

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**LUCIANA TAKADA**

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A MATURAÇÃO  
DOS OVÓCITOS EM SISTEMA TRADICIONAL DE  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Pirassununga 2008**

**LUCIANA TAKADA**

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A MATURAÇÃO  
DOS OVÓCITOS EM SISTEMA TRADICIONAL DE  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Lia de Alencar Coelho

**Pirassununga 2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

T136e	<p>Takada, Luciana</p> <p>Efeito da melatonina sobre a maturação dos ovócitos em sistema tradicional de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos / Luciana Takada - Pirassununga, 2008.</p> <p>85 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.</p> <p>Departamento de Zootecnia.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Lia de Alencar Coelho.</p> <p>Unitermos: 1. Apoptose 2. Bovino, embrião 3. Maturação In vitro 4. Melatonina I. Título.</p>
-------	---

## **DEDICATÓRIA**

**A Deus que está sempre presente em minha vida.**

**Aos meus queridos pais ODETE E YOSHINORI, e aos meus irmãos CLAUDIA  
HAMILTON e RICARDO, que me apoiaram e motivaram em todos os  
momentos da minha vida, sempre com muito amor e carinho.**

**Ao meu cunhado Emerson e as minhas cunhadas Flavia e Mariane pela  
amizade, apoio e agradável convívio durante todos estes anos.**

**Amo Vocês!!!**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lia de Alencar Coelho pela orientação, paciência, amizade e dedicação que teve neste trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zoccal Mingoti da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) da UNESP, toda minha admiração, respeito e gratidão pelo seu empenho na execução deste trabalho e por ceder seu laboratório para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alicio Martins Junior da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) da UNESP pela colaboração e participação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Titular Ciro de Moraes Barros do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da UNESP pela inestimável colaboração na realização das ultra-sonografias.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Lima Verde e ao Dr. Paulo Roberto Adona da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP pelo auxílio na elaboração do projeto e pela doação dos materiais utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP pela realização das análise estatísticas

À Dr<sup>a</sup> Leticia Barreto que gentilmente me ensinou a técnica do cometa.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Nogueira Mendes e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Regina Peiró da Faculdade de Medicina Veterinária FMVA-UNESP Araçatuba, pelo incentivo, amizade e oportunidades oferecidas.

À Maria Conceição Roldão e a Estagiária Layla da Seção de Pós-Graduação da FZEA pela paciência e dedicação aos pós-graduandos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação da FZEA e em especial ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leme pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos colegas de pós-graduação e principalmente à Marcia Izumi Sakamoto, e a Dani e Bia, de Araçatuba, pela agradável convivência.

A todas as pessoas que, de qualquer maneira, colaboraram para a realização do presente estudo.

**Muito Obrigado!!!**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Resumo

Abstracts

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	20
2.1 Objetivo Geral .....	20
2.2 Objetivo específico .....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
3.1. Oogênese e Foliculogênese .....	22
3.2. Maturação Ovocitária .....	26
3.3. Maturação Nuclear .....	27
3.4. Maturação Citoplasmática .....	28
3.5. Melatonina .....	30
3.6. Melatonina e Reprodução .....	31
3.7. Apoptose e Morte celular .....	32
4. MATERIAL E METODOS .....	36
4.1. Local do Experimento .....	36
4.2. Colheita de ovários .....	36
4.3. Obtenção e Seleção dos Complexos <i>Cumulus</i> -Ovócitos (COCs) Imaturos .....	36
4.4. Condições de cultivo para maturação <i>in vitro</i> .....	37
4.5. Fertilização <i>in vitro</i> e Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV) para desenvolvimento embrionário .....	38
4.6. Estádios da meiose .....	39
4.7. Organização dos microtúbulos .....	39
4.8. Distribuição dos grânulos corticais .....	40
4.9. Avaliação da fragmentação do DNA das células do <i>cumulus oophorus</i> e de embriões pela técnica do COMETA .....	40
4.10 Delineamento experimental .....	42

4.11. Análises Estatísticas .....	42
5. RESULTADOS .....	44
5.1. Experimento 1: Efeito da melatonina sobre o estágio da meiose, organização dos microtúbulos e distribuição dos grânulos corticais.....	44
5.2. Experimento 2: Efeito da melatonina sobre a fragmentação do DNA das células do <i>cumulus oophorus</i> pela técnica do COMETA.....	48
5.3. Experimento 3: Efeito da melatonina sobre a fragmentação do DNA dos embriões pela técnica do COMETA .....	49
5.4. Experimento 4: Efeito da melatonina na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	51
6. DISCUSSÃO .....	54
7. CONCLUSÃO.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
Anexos .....	84



## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação da integridade de DNA total (Modificado de Visvardis et al., 1997). Grau 1: célula onde ocorreu pouca quebra de DNA (0) ou apenas difusão do DNA no gel (1); grau 2: pequena quebra e pouca migração de DNA (2); grau 3: quebra e migração parcial de DNA (3) e grau 4: quebra e migração de DNA acentuada (4). .....41
- Figura 2 - Representação dos estádios da meiose: (a) Vesícula Germinativa; (b) Metáfase I; (c) Anáfase I; (d) Telófase I; (e) Metáfase II.....44
- Figura 3 - Ovócitos maturados *in vitro*, marcação para microtúbulos: (a) Ovócitos em estágio de metáfase II (MII) com marcação para microtúbulos; (b) Ovócitos em estágio de MII sem marcação para microtúbulos.....45
- Figura 4 - Distribuição dos grânulos corticais em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. (a) Distribuição periférica dos grânulos corticais em ovócito em estágio de MII (b) distribuição geral dos *clusters* de grânulos corticais em ovócito em estágio VG.47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estádios da meiose (média $\pm$ erro padrão) em ovócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> com ou sem melatonina no meio de cultivo.....	46
Tabela 2 - Distribuição (média $\pm$ erro padrão) dos grânulos corticais em submetidos à maturação <i>in vitro</i> com ou sem melatonina no meio de cultivo.....	48
Tabela 3 - Percentual (média $\pm$ erro padrão) de fragmentação do DNA total das células do <i>cumulus</i> (CC) após a maturação <i>in vitro</i> de complexos <i>cumulus</i> -ovócitos com ou sem melatonina no meio de cultivo.....	50
Tabela 4 - Percentual (média $\pm$ erro padrão) de fragmentação do DNA total dos blastocistos produzidos <i>in vitro</i> a partir ovócitos submetidos à maturação com ou sem melatonina no meio de cultivo.....	51
Tabela 5 - Desenvolvimento embrionário (média $\pm$ erro padrão) no dia 7 de cultivo a partir de ovócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> com ou sem melatonina no meio de cultivo.....	52

## RESUMO

TAKADA, L. **Efeito da melatonina sobre a maturação dos ovócitos em sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos.** 85 f. 2008 Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2008.

Este trabalho teve objetivou-se avaliar o efeito da melatonina adicionada ao meio de maturação (meio B199) sobre a maturação nuclear, a distribuição dos grânulos corticais e dos microtúbulos, a produção *in vitro* de embriões e sobre a apoptose das células do *cumulus* (CC) e dos embriões. Os complexos *cumulus*-ovócitos (COCs), aspirados de folículos ovarianos obtidos de ovários de vacas oriundas de abatedouros, foram cultivados por 24 h, conforme os tratamentos: 1) Grupo Controle: meio B199 acrescidos de 0,5 µg/mL de FSH e 5,0 µg/mL de LH; 2) Grupo MEL: meio B199 com 1 µg/mL de melatonina; 3) Grupo MEL/FSH/LH: meio B199 com 1 µg/mL de melatonina e 0,5 µg/mL de FSH e 5,0 µg/mL de LH. Após a maturação *in vitro* (MIV), os COCs de todos os grupos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) e desenvolvimento embrionário *in vitro*. A condição de cultivo em todas as etapas foi microgotas, sob óleo de silicone, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,5°C. Foram avaliadas as taxas de clivagem e de embriões produzidos no dia 7 (D-7) pós-inseminação *in vitro*. Após a MIV, os ovócitos de todos os grupos também foram corados com Hoechst 33342, com anticorpo monoclonal anti-tubulina conjugada com FITC ou cultivados com aglutinina *Lens Culinaris* conjugada a FITC para avaliação da taxa de maturação nuclear (progressão da meiose), distribuição dos microtúbulos e dos grânulos corticais, respectivamente. Para avaliação do grau de apoptose das CC e dos embriões, utilizou-se a técnica do cometa. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre o grupo controle e os tratados com melatonina (MEL e MEL/FSH/LH) na taxa de ovócitos em metáfase II (66,18±4,04; 66,46±4,04 e 59,61±4,04), no percentual de blastocistos com baixo grau de apoptose (31,46±6,01; 38,36±6,01 e 32,92±6,01), na taxa de clivagem (85,70±2,47; 88,52±2,47 e 85,65±2,47) e nem na taxa de embriões no D-7 (54,47±3,67; 60,01±3,67 e 58,40±3,67). A distribuição dos microtúbulos e dos grânulos corticais também não foi alterada pelos grupos tratados com melatonina. O percentual de CC

que não apresentaram dano no DNA no grupo MEL ( $37,64 \pm 2,41$ ) foi superior ( $P < 0,01$ ) ao grupo MEL/FSH/LH ( $28,08 \pm 2,41$ ) e ao grupo controle ( $17,83 \pm 2,41$ ). Os resultados sugerem que a adição de melatonina durante o cultivo *in vitro* para maturação de ovócitos bovinos protegeu as CCs de danos no DNA promovendo a diminuição da incidência de apoptose e foi capaz de suportar o desenvolvimento embrionário produzindo taxas de embriões no D-7 similares as obtidas no sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões.

Palavras chave: apoptose, bovino, células do *cumulus*, maturação *in vitro*, melatonina.

## ABSTRACT

TAKADA, L. **Effect of melatonin on oocyte maturation in traditional system of bovine embryo in vitro production.** 85 f. 2008. Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2008.

