até D8. Os blastocistos (D8) foram destinados para avaliação de espécies reativas de oxigênio (ROS), contagem de blastômeros (nBLAST), detecção de atividade de caspase-3 e -7 (CASP) através de microscopia confocal de epifluorescência, e expressão gênica (GRP78, SOD1 e HSP60). Foi também analisada a taxa de blastocisto (TXBL). Constatou-se que não há migração para o óleo, ou degradação da MEL ao longo do tempo de CIV. Na utilização da dose de 50ng/ml de MEL no cultivo de embriões com estresse oxidativo induzido há consumo da melatonina no meio e formação de AFMK ($p<0.05$), maior TXBL (45,93 vs. 33,06%, $p<0.05$) e nBLAST (143 vs. 93,1, $p<0.05$), e redução de ROS

(0,84 vs. 1,66 pixels, $p<0.05$) e CASP (0,91 vs. 1,54 pixels, $p<0.05$), se comparado ao grupo sem MEL. Contudo, não houve alteração na expressão gênica. Conclui-se que a melatonina mostrou comportamento estável nas condições de cultivo, podendo ser usada em sistemas com e sem óleo e possui ação antioxidante na dose de 50ng/ml, aumentando a produção e qualidade de embriões *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo induzido.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Desenvolvimento. Cultivo. Caspase. AFMK.

ABSTRACT

ASSIS, P. M. **Melatonin on *in vitro* culture of bovine embryos:** dynamics and antioxidante properties. [Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e ação antioxidante]. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

Melatonin (MEL) is a lipophilic indolamine with well-known antioxidant properties, by an scavenger action, producing its metabolites such as N1-acetil- N2- formil-5 metoxykinuramin (AFMK) or through a membrane receptor pathway (MT1 and MT2). Although, little is known about its stability and ideal dose on *in vitro* bovine embryo culture (IVC). In this work, to evaluate if there is any loss of MEL to the IVC systems, we determinate by HPLC, the real concentration of MEL in each system, with and without mineral oil, after the addition of different initial doses of MEL (DM; 0, 25, 50, 100ng/ml), and then analyzed at different incubation period (0, 24, 72 e 144 hours). Then, it was evaluated the action and consumption of MEL in IVC of embryos submitted to induced oxidative stress. The IVC was done in controlled atmosphere (38,5°C, 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). At Day 5, embryos over 16 cells were randomly divided in the treatments 0, 25, 50 and 100 ng/ml of MEL, and all received the induction with 5µM of menadione during 24 hours. After incubation, the media was collected for HPLC analysis (MEL and AFMK) and embryos returned for culture with DM until Day8 (D8). The blastocysts (D8) were designated to Reactive oxygen species (ROS) evaluation, total number of cell (nBLAST), detection of caspase-3 and -7 activity (CASP) and gene expression (GRP78, HSP60 and SOD1). Blastocyst rate (TXBL) was also assessed. Result show that there is no loss of MEL to the oil, or degradation over incubation time. At 50ng/ml there was a consumption of melatonin in the media and formation of AFMK (p<0.05), higher TXBL (45,93 vs. 33,06%, p<0.05) and nBLAST (143 vs. 93,1, p<0.05), lower ROS (0,84 vs. 1,66 pixels, p<0.05) and CASP (0,91 vs. 1,54 pixels, p<0.05), when in contrast with the group without MEL. However, there was no difference in gene expression. In conclusion, melatonin has a stable behavior in IVC system, which allows the use in system with and without oil. Also, at the dose of

50ng/ml has an antioxidant effect, improving quality and production of embryos culture *in vitro* at induced oxidative stress.

Keywords: Oxidative stress. Development. Culture. Caspase. AFMK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio	27
Figura 2 - Biossíntese de melatonina pelo triptofano	32
Figura 3 - Efeito da indução com menadiona no status oxidativo, número total de blastômero e taxa de blastocistos de embriões induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014	49
Figura 4 - Avaliação morfológica do desenvolvimento embrionário (D8) nos embriões tratados com melatonina e induzidos ao estresse oxidativo - São Paulo – 2014.....	71
Figura 5 - Imagens descritivas das análises de quantificação número de blastômeros, avaliação do status oxidativo e atividade de caspase, dos diferentes tratamentos com melatonina com os controles positivos e negativos das técnicas – São Paulo – 2014	76

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Comparação da concentração de melatonina (MEL – 0, 25, 50 e 100ng/ml) no meio de cultivo, entre sistema com óleo mineral (SO) e sem óleo mineral (SSO) analisados por HPLC – São Paulo – 201467
- Gráfico 2 – Concentração de melatonina no meio de cultivo em cada um dos tempos de incubação avaliados (0, 24, 72 e 144 horas) – São Paulo – 201467
- Gráfico 3 - Comparação das concentrações de Melatonina, pela técnica de HPLC, no meio de cultivo de embriões, antes e após período de indução ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014.....68
- Gráfico 4 - Comparação das concentrações de AFMK, pela técnica de HPLC, no meio de cultivo de embriões antes e após período de indução ao estresse oxidativo – São Paulo - 201469
- Gráfico 5 - Efeito da dose de melatonina (DM) na taxa de blastocisto em D8 (TBL) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 201470
- Gráfico 6 - Efeito da dose de melatonina (DM) no número de blastômeros totais (nBLAST) em blastocisto expandido em D8 induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 201472
- Gráfico 7 - Efeito da dose de melatonina no status oxidativo de blastocisto expandidos (D8) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 201473

Gráfico 8 - Efeito da dose de melatonina na atividade de caspase 3 e 7 de blastocisto expandidos (D8) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 2014	74
Gráfico 9 - Níveis de expressão relativa dos genes SOD1 (A), HSP60 (B) e GRP78 (C), em blastocisto expandidos (D8) tratados com diferentes doses de melatonina (DM) e induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014	75
Gráfico 10 – Gráficos de dispersão entre as variáveis dependentes taxa de blastocisto (TXBL) e análise, status oxidativo (ROS) e número total de blastômeros (nBLAST) – São Paulo – 2014	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Levantamento bibliográfico do uso da melatonina na produção <i>in vitro</i> de embrião.....	36
Quadro 2 - Lista de referências dos primers (ensaio TaqMan®) utilizados para expressão gênica em blastocistos bovinos	62
Quadro 3 - Delineamento para análise da dinâmica da melatonina nos diferentes sistemas de cultivo – São Paulo – 2014.....	64
Quadro 4 - Delineamento para avaliação da ação da melatonina frente desafio oxidativo em embriões bovinos – São Paulo – 2014.....	64
Tabela 1 - Avaliação do desenvolvimento embrionário no D8 (blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) nas diferentes doses de melatonina (0, 25, 50 e 100ng/ml) – São Paulo - 2014	70
Tabela 2 – Valores de p e Rho das correlações da PIV de embriões bovinos induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014	105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	26
2.3	ANTIOXIDANTES	28
2.4	O ESTRESSE OXIDATIVO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	29
2.5	MELATONINA: POTENTE ANTIOXIDANTE PARA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	31
2.5.1	Síntese da melatonina	31
2.5.2	Ação antioxidante da melatonina: “<i>Scavenger</i>”	33
2.5.3	Ação antioxidante da melatonina: sinalização e receptores	34
2.6	MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	35
3	HIPÓTESE	39
4	OBJETIVOS.....	421
5	NOVA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	43
5.1	INTRODUÇÃO	44
5.2	MATERIAL E MÉTODO	45
5.2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	46
5.2.2	Sistema de cultivo <i>in vitro</i> embrionário bovino para avaliação de estresse oxidativo	46

5.2.3	Avaliação do desenvolvimento embrionário	47
5.2.4	Avaliação do <i>status</i> oxidativo	47
5.3	RESULTADOS.....	48
5.4	DISCUSSÃO	50
	REFERÊNCIAS.....	51
6	DINÂMICA E AÇÃO ANTIOXIDANTE DA MELATONINA NO SISTEMA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	52
6.1	INTRODUÇÃO	54
6.2	MATERIAL E MÉTODO	55
6.2.1	Reagentes e Soluções	56
6.2.2	Experimento 1 - Avaliação da dinâmica da melatonina nos sistemas utilizados para produção <i>in vitro</i> de embrião.....	56
6.2.2.1	Dosagem de melatonina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	57
6.2.3	Experimento 2 - Ação da melatonina no cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo	58
6.2.3.1	Colheita de oócitos, maturação e fecundação <i>in vitro</i>	58
6.2.3.2	Cultivo <i>in vitro</i> embrionário com indução de estresse oxidativo e melatonina.....	59
6.2.3.3	Análise de melatonina e seu derivado, AFMK, em meio de cultivo de embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo	60
6.2.3.4	Avaliação do desenvolvimento embrionário	60
6.2.3.5	Avaliação do <i>status</i> oxidativo	60
6.2.3.6	Avaliação da atividade de caspase-3 e caspase-7.....	61
6.2.3.7	Extração de RNA e RT-PCR quantitativo	61
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	63
6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65

6.5	RESULTADOS	66
6.5.1	Estabilidade da melatonina em sistema de cultivo <i>in vitro</i> embrionário com e sem óleo mineral	66
6.5.2	Ação antioxidante da melatonina no cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovino submetidos ao estresse oxidativo	68
6.5.2.1	Produção de AFMK e consumo de melatonina no meio durante o cultivo <i>in vitro</i> de embriões induzidos ao estresse oxidativo	68
6.5.2.2	Avaliação do desenvolvimento embrionário	69
6.5.2.3	Avaliação <i>status</i> oxidativo	72
6.5.2.4	Avaliação da atividade da Caspase-3 e Caspase-7	73
6.5.2.5	Avaliação de expressão gênica por RT-PCR	74
6.6	DISCUSSÃO	77
	REFERÊNCIAS	82
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A - MEIOS DE CULTIVO	97
	APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PROBES FLUORESCENTES PARA EMBRIÃO	103
	APÊNDICE C - ANÁLISE DE CORRELAÇÕES NA INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PIV.....	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial demanda dos produtores rurais maior produtividade. A pecuária utiliza as biotecnologias da reprodução como ferramentas para o aumento da produtividade de um rebanho pela multiplicação de animais com alto valor genético através da produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. O Brasil é o maior produtor de embriões bovinos, com 66,6% da produção mundial. A pecuária de corte é responsável pela produção de 79,7% dos embriões (IETS, 2011).

No Brasil, a relação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* alterou, sendo que desde 2010, 87,59% dos embriões são produzidos *in vitro* (PIV) (VIANA et al., 2010). Acredita-se que essa inversão ocorreu devido ao baixo custo de produção por embrião em comparação ao *in vivo*, a otimização do uso da palheta de sêmen, assim como, devido a maior parcela do rebanho brasileiro ser composto por animais *Bos indicus*. Sabe-se que vacas Nelore, possuem maior quantidade de folículos recrutados por onda, quando comparados com *Bos taurus* (AERTS; BOLS, 2010), aumentando a taxa de recuperação de oócitos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU - do inglês: Ovum Pick-Up).

No entanto, mesmo com todos os avanços e conhecimentos sobre a produção *in vitro* adquiridos ao longo dos últimos 40 anos de utilização da técnica a campo, ainda não foi possível igualar às taxas de prenhez dos embriões produzidos *in vivo*, pela técnica de superovulação e colheita/transferência de embriões (SOVTE). Em *Bos indicus*, apenas 12,5% dos oócitos utilizados para a produção *in vitro* de embrião geram gestação, sendo a taxa de prenhez por embrião transferido de 33,52% (de um total de 36,5% de taxa de blastocistos). Já na produção *in vivo* obtém-se uma média de 6,7 embriões viáveis/lavado, com taxa de prenhez de 41,5% (PONTES et al., 2009, 2011)

Essa disparidade de resultados leva a crer que o sistema de PIV acarreta alterações no embrião que impede a gestação a termo. Modificações morfológicas entre embriões *in vivo* e *in vitro*, já foram descritas, dentre elas, o aumento de gotas lipídicas no citoplasma e as alterações mitocondriais (ABE et al., 1999). No entanto,

achados recentes apontam para a existência também de modificações no perfil oxidativo desses embriões *in vitro* (CAGNONE; SIRARD, 2013).

Um dos fatores mais críticos na PIV que influenciam diretamente nas alterações do perfil oxidativo é a concentração de oxigênio durante o processo de produção. Sabe-se que a concentração de oxigênio intrauterina é em torno de 2-8% de O₂ e a concentração atmosférica é de 20% de oxigênio (BONTEKOE et al., 2012). Ao se cultivar embriões com porcentagens altas de oxigênio pode-se levar à condições de estresse oxidativo, ou seja, um desequilíbrio entre concentrações de pró- oxidantes (espécies reativas de oxigênio, radicais livres) e antioxidantes (ROCHA-FRIGONI et al., 2013).

Na produção *in vitro* de embriões de bovinos, ainda se utiliza do sistema de incubação em ar atmosférico, sendo por vezes associado ao cocultivo. O cocultivo com células da granulosa tem como princípio a manutenção da tensão de oxigênio e seus derivados, sendo o excesso consumido pelas células do tapete celular. Contudo, ainda é possível identificar nesses embriões alterações relacionadas ao metabolismo e ao estresse oxidativo (RIZOS et al., 2002). Outro método é o uso de atmosferas controladas (ROCHA-FRIGONI et al., 2013), com mistura de gases contendo entre 5 -7% de O₂, obtendo-se bons resultados, cresce sua utilização nos laboratórios, mas ainda permanece um custo elevado de operação (AUERBACH; BRINSTER, 1968; MARQUES, 2009).

Na tentativa de diminuir os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROS) na PIV, antioxidantes são adicionados aos meios de cultivo de embrião *in vitro* (FLOREANI; NAPOLI; PALATINI, 2002; KHALIL; MAREI; KHALID, 2013). A melatonina é uma indolamina, lipofílica, com função antioxidante, podendo ser uma boa alternativa a ser utilizada na produção *in vitro* de embriões bovinos.

A melatonina ao ser utilizada na produção *in vitro* de embriões durante a maturação e o cultivo de embriões apresentou diminuição de EROS e de fragmentação de DNA em oócitos e blastocistos (ASGARI et al., 2012; GAO et al., 2012; RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007). No entanto, ainda não existe uma dose ótima bem estabelecida, devido à variabilidade de resultados encontrados na literatura.

Ainda, sabe-se que a melatonina interage com bicamadas lipídicas, devido a sua característica lipofílica, o que leva ao questionamento da aplicação dessa indolamina em sistemas de cultivo sob óleo mineral (COSTA et al., 1997). Na literatura encontram-se trabalhos utilizando sistemas com óleo (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013) e sem óleo (EL-RAEY et al., 2011), tendo resultados positivos com doses diferentes, 10^{-4} M e 2.15×10^{-7} M (50ng/ml), respectivamente.