The aim of this study was to examine the effect of addition of melatonin in maturation medium (B199) on the nuclear maturation, the cortical granules and microtubules distribution, the in vitro production of embryos and the DNA damage (apoptosis) of cumulus cells and embryos. The bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) aspirated from follicles from abattoir ovaries were cultured for 24 h according to treatments: 1) Control group: B199 medium with 0.5 µg/ml FSH and 5.0 µg/ml LH; 2) MEL group: B199 medium with 1 µg/ml melatonin; 3) MEL/FSH/LH group: B199 medium with 1 µg/ml melatonin, 0.5 µg/ml FSH and 5.0 µg/ml LH. After in vitro maturation (IVM) the COCs of all groups were submitted to in vitro fertilization and in vitro embryo development. All cultures were in droplets under oil, at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The cleavage rate and the percentage of embryos produced on Day 7 (D-7) after in vitro insemination were evaluated. After IVM, the oocytes of all groups were stained with Hoechst 33342, or stained with FITC-conjugated anti-α-tubulin antibody or cultured with FITC-conjugated Lens Culinaris agglutinin to evaluate the nuclear maturation rate, microtubules and cortical granules distribution, respectively. The incidence of apoptosis of the CC and embryos was also measured by Comet assay. There was no difference ( $P > 0.05$ ) among groups on metaphase II oocyte rates (Control = 68.18±4.04; MEL = 66.46±4.04; MEL/FSH/LH = 59.61±4.04), on the percentage of blastocysts with low incidence of apoptosis (Control = 31,46±6,01; MEL = 38,36±6,01; MEL/FSH/LH = 2,92±6,01), on cleavage rate (Control = 85.70±2.47; MEL = 88.52±2.47; MEL/FSH/LH = 85.65±2.47) and on D-7 embryo rate (Control = 54.47± 3.67; MEL = 60.01±3.67; MEL/FSH/LH = 58.40±3.67). The distribution of microtubules and cortical granules was not affected by the groups treated with melatonin. The percentage of cumulus cells with no DNA damage in MEL group (37.64±2.41) was significantly superior to MEL/FSH/LH (28.08±2.41) and control groups (17.83±2.41). The results suggest that the addition of melatonin to the IVM medium protected the cumulus cells from DNA damage by

diminishing the incidence of apoptosis and also supported the embryo development by producing D-7 embryo rates similar to those obtained in traditional system of bovine embryo in vitro production.

Key words: apoptosis, bovine, cumulus cells, in vitro maturation, melatonin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
COCs	Complexo <i>cumulus oophorus</i>
GVBD	Quebra da Vesícula Germinativa
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
ICSI	Injeção intracitoplasmática do espermatozóide
LH	Hormônio luteinizante
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
VG	Vesícula germinativa
DNA	Ácido desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico mensageiro
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
GC	Grânulos corticais
μg	Micrograma
μM	microMol
MEL	Melatonina
AMP <sub>c</sub>	Monofosfato de adenosina cíclica
°C	Graus Celsius

SFB	Soro fetal bovino
BSA	Albumina sérica bovina
SOF	Fluido de oviduto sintético
TALP	meio tyrode's com albumina, lactato e piruvato
TCM 199	Meio de cultura de tecidos
PVA	Álcool polivinílico
D	Dia
nM	Nano Mol
g	Intensidade de centrifugação em gravidade
mM	miliMOL
UI	Unidades Internacionais
mm	Milímetro
mL	Mililitro
n°	Número
M	Molar
MAT	Metáfase I, Anáfase I e Telófase I



## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões é uma técnica em que os ovócitos imaturos recuperados de folículos ovarianos são submetidos a determinadas condições de cultura *in vitro* para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-implantação. Essa técnica, além de ser utilizada com propósitos científicos, tem a finalidade de produzir indivíduo com elevado mérito genético, sendo uma fonte alternativa de embriões em programas de transferência de embriões na espécie bovina (HASLER, 1996).

A tecnologia que envolve a produção *in vitro* de embriões tem tido um enorme avanço durante as últimas décadas desde o primeiro bezerro nascido a partir da técnica (BRACKETT; BOUSQUET; BOICE, 1982). Muitas pesquisas têm sido conduzidas para melhorar a PIV de embriões e a transferência do blastocisto bovino, entretanto o desenvolvimento de ovócitos até estágio de blastocisto tem permanecido entre 10-30% (DOMINKO; FIRST, 1997; RIZOS et al., 2002). Por outro lado, a proporção de ovócitos bovinos maturados *in vivo* que atingem o estágio de blastocisto depois da fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* tem variado de 50 a 80% (BLONDIN et al., 2002; RIZOS et al., 2002).

Geralmente, quando os complexos *cumulus*-ovócito são aspirados de folículos antrais de 2 a 8 mm de ovários bovinos adquiridos de abatedouro para procedimentos em fertilização *in vitro*, estes ovócitos podem não ter sido expostos aos hormônios de crescimento durante tempo suficiente para ter um acúmulo de mRNAs materno para seu desenvolvimento normal, já que *in vivo* os folículos demoram alguns dias para chegar ao tamanho denominado como pré-ovulatório, (RIZOS et al., 2002). As condições de maturação (ovócitos maturados *in vivo* ou *in vitro*) têm uma influência significativa nos números de embriões que se desenvolvem até a fase de blastocisto e um dos fatores que pode estar contribuindo para os variados resultados seriam as condições de cultivo para maturação dos ovócitos e desenvolvimento embrionário, alterações dos componentes adicionados aos meios utilizados têm sido apontados para melhorias nos índices de produção *in vitro* (THOMPSON et al., 1992a; 1992b).

A melatonina está presente no fluido folicular pré-ovulatório em humanos em concentrações três vezes mais elevadas do que no soro periférico (BRZEZINSKI et al., 1987; YIE; NILES; YOUNGLAI, 1995). Assim, a melatonina no fluido folicular pode desempenhar um papel fisiológico importante na maturação do ovócito, na

fertilização e no do desenvolvimento embrionário, entretanto existem controvérsias sobre esse papel provocando variadas respostas que podem representar diferenças nas dosagens de melatonina ou diferenças entre espécies.

A adição de melatonina no meio de cultivo para maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-ovócitos de camundongos aumentou a taxa de maturação nuclear (quebra da vesícula germinativa e extrusão do primeiro corpúsculo polar) do ovócito e diminuiu a apoptose das células do *cumulus* (NA et al., 2005). Em peixes, a adição de melatonina ao meio de cultivo não foi capaz de melhorar a taxa de quebra da vesícula germinativa, mas quando adicionada quatro horas antes do hormônio indutor da maturação (MIH), a melatonina acelerou a taxa de quebra da vesícula germinativa através da formação de um complexo de duas proteínas ligadas à ativação do fator promotor da maturação (CHATTORAJ et al., 2005).

Um estudo *in vitro* realizado com ovinos demonstrou que a adição de melatonina no meio de cultura para desenvolvimento embrionário aumentou a percentagem de blastocistos e reduziu a de embriões degenerados, embora a melatonina não tenha alterado a progressão do estágio de desenvolvimento embrionário de mórula para blastocisto (ABECIA; FORCADA; ZUNIGA, 2002). A melatonina teve efeito positivo sobre o desenvolvimento embrionário após a fertilização *in vitro* em ratos e camundongos (FERNANDEZ et al., 1995; ISHIZUKA et al., 2000). Takasaki et al. (2003) demonstraram que a melatonina pode melhorar a qualidade dos ovócitos em mulheres cuja gestação tem falhado quando do tratamento de injeção intracitoplasmática do espermatozóide. Ao contrário, a melatonina não influenciou a qualidade do ovócito em gatos (GRAHAM et al., 2004) e nem melhorou a capacidade de maturação ovocitária traduzida pelo percentual de ovócitos que completaram a maturação nuclear em camundongos após o cultivo celular (ADRIAENS et al., 2006).

Adicionalmente, a melatonina tem sido pesquisada principalmente devido aos seus efeitos no trato reprodutivo, sobretudo nas espécies de reprodução sazonal e em humanos. Entretanto, pouco se sabe sobre seus efeitos, quando adicionada em meios de cultivo para maturação *in vitro*, principalmente em ovócitos bovinos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

A presente pesquisa teve o objetivo de estudar os efeitos da adição de melatonina no meio de maturação *in vitro* dos ovócitos de bovinos em sistemas de produção *in vitro* de embriões sobre vários aspectos morfológicos da maturação ovocitária e dos embriões produzidos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da adição de melatonina no meio de cultivo para maturação *in vitro* dos ovócitos sobre a maturação nuclear (estádio da meiose) e distribuição dos microtúbulos e grânulos corticais.
- Avaliar o efeito da melatonina sobre a viabilidade (avaliação da apoptose) das células do *cumulus oophorus* e dos embriões produzidos *in vitro*.
- Avaliar o efeito da adição de melatonina no meio de cultivo para maturação *in vitro* dos ovócitos sobre a produção *in vitro* dos embriões.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Oogênese e Foliculogênese

O processo de desenvolvimento dos ovócitos denominado de ovogênese tem início durante a vida fetal. As células germinativas primordiais se originam do endoderma do saco vitelino primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de ovogônias e começam a multiplicar-se pelas divisões mitóticas (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997).

Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais dentro do ovário se multiplicam ativamente e diferenciam-se em ovogônias. As ovogônias sofrerão sucessivas mitoses e posteriormente entrarão na primeira divisão meiótica (estádio de prófase I) e passarão a ser denominadas de oócito ou ovócito. O núcleo ovocitário que se encontra na fase de meiose I passará sucessivamente, por quase todos os estádios pertencentes à prófase I (leptógeno, zigógeno, paquíteno e diplóteno). Porém, o processo meiótico é interrompido (primeiro bloqueio da meiose) no estágio de diplóteno, também denominado de estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa. O núcleo do ovócito permanecerá neste estágio até que o animal atinja a puberdade. Quando o animal atinge a puberdade, devido à ocorrência de liberação pré-ovulatória de LH, algumas horas antes da ovulação, a meiose é retomada e o núcleo ovocitário entra em diacinese. Nesse momento se inicia o processo de rompimento da vesícula germinativa que é seguida das fases de metáfase I, anáfase I, telófase I, quando então ocorrerá a expulsão do primeiro corpúsculo polar, resultando na formação do ovócito secundário, assim denominado pelo fato de seu núcleo encontrar-se na segunda divisão meiótica. Essa se caracteriza por uma progressão até metáfase II, quando ocorre o segundo bloqueio da meiose. O ovócito retornará a meiose somente se for fecundado pelo espermatozóide (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002).

Em bovinos, o processo de divisão meiótica inicia aos 75-80 dias de gestação, mas o ciclo celular é bloqueado na fase de diplóteno da prófase I, também conhecida como estágio de vesícula germinativa (VG), até o início da puberdade

(PICTON, 2001). Um pouco antes da ovulação, sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH), os ovócitos retomam a meiose e o ciclo celular progride de prófase I para metáfase II (DECKEL; GAKLIANI; BEERS, 1988). Após a ovulação, ocorre um segundo bloqueio da divisão meiótica, o qual poderá ser retomado com a penetração espermática (SIRARD; COENEN; BILODEAU, 1992).

A foliculogênese é o processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são selecionados para ovulação (WEBB et al., 1999). Em vacas, o recrutamento folicular ocorre no início do desenvolvimento fetal e folículos antrais podem ser encontrados antes do nascimento. Células germinativas de bezerras apresentam uma reserva de cerca de 120.000 a 150.000 folículos primordiais ou primários, 200 a 500 folículos em crescimento e 20 a 50 folículos antrais (HYTELL et al., 1997). A maioria desses folículos durante o seu crescimento vai se degenerar no processo conhecido como atresia folicular, enquanto que uma minoria vai completar seu crescimento e ovular. As diversas etapas da foliculogênese podem ser divididas de acordo com as características fisiológicas de cada grupo de folículos.

Na espécie bovina, em torno dos 130 dias de gestação, uma camada de células somáticas planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do mesoderma, circundam o ovócito primário ou imaturo (núcleo em prófase I), formando o primeiro e mais primitivo dos estádios foliculares, que é denominado folículo primordial. Os folículos primordiais compõem o estoque de folículos formados durante a vida fetal e que vão se desenvolver durante a vida reprodutiva da fêmea. Esses folículos em estado de quiescência são caracterizados por um ovócito na prófase da primeira divisão meiótica, sem zona pelúcida, rodeado por algumas células da pré-granulosa e envolvidas pela membrana basal (VAN WEZEL; RODGERS, 1996). Os folículos nesse estágio não têm suprimento sanguíneo próprio e, dessa forma recebem nutrientes por difusão (HIRSCHFIELD, 1991). O mecanismo determinante da passagem do estágio de folículo primordial para o folículo primário, na qual as células da granulosa crescem e se multiplicam, não é totalmente conhecido, mas acredita-se que isso ocorra sem a participação de gonadotrofinas. (FORTUNE et al., 1994).

Na maioria das espécies, o crescimento folicular começa com a transformação morfológica dos folículos primordiais, no qual ovócitos circundados com uma camada de células da granulosa, pavimentosa evoluem para folículos primários, cujos ovócitos são circundados por uma camada de células da granulosa

de forma cubóide. Entretanto, nos bovinos essas mudanças morfológicas não podem ser usadas para definir a ativação dos folículos quiescentes em função dos folículos primordiais conterem algumas células da granulosa cubóides na sua estrutura celular (VAN WEZEL; RODGERS, 1996).

Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de multiplicar-se e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência. A proliferação celular é retomada somente quando o folículo primordial (quiescente) começa a crescer, meses após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991), passando sucessivamente pelos estádios de folículos primários e secundários (folículos pré-antrais) e terciários (antrais) até chegar ao estágio de folículo pré-ovulatório (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002).

Os folículos secundários são formados por proliferação das células da granulosa que se apresentam dispostas em duas ou mais camadas de células cubóides. O tamanho dos ovócitos aumenta e a zona pelúcida pode ser observada entre o ovócito e as camadas de células da granulosa. Em seguida, o estroma que circunda a membrana basal se desenvolve em uma camada de células conhecidas como células da teca. Com o crescimento folicular, uma cavidade repleta de líquido é formada dentro da camada de células da granulosa e a camada de células da teca tornam-se mais estratificada. Esses folículos são chamados de folículos terciários ou folículos antrais. Os folículos antrais irão crescer em tamanho e apenas um ou alguns deles, dependendo da espécie, chegarão a ovular (IRELAND, 1987).

No momento da ativação folicular, inicia-se, dentre outros eventos, a expressão gênica para síntese de proteínas para formação da zona pelúcida (RANKIN et al., 2000). As células da granulosa que envolve e circundam o ovócito dão origem ao *cumulus oophorus*. A camada de células que cobre diretamente o ovócito é chamada de *corona radiata*. Estas células estão conectadas com oolema por filamentos citoplasmáticos que penetram na zona pelúcida. Conseqüentemente, as células da granulosa podem contribuir significativamente na maturação do ovócito, embora este processo seja principalmente controlado pelo ovócito. O ovócito também coordena o desenvolvimento e a diferenciação das células da granulosa no complexo *cumulus*-ovócito através de uma regulação bidirecional que é necessária tanto para o desenvolvimento do folículo como para o do ovócito (EPPIG, 2001).

O ovócito circundado pelas células da granulosa desenvolve uma forte associação interdependente durante foliculogênese. Através das junções tipo *gap*, das células da granulosa provêm fatores de crescimento, nutrientes, e outros fatores ainda não identificados que influenciam no crescimento e na maturação do ovócito (FAGBOHUN; DOWNS, 1991). Em troca, o ovócito secreta fatores que regulam as funções da célula da granulosa, incluindo o crescimento folicular (DONG; SCHROEDER; EPPIG, 1996), proliferação (VANDERHYDEN; TELFER; EPPIG, 1992), esteroidogênese (VANDERHYTEN; TONARY, 1995) e a expansão das células do *cumulus* (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990).

Dentro do folículo, a regulação do desenvolvimento do ovócito e da função celular depende da comunicação mediante as junções tipo *gap*, comunicação parácrina e interações com elementos da matriz extracelular (ROBERTS; FRANKS; HARDY, 2002; SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003). As células do *cumulus* têm um importante papel na maturação do ovócito, sendo que delas provêm vários fatores conhecidos e desconhecidos que são essenciais para as maturações nuclear e citoplasmática e para o desenvolvimento após a fertilização (TANGHE et al., 2002; WARRIACH; CHOCHAN, 2004). Adicionalmente, as células do *cumulus* têm um importante papel na regulação e no progresso da meiose no ovócito (DOWNS, 2001). Durante o crescimento do ovócito o desenvolvimento de sua competência meiótica (antes de iniciar a retomada da meiose), as células do *cumulus* são responsáveis por manter o núcleo bloqueado no estágio de GV através da elevação intracelular dos níveis de AMPc no ovócito transferindo um sinal inibitório pela junção GAP (SHIMADA; TERADA, 2002; EPPIG et al., 2004). Por outro lado, também existem evidências que as células do *cumulus* secretam fatores que induzem a meiose (XIA et al., 2000).

### 3.2. Maturação Ovocitária

A maturação de ovócitos *in vitro* tem sido um eficiente método na produção de ovócitos maduros para utilização de técnicas de reprodução assistida como: fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozóide, e clonagem de mamíferos (CHILD et al., 2001).

A maturação ovocitária consiste em uma série de transformações que ocorrem no núcleo (maturação nuclear) e no citoplasma (maturação citoplasmática) do ovócito. A maturação nuclear refere-se ao reinício da meiose do estágio de vesícula germinativa até a metáfase II. A maturação citoplasmática são eventos da maturação (não está diretamente relacionada ao estágio da meiose), mas na preparação do ovócito para fertilização e desenvolvimento até a implantação (MOTLIK, 1989; COMBELLES, 2002).

Em condições *in vivo*, esse processo tem início logo após o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) (TSAFRIRI et al., 1976) e um período de 18 a 22 horas são necessários para que ocorra a maturação nuclear em bovinos, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II da segunda divisão meiótica (HYTEL et al., 1989; GARCIA et al., 2003). Em condições *in vitro*, o processo se inicia com a remoção do ovócito do interior do folículo ovariano, quando da aspiração folicular. Quando os complexos *cumulus-ovócitos* (COCs) são aspirados de folículos antrais maiores que 2 mm de diâmetro e cultivados *in vitro*, eles reassumem a meiose espontaneamente ou na presença de gonadotrofinas (MILOVANOV; SIRARD, 1994; FAIR et al., 1995).

As gonadotrofinas estão definitivamente envolvidas na maturação do ovócito. O FSH e LH quando administrados simultaneamente promovem a maturação fisiológica do ovócito *in vitro* e aumentam significativamente a taxa de desenvolvimento dos ovócitos até blastocisto (GULER et al., 2000).

Entretanto, sabe-se que ovócitos não são totalmente capazes de responder a condições *in vitro* para a maturação ovocitária, ficando claro que esse processo pode ocorrer *in vitro*, mas nem todos os ovócitos submetidos a essas condições são capazes de produzir embriões viáveis (LONERGAN et al., 1996).

A completa maturação do ovócito envolve não somente uma competência meiótica, mas também, a maturação citoplasmática (MOTLIK; FULKA, 1986). Tanto a maturação nuclear como a citoplasmática, precisam ocorrer para que o ovócito



adquirir competência para se desenvolver após a fertilização (RODRIGUEZ; FARIN et al., 2004).

### **3.3. Maturação Nuclear**

A diferenciação do ovócito imaturo em maturo refere-se à progressão de seu ciclo celular, que estava bloqueado na fase de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica (profase I), até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (metáfase II) (FULKA et al., 1998).