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a dinâmica da melatonina em sistema com e sem óleo mineral de PIV, assim como, identificar a dose ideal antioxidante no cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A produção de embriões hoje na pecuária brasileira mudou drasticamente nos últimos anos, isso deve-se ao advento da biotecnologia de produção *in vitro* de embriões. Hoje o Brasil é o maior produtor de embriões do mundo, e dentre os embriões produzidos mais de 80% deles são derivados da PIV (IETS,2011).

A PIV na pecuária, consiste na coleta de oócitos imaturos de doadoras com alto potencial genético pela punção folicular guiada por ultrassom (OPU - do inglês *Ovum Pick-Up*) ou pós morte, por aspiração ou fatiamento de ovários provenientes de vacas destinadas ao abate comercial, para serem futuramente maturados *in vitro* (MIV). A MIV possui duração de 22 a 24 horas e é normalmente realizada em atmosfera de 5% CO₂ em ar, 38,5°C em alta umidade. Após a maturação é realizada a fecundação *in vitro* (FIV), com sêmen de touros também selecionados para qualidade genética, durante o período de incubação de 18 horas. Em seguida é realizado o cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos até o estágio de blastocisto no dia 7 de cultivo (D7), quando estes poderão ser transferidos a fresco para receptoras, ou serem criopreservados, gerando um banco genético para diferentes raças bovinas (MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012).

Em bovinos essa biotecnologia é utilizada também para estudos do desenvolvimento embrionário, ativação gênica embrionária, sendo considerada modelo para melhorias na reprodução assistida humana (DRIVER et al., 2012).

Ainda que essa biotecnologia tenha atingido escala industrial em bovinos, até o presente, não foi possível igualar os resultados de prenhez ao da produção *in vivo* de embriões. Principalmente quando se fala de embriões criopreservados, que possuem conversão de prenhez ainda menor (NICACIO et al., 2011), tendo como justificativa a qualidade do embrião que é submetido à criopreservação.

A qualidade embrionária relaciona-se muitas vezes com a dificuldade de mimetizar as condições uterinas hormonais, de sinalização celular, nutrientes e principalmente, na concentração de oxigênio disponível (LONERGAN et al., 2003). A atmosfera intrauterina possui uma concentração de oxigênio em torno de 2-8% de

oxigênio, menor do que as concentrações trabalhadas ao longo do processo de produção *in vitro*. O excesso de oxigênio pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), o que pode levar a uma situação de estresse oxidativo ao embrião. Visando melhorias na produção *in vitro* de embrião, pesquisas se concentram na tentativa de diminuir a ação maléfica das EROS na produção de embriões, podendo melhorar assim a qualidade embrionária (LONERGAN; FAIR, 2008).

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é essencial aos seres eucariontes para a produção de energia através de cadeias transportadoras de elétrons. Devido a esta importância, muitas vezes deixa-se de lado a ação tóxica que este elemento pode apresentar. Em situação fisiológica, o oxigênio consegue roubar elétrons de outras moléculas por auto oxidação não enzimática, no entanto, devido a conformação química, só é possível pegar um elétron por vez, tornando-se desemparelhado e formando assim o radical livre. Nos mamíferos, a mitocôndria produz 80% ou mais de toda a energia necessária para todas as células animais, sendo por consequência a maior produtora de espécies reativas de oxigênio (EROS)(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo pode levar ao aumento da proliferação celular (adaptação da célula para aumentar a expressão de sistemas de defesa) e a danos celulares. Os danos celulares associados ao estresse oxidativo afetam lipídeos, DNA, proteína e carboidratos (ABDELHAFEZ et al., 2011; LORD; AITKEN, 2013). Esses danos podem ser corrigidos, mas se não o forem pode ocorrer a ativação da cascata de apoptose, podendo levar a morte celular.

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante a respiração e outras reações metabólicas envolvendo o oxigênio, gera-se espécies reativas de oxigênio, que englobam radicais livres. Define-se como radicais livres moléculas que possuem elétrons de valência desemparelhados, ou seja, altamente reativas. O radical superóxido e a hidroxila, são radicais livres que participam da família de EROS, no entanto, o peróxido de hidrogênio também é considerado EROS, mas não é considerado um radical livre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O radical superóxido pode ser produzido por via enzimática, por exemplo a cadeia xantina/ hipoxantina, por auto-oxidação de algumas moléculas, como adrenalina, cisteína entre outras e pela oxidação de hemoglobina. Em mamíferos, a maioria do superóxido produzido é originado da cadeia de transporte de elétron da mitocôndria. O excesso desse radical pode diminuir as defesas antioxidantes (ex. catalase), iniciar a peroxidação de ácidos graxos, alterar pH de membranas e pode levar a alterações de expressão proteica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Ao serem transferidos dois elétrons ao radical superóxido, o produto transformado será o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , que não pode ser considerado um radical livre, mas é uma espécie reativa de oxigênio. É considerado um agente oxidante/redutor de baixa reatividade, contudo, possui efeito citotóxico, sendo capaz de atravessar a membrana celular e indiretamente levar a oxidação de lipídeos, DNA e proteínas, assim como inativar enzimas, a exemplo, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH). Alguns quelantes de ferro e cobre são capazes de transferir um terceiro elétron ao peróxido de hidrogênio, levando a quebra da ligação O-O, conhecida como reação de Fenton ou Haber-Weiss. Nessa reação, um fragmento é reduzido ao estado de H_2O e o outro fragmento é o mais potente radical livre existente: a hidroxila ($OH\cdot$) (Figura 1) (MCCORD, 2000).

Figura 1 - Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio

Fonte: (MCCORD, J., 2000).

A hidroxila é o radical livre de maior eletrofilia, com uma meia vida curta de aproximadamente 10^{-9} s. Tem a capacidade de reagir imediatamente com qualquer molécula próxima a ela, o que na maioria das vezes leva a danos. Por esse motivo a hidroxila é considerada o radical livre mais deletério para a célula (CADET; WAGNER, 2014).

Além das espécies reativas de oxigênio existem outros radicais livres que também podem causar danos celulares. Outro grupo muito comum são as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que sozinhas são pouco reativas, mas quando reagem com $O_2^{\cdot-}$ levam a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), que é um potente radical livre capaz de reagir de maneira deletéria com proteínas, lipídeos e DNA (GALANO; TAN; REITER, 2011).

É de relevante importância compreender que tanto as EROS, como as ERNS em pequenas concentrações são fundamentais para o funcionamento celular, pois estão relacionadas com sistema de defesa, sinalização celular, regulação de receptores de insulina e vias de apoptose. Para que ambas permaneçam em

concentrações fisiológicas, o organismo possui mecanismos antioxidantes que modulam a concentração de radicais livres presentes (HENSLEY et al., 2000).

2.3 ANTIOXIDANTES

Um antioxidante é qualquer molécula que presente em pequenas concentrações é capaz de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato, sendo este qualquer molécula presente no ser vivo. Didaticamente, é possível classificá-los em enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentre os antioxidantes enzimáticos estão as enzimas superóxido dismutases (SOD). Estas enzimas atuam na regulação do radical superóxido através de uma reação catalítica altamente eficiente. Dentre elas, as mais importantes em mamíferos são a superóxido dismutase cobre-zinco (CuZnSOD), presentes no citosol de todas as células eucariotas, e a superóxido dismutase manganês (MnSOD), também conhecida como SOD2, presente nas mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Ambas atuam pela mesma reação, transformando superóxido em peróxido de hidrogênio:

O peróxido de hidrogênio formado na oxidação do superóxido, pode ser decomposto pela ação da catalase (CAT). A catalase é uma enzima presente em grande quantidade no fígado, capaz de diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio circulante pela reação:

Outro grupo de enzimas antioxidantes são as peroxidases, dentre elas a glutathiona peroxidase (GPx) que age na eliminação do peróxido de hidrogênio. A GPx

atua como antioxidante através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSH), e para isso utiliza o peróxido de hidrogênio, como exemplifica a reação a seguir:

Existem outras moléculas, não enzimáticas, que possuem ação antioxidante, inativando os radicais livres. Exemplos são o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), selênio, melatonina, entre outros (NUNES et al., 2005). A melatonina, devido à ação antioxidante frente aos radicais livres de diversas famílias, é o antioxidante de eleição para o cultivo *in vitro* (LANOIX et al., 2012). No entanto, o desequilíbrio entre antioxidantes e EROS levam ao quadro celular de estresse oxidativo.

2.4 O ESTRESSE OXIDATIVO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O ambiente intrauterino é composto por fatores de crescimentos, proteínas e enzimas capazes de propiciar o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. No entanto, a PIV ainda não foi capaz de se igualar às condições intrauterinas. Acredita-se que as alterações de temperatura, luminosidade e concentração de oxigênio são os fatores que predispõem ao estresse oxidativo, durante o processo de cultivo *in vitro* (BALASUBRAMANIAN et al., 2007).

Em 1989 foram iniciadas as pesquisas com o cocultivo celular visando diminuir as diferenças entre o cultivo *in vitro* e o *in vivo* (EYESTONE; FIRST, 1989). No início, testou-se o cultivo com células endoteliais que poderiam secretar o que fosse necessário para o desenvolvimento embrionário, assim como diminuir a tensão de oxigênio submetida ao embrião. Mais tarde foi possível ter melhoras nas taxas de blastocisto no cocultivo com células da granulosa remanescentes da maturação oocitária *in vitro* (FREEMAN; WHITWORTH; HILL, 1995). Contudo, estudos de

expressão gênica revelaram que ainda assim, era possível identificar alterações de *gap junctions*, sinalização para apoptose e estresse oxidativo, havendo a necessidade de implementar ainda os sistemas de cultivos *in vitro* de embriões bovinos (RIZOS et al., 2002).

Outra tentativa foi mimetizar a concentração de oxigênio intrauterina, diminuindo os efeitos deletérios do oxigênio e a formação de radicais livres (ROCHA-FRIGONI et al., 2013). Para tanto, são utilizadas mistura de gases, normalmente constituída por 5% O₂, 5% CO₂ e 90% de N₂, durante o período de cultivo dos presumíveis zigotos pós fecundação *in vitro*, até o estágio de blastocisto, que em bovinos ocorre entre os dias 6-8 de cultivo (AUERBACH; BRINSTER, 1968; MARQUES, 2009). Mesmo com a utilização de atmosferas controladas de oxigênio, não foi possível garantir proteção total frente aos efeitos do estresse oxidativo (ROCHA-FRIGONI et al., 2013). Além do custo elevado de utilização ser uma limitação.

Frente a essa problemática e no intuito de produzir embriões de melhor qualidade, o uso de antioxidante na produção *in vitro* de embriões tornou-se objeto de pesquisa na reprodução animal. Dentre os antioxidantes enzimáticos, a glutathione foi utilizada nos diferentes sistemas de cultivo. O uso deste antioxidante, em cultivo embrionário de bovinos, em atmosfera não controlada, proporcionou aumento na taxa de blastocisto (YOON et al., 2014). Em suínos, ao utilizar a glutathione no meio de cultivo não houve melhora na taxa de clivagem, tampouco na taxa de blastocisto, o que confere uma variabilidade nos efeitos da ação da glutathione como antioxidante na PIV em diferentes espécies (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014). Outras enzimas como SOD, catalase ou thioredoxin também foram testadas em diferentes espécies para o desenvolvimento embrionário, relatando melhorias nas taxas de blastocisto (TAKAHASHI, 2012).

Foram testados também na PIV o uso de, ácido ascórbico (vitamina C) (MILCZAREK et al., 2010; HAMMAMI et al., 2013; KHALIL; MAREI; KHALID, 2013; CASTILLO-MARTÍN et al., 2014), vitamina E e selênio (DALVIT et al., 2005; CÓRDOVA et al., 2010; TAREQ et al., 2012), ácido lipóico (RAHNAMA et al., 2013; ZHANG et al., 2013) , entre outros, no entanto, ainda com resultados controversos entre os autores.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a melatonina tem apresentado uma potente ação contra o estresse oxidativo gerado na produção *in vitro* de embriões, levando a melhoria na qualidade embrionária (TAMURA et al., 2008; ASGARI et al., 2012; WANG et al., 2014b). Por consequência da melhor qualidade embrionária de maneira indireta, a melatonina melhora também a criotolerância do embrião (GAO et al., 2012), tendo um impacto econômico importante, devido às melhores taxas de prenhez e viabilidade embrionária pós-devitrificação.

2.5 MELATONINA: POTENTE ANTIOXIDANTE PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.5.1 Síntese da melatonina

A melatonina é uma indolamina, amina biogênica derivada do triptofano, sintetizada a partir da serotonina, com ação em cadeia, iniciada pela ação das enzimas arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e acetilserotonina metiltransferase (ASMT). É produzida em sua maioria na glândula pineal, contudo, pode ser produzida também pela pele, retina, linfócitos, glândulas salivares, cérebro, entre outros (MILCZAREK et al., 2010). Estudos recentes encontraram evidências de síntese de melatonina também pelo complexo cumulus oocitário de bovinos (EL-RAEY et al., 2011).

A melatonina foi descoberta em 1958, por Aron B. Lerner em glândulas pituitárias bovinas e posteriormente foi identificada como um modulador de humor, sono, comportamento sexual e ritmo circadiano. É sintetizada por células parênquimais em resposta à luminosidade reconhecida pelo eixo retina-hipotálamo. A informação chega no núcleo supraquiasmático hipotalâmico, responsável pela organização temporal dos diversos eventos fisiológicos e comportamentais. A

tradução desse sinal possibilita a sincronização das fases do relógio circadiano com o ciclo claro/escuro. A informação relacionada ao tempo passa pelo SNC para o gânglio cervical superior e finalmente chega a glândula pineal. Esse caminho é estimulado durante a noite e a atividade do gânglio cervical central é inibida pela luminosidade.

Os receptores da glândula pineal são ativados pela noradrenalina secretada pelos nervos terminais da região cervical superior. Com isso, há o aumento da produção de cAMP, que por sua vez, aumenta atividade tanto da AANAT ou N-acetiltransferase (NAT), enzimas importantes na síntese de melatonina. Essas enzimas são capazes de converter serotonina em N-acetilserotonina, que com a ação da hidroxindol-O-metil transferase (HIOMT), também conhecida como acetil serotonina N-metiltransferase (ASMT) é convertida em melatonina (Figura 2).

Figura 2 - Biossíntese de melatonina pelo triptofano

Fonte: (SINGH.; JADHAV, 2014)

A metabolização dessa indolamina pode se dar por duas vias principais: no fígado e no cérebro. No fígado, ocorre a hidroxilação da melatonina, processo que

origina 6-hidroximelatonina, seguido de uma conjugação com sulfato ou glucoronato, e tendo por fim a excreção na urina. No tecido cerebral, a melatonina é convertida em N-g-acetil-2-formilmetoxiquinurenamina que é degradado imediatamente em N-g-acetil-5-metoxiurenamina. Em outros tecidos é possível ter a metabolização da melatonina pela interação com radicais livres, tendo assim uma ação antioxidante associada (VENEGAS et al., 2012) .

2.5.2 Ação antioxidante da melatonina: “*Scavenger*”

A melatonina é considerada um potente antioxidante, pois é capaz de se ligar diretamente com os radicais livres, e por essa função é reconhecida como um *scavenger* (do inglês: aquele que retira impurezas e refugo). Sabe-se que os radicais livres estão por todas as células do organismo e são altamente reativos com moléculas vizinhas, por tanto, um bom *scavenger* deve estar igualmente disponível nas células (GALANO; TAN; REITER, 2011).

Devido à característica lipofílica da melatonina, ela é capaz de difundir por quase todas as células do organismo. Em humanos, tem-se concentrações de até 112pg/ml em fluido folicular, 15 pg/ml na saliva, podendo chegar a uma produção noturna pela glândula pineal de até 400pg/mg. Em suínos, foi encontrado uma concentração de 20 ± 2.4 pg/mL de melatonina no fluido de folículos com diâmetro menor que 3mm (SHI et al., 2009).

Outra característica que faz da melatonina um potente antioxidante *scavenger* é a capacidade de se ligar a diferentes radicais livres. Já foi comprovado de que é capaz de neutralizar grande parte das espécies reativas de oxigênio, como a hidroxila, alkoxila e peroxila (REITER, 1998). Bem como, possui ação nas espécies reativas de nitrogênio (PEYROT; DUCROCQ, 2008).

A reação entre um antioxidante e um radical livre, origina uma forma oxidada do antioxidante, que normalmente possui ação menor. Para manter níveis ótimos, os

antioxidantes possuem vias de redução, contudo, no caso da melatonina, seus derivados também possuem ação antioxidante.

Ao se ligar aos radicais livres, a melatonina oxida e é transformada em outras duas moléculas (N1-acetil- N2- formil-5 metoxikinuramina – AFMK; e N1-acetil – 5-metoxikinuramina - AMK), ambos com ação antioxidante, formando assim a cascata antioxidante da melatonina.

O AFMK é um dos metabólitos da melatonina formado após a reação com radicais livres, sendo esta enzimática ou não enzimática. É capaz de reduzir a peroxidação lipídica e o dano oxidativo ao DNA pela neutralização do radical hidroxila. No entanto, esta ação é menos eficaz do que a do metabólito AMK e até mesmo da melatonina (GALANO; TAN; REITER, 2013).

O AMK por sua vez, é mais eficaz na neutralização do radical NO do que a melatonina e o AFMK. Frente as espécies reativas de oxigênio, o AMK tem maior eficiência de neutralização do que a melatonina em soluções aquosas, potencializando a ação antioxidante da melatonina neste meio (GALANO; TAN; REITER, 2013). Ressmeyer et al. (2003) comprovaram a ação deste metabólico na proteção de proteínas, frente ao dano oxidativo por ação de peróxido de hidrogênio.

2.5.3 Ação antioxidante da melatonina: sinalização e receptores

Devido a característica lipofílica, a melatonina pode passar por todas as barreiras e se difundir nas células, se ligando a receptores de membrana e também receptores nucleares. A via de receptores de melatonina é uma segunda via de ação antioxidante, porém indireta. Os receptores de membrana conhecidos da melatonina são o Met 1 (MT1) e o Met 2 (MT2), da família de receptores acoplados à proteína G. Estes receptores já foram descritos em pele, pulmão, ovário, oócito e blastocistos. A ativação dos receptores MT1 e MT2 pode levar ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes como, MnSOD, CuZnSOD, CAT, e GPx e também a diminuição na

expressão de enzimas oxidantes como a NO sintase e a lipoxigenases (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005; FISCHER et al., 2008).

Esses receptores também podem ativar respostas na via da apoptose. Há a inibição da fosforilação de p38 e c-Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase de ativação mitótica (MAPK), com isso há o bloqueio na ativação da proteína pró-apoptótica p53. Esse bloqueio diminui a relação Bax/Bcl-2 que inibe a perda de potencial de membrana mitocondrial. O resultado dessa sequência de eventos é a inativação das caspases, atuando no bloqueio da via de apoptose celular (LANOIX et al., 2012).

Em bovinos já foi encontrado receptor MT1 e MT2 em oócitos e células do cumulus, associados ao aumento da maturação oocitária e a expansão das células do cumulus. Em blastocisto, no entanto, não foi encontrado pela imunocitoquímica, reação para o receptor de membrana MT2. Entretanto, forte reação foi identificada para o receptor MT1, porém como no delineamento a melatonina tinha sido adicionada no meio de MIV, não foi possível identificar a ação da melatonina através da via de receptor no embrião (SAMPAIO et al., 2012). Contudo, acredita-se que na presença desta molécula no meio de cultivo é possível que o embrião seja beneficiado.

2.6 MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Nos últimos 50 anos, estudos sobre melatonina estão presentes em mais de 22.800 publicações, sendo uma das moléculas de maior interesse na pesquisa (GALANO; TAN; REITER, 2011). No entanto, apenas na última década essa molécula vem sendo estudada por sua ação antioxidante. O grande potencial antioxidante chamou a atenção dos embriologistas, principalmente como ferramenta para melhoria da qualidade embrionária de embriões produzidos *in vitro*.

A melatonina já foi testada para o cultivo *in vitro* de embriões de diferentes espécies (Quadro 1), no entanto, os resultados ainda não são constantes, sendo

apresentadas diferentes doses e diferentes durações de tratamentos. Questiona-se também, os diferentes sistemas de cultivo utilizados, mais uma vez, ressaltando sua característica lipofílica, pode levar ao comprometimento da ação da melatonina, em sistemas com óleo mineral, devido à perda desta para o óleo.

Quadro 1 – Levantamento bibliográfico do uso da melatonina na produção *in vitro* de embrião

Autor	Ano	Espécie	Aplicação	Doses
Papis, K	2007	bovino	CIV	10 ⁻⁴ M
El-Raey, M	2011	bovino	MIV	10 e 50ng/ml
Takada, L.	2012	bovino	MIV	1nM
Sampaio, RV	2012	bovino	MIV	1pM
Cebrian-Serrano, A.	2013	bovino	MIV/CIV	10 ⁻⁴ M
Wang, F.	2014	bovino	CIV	100 nM
Zhao, XM	2014	bovino	MIV	1 nM
Wang, F.	2014	bovino	CIV	10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁵ M
Mehaisen, GM; Saeed, AM	2013	coelho	CIV	10 ⁻³ M, 1μM, 1nM
Wei, D et al.	2014	humano	MIV	1nM
Gao, C.	2012	murino	CIV	1nM
Tian, XZ	2010	murino	CIV	1 nM
Asgari, Z.	2012	murino	CIV	10 e 100nM
Lord, T et al.	2013	murino	MIV	1 mM
Wang, F.	2013	murino	CIV	100 nM
Dehghani-Mohammadabadi, M	2014	rato	CIV	1pM e 1nM
Salimi, M	2014	rato	MIV	1μM
Rodriguez-Osório, N.	2007	suíno	CIV	1nM
Choi, J	2008	suíno	CIV	100pM
Shi, JM	2009	suíno	MIV/ CIV	1nM MIV+CIV; 0.1μM CIV
Pang, YW	2013	suíno	CIV	0.1nM

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Em suínos, melhorias na produção *in vitro* foram relatadas com a utilização de melatonina no cultivo embrionário na dose de 1 nM em sistema com óleo mineral, aumentando a taxa de clivagem e de blastocisto. No entanto, não foi possível observar alterações na expressão de Bax (pró-apoptótico) envolvido na via de apoptose e do BCL2L1 de ação anti-apoptótica. Também não foram avaliados genes envolvidos com ação antioxidante ou pró-oxidante (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007). Ainda em suínos, na concentração de 100pM, também em sistema com óleo mineral,

conseguiram identificar ação anti-apoptótica e antioxidante da melatonina frente ao estresse oxidativo no cultivo embrionário, apresentando diminuição de EROS e menor expressão de Bax (CHOI et al., 2008). Em outro trabalho foi possível melhorar o cultivo de embriões clonados de suínos com o uso de melatonina no meio de cultivo na dose de 0,1nM. Os autores sugeriram a ação da melatonina pela via da proteína p53, regulando a apoptose, porém, não conseguiram identificar a expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 nos blastocistos clones (PANG et al., 2013).

Os trabalhos mais recentes são na espécie murina, encontrando resultados positivos na produção de embriões em concentrações de melatonina variando de 10^{-12} a 10^{-3} M (ASGARI et al., 2012; GAO et al., 2012; LORD et al., 2013; TIAN et al., 2010; WANG et al., 2013). Foram relatadas melhores taxas de blastocisto ($48,08 \pm 5,25\%$ controle (C) vs. $82,08 \pm 2,34\%$ melatonina (M); $p < 0,05$), assim como no desenvolvimento embrionário, segundo a relação blastocisto expandido/ blastocisto eclodido ($25,65 \pm 11,79\%$ (C) vs. $66,47 \pm 4,94\%$ (M); $p < 0,05$), assim como no número de blastômeros por blastocisto ($62,71 \pm 5,97$ (C) vs. $77,91 \pm 10,63$ (M); $p < 0,05$) (TIAN et al., 2010).

Em bovinos, um dos primeiros trabalhos que testou a melatonina (MEL) no cultivo embrionário, utilizou a dose de 10^{-4} M de melatonina, demonstrando melhoras na taxa de blastocisto quando o tratamento foi realizado em atmosfera não controlada, com 20% de O_2 (68,9% MEL vs. 50,8% controle), ainda com sistema com óleo mineral (PAPIS et al., 2007). No entanto, comprovou-se que a melatonina em condições de baixas concentrações de oxigênio (7%), por tanto com menos formação de EROS, pode ter efeito contrário, diminuindo as taxas de blastocisto em comparação ao controle, 47,7% e 67,7%, respectivamente.

Os trabalhos subsequentes com melatonina em bovinos concentraram-se na ação antioxidante da indolamina sobre o oócito na MIV (SAMPAIO et al., 2012; TAKADA et al., 2012; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Ao introduzir 10 ou 50 ng/ml (4.3×10^{-8} M e 2.15×10^{-7} M, respectivamente) de melatonina no meio de MIV, em sistema sem óleo, obtiveram um aumento da maturação nuclear oocitária, assim como, aumento da expansão das células do cumulus e diminuição dos níveis de EROS presentes nos oócitos comparados aos controles (EL-RAEY et al., 2011).

Foi identificado a presença dos receptores de melatonina MT1 e MT2 nas células da granulosa e no oócito bovino, porém apenas o MT1 está presente em blastocisto (SAMPAIO et al., 2012). Apesar da melatonina promover um aumento de células da granulosa sem fragmentação de DNA comparado à utilização apenas dos hormônios FSH e LH no meio de MIV ($37,6\% \pm 2,4$ MEL vs. $28,0 \pm 2,4$ MEL+FSH+LH e $17,8\% \pm 2,41$ FSH+LH), não foi possível identificar melhoria na taxa de blastocisto durante a MIV (TAKADA et al., 2012).

Devido a presença do receptor MT1 em blastocistos e baseado nos resultados com outras espécies, o uso de melatonina no cultivo embrionário, sugere ter ação benéfica na produção *in vitro* de embrião bovinos, devendo seu mecanismo de ação ser melhor estudado.

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

A melatonina é estável e possui atividade antioxidante em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a estabilidade da melatonina nos sistemas com e sem óleo mineral e a ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo induzido. O objetivo geral será atingido por meio dos objetivos específicos, que trarão sustentação para defender a hipótese inicial.

Por objetivos específicos define-se:

- Estudar a dose de indução da menadiona, indutor a ser utilizado em sistema definido para indução de estresse oxidativo em embriões PIV bovinos;
- Comparar a concentração de melatonina no meio em sistemas com ou sem óleo mineral em diferentes tempos de incubação;
- Avaliar consumo da melatonina e formação do metabólito AFMK no cultivo *in vitro* de embriões bovinos.
- Definir a dose antioxidante da melatonina na produção *in vitro* de embriões pela: avaliação do desenvolvimento embrionário, status oxidativo, atividade de caspase e expressão gênica relacionada ao estresse oxidativo dos embriões PIV bovinos;

**NOVA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

5 NOVA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*¹

RESUMO

Nova análise quantitativa do *status* oxidativo em embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo induzido. Embriões >16células, cultivados em 5%O₂, foram tratados com menadiona (0,1,2,5 e 5µM) durante 24h. Blastocistos expandidos foram corados com sonda fluorescente CellROX®Green (CRG) e avaliados por microscopia de epifluorescência para quantificação do nível de status oxidativo (SO). Foi observado um efeito na taxa de blastocisto (TXBL;p=0.0039) e número de blastômero (nBLAST;p<0.0001) e em SO por embrião (SO/emb;p<0.0001). Encontramos uma forte correlação negativa entre SO/emb e TXBL, assim como, SO/emb e nBLAST. Concluimos que a análise CRG se mostrou eficiente para avaliar o estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5.1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são fatores pró-oxidantes que podem levar a uma situação de estresse oxidativo. Acredita-se que, devido à alta tensão de oxigênio no cultivo, o estresse oxidativo é um fator limitante para o aumento da produtividade na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos (CAGNONE; SIRARD, 2013). Contudo, EROS estão envolvidos em processos fisiológicos do metabolismo

¹ a ser submetido para Reproductive Biomedicine Online como Short Communication

celular, sendo necessário identificar os níveis de EROS livres que levam a efeitos deletérios ao desenvolvimento embrionário.

A probe CellROX Green (CRG) é capaz de quantificar níveis de estresse oxidativo pela intensidade do sinal emitido devido a oxidação do fluoróforo ao reagir com espécies reativas de oxigênio em excesso. Relata-se, uma maior estabilidade da CRG, o que confere maior confiabilidade nos resultados de intensidade do que outras técnicas, como a 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (WANG; JOSEPH, 1999; GRINBERG; DRONGELEN; KRAIG, 2012).

Neste trabalho, propomos um sistema controlado de indução de estresse oxidativo em embriões que associado à avaliação do *status* oxidativo com a probe CellROX Green auxiliará no estudo dos efeitos do estresse oxidativo no desenvolvimento embrionário.