Esse processo, também conhecido como maturação nuclear, é caracterizado pelo rompimento da vesícula germinativa (membrana nuclear), condensação dos cromossomos e liberação do primeiro corpúsculo polar. Ocorre duplicação dos centríolos, e os cromossomos em pares diplóides, que se encontram livres no citoplasma, migram para a região equatorial (metáfase I - MI). Como resultado da primeira divisão meiótica, duas células filhas de tamanhos diferentes são formadas, sendo que uma delas contém a maior parte do citoplasma e constitui o ovócito propriamente dito, que além de cromossomos, possui uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. Nesse momento, o ovócito é considerado secundário, e os cromossomos se alinham no centro do fuso, caracterizando o estágio de metáfase II (MII) (SIRARD; COENEN; BILODEAU, 1992).

O tempo necessário para conclusão da primeira divisão meiótica *in vitro* de ovócitos bovinos varia de 18 a 24 horas e aproximadamente 95% dos ovócitos atingem a fase de metáfase II entre 22 e 24 horas de cultivo (SUSS; WÜTHRICH; STRANZINGER, 1988; HYTEL; GREVE; CALLESEN, 1989). O primeiro evento da maturação nuclear é o processo de rompimento da vesícula germinativa que ocorre entre sete e 12 horas após o início do cultivo *in vitro*. A fase de metáfase I ocorre entre 12 e 15 horas enquanto que as fases de anáfase I e telófase I ocorrem entre 15 e 18 horas e a metáfase II (MII), a partir de 18 horas (VIGNOLA; PRADO; VALENTE, 1994).

### 3.4. Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática pode ser classificada como um processo no qual o gameta feminino passa por modificações ultra-estruturais e biológicas que permitem sua fertilização e desenvolvimento embrionário. Durante esse processo, os ovócitos sofrem alterações bioquímicas e estruturais que incluem a redistribuição das organelas celulares tais como, grânulos corticais, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (DULCIBELLA et al., 1993).

Os eventos citoplasmáticos que acontecem durante o crescimento do ovócito e durante a maturação ovocitária são essenciais para a aquisição da competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Os ovócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não chegarão a se desenvolver após a fecundação (BEVERS et al., 1997). Há uma significativa mudança na síntese protéica, detectável após o pico de LH, que é observada simultaneamente com a reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação do ovócito (MOTLIK; KUBELKA, 1990).

No decorrer do remodelamento do citoplasma, a maioria das organelas migra para o centro da célula, entretanto os grânulos corticais, associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, permanecem próximos à periferia da célula. Há um aumento do número dos grânulos corticais após o pico de LH (HYTTEL et al., 1989).

Os grânulos corticais são organelas derivadas do complexo de Golgi do ovócito durante o início do crescimento folicular. A fertilização ativa a fusão dos grânulos corticais com a membrana plasmática levando à sua exocitose. Este evento, denominado de reação cortical, pode ser importante na prevenção da polispermia (SCHMEL; GULYAS; HEDRICK, 1983). Esta exocitose dos grânulos corticais, também chamada de reação cortical, é iniciada pela oscilação de cálcio durante a penetração do espermatozóide. A elevação da concentração do cálcio intracelular induz a fusão da membrana dos grânulos corticais com o ooplasma e o conteúdo dos grânulos corticais é liberado para o espaço perivitelíneo (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001).

Em vacas (SATHANANTHAN; TROUNSON, 1982) e em suínos (CRAN; CHENG, 1985), a alta incidência de ovócitos com polispermia tem sido associada a

uma distribuição anormal dos grânulos corticais e falhas da reação cortical causados pela penetração do espermatozóide.

Nas espécies domésticas, a migração dos grânulos corticais tem sido demonstrada como um importante critério de avaliação de maturação citoplasmática (CARNEIRO et al., 2002a). A distribuição dos grânulos corticais é espécie específica. Antes da maturação meiótica, os grânulos corticais não são encontrados no córtex de suínos e marsupiais, mas em humanos os grânulos corticais estão presentes no córtex durante a fase de vesícula germinativa e metáfase I (DULCIBELLA et al., 1996). No processo de maturação de camundongos e hamster os grânulos corticais dos ovócitos ocupam a área abaixo do oolema formando apenas uma camada, mas nas outras regiões o fuso fica destituído de grânulos corticais (DUCIBELLA et al., 1990). Em suínos (CRAN; CHANG, 1985) e vacas (KRUIP et al., 1983), os grânulos corticais estão distribuídos em uma camada abaixo do oolema, e não apresentam uma área livre de grânulos corticais (VELILLA, et al., 2004).

Os grânulos corticais são distribuídos por todo citoplasma e córtex do ovócito em vesícula germinativa. Durante a maturação, os grânulos corticais migram para periferia sendo localizados logo abaixo da membrana plasmática (VELILLA et al., 2004). Essa distribuição tem sido observada em suínos (CRAN; CHENG, 1985; WANG et al., 1997) e éguas (CARNEIRO, 2002b) em ovócitos em estágio de metáfase II (VELILLA et al., 2004).

Os microtúbulos são polímeros homólogos de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina com filamentos polares dinâmicos e intrínsecos. A transição do ciclo celular durante a maturação meiótica em ovócitos de mamíferos parece ser acompanhada por uma extensa reorganização da rede de microtúbulos (MESSINGER; ALBERTINI, 1991; VERLHAC et al., 1994). Na maturação meiótica os microtúbulos regulam tanto eventos nucleares como citoplasmáticos, tais como quebra da vesícula germinativa, condensação de cromossomos, extrusão do corpúsculo polar e formação de estruturas da metáfase (KIM et al., 2000).

A organização dos microtúbulos não ocorre no citoplasma de ovócitos no estágio de vesícula germinativa. Após a quebra da vesícula germinativa, pequenos ásteres de microtúbulos aparecem perto da cromatina condensada. Ásteres de microtúbulos alongados são observados em associação com cada partícula de cromatina durante os estádios de pró-metáfase. Na metáfase I os microtúbulos são observados ao redor do fuso. Durante a anáfase I e telófase I foram encontrados no

centro do corpúsculo polar e bem organizados no fuso. Nos ovócitos em metáfase II, os microtúbulos também são observados, em menor quantidade, no fuso meiótico do segundo corpúsculo polar (KIM et al., 2000).

### **3.5. Melatonina**

A melatonina, principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal, desempenha uma função importante e bem estabelecida no controle dos ritmos circadianos e na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais (ARENDRT, 1998). Normalmente, a produção máxima de melatonina ocorre durante o período escuro (escotoperíodo) do dia e a duração de sua secreção reflete a duração da noite. Portanto, mudanças circadianas das concentrações sanguíneas de melatonina em função do ciclo claro-escuro transmitem a informação fotoperiódica para organização dos ritmos circadianos e sazonais em mamíferos. Dessa forma, o ritmo circadiano endógeno da melatonina é gerado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e sincronizado pelo ciclo claro-escuro via o trato retino-hipotalâmico (ARENDRT, 1998).

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano o qual é levado dos reservatórios cerebrais e convertido em serotonina. A serotonina é acetilada a N-acetilserotonina, que por sua vez é O-metilada, resultando na melatonina. As enzimas responsáveis por estas duas reações são a arilaquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) e a indoxi hidroxí-indol-O-metiltransferase. A secreção da enzima NAT também é de natureza circadiana apresentando concentrações elevadas durante a fase escura do dia. O ritmo da segunda enzima é menos evidente, mas participa da regulação sazonal da produção de melatonina (RIBELAYGA et al., 2000).

Com características lipofílicas, a melatonina está presente no fluido cérebro-espinhal, saliva, líquido amniótico, plasma seminal e fluido folicular (REITER et al., 1991). Além da glândula pineal, o hormônio pode ser produzido por várias células do organismo, como, por exemplo, a retina, a glândula harderiana e as plaquetas (ARENDRT, 1995).

Tem sido atribuído a melatonina efeitos antioxidantes e radioprotetores (REITER et al., 2004). A melatonina e seus metabólitos neutralizam reações tóxicas, estimulam enzimas antioxidativas (NODA, MORI e LIBURTY, 1999) e também

podem ajudar a reconstruir algumas moléculas que tinham sido oxidadas (MAHAL; SHARMA; MUKHERJEE, 1999). A melatonina ainda possui um potente efeito anti-apoptótico em diferentes tipos de células (YU et al., 2000; YOO et al., 2002) e age particularmente na mitocôndria reduzindo o estresse oxidativo (JOU et al., 2004).

### **3.6. Melatonina e Reprodução**

Segundo Goldman (1992), alguns mamíferos exibem um modelo de reprodução sazonal cujo principal fator determinante é o ciclo anual do fotoperíodo. Dessa forma, a reprodução se concentra em uma determinada época do ano de modo que as condições ambientais sejam propícias à sobrevivência da espécie. De acordo com a duração da gestação, a atividade reprodutiva pode ocorrer durante a primavera e verão (hamster e eqüinos) ou durante o outono e inverno (caprinos e ovinos). Em ambos os casos, existem evidências de que a glândula pineal, mediante a secreção de melatonina, é responsável pela transmissão da informação da duração do dia ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

De modo geral, a melatonina exerce efeito inibitório no número de neurônios secretores de GnRH em animais que se reproduzem nas estações do ano com dias longos, como o hamster (BUCHANAN; YELLON, 1991), enquanto que nas espécies que se reproduzem nas estações de dias curtos, a melatonina exerce efeito estimulatório sobre a produção de GnRH, acionando o início da estação reprodutiva de espécies sazonais de dias curtos como os ovinos (MALPAUX et al., 1997). Em espécies não estacionais como ratos e humanos, a melatonina exerce uma ação antigonadotrófica (ARENDDT, 1995).