5.2 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado mediante aprovação da comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA n.2711/2012). Todos os produtos químicos foram comprados na Sigma-Aldrich, senão mencionados futuramente. A solução estoque de menadiona foi preparada em etanol absoluto (cat. 100983.1000, Merk) e armazenada à 5°C, protegido da luz por até 10 dias. O meio de cultivo KSOM, liofilizado (KSOM, Millipore, 020-P), foi ressuscitado no diluente fornecido no kit e armazenado à -20°C por até 2 meses.

5.2.1 Produção *in vitro* de embriões

Foram utilizados ovários de vacas destinadas ao abate comercial. Folículos de 2-8mm foram aspirados com seringa de 5ml acoplado a agulha 21G). Em seguida, foram selecionados apenas complexos cumulus oócitos (COC) com três ou mais camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo. Os COCs selecionados foram lavados (3x; MIV-HEPES; 3x; MIV-meio) e divididos em grupos de 25 oócitos/gota de MIV-meio (90µL/gota; Apêndice A), sob óleo mineral. Após 22-24 horas de incubação à 38,5°C, 5% CO₂ em ar e alta humidade, os oócitos maturados foram transferidos para meio FIV (90µL/gota; Apêndice A). Para inseminação (D0), foi utilizado sêmen de um touro Nelore com produção conhecida e os espermatozoides móveis foram separados por gradiente descontinuo de Percoll (45%/90%). A dose inseminante foi de 1x10⁶ espermatozoides/ml, sendo estes incubados por 18 horas com os oócitos, nas condições descritas.

5.2.2 Sistema de cultivo *in vitro* embrionário bovino para avaliação de estresse oxidativo

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram desnudados mecanicamente e transferidos para o cultivo *in vitro* em grupos de 7-15 estruturas por gotas de KSOMaa (50 µL), sob óleo mineral em atmosfera controlada (38,5°C; 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂, e alta umidade) para evitar interferência de altas concentrações de oxigênio na indução de estresse oxidativo. Após 48 horas de incubação, o meio foi suplementado com 5% SFB (Gibco). No dia 5 de cultivo (D5), os embriões acima de 16 células foram transferidos para placa de 4 poços, em grupos de 30-45 embriões por poço contendo 300µL de KSOMaa + 5%SFB (Apêndice A). Os embriões foram divididos em quatro grupos de acordo com as doses de menadiona a serem testadas para indução de

estresse oxidativo: 0;1; 2,5 e 5 μ M (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009) e incubados por 24 horas em atmosfera controlada. Após esta incubação, os embriões foram lavados (KSOMaa,3x) e alocados novamente na placa de cultivo apenas em KSOM+5%SFB, sem o indutor, no qual permaneceram até o Dia-8(D8), para avaliação do desenvolvimento embrionário.

5.2.3 Avaliação do desenvolvimento embrionário

No D8, foi avaliada taxa de blastocisto, sendo esta calculada baseada na relação de blastocistos totais pelo número de embriões acima de 16 células colocados em cada tratamento. Blastocistos expandidos em D8 foram separados para quantificação do número total de blastômeros por embrião, realizado por coloração com *4',6-diamidino-2-phenilindole, dihydrochloride* (DAPI; Prolong Gold® Antifade Reagent, Molecular Probes®) e avaliados por microscopia de epifluorescência, no aumento de 20X (Olympus) em imagens obtidas pelo software (Image Pro Plus, Olympus).

5.2.4 Avaliação do *status* oxidativo

Para a avaliação do *status* oxidativo foi utilizado um novo método quantitativo de marcação. A probe CellRox® Green (CRG; Molecular Probes ®) possui uma fluorescência basal de verde e ao se oxidar com EROS em excesso, emite um sinal verde mais intenso (comprimento de onda 485/520nm). O protocolo foi adaptado para ser, pela primeira vez, utilizado em embrião bovino (GRINBERG; VAN DRONGELEN; KRAIG 2012). Blastocistos expandidos em D8 foram corados com 5 μ M de CRG em

meio KSOM, sob óleo mineral e incubados por 30 minutos à 38,5°C, 5% CO₂ em ar. Após a incubação, os embriões foram lavados (3x; PBS) e fixados em 3,7% de formaldeído (Apêndice B). A fixação e a estabilidade do fluoróforo permitiram avaliação em até 4 horas, após preparação da lâmina, sem perda do sinal. O sinal de verde emitido foi captado por microscopia de epifluorescência (descrito anteriormente). Avaliação foi feita por quantificação de pixel total do embrião (sinal verde), utilizando para mensuração o programa Image J (Windows). Contudo, foi realizado um cálculo para quantificar SO:

$$SO = \frac{\text{pixel total na área do embrião}}{\text{n. total de blastômeros}}$$

5.3 RESULTADOS

Foram analisados 94 embriões (5 manipulações) para determinar o sistema de avaliação de *status* oxidativo. A metodologia descrita para avaliação de *status* oxidativo provou ser eficaz em avaliar o estresse oxidativo e respectiva consequência em embriões bovinos PIV.

A produção in vitro de embrião obteve uma taxa de clivagem de média de XX, sendo apenas os embriões acima de 16 células submetidos ao tratamento.

Entre os grupos induzidos foi possível ver um aumento nos níveis de SO proporcionais à dose de menadiona, mais evidentes quando comparado o grupo 0 e 5µM de menadiona (1,21 ± 0,16 vs. 1.84 ± 0,26). A indução de estresse oxidativo apresentou efeito negativo na taxa de blastocisto, mais evidentes quando comparado o grupo 0 e 5µM de menadiona (43,24 ± 2,22 vs. 29.74 ± 7,21), assim como no número total de blastômeros/embrião (126,76 ± 30,43 vs. 90,62 ± 22,85) (Figura 3).

Encontramos uma correlação negativa entre SO e a taxa de blastocisto, assim como entre o número de blastômero por embrião (Apêndice C). Existe uma correlação positiva entre taxa de blastocisto e número de blastômeros por embrião.

Figura 3 - Efeito da indução com menadiona no status oxidativo, número total de blastômero e taxa de blastocistos de embriões induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014

Legenda: A- Efeito da dose de menadiona (DMEN) no status oxidativo (pixel total/n. total de blastômero) (A); contagem total de blastômeros (nBLAST) (B) e na taxa de blastocisto (TXBL) (C). D- nBLAST por DAPI e níveis de OS (CellROX) realizado por microscopia de epifluorescência dos níveis 0 e 5µM de indução de menadiona (MEN) sendo apresentados os controles positivos e negativos para cada técnica. Controle positivo realizado com indução de 100µM de MEN.
Fonte: (ASSIS, P.M.; 2014)

5.4 DISCUSSÃO

Acredita-se que um dos fatores para as baixas taxas de produção *in vitro* de embrião é o estresse oxidativo (CAGNONE; SIRARD, 2013). Métodos para avaliação de EROS são importantes para estudos dos efeitos do estresse oxidativo no desenvolvimento embrionário. Neste trabalho foi possível estabelecer uma nova metodologia para análise de EROS em embriões bovinos.

A menadiona foi o indutor de eleição, pois ao reagir com oxigênio produz superóxido e peróxido de hidrogênio entre outras espécies reativas de oxigênio, as quais nossa metodologia foi capaz de detectar até nos menores níveis de indução. A CellROX permitiu uma janela para avaliação de até 4 horas após a fixação, sem perda na intensidade do sinal, não apresentando foto-oxidação, como relatado na utilização da técnica de marcação por DCFH-DA, marcador utilizado nas avaliações de níveis de EROS em embrião em estudos anteriores (WANG; JOSEPH, 1999).

A indução com menadiona teve efeito negativo na taxa de blastocisto, com queda de aproximadamente 10% na produção de embriões na maior dose de menadiona utilizada. Radicais livres podem ativar vias de apoptose celular, fragmentação de DNA e peroxidação lipídica das membranas, levando à morte celular (HENSLEY et al., 2000), o que justifica o efeito negativo da indução no número total de blastômeros por embrião encontrado neste estudo.

Esta metodologia permitirá estudos futuros para avaliação de efeitos do estresse oxidativo em embriões, sendo associado a outras técnicas como, por exemplo, avaliações de sistemas biológicos e expressão gênica.

Em conclusão, a nova metodologia proposta para avaliação de estresse oxidativo em embriões PIV, possibilitou avaliar o efeito negativo das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento embrionário, diminuindo as taxas de blastocisto.

REFERÊNCIAS

CAGNONE, G. L. M.; SIRARD, M.A. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 4, p. 1–18, 20 abr. 2013.

GRINBERG, Y.; VAN DRONGELEN, W.; KRAIG, R. P. Insulin- like growth factor -1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 1, p. 221–229, jul. 2012.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1456–1462, maio 2000.

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

WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 99, p. 612–616, 1999.

**DINÂMICA E AÇÃO ANTIOXIDANTE DA
MELATONINA NO SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES**

6 DINÂMICA E AÇÃO ANTIOXIDANTE DA MELATONINA NO SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS ²

RESUMO

A melatonina (MEL) possui ação antioxidante conhecida por via direta, através da formação e ação de seus metabólitos, dentre eles o N1-acetil- N2- formil-5 metoxikinuramina (AFMK), ou por ação via receptores de membrana (MT1 e MT2). Devido sua característica lipofílica, não se sabe sobre sua estabilidade em sistemas de CIV sob óleo mineral e dose ideal para ação antioxidante. Para avaliação da perda de MEL para o sistema de CIV, determinou-se pela técnica de HPLC a concentração real de melatonina no meio CIV em sistema com e sem óleo mineral após a adição de diferentes doses iniciais de MEL (DM; 0, 25, 50, 100ng/ml), e assim, avaliadas em diferentes tempos de incubação (0, 24, 72 e 144h). Em seguida, avaliou-se a ação e consumo da MEL no CIV de embriões submetidos ao estresse oxidativo induzido. A CIV foi realizada em atmosfera controlada (38,5°C, 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). No D5 de CIV, os embriões (>16 células) foram divididos aleatoriamente entre os grupos 0, 25, 50 e 100ng/ml de MEL, e todos receberam indução com 5µM de menadiona durante 24 horas. Após incubação, amostra foi coletada para análise de HPLC (MEL e AFMK) e os embriões foram cultivados apenas com as DM até D8. Os blastocistos (D8) foram destinados para avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS), contagem de blastômeros (nBLAST), detecção de atividade de caspase-3 e -7 (CASP) através de microscopia confocal de epifluorescência, e expressão gênica (GRP78, SOD1 e HSP60). Foi também analisada a taxa de blastocisto (TXBL). Constatou-se que não há migração para o óleo, ou degradação da MEL ao longo do tempo de CIV. Na utilização da dose de 50ng/ml de MEL, há consumo da melatonina no meio e formação de AFMK (p<0.05), maior TXBL (45,93 vs. 33,06%, p<0.05) e nBLAST (143

² a ser submetido para Journal of Pineal Research

vs. 93,1, $p < 0.05$), e redução de EROS (0,84 vs. 1,66 pixels, $p < 0.05$) e CASP (0,91 vs. 1,54 pixels, $p < 0.05$), se comparado ao grupo sem MEL. Contudo, não houve alteração na expressão gênica. Conclui-se que a melatonina mostrou comportamento estável nas condições de CIV, podendo ser usada em ambos sistemas e possui ação antioxidante na dose de 50ng/ml, aumentando a produção e qualidade de embriões *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo induzido.

6.1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma ferramenta para a multiplicação de animais com alto valor genético, sendo sua aplicação na pecuária mundial crescente ao longo dos anos (IETS, 2011). Contudo, os índices de produção ainda podem ser melhorados, sendo a média de prenhez por embriões PIV abaixo de 40% (PONTES et al., 2009).

O sistema de PIV procura mimetizar o ambiente uterino no período pré-implantacional, mas um dos fatores limitantes é a concentração de oxigênio, que ainda, na maioria das vezes, é mais alta do que as condições intrauterinas (2-8% de O_2) (ARIAS; SANCHEZ; FELMER, 2011). Altos níveis de O_2 podem levar a formação de radicais livres, que em excesso promovem o estresse oxidativo. Sabe-se que embriões PIV possuem perfil oxidativo alterado se comparado com embriões *in vivo* (DRIVER et al., 2012). Uma alternativa para reverter o estresse oxidativo é uso de antioxidante no cultivo *in vitro* de embriões.

A melatonina é uma indolamina, que atua como antioxidante de forma direta e indireta. É capaz de neutralizar radicais livres através de reações que irão resultar na formação de metabólitos, como o N1-acetil- N2- formil-5 metoxikinuramina (AFMK) e o N1-acetil – 5- metoxikinuramina (AMK), que possuem também características antioxidantes (SILVA et al., 2004). A outra via de ação é pela sensibilização dos receptores de membranas conhecidos em mamíferos como MT1, MT2, que são da família de receptores da proteína G. Os receptores ativam diferentes vias de tradução,

entre elas a produção de enzimas antioxidante superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), assim como podem inibir a atividade das caspases, conferindo a essa indolamina também uma ação anti-apoptótica (LANOIX et al., 2012).

Em bovinos, foi identificado o receptor MT1 em blastocistos, o que leva a crer que na produção *in vitro* de embriões a melatonina irá conferir melhorias na produtividade (SAMPAIO et al., 2012; WANG et al., 2014a). Contudo, a dose de melatonina a ser utilizada no cultivo *in vitro* de embriões bovinos ainda é questionável, variando de doses de 10^{-7} a 10^{-4} M de melatonina no meio (PAPIS et al., 2007; RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; WANG et al., 2014b).

Sabe-se que o sistema de cultivo sob óleo mineral é o sistema de eleição para a CIV de embriões bovinos e questiona-se, devido a característica lipofílica da melatonina (SINGH; JADHAV, 2014), se as diferenças nos resultados e doses encontrados são devido a migração da melatonina para o sistema. Contudo, nenhum estudo foi realizado para detectar se há perda da melatonina para o sistema de cultivo.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a dinâmica da melatonina em sistemas com e sem óleo mineral. Assim como, realizar um estudo de dose antioxidante da melatonina para o cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

Neste trabalho, os resultados encontrados mostram que a melatonina é uma molécula estável no sistema de cultivo *in vitro* de embrião, podendo ser utilizada como antioxidante na dose ideal de 50ng/ml, o que resulta na produção de embriões com maior potencial de desenvolvimento e por consequência, maior taxa de blastocisto.

6.2 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal e de Biologia do Espermatozoide, do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo, Brasil. Este trabalho foi realizado mediante aprovação da comissão de ética da instituição (CEUA n.2711/2012).

6.2.1 Reagentes e Soluções

Todos os produtos químicos foram comprados na Sigma-Aldrich, senão serão indicados no texto. A solução estoque de menadiona foi preparada em etanol absoluto (cat. 100983.1000, Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha), em concentração de 500 μ M. A solução foi armazenada à 5°C, protegido da luz, por até 10 dias. Todas as soluções de melatonina foram realizadas com a solução diluente de 10% de DMSO em solução tampão fosfato-salino (PBS) e armazenadas à 5°C, protegidas da luz por até 10 dias. Para o grupo 0ng/ml de melatonina foi utilizada apenas a solução diluente. Os meios de MIV e FIV e lavagens foram preparados para cada manipulação. O meio de cultivo KSOM foi obtido liofilizado (KSOM, Millipore, 020-P), suspenso em diluente fornecido pelo kit e armazenado em alíquotas menores (6ml) à -20°C por até 2 meses.

6.2.2 Experimento 1 - Avaliação da dinâmica da melatonina nos sistemas utilizados para produção *in vitro* de embrião

O meio de cultivo foi utilizado para avaliar se há perda da melatonina para o óleo mineral, e ainda, se há degradação da mesma devido ao período e método de incubação utilizado em sistemas de cultivo *in vitro* embrionário. Para tanto, placas contendo somente o meio de cultivo foram incubadas a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar, para determinar a influência dos diferentes sistemas e diferentes períodos de incubação na estabilidade da molécula de melatonina.

Para o sistema com óleo mineral (SO), foram utilizadas placas de petri de 35mm contendo 4 gotas de 100 μ l de meio de cultivo SOFaa (SIMÕES et al., 2013), cada, sob óleo mineral. O sistema sem óleo mineral (SSO) foi representado por uma placa

de poços, contendo 400 µl de SOFaa em cada poço. Entre os poços acrescentou-se 1ml de PBS para evitar evaporação do meio ao longo do período de incubação.

Em cada sistema foram testadas diferentes doses de melatonina, 0, 25, 50, 100 ng/ml, baseadas no estudo de El-Raey et al. (2011). As avaliações de concentração de melatonina foram realizadas em diferentes períodos de incubação, baseados no período de cultivo *in vitro* embrionário bovino, 0, 24, 72 e 144 horas de incubação.

As amostras foram coletadas e transferidas para tubos de microcentrífuga de 0,7ml e imediatamente armazenadas em gelo seco até o recolhimento de todas as amostras e em seguida armazenadas em -80°C, para futuras análises de concentração de melatonina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

6.2.2.1 Dosagem de melatonina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As concentrações de melatonina foram determinadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito por Conti; Maestroni (1996). Resumidamente, para detecção da melatonina o sistema de cromatografia (Shimadzu, Kyoto, Japan) foi operado de forma isocrática com uma fase móvel contendo 0,1mm de acetato de sódio, 0,1mm ácido cítrico, 0,15mm EDTA e 30% metanol, sendo o pH ajustado para 3.5 e taxa de fluxo de 0,5 ml/min. O detector foi ajustado para potência de +0,90V (versus Ag/AgCl eletrodo de referência). Para a avaliação do experimento 1, a amostra foi descongelada em gelo, sendo 60 µL da amostra aplicada diretamente no cromatógrafo. Em cada avaliação foi realizada uma curva padrão de melatonina como referência para a concentração da amostra (1.000ng/µL – 0.31ng/µL).

6.2.3 Experimento 2 - Ação da melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo

6.2.3.1 Colheita de oócitos, maturação e fecundação *in vitro*

Ovários de vacas destinadas ao abate comercial foram coletados e transportados ao laboratório em solução fisiológica à 30°C. Folículos de 2-8mm foram aspirados com seringa de 5ml, acoplada a agulha 21G) e o fluido folicular mantido em tubos de 15ml para formação de sedimento à 35°C, por 10 minutos. A seleção dos oócitos foi realizada em meio MIV-HEPES (TCM 199 Hepes, 10% SFB, 22 mg/ml piruvato e 50 mg/ml gentamicina), sendo selecionados apenas complexos cumulus oócitos (COC) com três ou mais camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo.

Os COCs selecionados foram lavados (3x; MIV-HEPES; 3x; MIV-meio) e divididos em grupos de 25 oócitos por gota de MIV-meio (90µL/gota; Apêndice A), sob óleo mineral. Após 22-24 horas de incubação à 38,5°C, 5% CO₂ em ar e alta humidade, os oócitos maturados foram lavados em meio TL-HEPES e transferidos também em grupos de 25 oócitos para gotas de meio FIV (90µL/gota). Para realizar a inseminação, uma palheta de sêmen de um touro Nelore de produção *in vitro* de embriões conhecida foi descongelada. Os espermatozoides móveis foram separados por gradiente descontínuo de Percoll (45%/90%). Os oócitos foram inseminados com dose de 1x10⁶ espermatozoides/ml e incubados por 18 horas, nas condições descritas.

6.2.3.2 Cultivo *in vitro* embrionário com indução de estresse oxidativo e melatonina

Após a fecundação *in vitro* (D0), os presumíveis zigotos foram desnudados mecanicamente com auxílio de pipeta e transferidos para o cultivo *in vitro* em grupos de 7-15 oócitos para gotas de KSOMaa (50 µL/gota), sob óleo mineral em atmosfera controlada (38,5°C; 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂, e alta umidade). Após 48 horas de incubação (D3), o meio foi suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco), sendo também avaliada a taxa de clivagem para verificação do sucesso da FIV.

No quinto dia de cultivo, embriões que apresentavam no mínimo 16 células foram divididos aleatoriamente entre os grupos 0, 25, 50 e 100ng/ml de MEL, em placa de 4 poços (300µL de KSOMaa + 5%SFB) e simultaneamente, receberam indução com 5µM de menadiona durante 24 horas em atmosfera controlada. O grupo 0ng/ml de melatonina recebeu apenas 6µL de solução diluente de melatonina (mesmo volume utilizado nos grupos tratados com melatonina). Em experimento prévio foi realizado teste de indução para definir a dose de menadiona a ser utilizada (0, 1, 2,5 e 5 µM de menadiona) (descrito no Item 5). Após este período os embriões foram transferidos para placa de cultivo e o meio de cultivo foi recolhido em alíquotas de 150 µL e armazenado imediatamente em gelo seco, protegido da luz, para em seguida ser armazenado a -80°C para futura análise de concentração de melatonina e AFMK por HPLC.

Os embriões foram alocados novamente na placa de cultivo em KSOM sob óleo mineral, sendo o meio suplementado com as diferentes doses de melatonina, no qual permaneceram até o D8, para avaliação do desenvolvimento embrionário.

6.2.3.3 Análise de melatonina e seu derivado, AFMK, em meio de cultivo de embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo

As concentrações de melatonina e AFMK foram determinadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência descritas no experimento 1. Com a ressalva que para este experimento, a concentração de melatonina e AFMK foi realizada na mesma amostra, sendo esta diluída 1:2 em ácido perclórico.

6.2.3.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário

No dia 8 (D8) de cultivo foi avaliada a taxa de blastocisto, sendo esta calculada com base na relação de blastocisto total pelo número de embriões acima de 16 células. Blastocistos expandidos em D8 foram separados para quantificação do número total de blastômeros por embrião, realizado por coloração com 4',6-diamidino-2-fenillindol, dihidroclorido (DAPI; Prolong Gold® *Antifade Reagent*, Molecular Probes®) e avaliados por microscopia de epifluorescência confocal, no aumento de 20X (Olympus) em imagens de planos confocais sequenciais feitas pelo software (Olympus Fluoview. ver. 3.1).

6.2.3.5 Avaliação do *status* oxidativo

Para a avaliação do *status* oxidativo foi utilizado o método quantitativo de marcação por probe de fluorescência, CellRox® Green (CRG; Molecular Probes ®),

baseado no protocolo descrito anteriormente (Item 5). Resumidamente, blastocistos expandidos (D8) foram corados com 5 μ M de CRG em meio KSOM e incubados por 30 minutos à 38,5°C, 5% CO₂ em ar. Após a incubação, os embriões foram lavados (3X; PBS) e fixados em 3,7% de formaldeído. O sinal de verde emitido foi captado por microscopia de epifluorescência (descrito anteriormente). A avaliação foi feita por quantificação de pixel total do embrião (sinal verde), utilizando para mensuração da intensidade de pixel o programa Image J (Windows).

6.2.3.6 Avaliação da atividade de caspase-3 e caspase-7

Foi utilizado o ensaio Image-iT™ Live Red Caspase Detection (Molecular Probes™, Cat. I35102). O reagente FLICA, liofilizado, foi dissolvido em 50 μ L de DMSO e armazenado em alíquotas de 1,6 μ L à -20°C (150X FLICA). Para a avaliação, a alíquota de 150XFLICA foi diluída em PBS (1:5), para fazer a solução de uso. Para a coloração, foi adicionado 1:30 da Solução Uso em KSOM contendo os blastocistos expandidos, e incubação por 60 minutos (38,5°C, 5%CO₂, em ar e alta umidade). Após a incubação, os embriões foram lavados (3X; Wash Buffer), e fixados em 3,7% formaldeído (Apêndice B). Foi avaliado o sinal vermelho (550/595nm), também pela quantificação de pixel total do embrião, como descrito anteriormente.

6.2.3.7 Extração de RNA e RT-PCR quantitativo

Embriões bovinos, em estágio de blastocisto expandido de cada tratamento, foram coletados e lavados em PBS. Grupos de 5 estruturas foram transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,7ml contendo 40 μ L de Extraction Buffer, do kit de

extração de RNA Pico Pure™ (Life Technologies), incubados por 30 minutos à 42°C e imediatamente transferidos para nitrogênio líquido. Posteriormente, estes tubos foram armazenados à -80°C. A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo do kit PicoPure™, ou seja, foi realizado o tratamento com DNase, e a eluição do RNA em 11µL da solução de eluição do kit. Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit Superscript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™), sendo padronizada a reação para o volume de 6µL de RNA, segundo as orientações do fabricante. Para análise em RT-PCR foram desenhados os primers para os genes de interesse heat shock protein 60 (HSP60), superóxido dismutase 1 (SOD1), glucose-regulated protein 78kDa (GRP78) (Quadro 2) e foi utilizado o protocolo TaqMan® Gene Expression Assays, utilizando para preparo da reação TaqMan Universal Master Mix II, com UNG (Cod. 4440038, Applied Biosystem, USA). Como controle endógeno foi realizado um sistema TaqMan® para o gene β -actina (ACTB).

Quadro 2 - Lista de referências dos primers (ensaio TaqMan®) utilizados para expressão gênica em blastocistos bovinos

Gene	Espécie	Referência catálogo
SOD1	Bovino	Bt03215423_g1 (Life Technologies, Inc.)
HSP60	Bovino	Bt04301470_g1 (Life Technologies, Inc.)
GRP78	Bovino	Bt03244880_m1 (Life Technologies, Inc.)
ACTB	Bovino	Bt03279174_g1 (Life Technologies, Inc.)

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para análise da dinâmica da melatonina nos diferentes sistemas, as amostras foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x4x4, segundo Quadro 3. Foi considerado, como unidade experimental, para o grupo SO, o *pool* de 4 gotas de uma placa de Petri, e para o grupo SSO, o volume de meio de cada poço.

Para a avaliação da ação da melatonina frente a um desafio oxidativo induzido por menadiona (5 μ M) nos embriões bovinos, estes foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado nas diferentes concentrações de melatonina, 0, 25, 50 e 100 ng/ml, como ilustrado em Quadro 4. Neste experimento, a unidade experimental considerada foi o poço que recebeu o tratamento. O meio de cada poço foi armazenado em cada replicata, para avaliação futura em HPLC, da concentração de melatonina e AFMK. Utilizou-se a atmosfera controlada em todos os períodos da CIV para diminuir os efeitos do sistema na indução do estresse oxidativo. A indução do estresse oxidativo foi realizada pelo tratamento com 5 μ M de menadiona, que leva à formação de radicais livres.

Quadro 3 - Delineamento para análise da dinâmica da melatonina nos diferentes sistemas de cultivo – São Paulo – 2014

Avaliação da presença de melatonina no meio de cultivo																			
Sistema com óleo mineral – Placa com 4 gotas de 100µL de meio										Sistema sem óleo mineral – Poço 400µL de meio									
0 ng/ ml de melatonina		25 ng/ ml de melatonina		50 ng/ ml de melatonina		100 ng/ ml de melatonina		0 ng/ ml de melatonina		25 ng/ ml de melatonina		50 ng/ ml de melatonina		100 ng/ ml de melatonina					
0 h	2 4 h	7 2 h	1 4 4 h	0 h	2 4 h	7 2 h	1 4 4 h	0 h	2 4 h	7 2 h	1 4 4 h	0 h	2 4 h	7 2 h	1 4 4 h	0 h	2 4 h	7 2 h	1 4 4 h

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Quadro 4 - Delineamento para avaliação da ação da melatonina frente desafio oxidativo em embriões bovinos – São Paulo – 2014

MIV E FIV (38,5°C, 5% CO ₂ em ar)				
CIV (D0 – D5) KSOM (7-15 emb./gota 50µL) sob óleo mineral – Atmosfera controlada (ATM-C; 38,5°C, 5% O ₂ , 5% CO ₂ , 90% N ₂) D3 – SFB (5%)				
TRAT. 24 HRS – PLACA NUNC ATM. CONTROLADA				
G1: 0 MEL (Sol. Diluente)	G2: 25ng/ml MEL	G3: 50 ng/ml MEL	G4: 100 ng/ml MEL	Controle Replicata: 0 Menadiona + 0 MEL
ADICIONAR MENADIONA 5 µM para grupos G1- 4				
CIV D6 – D8 KSOM SOB OLEO MINERAL (ATM-C)				
G1: 0 MEL (Sol. Diluente)	G2: 25ng/ml MEL	G3: 50 ng/ml MEL	G4: 100 ng/ml MEL	Controle Replicata

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Foram realizadas 10 replicatas (manipulações de FIV). Para garantir a homogeneidade das replicatas, uma manipulação de rotina (Controle Replicata), foi realizada em paralelo ao experimento, em todas as manipulações, sendo somente utilizadas para as avaliações de quantificação de EROS, atividade de caspase,

desenvolvimento embrionário e expressão gênica, as manipulações em que o controle apresentou taxa de blastocisto superior a 20%. Em cada manipulação, os embriões foram separados para avaliação da expressão gênica (pool de 5 embriões) e para as avaliações em microscopia de epifluorescência confocal (mínimo de 2 embriões/grupo/replicata). Para cada replicata, os mesmos embriões, foram avaliados para quantificação de EROS, atividade de caspase e contagem de número total de blastômeros por embrião por microscopia de epifluorescência confocal.

Nas análises de HPLC, a curva padrão foi rodada sempre em duplicata para cada momento de avaliação.