Alguns estudos, compilados por Sirotkin e Schaeffer (1997), têm sugerido uma regulação direta dos órgãos reprodutivos pela melatonina, principalmente por seu efeito na produção de esteróides pelo tecido ovariano. A melatonina exerce um efeito estimulatório sobre a produção de progesterona pelas células da granulosa em ratos (FISKE et al., 1984), humanos (WEBLEY; LUCK; HEARN, 1988) e camundongos (ADRIAENS et al., 2006).

Esses resultados sugerem que a ação da melatonina na esteroidogênese gonadal provavelmente ocorra dentro do próprio de ovário, suposição fortalecida pela presença de sítios de ligação da melatonina em frações de membranas das células da granulosa de humanos (YIE et al., 1995) e expressão dos receptores de

membrana para melatonina nas células da granulosa e luteais de humanos (WOO et al., 2001).

Para examinar o efeito da melatonina na fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*, Ishizuka et al. (2000) cultivaram embriões de camundongo, após a fertilização *in vitro* (FIV), em meio fisiológico com e sem melatonina. A adição de melatonina no meio de cultivo para desenvolvimento embrionário aumentou significativamente a taxa de fertilização quando as concentrações de melatonina variaram entre  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$ M. Além disso, foi observado um significativo aumento na taxa de produção de embriões nos estádios de quatro células, oito células e de blastocistos quando as concentrações de melatonina variaram entre  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$ M de melatonina. Estes resultados sugerem que a melatonina exerça um papel importante na produção *in vitro* de embriões (PIV), provavelmente desde a maturação ovocitária até o início do desenvolvimento embrionário.

Outro estudo utilizando melatonina na produção *in vitro* de embriões de suínos foi realizado por Rodriguez-Osório, Kim e Wang, (2007) em que o meio de cultivo para desenvolvimento embrionário foi suplementado com concentrações de melatonina que variaram de  $10^{-3}$  a  $10^{-13}$ M. Nesse estudo, observou-se que a concentração de  $10^{-9}$ M de melatonina tem efeito positivo nas taxas de clivagem e no número total de células dos blastocistos.

### 3.7. Apoptose ou Morte Celular

Alguns anos atrás a morte celular fisiológica foi descrita através de avaliações morfológicas como a destruição de um tecido (MAJNO; JORIS, 1995). A morte celular programada ou apoptose envolve mudanças morfológicas que inclui perda de volume celular acompanhada por picnose nuclear, resultado da condensação da cromatina em regiões adjacentes à membrana nuclear. Muitas organelas citoplasmáticas permanecem intactas até o estágio final da morte celular, que geralmente é marcada pela formação e liberação de vesículas da membrana plasmática (corpos apoptóticos) que contêm restos de componentes celulares da célula que são englobados por fagócitos e/ou células adjacentes (TILLY, 1996).

O desenvolvimento do folículo e do seu complexo *cumulus*-ovócito (COC) é influenciado por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). Durante o crescimento folicular e a maturação ovocitária, o controle do início e da duração da

apoptose é regulada rigorosamente. O grau de apoptose pode alterar a conectividade da massa de células do *cumulus* e entre as células do *cumulus* e o ovócito, causando deficiências na qualidade do ovócito. Na realidade, o grau de apoptose foi relacionado com a competência e o desenvolvimento do ovócito bovino (IKEDA; IMAI; YAMADA, 2003).

Durante a foliculogênese, a apoptose tem um papel importante. Ela ocorre tanto no ovócito como nas células da teca e do *cumulus*. A apoptose das células do *cumulus* está associada com a atresia folicular sendo a taxa de apoptose dessas células um indicador da qualidade do ovócito. Como as células do *cumulus* têm um papel importante nas mudanças no núcleo e no citoplasma que ocorrem no ovócito durante a maturação *in vitro* (MIV) (TANGHE et al., 2003), a apoptose dessas células afeta a maturação do ovócito, diminuindo a sua capacidade de desenvolvimento (HOST et al., 2000). A baixa taxa de apoptose nas células do *cumulus* também está relacionada com uma alta qualidade do embrião (ALISCH et al., 2003).

Em geral, ovócitos humanos circundados por uma camada de células do *cumulus* com baixo grau de apoptose ou sem a presença de apoptose, têm uma melhor capacidade de se desenvolver até embriões, de boa qualidade, depois da fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) do que ovócitos cercados por células do *cumulus* que apresentem algum grau significativo de apoptose (LEE et al., 2000).

Em bovino, a apoptose espontânea do complexo *cumulus*-ovócito (COCs) pode ocorrer durante a MIV (IKEDA; IMAI; YAMADA, 2003), mas não é possível afirmar categoricamente o quanto esse evento pode afetar a capacidade de desenvolvimento do ovócito maturado. O FSH induz a expansão das células do *cumulus* quando acrescentado ao meio de cultivo para maturação do COCs bovino aumentando o potencial de desenvolvimento dos ovócitos em termos de resultado da FIV (VAN TOL et al., 1996; IZADYAR; ZEINSTRA; BEVERS, 1998). A presença de FSH previne a apoptose das células da granulosa de ovócitos bovinos *in vitro* (YANG et al., 2000), mas se este efeito protetor também acontece nas células do *cumulus* não é conhecido.

Processos que afetam o ovócito durante a MIV, fertilização, e taxa de clivagem, induzem a anormalidades no desenvolvimento do embrião como a fragmentação de DNA que pode não ser aparente na formação dos blastocistos (WATSON et al., 2000). Em camundongos, as gonadotrofinas diminuíram a

apoptose nas células da granulosa tendo um importante papel na manutenção do ovócito durante a foliculogênese ovariana (MATSUMOTO et al., 1999). Outro estudo realizado com camundongos avaliou o efeito da melatonina sobre a maturação ovocitária, apoptose das células do *cumulus*, e a expressão do RNAm das células do *cumulus in vitro* (NA et al., 2005). Os autores observaram uma melhora da maturação nuclear quando 1,0  $\mu$ M de melatonina foi adicionado ao meio de maturação e nas células do *cumulus* houve uma diminuição da apoptose e um aumento na expressão de RNAm do receptor de melatonina.

Normalmente em mórulas e blastocistos humanos em desenvolvimento, algumas células sofrem morte celular programada espontaneamente, ou seja, a apoptose esta envolvida na eliminação das células anormais (HARDY, 1999). Durante o cultivo embrionário *in vitro*, a apoptose é causada provavelmente pelas condições desfavoráveis e pode ser um grande indicador da qualidade do embrião (BYRNE, 1999). A apoptose é observada em embriões bovinos depois da fase de oito células (BYRNE, 1999), quando o genoma embrionário bovino é ativado (FREI; SCHULTZ; CHURCH, 1989). A maioria dos núcleos apoptóticos dos blastocistos bovinos são encontrados na massa celular interna (BYRNE, 1999), enquanto que em humanos, as células apoptóticas foram observadas distribuídas por todo embrião (HARDY, 1999).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Grandes Animais e no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Reprodução, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) da UNESP, Campus de Araçatuba-SP, durante o período de janeiro a julho de 2007.

### 4.2. Colheita dos ovários e Complexos *Cumulus*-Ovócitos (COCs)

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas no frigorífico Fricouro de Birigui-SP. Os ovários foram transportados em garrafa térmica com solução salina em temperatura aproximada de 35°C. O tempo de transporte do frigorífico ao laboratório variou entre 30 a 60 minutos.

### 4.3. Obtenção e Seleção dos COCs

No laboratório, após várias lavagens com solução salina a 35°C, os ovários foram acondicionados em um béquer estéril de 400 mL, contendo solução salina 35°C. Para a aspiração dos ovócitos imaturos de folículos ovarianos com 2 a 6 mm de diâmetro, utilizou-se uma agulha de calibre 40x12 acoplada a uma seringa de 20 mL. O líquido folicular aspirado foi colocado em um tubo cônico graduado de 50 mL e armazenado em banho-maria a 35°C por 15 minutos, para sedimentação.

Para procura e seleção dos COCs, o sobrenadante foi retirado e o sedimento juntamente com um pouco de fluido folicular foi colocado dentro de uma placa de *petri* contendo meio de lavagem. O meio de lavagem foi constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio, 250 mg/mL de sulfato de amicacina (meio H-199).

Em uma capela de fluxo laminar e sob estereoscópio (aumento de 10 a 60X), os COCs foram selecionados morfológicamente e submetidos a sucessivas lavagens em meio H-199, sendo a última lavagem realizada com meio de maturação (B-199). Somente COCs com *cumulus* compacto e citoplasma de coloração marrom e

homogênea foram selecionados. Sendo descartados os ovócitos atrésicos, com *cumulus* expandido ou desnudo. Os ovócitos cobertos com pelo menos duas camadas de células da granulosa e com citoplasma uniformemente granulado foram selecionados para maturação *in vitro*.

#### 4.4. Condições de cultivo para Maturação *In Vitro* (MIV)

Para maturação *in vitro*, os complexos *cumulus*-ovócitos (COCs) selecionados foram transferidos para o meio de maturação (meio B199) e cultivados em microgotas de 100 µl de meio B199 (20 ovócitos/gota), sob óleo de silicone em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,5°C por um período de 24 horas. O meio B199 foi composto por meio TCM 199 (Gibco/11150-067), tendo o bicarbonato de sódio (25 mM) como componente tampão, enriquecido com 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de sulfato de gentamicina (Gibco 1272) e 10% de soro fetal bovino (Gibco).

Para avaliar o efeito da melatonina na maturação ovocitária, os ovócitos foram cultivados na ausência (controle) ou presença de melatonina, conforme os seguintes tratamentos:

1) **Tratamento 1 (Grupo controle)** ovócitos cultivados em meio B199 acrescidos de 0,5 µg/mL de FSH (hormônio folículo estimulante, Bioniche-Folltropin-v) e 5,0 µg/mL de LH (hormônio luteinizante, Bioniche - Lutropin-v);

2) **Tratamento 2 (Grupo MEL)** ovócitos cultivados em meio B199 com 1 µg/mL de melatonina;

3) **Tratamento 3 (Grupo MEL/FSH/LH)** ovócitos cultivados em meio B199 com 1 µg/mL de melatonina e 0,5 µg/mL de FSH e 5,0 µg/mL de LH.