Nas análises de expressão gênica foi selecionada a beta-actina como gene endógeno já bem descrito para as análises semi-quantitativas de embriões bovinos. O uso de apenas um gene endógeno se justifica devido à homogeneidade da amostra frente ao estágio embrionário. As amostras foram analisadas em triplicata, respeitando uma diferença entre avaliação de desvio padrão máximo 0,5 dos valores de CT.

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas pelo programa SAS System for Windows 9.3. Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. No caso das premissas estatísticas não serem obedecidas, os dados foram transformados.

Para as avaliações de desenvolvimento embrionário, quantificação de EROS, atividade de Caspase e expressão gênica, as concentrações de melatonina foram tratadas como níveis, sendo utilizado por tanto, a análise de regressão polinomial. Para análise de regressão polinomial foi utilizado o procedimento IML para obter os polinômios ortogonais referente aos níveis utilizados, sendo, em seguida, realizada a Análise de Variância para verificação dos efeitos lineares e respectivos desvios.

Para dados não paramétricos, foi utilizado análise de variância não paramétrica (KRUSKAL WALLIS, pelo procedimento NPAR1WAY), e a comparação de médias por comparação de dois grupos por vez (WILCOXON).

A análise de expressão gênica foi feita usando o PROC MIXED do SAS com um modelo linear como descrito por Steibel et al. (2009). A variável dependente foi o ciclo de detecção (Ct).

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Estabilidade da melatonina em sistema de cultivo *in vitro* embrionário com e sem óleo mineral

Para avaliar se existe perda da melatonina para o sistema foi comparado o sistema com e sem óleo mineral, sendo avaliada a concentração da melatonina no meio de cultivo em diferentes tempos de incubação. Foi identificado que a concentração de melatonina não se alterou ao comparar os sistemas com (SO) ou sem (SSO) óleo mineral (Gráfico 1). A concentração de melatonina no meio também não se alterou ao longo do tempo, pois não houve diferença significativa entre os tempos 0, 24, 72 e 144 horas de incubação (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Comparação da concentração de melatonina (MEL – 0, 25, 50 e 100ng/ml) no meio de cultivo, entre sistema com óleo mineral (SO) e sem óleo mineral (SSO) analisados por HPLC – São Paulo – 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Gráfico 2 – Concentração de melatonina no meio de cultivo em cada um dos tempos de incubação avaliados (0, 24, 72 e 144 horas) – São Paulo – 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.5.2 Ação antioxidante da melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovino submetidos ao estresse oxidativo

6.5.2.1 Produção de AFMK e consumo de melatonina no meio durante o cultivo *in vitro* de embriões induzidos ao estresse oxidativo

Para identificar o consumo de melatonina pelo embrião induzido ao estresse oxidativo e se houve formação do metabólito da melatonina AFMK pela ação *scavanger* desta, foi avaliada a concentração de AFMK e de melatonina no meio de cultivo. Não houve consumo de melatonina nas doses 25 e 100ng/ml, contudo foi possível identificar uma diminuição na concentração de melatonina na dose de 50ng/ml, após o período de indução (Gráfico 3).

Foi possível identificar a formação de AFMK em todos os grupos tratados com melatonina. Não houve diferença, contudo, na concentração deste metabólito entre os grupos tratados com melatonina (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Comparação das concentrações de Melatonina, pela técnica de HPLC, no meio de cultivo de embriões, antes e após período de indução ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Gráfico 4 - Comparação das concentrações de AFMK, pela técnica de HPLC, no meio de cultivo de embriões antes e após período de indução ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.5.2.2 Avaliação do desenvolvimento embrionário

Neste estudo, 3000 oócitos foram maturados e fecundados *in vitro* e no D5 de cultivo, os embriões que apresentavam acima de 16 células ($51,8\% \pm 6,69$ sobre o número total de oócitos) foram aleatoriamente separados nos diferentes tratamentos (0, 25, 50 e 100ng/ml de melatonina), e todos receberam a indução com menadiona (D5). No dia 8 de cultivo foi avaliada taxa de blastocisto dos diferentes grupos, sendo possível identificar um efeito quadrático da dose de melatonina na taxa de blastocisto. A dose de 50ng/ml apresentou taxas de blastocisto mais altas do o grupo sem MEL (Gráfico 5). Ao longo do experimento observou-se uma melhora na morfologia dos embriões tratados com melatonina (Figura 4), sendo então avaliado a proporção de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido em D8. No entanto, não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação do desenvolvimento embrionário no D8 (blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) nas diferentes doses de melatonina (0, 25, 50 e 100ng/ml) – São Paulo - 2014

Dose MEL (ng/ml)	% Blastocisto Média (Desv. Padrão)	% Blastocisto Expandido Média (Desv. Padrão)	% Blastocisto Eclodido Média (Desv. Padrão)	Taxa de Blastocisto Total Média (Desv. Padrão)
0	12,67 (±8,18)	19,68 (±9,15)	0,72 (±1,52)	33,07 (±9,90)
25	17,18 (±5,65)	22,41 (±15,05)	0,73 (± 1,56)	40,32 (7,88)
50	22,20(±9,53)	22,05 (±13,39)	1,68 (±2,62)	45,93 (11,07)
100	20,01 (± 9,31)	17,14 (±10,74)	2,38 (±2,89)	39,56(6,42)

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Gráfico 5 - Efeito da dose de melatonina (DM) na taxa de blastocisto em D8 (TBL) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Figura 4 - Avaliação morfológica do desenvolvimento embrionário (D8) nos embriões tratados com melatonina e induzidos ao estresse oxidativo - São Paulo – 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Ao avaliar a qualidade embrionária pelo número total de blastômeros por blastocisto expandido (Figura 5), foi possível identificar também um efeito quadrático da melatonina em situação de estresse oxidativo (Gráfico 6). Foram avaliados no total 33 embriões. Houve aumento no número de células/embrião no grupo tratado com 50ng/ml (143 ± 24.83 blastômeros/embrião).

Gráfico 6 - Efeito da dose de melatonina (DM) no número de blastômeros totais (nBLAST) em blastocisto expandido em D8 induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 2014

Legenda: O valor de número de blastômeros (nBLAST) expressa a média ($\pm$ erro padrão) do número total de blastômero por blastocisto.

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.5.2.3 Avaliação *status* oxidativo

Ao avaliar o *status* oxidativo no embrião foi possível identificar efeito quadrático do tratamento com melatonina, sendo a dose de 50ng/ml mais representativa da diminuição do estresse oxidativo (EO), segundo a avaliação por CellROX Green. O EO foi expresso pela somatória de pixel mensurado nos diferentes planos de análise confocal do blastocisto expandido (Figura 5). A intensidade durante a avaliação foi balanceada para cada análise por um controle positivo e um negativo (retirados do controle da replicata, sendo o controle positivo induzido com 100 μ M de menadiona), para impedir influências do *background* na mensuração (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Efeito da dose de melatonina no *status* oxidativo de blastocisto expandidos (D8) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 2014

Legenda: No eixo EO está expresso o nível de estresse oxidativo (EO) pela média ($\pm$ erro padrão) do valor em pixel total por blastocisto para os tratamentos com diferentes doses de melatonina (DM), 0, 25,50 e 100ng/ml.

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.5.2.4 Avaliação da atividade da Caspase-3 e Caspase-7

Para a avaliação da atividade de caspase foram utilizados 33 embriões de 3 manipulações de PIV. Ao avaliar a intensidade total em pixels de cada embrião foi possível identificar um efeito da melatonina na atividade de caspase (Figura 5). Na presença de melatonina houve uma queda na atividade das caspases 3 e 7 (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Efeito da dose de melatonina na atividade de caspase 3 e 7 de blastocisto expandidos (D8) induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo – 2014

Legenda: A atividade de caspase (CASP) está expressa pela média ($\pm$ erro padrão) de pixel total por blastocisto para os tratamentos com diferentes doses de melatonina (DM), 0, 25,50 e 100ng/ml de melatonina.

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.5.2.5 Avaliação de expressão gênica por RT-PCR

Foi feita a quantificação relativa dos transcritos dos blastocistos induzidos ao estresse oxidativo, tratados com diferentes concentrações de melatonina. Não houve diferença de expressão dos transcritos do gene relacionado com o estresse oxidativo HSP 60. Tampouco houve diferença na expressão das ações antioxidantes, como a superóxido dismutase e de anti-apoptóticos como a expressão de transcritos da proteína regulada por glicose-78, em relação ao controle (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Níveis de expressão relativa dos genes SOD1 (A), HSP60 (B) e GRP78 (C), em blastocisto expandidos (D8) tratados com diferentes doses de melatonina (DM) e induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014

Legenda: Os níveis de mRNA dos genes foram analisados por RT-PCR e as amostras foram normalizadas pela expressão do gene endógeno β -actina. Os dados apresentados estão em escala Log2.

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Figura 5 - Imagens descritivas das análises de quantificação número de blastômeros, avaliação do *status* oxidativo e atividade de caspase, dos diferentes tratamentos com melatonina com os controles positivos e negativos das técnicas – São Paulo – 2014

Legenda: A-F: representação da coloração por DAPI para contagem de blastômeros, nos grupos 0, 25, 50, 100, controle positivo e controle negativo, respectivamente; G-L: representação da coloração por CellROX para quantificação de EROS por quantificação total de pixel por embrião, nos grupos 0, 25, 50, 100, controle positivo e controle negativo; M-R: representação da coloração por ensaio IT -Image Live Caspase para avaliação de atividade de caspase por quantificação total de pixel por embrião, nos grupos 0, 25, 50, 100, controle positivo e controle negativo respectivamente; S-Z: Sobreposição das três análises realizadas no mesmo embrião nos grupos 0, 25, 50, 100, controle positivo e controle negativo respectivamente.

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

6.6 DISCUSSÃO

Devido a característica lipofílica da melatonina e as divergências da dose preconizada para o cultivo *in vitro* de embrião, no intuito de se obter ação antioxidante, foi questionado se a melatonina passaria para o óleo mineral ou se seria degradada no sistema de cultivo *in vitro*. Dúvidas, de qual seria a dose antioxidante ideal de melatonina a ser utilizada no sistema de cultivo *in vitro* de embrião bovino, também foram suscitadas. Os resultados mostram que é possível a suplementação de melatonina no meio de cultivo, não havendo perdas para o sistema com óleo mineral, sendo sugerida a dose antioxidante de 50ng/ml a ser utilizada em sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

A melatonina é uma indolamina altamente lipofílica (FISCHER et al., 2008), descrita como sensível à luminosidade, levando a possível degradação (BRÖMME; PESCHKE; ISRAEL, 2008). No entanto, o comportamento dessa molécula nos diferentes sistemas de cultivo embrionário bovino não havia sido descrito. Neste trabalho, contrastando ao que se esperava com base nas características descritas da molécula, foi possível constatar que não há perda da melatonina do meio de cultivo para o óleo mineral, sendo viável a utilização deste antioxidante em sistemas com óleo mineral ou sem.

Com relação a estabilidade da molécula no sistema, foi possível observar que não há uma perda mensurável, pela técnica utilizada e nas concentrações testadas, da melatonina durante o período máximo avaliado de 144 horas de incubação, permitindo a suplementação ao longo de todo o período de cultivo embrionário.

Após a certificação da estabilidade da molécula no sistema de cultivo, foi realizado um teste de dose antioxidante da melatonina em embriões tratados com menadiona. Sabe-se que a menadiona ao reagir com oxigênio, produz o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, que pode produzir o radical hidroxila (BLADEN; KOZLOWSKI; DYNAN, 2012). Após 24 horas de incubação dos embriões com menadiona e melatonina, nas diferentes concentrações, foi possível, aqui relatado pela primeira vez, identificar um consumo de melatonina

na dose de 50ng/ml no meio de cultivo. No entanto, não foi possível identificar alterações nas doses de 25 e 100 ng/ml pela técnica de HPLC.

A melatonina pode atuar como antioxidante por ação direta, neutralizando radicais livres. Ao reagir com radicais como a hidroxila, gera o metabólito AFMK, que também possui características antioxidantes (TAN et al., 2007). Após a incubação de 24 horas houve formação de AFMK em todos os grupos tratados com melatonina no meio de cultivo, contudo, não houve diferença na concentração de AFMK formado entre os grupos. A mesma quantidade de AFMK no meio de cultivo era esperada, visto que todos os grupos foram tratados com a mesma dose de menadiona, obtendo, assim, a mesma formação de EROS extracelular. Demonstrando uma ação *scavenger* da melatonina extracelular, contudo não refletindo os efeitos no desenvolvimento embrionário avaliados neste trabalho.

A menadiona, no meio intracelular, é capaz de atuar na mitocôndria induzindo reações redox que resultam na formação de superóxido, aumentando os níveis de EROS endógeno. Devido a essa característica pode ser utilizada como indutor de estresse oxidativo em diferentes modelos, como embriões de *zebra fish* (BLADEN; KOZLOWSKI; DYNAN, 2012), de bovinos (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009) e também de outros tipos celulares (GUTHRIE; WELCH, 2006; LOOR et al., 2010; NUNES et al., 2005). Altos níveis de estresse oxidativo foram encontrados no grupo induzido com menadiona e que não recebeu tratamento com melatonina. Na dose de 50ng/ml de MEL, foi possível identificar uma queda significativa nesses níveis, semelhante às relatadas quando da utilização de melatonina como antioxidante na maturação *in vitro* de oócito bovinos (EL-RAEY et al., 2011).

Contudo, o *status* oxidativo semelhante ao grupo induzido encontrado nos embriões tratados com 100ng/ml de melatonina, sugere um mecanismo de saturação na ação antioxidante da melatonina. Sabe-se que a melatonina além da ação *scavenger*, é capaz de atuar por meio de receptores de membrana MT1 e MT2, que sinalizam a ativação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005). A melatonina é capaz de ativar ou inibir a ação desses receptores, podendo desencadear múltiplas cascatas de tradução ainda não totalmente conhecidas.

In vivo há relato de dessensibilização do receptor MT1 após exposição prolongada a altas doses de melatonina (WITT-ENDERBY et al., 2003). Estudos recentes, identificaram o receptor MT1 na membrana de blastocistos bovinos (SAMPAIO et al., 2012; WANG et al., 2014a), sugerindo que a ação da melatonina encontrada nos embriões do presente estudo, tenha sido via receptores.

O estresse oxidativo no cultivo pode retardar o desenvolvimento embrionário, refletindo em queda da taxa de blastocisto (FAVETTA et al., 2007; TAKAHASHI, 2012; YOON et al., 2014). Neste trabalho o tratamento com melatonina (50ng/ml), foi capaz de diminuir os níveis de EROS, apresentando efeito positivo sobre a taxa de blastocisto, com incremento de até 10%, quando comparado ao grupo induzido, que não recebeu tratamento, semelhante aos relatos na literatura (PAPIS et al., 2007; WANG et al., 2014a). Tais relatos confirmam os benefícios da melatonina no desenvolvimento embrionário. O presente trabalho, devido ao estudo das diferentes doses de melatonina, aponta ainda um efeito quadrático deste antioxidante na taxa de blastocisto. Isso indica um ponto ótimo de ação da melatonina no cultivo *in vitro* de embriões, nas condições aqui descritas e uma perda deste efeito positivo em doses mais elevadas.