A melatonina foi primeiramente dissolvida em DMSO (solução estoque) e estocada a - 20°C em alíquotas de 10 µL. Posteriormente uma alíquota foi diluída em meio B199 para produzir a concentração desejada (1 µg/mL).

#### 4.5. Fertilização *In Vitro* (FIV) e Cultivo *In Vitro* (CIV) para desenvolvimento embrionário

A fração móvel do sêmen foi separada por gradiente descontínuo de Percoll constituído por soluções de 45% e 90% de Percoll a 100% (Anexos 1-2). Em tubo cônico de 15 mL foi adicionado 1 mL de solução de Percoll a 90% (anexo 1) e, em seguida, 1 mL de solução de Percoll a 45% (Anexo 2). Após incubação prévia por um período de 1 hora na estufa de CO<sub>2</sub>, o sêmen, previamente descongelado (palheta de 0,5 mL) a 37°C por 30 segundos, foi depositado delicadamente sobre o gradiente sendo esse conjunto (gradiente e amostra de sêmen) centrifugado a 700 g durante 30 minutos. Após a retirada do sobrenadante, adição de 5 mL de meio TL-SÊMEN (Anexo 3) e centrifugação a 270xg por 10 minutos, para retirada de resíduos da solução de Percoll. Posteriormente, 30 µL do sedimento foram depositados em um microtubo contendo 30 µL de meio FIV (Anexo 4) para avaliação da motilidade e concentração espermática.

A suspensão de sêmen (4 µL) foi adicionada em cada gota de fecundação a uma concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A fecundação foi realizada em meio FIV (Anexo 4) suplementado com 10 µg/mL de heparina, 160 µL PHE (Anexo 5) e 0,6% BSA. Após sucessivas lavagens em meio FIV, aproximadamente 20 ovócitos foram transferidos para as gotas de fecundação sendo os mesmos incubados em placa de *Petri* (35 x 10 mm) contendo gotas de 100 µL, sob óleo mineral, a 38,8°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante um período de 18-22 horas.

Após a fecundação *in vitro*, os ovócitos foram isolados das células do *cumulus* mediante sucessivas aspirações com uma pipeta *Pasteur*. Seguida a retirada das células do *cumulus*, os ovócitos foram lavados duas vezes em meio SOF (Fluido Sintético do Oviduto – Anexo 6) suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% SFB (SOF-SFB). Posteriormente os mesmos foram transferidos para as placas de *Petri* contendo gotas de 100 µL de meio SOF-SFB. O cultivo foi conduzido em estufa à temperatura de 38,8°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 99% de umidade, durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foram renovados. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada às 40 horas (clivagem), 168

horas (formação de blastocistos) e 192 horas (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão) pós-inseminação *in vitro* (hpi).

#### 4.6. Estádio da Meiose

O estágio da meiose foi avaliado simultaneamente quando das avaliações, microtúbulos e grânulos corticais. Para tal, utilizou-se 10 µg/ml de Hoechst 33342 diluído em solução SP (solução salina com 1 mg/mL de PVA - álcool polivinílico). Os ovócitos foram examinados obedecendo à seguinte classificação: a) ovócitos com vesícula germinativa (VG) - núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina; b) ovócitos em metáfase I (MI) - cromossomos já condensados formando a placa equatorial ou início da formação da mesma; c) ovócitos em anáfase I (AI) - início da migração dos cromossomos para os pólos da célula com fibras do fuso aparente; d) ovócitos em telófase I (TI) - cromossomo já nos pólos, com fibras do fuso aparente; d) ovócitos em metáfase II (MII) - cromossomos formando a placa equatorial com 1º corpúsculo polar já exteriorizado.

#### 4.7. Organização dos microtúbulos

Para avaliação dos microtúbulos, ovócitos foram mantidos por 5 minutos em solução salina 0,9% (Sigma/S-9625) contendo 0,2% de hialuronidase para remoção das células do *cumulus*. Os ovócitos desnudos foram fixados por 1 hora em solução salina 0,9% com 4% de paraformaldeído (Sigma/P-6148) e 0,3% de Triton X-100 (USB/9002-93-1), seguido por três lavagens em solução SP (solução salina com 1 mg/mL de PVA - álcool polivinílico). Os ovócitos foram depois incubados com 10% de soro de cabra em solução SB (solução SP com 3% de BSA) por 45 min e posteriormente corados com anticorpo monoclonal anti-tubulina conjugada com isotiocianato de fluoresceína - FITC (1:50) em solução SP por 1 hora. Após esse período, os ovócitos foram lavados três vezes em solução SP, corados com 10 µg/ml de Hoechst 33342 diluído em solução SP por 15 min, e novamente lavados três vezes em solução SP. Os ovócitos corados foram montados em lâmina sob lamínula com Vectashield para minimizar a perda de fluorescência (LIN; LEE; MOOR, 1996) e observados sob microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III).

#### 4.8. Distribuição dos grânulos corticais

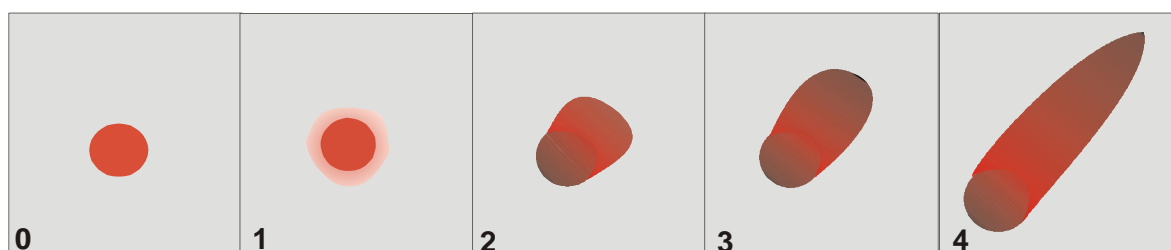
A distribuição dos grânulos corticais foi avaliada conforme a metodologia descrita por Cherr, Drobnis e Katz (1988) com algumas modificações. A zona pelúcida dos ovócitos desnudos foi removida por incubação em pronase a 0,5%, em solução salina por aproximadamente 5 min. Em seguida, os ovócitos foram fixados em 3% de para formaldeído em solução salina por 30 min, à temperatura ambiente, e incubados por 2 horas em solução de bloqueio (SB - solução salina 0,9% com 1 mg/mL de BSA (Sigma A-6003), 100 mM de glicina e 0,2% de azida de sódio - Sigma- S-8032). Para a permeabilização, os ovócitos foram tratados por 5 min a 38°C em solução SB acrescida de 0,1% de Triton X-100. Após três lavagens em solução SB, os ovócitos foram corados com 10 µg/mL de *Lens culinaris* (Sigma/L-9262) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA) em solução SB por 15 min. Em seguida, os ovócitos foram lavados três vezes (5 min cada vez) em solução SB, corados com 10 µg/ml de Hoechst 33342 em solução SB por 15 min, lavados novamente em solução SB, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III; excitação 420 a 460 nm e emissão 515 nm) para avaliação da distribuição dos grânulos corticais no interior dos ovócitos. De acordo com o padrão de distribuição dos grânulos corticais, os ovócitos foram classificados em três grupos: GC distribuídos em “clusters” – ovócito imaturo e GC periféricos – ovócitos maduros, de acordo com Hosoe e Shioya (1997). Os ovócitos foram colhidos em dois momentos: antes da maturação (em estágio de vesícula germinativa - VG) e após 24 horas de maturação *in vitro*.

#### 4.9. Avaliação da Fragmentação do DNA das Células do *Cumulus Oophorus* e de Embriões pela técnica do COMETA

As células do *cumulus* provenientes de ovócitos maturados nos diferentes meios de cultivo e os blastocistos produzidos a partir da fertilização *in vitro* desses ovócitos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 200xg em meio H-199. Após a retirada do sobrenadante, foi realizada a adição do gel de *agarose low melting* (0,75%) a 37°C. Uma gota dessa mistura foi depositada sobre uma lâmina para realização de um esfregaço tomando o cuidado para não provocar nenhum

dano às células. A lâmina foi deixada na geladeira por 10 minutos em câmara úmida e, em seguida a lâmina foi coberta com gel de Agar e deixada mais 30 minutos na geladeira para polimerização do gel. Posteriormente a lâmina foi colocada em solução de lise [Tris (10 mM), Triton X-100 (1%), Na<sub>2</sub>EDTA (100 mM), Proteinase K (5 µg/mL) NaCl (2,5 mM)] por duas horas a 50°C. Durante esse período, a lâmina foi re-coberta com solução de lise a cada 30 minutos para evitar sua secagem. Após essa etapa, a lâmina foi colocada em solução de eletroforese pH 13-14 [NaOH (300 mM), Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM)] por vinte minutos para separação das fitas de DNA na cuba desligada, e depois sob corrente eletroforética 25 V por mais 20 minutos. Após a sua retirada da cuba, a lâmina foi lavada com solução de TRIS-HCl (0,4 M) por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (10 µg/mL) por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram avaliadas sob microscopia de epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III; excitação 340 a 380 nm e emissão 430 nm).

As células do *cumulus* e os embriões foram classificados em quatro graus de acordo com o tamanho da cauda do DNA, conforme adaptação do método utilizado por Visvardis; Tassiou e Piperakis, 1997. O tamanho da “cauda” é diretamente proporcional ao dano do DNA (TAKAHASHI et al., 2000). Esta classificação pode ser visualizada na Figura 1: grau 1, fragmentação inexistente (Figura 1-0) ou minimamente visível (Figura 1-1); grau 2, fragmentação pequena (Figura 1-2); grau 3, fragmentação média (Figura 1-3); grau 4, fragmentação avançada (Figura 1-4).