O número total de blastômeros é um parâmetro utilizado para determinar potencial de desenvolvimento (SHI et al., 2009). Em estudos prévios, foi correlacionado negativamente ao estresse oxidativo e o número de blastômeros total em embriões tratados com menadiona (Artigo I). Tal resultado foi coerente com trabalhos anteriores que utilizaram método de indução semelhante em embriões bovinos (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009). No presente estudo, a dose de 50ng/ml, reestabeleceu o potencial de desenvolvimento embrionário, apresentando número de blastômero superior aos embriões que não receberam o tratamento, 143 vs. 93 blastômeros, respectivamente.

Estes resultados podem estar relacionados com a ação anti-apoptótica da melatonina. A via de ativação de caspase pode ser inibida pela ativação dos receptores de melatonina, o que soma à ação antioxidante da melatonina, a ação anti-apoptótica (LANOIX et al., 2012). Ao avaliar a atividade das caspases 3 e 7, neste trabalho, foi possível identificar uma atividade alta dessas caspases

nos embriões induzidos com menadiona, sugerindo aumento de apoptose em embriões submetidos ao estresse oxidativo. Em contrapartida, há um efeito negativo na atividade da caspase nos grupos tratados com melatonina, ou seja, ao tratar os embriões submetidos ao estresse oxidativo com melatonina, a atividade de Caspase 3 e 7 diminui.

A queda na atividade de caspase, a queda dos níveis de estresse oxidativo, o aumento na taxa de blastocisto e os resultados opostos na dose mais alta de melatonina, são mais evidências de que a ação da melatonina nos embriões bovinos durante o cultivo *in vitro* se faz via receptores. Por esse motivo esperava-se uma alteração na expressão gênica do perfil oxidativo dos embriões, já que a sinalização via receptores envolveria a ativação de enzimas antioxidantes. No entanto, não foi possível identificar alterações na expressão de SOD e Gxp78 (também associada a uma resposta frente ao estresse oxidativo). Não foi possível identificar também, alteração na expressão de HSP60, que normalmente encontra-se aumentada em situação de estresse oxidativo. Contudo, esses resultados não invalidam a hipótese, pois sabe-se que o perfil oxidativo de expressão gênica é dinâmico e pode se alterar em um curto intervalo de tempo (BLANCHARD et al., 2007). Provavelmente, se a avaliação de expressão gênica dos embriões tivesse sido realizada logo após o período de indução, e não em embriões em D8 como foi feito, talvez uma alteração nestes genes pudesse ter sido detectada. No entanto, a eleição para que fosse utilizado embriões em D8, foi para garantir maior homogeneidade entre os grupos avaliados.

Um fator limitante quando se trabalha com ovários provenientes de vacas destinadas ao abatedouro, é quanto a variabilidade do material. A época do ano, *status* nutricional, reprodutivo e sanitário influenciam sobremaneira os resultados da PIV de embriões. Apesar do sistema de cultivo ter sido homogeneizado, devido ao período do ano, a qualidade dos ovários, neste experimento, foi muito variável, o que pode justificar os altos erros padrões apresentados e ter dificultado a interpretação de alguns resultados, como, por exemplo, a expressão gênica. Contudo, este trabalho agrega informações relevantes para o entendimento da ação da melatonina em embriões PIV bovinos, como a estabilidade da molécula nos sistemas de cultivo, assim como, o comportamento

da melatonina frente a dose utilizada, sendo identificado uma dose ótima para ação antioxidante. Sugere-se estudos futuros para identificar a ativação dos receptores de melatonina e as vias de tradução acionadas nas diferentes doses.

Em conclusão, a melatonina é estável no sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos utilizados nesse trabalho. A dose de 50ng/ml reduz os níveis de EROS, diminui a atividade de caspase, resultando em embriões com maior potencial de desenvolvimento e aumenta a taxa de blastocisto. Deve ser considerado que a melatonina em doses mais elevadas pode perder ação antioxidante, possivelmente por alterações nas cascatas de tradução acionadas pelo receptor de melatonina. Por tanto, na dose de 50ng/ml a melatonina tem ação antioxidante e anti-apoptótica, sendo uma alternativa de tratamento do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

ARIAS, M. E.; SANCHEZ, R.; FELMER, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, p. 1–9, 24 mar. 2011.

BLADEN, C. L.; KOZLOWSKI, D. J.; DYNAN, W. S. Effects of low-dose ionizing radiation and menadione, an inducer of oxidative stress, alone and in combination in a vertebrate embryo model. **Radiation Research**, v. 178, n. 5, p. 499–503, nov. 2012.

BLANCHARD, J. L.; WHOLEY, W.-Y.; CONLON, E. M.; POMPOSIELLO, P. J. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. **PloS One**, v. 2, n. 11, p. e1186, jan. 2007.

BRÖMME, H.-J.; PESCHKE, E.; ISRAEL, G. Photo-degradation of melatonin: influence of argon, hydrogenperoxide, and ethanol. **Journal Of Pineal Research**, v. 44, n. 4, p. 366–372, maio 2008.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 738–746, 4 mar. 2013.

CONTI, A.; MAESTRONI, G. J. M. HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. **Journal of Pineal Research**, v. 20, n. 3, p. 138–144, abr. 1996.

DRIVER, A. M.; PENAGARICANO, F.; HUANG, W.; AHMAD, K. R.; HACKBART, K. S.; WITLBANK, M. C.; KHATIB, H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 118–126, 28 mar. 2012.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E. A. A.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Molecular Reproduction And Development**, v. 78, n. 4, p. 250–262, abr. 2011.

FAVETTA, L. A.; ST JOHN, E. J.; KING, W. A.; BETTS, D. H. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1201–1210, 15 abr. 2007.

FISCHER, T. W.; SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M. A.; REITER, R. J.; PAUS, R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 713–730, 2008.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal Of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2089–100, ago. 2006.

IETS. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. 2011.

LANOIX, D.; LACASSE, A.-A.; REITER, R. J.; VAILLANCOURT, C. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 1–11, 2 jan. 2012.

LOOR, G.; KONDAPALLI, J.; SCHRIEWER, J. M.; CHANDEL, N. S.; VANDEN HOEK, T. L.; SCHUMACKER, P. T. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1925–36, 15 dez. 2010.

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

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

PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal of pineal research**, v. 43, n. 4, p. 321–326, nov. 2007.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 1 mar. 2009.

RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KIM, I. J.; WANG, H.; KAYA, A.; MEMILI, E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal Of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 283–288, 2007.

SAMPAIO, R. V.; CONCEIÇÃO, S. D. B.; MIRANDA, M. S.; SAMPAIO, L. D. F. S.; OHASHI, O. M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst

produced in vitro. **Reproductive Biology And Endocrinology : RB&E**, v. 10, p. 103, 1–7, jan. 2012.

SHI, J.-M.; TIAN, X.-Z.; ZHOU, G.-B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S.-E.; ZENG, S.-M.; TIAN, J.-H.; LIU, G.-S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal Of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 318–323, nov. 2009.

SILVA, S. O.; RODRIGUES, M. R.; CARVALHO, S. R. Q.; CATALANI, L. H.; CAMPA, A.; XIMENES, V. F. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. **Journal Of Pineal Research**, v. 37, n. 3, p. 171–5, out. 2004.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F. F.; MARQUES, M. G.; PERES, M. A.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 146, n. 5, p. 433–41, jan. 2013.

SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: functions and ligands. **Drug Discovery Today**, v.1, p. 1–9, 30 abr. 2014.

STEIBEL, J. P.; POLETO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146–152, ago. 2009.

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

TAN, D.-X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal Of Pineal Research**, v. 42, n. 1, p. 28–42, jan. 2007.

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

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; GAO, C.; HE, C.; FU, Y.; JI, P.; LI, Y.; LI, N.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal Of Pineal Research**, v. 56, n. 3, p. 333–342, abr. 2014a.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHOU, Y.; TAN, D.; ZHU, S.; DAI, Y.; LIU, G. Melatonin Improves the Quality of In Vitro Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e93641, 1–7, jan. 2014b.

WITT-ENDERBY, P. A.; BENNETT, J.; JARZYNSKA, M. J.; FIRESTINE, S.; MELAN, M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2183–2198, abr. 2003.

YOON, S.-B.; CHOI, S.-A.; SIM, B.-W.; KIM, J.-S.; MUN, S.-E.; JEONG, P.-S.; YANG, H.-J.; LEE, Y.; PARK, Y.-H.; SONG, B.-S.; KIM, Y.-H.; JEONG, K.-J.; HUH, J.-W.; LEE, S.-R.; KIM, S.-U.; CHANG, K.-T. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 104; 1–10, maio 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa identificou que não há perda significativa da melatonina para o sistema de cultivo, permitindo sua utilização em sistemas de cultivo *in vitro* de embriões bovinos sob óleo mineral.

O sistema proposto para a avaliação de estresse oxidativo, o qual associou a indução deste por menadiona e incubação dos embriões em atmosfera controlada, possibilitou determinar o estresse oxidativo e correlacionar com efeitos negativos no desenvolvimento embrionário. a dose antioxidante da melatonina.

Ao avaliar a ação antioxidante da melatonina, na dose de 50ng/ml de melatonina, foi possível abaixar os níveis de radicais livres, diminuir a atividade de caspase, aumentando o número de blastômeros totais por embrião e também a taxa de blastocisto, quando comparado ao grupo induzido que não recebeu tratamento com melatonina.

Acredita-se que a melatonina seja capaz de neutralizar os radicais livres produzidos no meio de cultivo pela indução de menadiona, por meio da produção de metabólito AFMK. Contudo, sugere-se que os efeitos descritos neste trabalho, no que se refere a uma ação intracelular da melatonina, possivelmente ocorre via ação de receptores. Os resultados encontrados na dose de 100ng/ml de melatonina, sugerem que doses elevadas desta indolamina podem desencadear inibição dos receptores ou até a ativação de outras vias de tradução maléficas ao desenvolvimento embrionário, que exigem novos estudos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ, F.; XU, J.; GOLDBERG, J.; DESAI, N. Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. **BMC Biotechnology**, p. 11–29, jan. 2011.
- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anatomy and Embryology**, v. 199, p. 519–527, 21 abr. 1999.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 1, p. 180–7, fev. 2010.
- ASGARI, Z.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; BAHADORI, M. H. The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. **Cell Journal**, v. 14, n. 3, p. 203–208, jan. 2012.
- AUERBACH, S., BRINSTER, R. L. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryo. **Nature**, v. 217, n. February 3, p. 465 – 466, 1968.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W. J.; KUMAR, B. M.; OCK, S. A; YOO, J. G.; IM, G. S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 265–275, 15 jul. 2007.
- BONTEKOE, S.; MANTIKOU, E.; VAN WELY, M.; SESHADRI, S.; REPPING, S.; MASTENBROEK, S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. **The Cochrane Database Of Systematic Reviews**, v. 7, p. CD008950, jan. 2012.
- CADET, J.; WAGNER, J. R. Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: Similarities and differences. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 557, n. Sep 1, p. 47–54, 10 maio 2014.
- CAGNONE, G. L. M.; SIRARD, M.-A. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction And Development**, v. 80, n. 4, p. 1–18, 20 abr. 2013.
- CASTILLO-MARTÍN, M.; BONET, S.; MORATÓ, R.; YESTE, M. Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. **Cryobiology**, p. 1–8, 19 mar. 2014.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 738–746, 4 mar. 2013.

CHOI, J.; PARK, S.-M.; LEE, E.; KIM, J.-H.; JEONG, Y.-I.; LEE, J.-Y.; PARK, S.-W.; KIM, H.-S.; HOSSEIN, M. S.; JEONG, Y.-W.; KIM, S.; HYUN, S.-H.; HWANG, W.-S. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular Reproduction And Development**, v. 75, n. 7, p. 1127–1135, jul. 2008.

CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, T.; MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1341–1348, nov. 2010.

COSTA, E. J. .; SHIDA, C. S.; BIAGGI, M. H.; ITO, A. S.; LAMY-FREUND, M. T. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. **FEBS Letters**, v. 416, n. 1, p. 103–106, out. 1997.

DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 40, n. 2, p. 93–97, abr. 2005.

DRIVER, A. M.; PENAGARICANO, F.; HUANG, W.; AHMAD, K. R.; HACKBART, K. S.; WITLBANK, M. C.; KHATIB, H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 118–126, 28 mar. 2012.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E. A. A.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Molecular Reproduction And Development**, v. 78, n. 4, p. 250–262, abr. 2011.

EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. **Journals Of Reproduction & Fertility Ltd**, v. 85, p. 715–720, 1989.

FISCHER, T. W.; SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M. A.; REITER, R. J.; PAUS, R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 713–730, 2008.

FLOREANI, M.; NAPOLI, E.; PALATINI, P. Role of antioxidant defences in the species-specific response of isolated atria to menadione. **Comparative Biochemistry And Physiology. Part C**, v. 132, n. 2, p. 143–151, jun. 2002.

FREEMAN, M. R.; WHITWORTH, C. M.; HILL, G. A. Fertilization and early embryology: Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization. **Hum. Reprod.**, v. 10, n. 2, p. 408–414, 1 fev. 1995.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal Of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1–16, ago. 2011.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal Of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245–257, abr. 2013.

GAO, C.; HAN, H.-B.; TIAN, X.-Z.; TAN, D.-X.; WANG, L.; ZHOU, G.-B.; ZHU, S.-E.; LIU, G.-S. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal Of Pineal Research**, v. 52, n. 3, p. 305–311, abr. 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAMMAMI, S.; MORATÓ, R.; ROMAGUERA, R.; ROURA, M.; CATALÁ, M. G.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Developmental competence and embryo quality of small oocytes from pre-pubertal goats cultured in IVM medium supplemented with low level of hormones, insulin-transferrin-selenium and ascorbic acid. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 339–344, abr. 2013.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1456–1462, maio 2000.

IETS. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. 2011.

KHALIL, W. A.; MAREI, W. F. A.; KHALID, M. Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 161–168, 15 jul. 2013.

LANOIX, D.; LACASSE, A.-A.; REITER, R. J.; VAILLANCOURT, C. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 1–11, 2 jan. 2012.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17–22, 1 jan. 2008.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene

expression patterns. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259–267, ago. 2003.

LORD, T.; AITKEN, R. J. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. **Reproduction**, v. 146, p. R217–R227, dez. 2013.