**Figura 1** - Classificação da integridade de DNA total (Modificado de VISVARDS; TASSIOU; PIPERAKIS, 1997). Grau 1: célula onde ocorreu pouca quebra de DNA (0) ou apenas difusão do DNA no gel (1); grau 2: pequena quebra e pouca migração de DNA (2); grau 3: quebra e migração parcial de DNA (3) e grau 4: quebra e migração de DNA acentuada (4).

#### 4.10. Delineamento Experimental

Foi avaliado o efeito da melatonina no meio de cultivo *in vitro* para maturação ovocitária sobre o estágio da meiose, a distribuição e organização dos grânulos corticais e dos microtúbulos (**experimento 1**) dos ovócitos, sobre a fragmentação do DNA das células do *cumulus oophorus* (**experimento 2**) e dos embriões (**experimento 3**) e sobre a produção *in vitro* de embriões (**experimento 4**). Em cada experimento foram realizadas nove repetições e foram utilizados de 20 a 30 complexos *cumulus*-ovócitos por tratamento em cada repetição. No experimento 1, em cada repetição de cada tratamento, os ovócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um grupo foi submetido à avaliação da organização dos microtúbulos e o outro submetido à avaliação da distribuição dos grânulos corticais. O estágio da meiose foi avaliado em ambos os grupos. No experimento 4 foram avaliadas a taxa de clivagem e as taxas de embriões no sétimo (D-7) dia de cultivo *in vitro*.

#### 4.11. Análise Estatística

Os dados foram avaliados mediante o método dos quadrados mínimos utilizando os procedimentos PROC GLM (General Linear Model) e do programa SAS (Statistical Analysis System), versão 8.0 (SAS, 1995). As variáveis analisadas foram transformadas conforme a função arco seno (raiz - percentagem). A comparação entre médias foi realizada pelo teste *t* de *Student* sendo as medias apresentadas na escala original (%). Para avaliação da organização e distribuição dos microtúbulos foi realizada uma análise descritiva.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento 1: Efeito da melatonina sobre o estágio da meiose, organização dos microtúbulos e distribuição dos grânulos corticais

O primeiro experimento foi realizado para avaliar o efeito da melatonina sobre a maturação citoplasmática (organização dos microtúbulos e distribuição dos grânulos corticais) e nuclear (estádios da meiose) dos ovócitos após 24 horas de maturação *in vitro*. Os vários estádios da meiose estão representados na Figura 2.

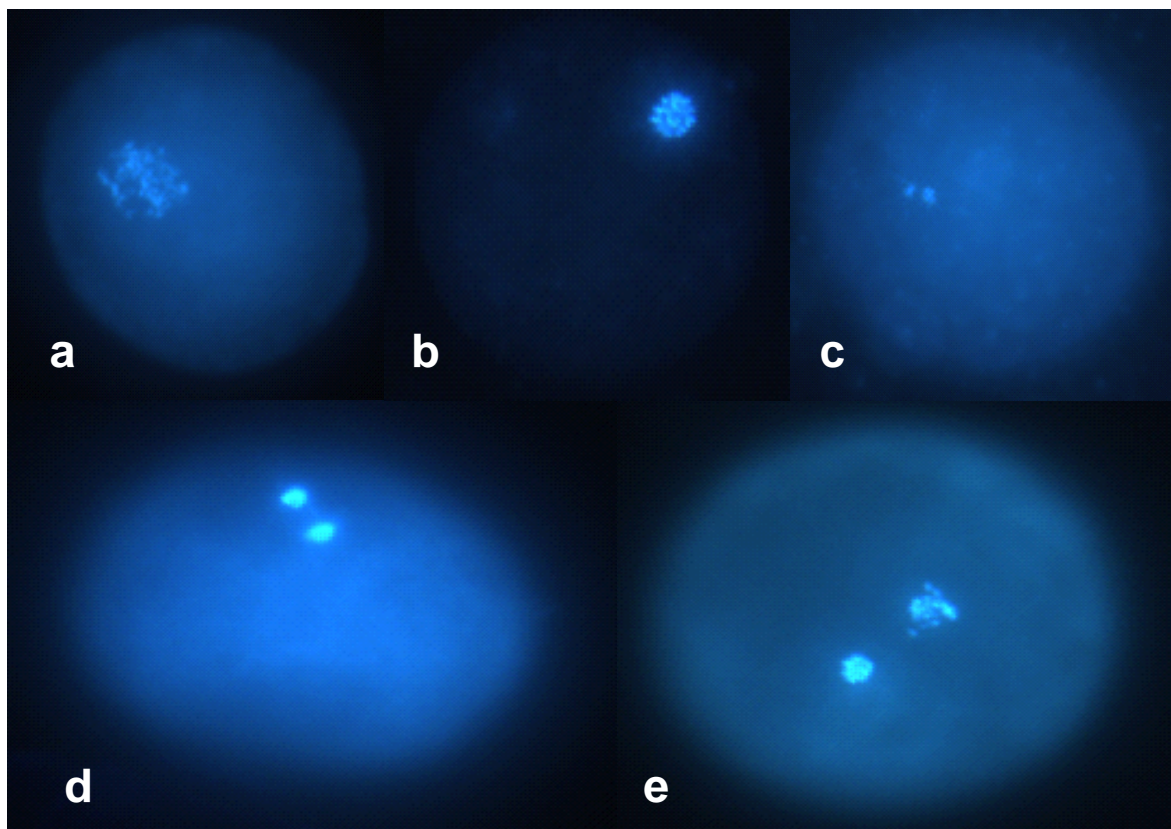


Figura 2. Representação dos estádios da meiose: (a) Vesícula Germinativa; (b) Metáfase I; (c) Anáfase I; (d) Telófase I; (e) Metáfase II.

A marcação positiva dos microtúbulos foi observada por todo o citoplasma dos ovócitos, tanto no grupo controle (FSH/LH) como nos grupos MEL e MEL/FSH/LH. Antes da maturação (0 h), uma marcação mais intensa dos microtúbulos foi observada junto aos cromossomos (fuso meiótico) nos ovócitos em



fase de transição, metáfase I, anáfase I e telófase I (MAT). Durante a MI, os fusos ficavam freqüentemente situados na periferia da célula. Na anáfase I e telófase I, foram encontrados microtúbulos na parte central do fuso. Não foi possível a observação dos microtúbulos no citoplasma de ovócitos em estágio de vesícula germinativa (VG).

Após 24 h de maturação, uma intensa coloração dos microtúbulos também foi observada junto aos cromossomos dos ovócitos em metáfase II (MII) de todos os tratamentos (controle, MEL e MEL/FSH/LH). Nos ovócitos em metáfase II, os microtúbulos foram observados próximos ao segundo fuso de meiótico, e em menor quantidade, no corpúsculo polar do grupo controle e dos tratados com melatonina MEL e MEL/FSH/LH (FIGURA 3).

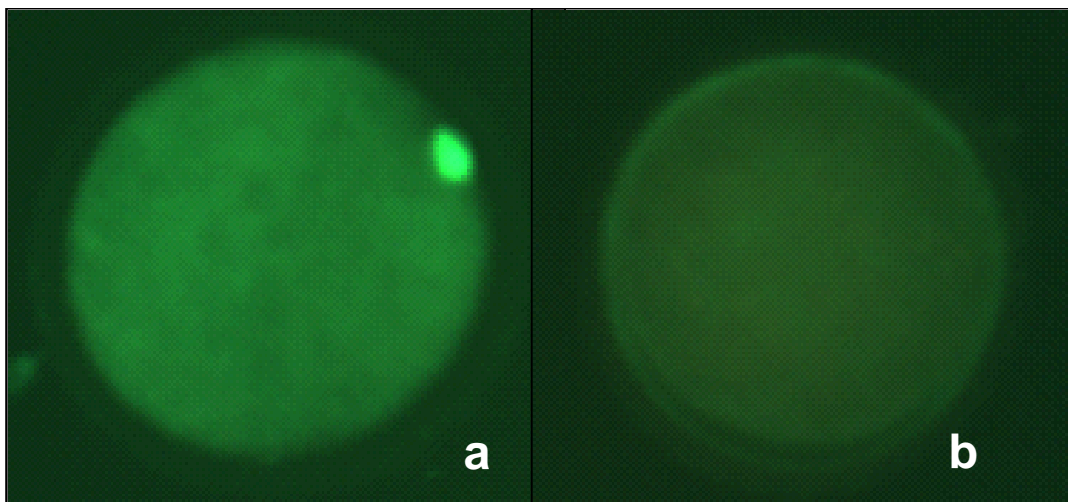


Figura 3. Ovócitos maturados *in vitro*, marcação para microtúbulos: (a) Ovócitos em estágio de metáfase II (MII) com marcação para microtúbulos; (b) Ovócitos em estágio de MII sem marcação para microtúbulos.

A adição de melatonina no meio de maturação não interferiu ( $p>0,05$ ) nas taxas de ovócitos em estágio de vesícula germinativa ( $8,67\pm 1,92$ ,  $7,70\pm 1,92$  e  $10,09\pm 1,92$ ) metáfase I anáfase I, telófase I (MAT=  $25,15\pm 3,80$ ,  $25,84\pm 3,80$  e  $30,29\pm 3,80$ ) e de metáfase II ( $66,18\pm 4,04$ ,  $66,46\pm 4,04$  e  $59,61\pm 4,04$ ) nos grupos controle e nos grupos tratados com MEL e MEL/FSH/LH respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1. Estádios da meiose (média  $\pm$  erro padrão) em ovócitos submetidos à maturação *in vitro* com ou sem melatonina no meio de cultivo.