LORD, T.; NIXON, B.; JONES, K. T.; AITKEN, R. J. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. **Biology Of Reproduction**, v. 88, n. 3, p. 67, 1–9, mar. 2013.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 937–950, 15 set. 2012.

MARQUES, M. G. **Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária in vitro e sua influencia no desenvolvimento embrionário em suínos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal Of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 1 jun. 2000.

MILCZAREK, R.; HALLMANN, A.; SOKOŁOWSKA, E.; KALETHA, K.; KLIMEK, J. Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. **Journal Of Pineal Research**, v. 49, n. 2, p. 149–55, set. 2010.

NICACIO, A. C.; SIMÕES, R.; DE PAULA-LOPES, F. F.; DE BARROS, F. R. O.; PERES, M. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of in vitro produced bovine embryos. **Zygote**, v. 20, n. May, p. 117–122, 1 maio 2011.

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

PANG, Y.-W.; AN, L.; WANG, P.; YU, Y.; YIN, Q.-D.; WANG, X.-H.; XIN-ZHANG; QIAN-ZHANG; YANG, M.-L.; MIN-GUO; WU, Z.-H.; TIAN, J.-H. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. **Journal Of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. 389–397, maio 2013.

PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal Of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 321–326, nov. 2007.

PEYROT, F.; DUCROCQ, C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. **Journal Of Pineal Research**, v. 45, n. 3, p. 235–246, out. 2008.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640–1646, jun. 2011.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 1 mar. 2009.

RAHNAMA, A.; ZAVAREH, S.; GHORBANIAN, M. T.; KARIMI, I. The effects of cAMP-elevating agents and alpha lipoic acid on In Vitro Maturation of mouse germinal vesicle oocytes. **Journal Of Reproduction & Infertility**, v. 14, n. 4, p. 173–183, out. 2013.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress In Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 359–384, out. 1998.

RESSMEYER, A.-R.; MAYO, J. C.; ZELOSKO, V.; SÁINZ, R. M.; TAN, D.-X.; POEGGELER, B.; ANTOLÍN, I.; ZSIZSIK, B. K.; REITER, R. J.; HARDELAND, R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. **Redox report : communications in free radical research**, v. 8, n. 4, p. 205–213, jan. 2003.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems : implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589–595, 2002.

ROCHA-FRIGONI, N. A. D. S.; LEÃO, B. C. D. S.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M. F.; MINGOTI, G. Z. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. **Zygote**, p. 1–10, 16 set. 2013.

RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KIM, I. J.; WANG, H.; KAYA, A.; MEMILI, E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal Of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 283–288, 2007.

SAMPAIO, R. V.; CONCEIÇÃO, S. D. B.; MIRANDA, M. S.; SAMPAIO, L. D. F. S.; OHASHI, O. M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst

produced in vitro. **Reproductive Biology And Endocrinology : RB&E**, v. 10, p. 103, 1–7, jan. 2012.

SHI, J.-M.; TIAN, X.-Z.; ZHOU, G.-B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S.-E.; ZENG, S.-M.; TIAN, J.-H.; LIU, G.-S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal Of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 318–323, nov. 2009.

SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: functions and ligands. **Drug Discovery Today**, v. 01, p. 1–9, 30 abr. 2014.

TAKADA, L.; JUNIOR, A M.; MINGOTI, G. Z.; BALIEIRO, J. C. C.; 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. **Research In Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 124–127, fev. 2012.

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

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal Of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p. 280–287, abr. 2008.

TAREQ, K.; AKTER, Q.; KHANDOKER, M. A. M. Y.; TSUJII, H. Selenium and vitamin E improve the in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. **Journal Of Reproduction And Development**, v. 58, n. 6, p. 621–628, 2012.

TIAN, X.-Z.; WEN, Q.; SHI, J.-M.; LIANG-WANG; ZENG, S.-M.; TIAN, J.-H.; ZHOU, G.-B.; ZHU, S.-E.; LIU, G.-S. Effects of melatonin on in vitro development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. **Endocrine Research**, v. 35, n. 1, p. 17–23, jan. 2010.

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

VENEGAS, C.; GARCÍA, J. A.; ESCAMES, G.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, A.; DOERRIER, C.; GARCÍA-CORZO, L.; LÓPEZ, L. C.; REITER, R. J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal Of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 217–227, mar. 2012.

VIANA, J. H. .; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of in vitro Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661–674, 2010.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J.; LIU, G. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal Of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 267–274, 21 maio 2013.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHOU, Y.; TAN, D.; ZHU, S.; DAI, Y.; LIU, G. Melatonin Improves the Quality of In Vitro Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e93641, 1–7, jan. 2014.

YOON, S.-B.; CHOI, S.-A.; SIM, B.-W.; KIM, J.-S.; MUN, S.-E.; JEONG, P.-S.; YANG, H.-J.; LEE, Y.; PARK, Y.-H.; SONG, B.-S.; KIM, Y.-H.; JEONG, K.-J.; HUH, J.-W.; LEE, S.-R.; KIM, S.-U.; CHANG, K.-T. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 104; 1–10, maio 2014.

ZHANG, H.; WU, B.; LIU, H.; QIU, M.; LIU, J.; ZHANG, Y.; QUAN, F. Improving development of cloned goat embryos by supplementing α -lipoic acid to oocyte in vitro maturation medium. **Theriogenology**, v. 80, n. 3, p. 228–233, ago. 2013.

ZHAO, X.-M.; MIN, J.-T.; DU, W.-H.; HAO, H.-S.; LIU, Y.; QIN, T.; WANG, D.; ZHU, H.-B. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, p. 1–12, 29 maio 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A - MEIOS DE CULTIVO

Seção 1.01 Meio de lavagem MIV (MIV-HEPES)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
TCM-199 com HEPES	Gibco	12380-028	90% (v/v)
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	10% (v/v)
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50µg/ml
Filtrar em 0,22 µm			

Seção 1.02 Meio de maturação *in vitro* (MIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
TCM-199 com BICARBONATO	Gibco	11150-026	90%(v/v)
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	10%(v/v)
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50µg/ml
FSH	Bioniche	Folltropin-V	0,5µg/ml
hCG	Intervet	Chorulon	7UI/ml
Filtrar em 0,22 µm			
Estradiol	Sigma	E-4389	1µg/ml

Seção 1.03 Solução estoque para FIV – TALP STOCK (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	TALP STOCK
NaCl	Sigma	S-5886	0,01M
KCl	Sigma	P-5405	0,003M
MgCl ₂	Sigma	M-2393	0,5μM
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	0,35μM
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	0,025M
CaCl ₂ H ₂ O	Sigma	C-5670	0,003M
Ác. Láctico syr.	Sigma	L-7900	0,15% (v/v)

pH = 7.4; OSM = 295-300; Filtrar em 0,22μm

Seção 1.04 Solução de Gentamicina

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
Sulfato de Gentamicina	Sigma	G-1264	50μg/ml
Solução fisiológica (q.s.p)	-	-	100ml

Aliquotar e manter a -20° C

Seção 1.05 Solução de Piruvato

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
Ácido Pirúvico	Sigma	P-3662	0,02M
Água Destilada (q.s.p)	-	-	10ml

Aliquotar e manter a -20° C

Seção 1.06 Solução PHE

Solução PHE			
Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
Na Lactato	Sigma	L-7900	0,03M
Na metabisulfito	Sigma	S-1516	0,005M
Água Milli-Q (q.s.p)	-	-	50ml

pH = 4.0

Componentes Solução PHE			
Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
Penicilamina 2 μ M	Sigma	P-5125	0,3mg/ml salina 0,9%
Hipotaurina 1 μ M	Sigma	H-1384	0,109mg/ml salina 0,9%
Epinefrina 0,25 μ M	Sigma	E-4250	0,04575mg/ml sol. pH 4,0

Solução PHE Final			
Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
Penicilamina	Sigma	P-5125	2,5ml
Hipotaurina	Sigma	H-1384	2,5ml
Epinefrina	Sigma	E-4250	2ml
Solução salina 0,9%			4ml

Seção 1.07 Meio de lavagem FIV (FIV-HEPES)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
TCM-199 com HEPES	Gibco	12380-028	10ml
BSA – V	Sigma	A-9647	0,003% (m/v)
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina 50 μ g/ml	Sigma	G-1264	50 μ g/ml

Filtrar em 0,22 μ m

Seção 1.08 Meio FIV

Reagentes	Fabricante	Catálogo	10ml
TALP STOCK	-	-	10ml
BSA – Livre de Ácidos Graxos	Sigma	A-7511	0,006% (m/v)
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	20µl
Gentamicina 50µg/ml	Sigma	G-1264	50µl

Filtrar em 0,22 µm

Seção 1.09 Meio FIV gota (FIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	4ml
Meio FIV	-	-	3,640ml
Heparina 140 usp/mg	Sigma	H-9399	40µl
PHE	-	-	160µl

Filtrar em 0,22 µm

Seção 1.10 Meio CIV - KSOM para uso

Reagentes	Fabricante	Catálogo	6ml
KSOM	Millipore	020-P	6 ml
BSA – FAF	Sigma	A-7511	0,018g
Gentamicina 10mg/ml	Sigma	G-1264	1,5µl
Aminoácido essencial	Sigma	M-5550	120µl
Aminoácido não essencial	Sigma	M-7145	60µl

Filtrar em 0,22µm; Validade: 1 semana

SOLUÇÕES DE TRATAMENTOS

Seção 1.11 Solução Menadiona

Reagentes	Fabricante	Catálogo
Etanol Absoluto	Merk	020-P
Menadiona	Sigma	M-5625

Preparo de Solução Mãe de Menadiona (200mM)	
Reagentes	Quantidade
Etanol Absoluto	1ml
Menadiona	0,0034g

Solução Uso Menadiona (500µM)	
Reagentes	Quantidade
Solução Mãe	2,5µL
Etanol Absoluto	997,5 µL

Dose de 5µM de menadiona para indução:

- Adicionar 3µL da Solução Uso Menadiona em 300 µL de KSOM (30-45 embriões);
- Incubar por 24 horas em atmosfera controlada (5% O₂, 5%CO₂, 90% N₂).

Seção 1.12 Solução de Melatonina

Solução Mãe Melatonina			
Reagentes	Fabricante	Catálogo	10 ⁵ ng/ml
Melatonina	Sigma	M-5250	0,001g
DMSO	Sigma		1ml
PBS	-		9ml

Solução Diluente			
Reagentes	Fabricante	Catálogo	10ml
DMSO	Sigma		1ml
PBS	-	-	9ml

-Para o grupo 0 ng/ml: adicionar 1µL da Solução diluente em gota de 50 µL de KSOM; adicionar 6µL da Solução diluente em poço de 300µL de KSOM.

Solução Uso – Grupo 25 ng/ml	
Reagentes	2ml
Solução Mãe	25µL
Solução Diluente	1,975 ml

- Para uso: adicionar 1µL em gota de 50 µL de KSOM; adicionar 6µL em poço de 300µL de KSOM.

Solução Uso – Grupo 50ng/ml	
Reagentes	2ml
Solução Mãe	50µL
Solução Diluente	1,950 ml

- Para uso: adicionar 1µL em gota de 50 µL de KSOM; adicionar 6µL em poço de 300µL de KSOM.

Solução Uso – Grupo 100ng/ml	
Reagentes	2ml
Solução Mãe	100µL
Solução Diluente	1,900ml

- Para uso: adicionar 1µL em gota de 50 µL de KSOM; adicionar 6µL em poço de 300µL de KSOM.

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PROBES FLUORESCENTES PARA EMBRIÃO

Seção 2.01 Preparar Reagentes (kit Image-iT® Live Red Caspase-3 e -7 Detection)

Produtos	Fabricante	Catálogo
CellROX® Green Reagent, for oxidative stress	Molecular Probes	C10444
Image-iT® Live Red Caspase-3 e -7 Detection	Molecular Probes	I35102
Prolong Gold® Antifade Reagent	Molecular Probes	P-36930

1X Wash Buffer

- Aquecer (temperatura ambiente) o 10X Apoptosis wash buffer;
- Diluir 1:10 com H₂O Mili-Q.

150X FLICA stock solution

- Adicionar 50µL de DMSO no reagente FLICA liofilizado;
- Misturar bem até dissolver tudo;
- Fazer Aliquotas de 1.6µL e guardar em -20°C protegido da luz (Aliquotas podem ser descongeladas até 2X).

Solução 30X FLICA (Solução Uso Caspase)

- Acrescentar 6,4 µL de PBS (pH7.4) na alíquota 150X FLICA (1.6 µL);
- Validade de 1 dia.

Seção 2.02 Preparar CellROX®Green (CRG) para uso

Em alíquota de CRG de 1 µL adicionar 15,6 µL de KSOM aquecido (38,5°C).

Seção 2.03 Protocolo de Associação de sondas CRG, Live Red Caspase e DAPI

- Retirar embriões da gota de cultivo e transferir para gota de 30 µL de KSOM, sob óleo mineral;
- Adicionar 1 µL da Solução Uso Caspase;
- Incubar a 38,5°C 5%CO₂ em ar, por 30 minutos;
- Remover da incubação, adicionar 1 µL de CRG para uso e retornar a incubação;
- Incubar a 38,5°C 5%CO₂ em ar, por 30 minutos;
- Retirar da incubação, lavar 3x em gota de 100 µL de 1XWash Buffer;
- Transferir embriões para gota de 50 µL formaldeído 3,7% gelado (5°C);
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
- Lavar 3X em gotas de 100 µL de PBS;
- Preparar lâmina com gota de 12 µL de Prolong Gold® Antifade Reagent;
- Transferir 1-3 embriões por lâmina;
- Vedar lâmina com esmalte;
- Armazenar lâmina protegida da luz até leitura;
- Ler em microscopia de epifluorescência em aumento de 20X.

APÊNDICE C - ANÁLISE DE CORRELAÇÕES NA INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PIV.

Gráfico 10 – Gráficos de dispersão entre as variáveis dependentes taxa de blastocisto (TXBL) e análise, *status* oxidativo (SO) e número total de blastômeros (nBLAST) – São Paulo – 2014

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)

Tabela 2 – Valores de p e Rho das correlações da PIV de embriões bovinos induzidos ao estresse oxidativo – São Paulo - 2014

	TxTOTAL	Mnblast	MpixelCR
TxTOTAL	1	0.53002 0.0162	-0.53762 0.0145
Mnblast		1	-0.57455 0.0081
MpixelCR			1

Legenda: **Prob** > |r| under H0: **Rho**=0. Correlação entre taxa de blastocisto (TxTOTAL), média de número de blastômeros totais (Mnblast) e *status* oxidativo avaliado por média de pixel da avaliação por CellRox Green (MpixelCR)

Fonte: (ASSIS, P.M., 2014)