Tratamentos	Ovócitos (n°)	Estádio da Meiose		
		VG (n°)	MAT (n°)	MII (n°)
Controle	171	8,67 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup> (14)	25,15 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup> (44)	66,18 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup> (113)
MEL	157	7,70 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup> (12)	25,84 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup> (42)	66,46 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup> (103)
MEL/FSH/LH	209	10,09 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup> (21)	30,29 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup> (65)	59,61 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup> (123)

VG: Vesícula Germinativa; MAT: metáfase I, anáfase I e telófase I; MII: metáfase II. Controle: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 acrescidos de 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH; MEL: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; MEL/FSH/LH: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina e 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH, NS = não-significativo ( $P>0,05$ ).

Durante a maturação ovocitária, os grânulos corticais migraram para periferia dos ovócitos no estágio de metáfase II (distribuição periférica de grânulos corticais), localizando-se logo abaixo da membrana da plasmática (FIGURA 4a). Em alguns ovócitos em metáfase II os grânulos corticais não migraram para periferia permanecendo com uma distribuição geral. Os ovócitos que não maturaram e permaneceram no estágio de vesícula germinativa (VG) apresentaram *clusters* de grânulos corticais distribuídos por todo citoplasma (geral), mas foi possível observar que alguns ovócitos em VG apresentaram distribuição periférica dos grânulos corticais. Em ovócitos imaturos (vesícula germinativa) os *clusters* de grânulos corticais encontravam-se distribuídos por todo citoplasma e em alguns ovócitos maturados apresentaram-se com estas mesmas características (FIGURA 4b).

Após a maturação, também não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos tratados com melatonina MEL e MEL/FSH/LH na distribuição dos grânulos corticais (periférica e geral) dos ovócitos em estágio de vesícula germinativa e em metáfase II (TABELA 2). Os ovócitos em estágio de

vesícula germinativa com distribuição geral foram de  $5,01 \pm 2,28$  a  $8,34 \pm 2,28$ , e na distribuição periférica variou de  $8,69 \pm 3,19$  a  $15,04 \pm 3,19$ . No estágio de metáfase II, a distribuição geral dos grânulos corticais foi de  $16,56 \pm 4,47$  a  $27,61 \pm 4,47$  e na distribuição periférica de  $55,35 \pm 5,09$  a  $63,02 \pm 5,09$ .

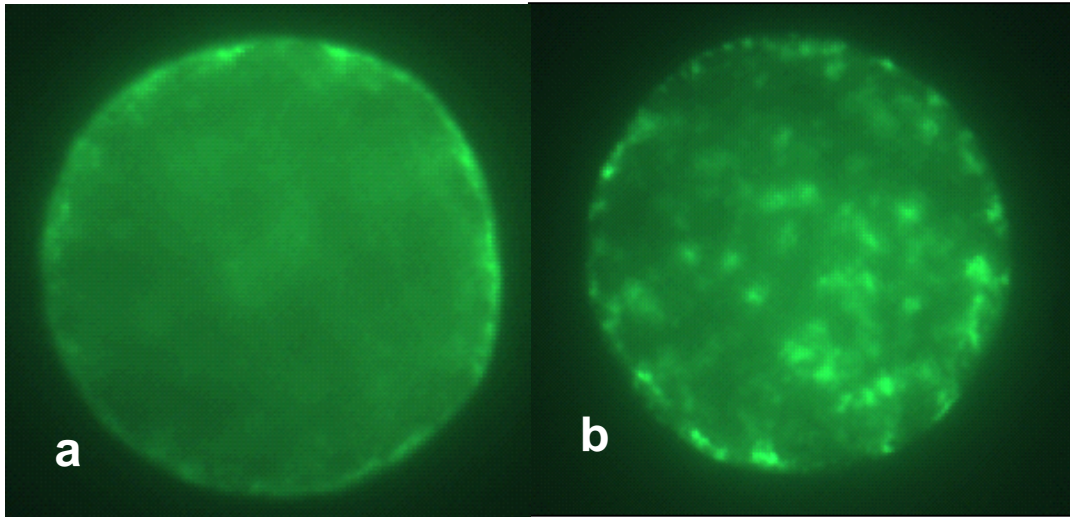


Figura 4. Distribuição dos grânulos corticais em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. (a) Distribuição periférica dos grânulos corticais em ovócito em estágio de MII. (b) Distribuição geral dos grânulos corticais em ovócito em estágio de VG.

Tabela 2. Distribuição (média  $\pm$  erro padrão) dos grânulos corticais em ovócitos submetidos à maturação *in vitro* com ou sem melatonina no meio de cultivo.

Tratamentos	Ovócitos (n°)	Distribuição dos grânulos corticais (%)			
		Vesícula Germinativa		Metáfase	
		Geral <sup>1</sup> (n°)	Periférica <sup>2</sup> (n°)	Geral <sup>1</sup> (n°)	Periférica <sup>2</sup> (n°)
Controle	122	5,01 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup> (8)	15,04 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup> (22)	16,56 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup> (19)	63,02 $\pm$ 5,09 <sup>a</sup> (73)
MEL	110	6,22 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup> (7)	9,18 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup> (9)	26,35 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup> (29)	58,24 $\pm$ 5,09 <sup>a</sup> (65)
MEL/FSH/LH	114	8,34 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup> (11)	8,69 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup> (11)	27,61 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup> (28)	55,35 $\pm$ 5,09 <sup>a</sup> (64)

<sup>1</sup>Geral, distribuição dos clusters de grânulos corticais por todo o citoplasma do ovócito; <sup>2</sup>Periférica, grânulos corticais distribuídos no córtex citoplasmático do ovócito. Controle: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 acrescidos de 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH; MEL: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; MEL/FSH/LH: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina e 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH, NS = não-significativo (P>0,05).

## 5.2. Experimento 2: Efeito da melatonina sobre a fragmentação do DNA das células do *cumulus oophorus* pela técnica do COMETA

No segundo experimento foi avaliado o efeito da melatonina no meio de maturação dos ovócitos sobre a fragmentação do DNA das células do *cumulus oophorus*. Os resultados referentes ao grau de fragmentação do DNA dessas células estão expostos na Tabela 3. O percentual de células do *cumulus* (CC) que não apresentaram dano no DNA (grau 1) no grupo cuja melatonina foi adicionada ao meio de cultivo *in vitro* para maturação ovocitária (MEL) foi superior (P<0,01) quando comparado com os demais grupos: grupo que foi adicionado melatonina e hormônios (MEL/FSH/LH) e grupo que somente foi adicionado hormônios (Controle). O percentual de CC, classificadas como grau 1, do grupo controle foi inferior (P<0,01) ao grupo MEL/FSH/LH. Não houve diferença (P>0,05) entre os grupos experimentais no percentual de CC classificadas como grau 2 (células com pequena quebra e pouca migração de DNA). Quanto às células que apresentaram quebra e

---

migração parcial de DNA (grau 3), o grupo controle foi superior ( $P < 0,01$ ) ao grupo MEL, mas similar ( $P > 0,05$ ) ao grupo que foi adicionado melatonina e hormônios (MEL/FSH/LH). Adicionalmente, o percentual de CC que apresentaram acentuado grau de dano no DNA (grau 4) no grupo MEL foi inferior ( $P < 0,01$ ) ao do grupo controle, mas similar ( $P > 0,05$ ) ao grupo MEL/FSH/LH.

### **5.3. Experimento 3: Efeito da melatonina sobre a fragmentação do DNA dos embriões pela técnica do COMETA**

No terceiro experimento, foi avaliado o efeito da melatonina no meio de maturação dos ovócitos sobre a fragmentação do DNA dos blastocistos. Os resultados referentes ao grau de fragmentação do DNA desses embriões estão expostos na Tabela 4. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em nenhum dos graus de fragmentação do DNA. A fragmentação do DNA foi de  $31,46 \pm 6,01$ ;  $38,36 \pm 6,01$  e  $32,92 \pm 6,01$  para os graus de 0-1, de  $53,77 \pm 4,53$ ;  $52,15 \pm 4,53$  e  $46,14 \pm 4,53$  para o grau 2, de  $14,76 \pm 4,23$ ;  $9,49 \pm 4,23$  e  $20,14 \pm 4,23$  para o grau 3 e de  $0,00 \pm 0,46$ ;  $0,00 \pm 0,46$  e de  $0,79 \pm 0,46$  para o grau 4 nos grupos controle, MEL e MEL/FSH/LH, respectivamente.

Tabela 3. Percentual (média  $\pm$  erro padrão) de fragmentação do DNA total das células do *cumulus* (CC) após a maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-ovócitos com ou sem melatonina no meio de cultivo.

Tratamentos	CC (n°)	Classificação COMETA			
		Grau 0-1 (n°)	Grau 2 (n°)	Grau 3 (n°)	Grau 4 (n°)
Controle	816	17,83 $\pm$ 2,41 <sup>c</sup> (145)	32,57 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup> (265)	31,36 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup> (258)	18,24 $\pm$ 1,91 <sup>a</sup> (148)
MEL	768	37,64 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup> (281)	35,04 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup> (261)	18,75 $\pm$ 2,59 <sup>b</sup> (161)	8,57 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup> (65)
MEL/FSH/LH	789	28,08 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup> (222)	36,43 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup> (286)	24,48 $\pm$ 2,59 <sup>ab</sup> (194)	11,00 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup> (87)

Grau 1: fragmentação do DNA inexistente ou minimamente visível; grau 2: fragmentação pequena; grau 3: fragmentação média e grau 4: fragmentação acentuada. Controle: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 acrescidos de 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH; MEL: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; MEL/FSH/LH: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH. Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste *t* de student ( $P > 0,05$ ).

Tabela 4. Percentual (média  $\pm$  erro padrão) de fragmentação do DNA total dos blastocistos produzidos *in vitro* a partir ovócitos submetidos à maturação com ou sem melatonina no meio de cultivo.

Tratamentos	Blastocistos (n°)	Classificação COMETA			
		Grau 0-1 (n°)	Grau 2 (n°)	Grau 3 (n°)	Grau 4 (n°)
Controle	89	31,46 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup> (29)	53,77 $\pm$ 4,53 <sup>a</sup> (47)	14,76 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup> (13)	0,00 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup> (0)
MEL	85	38,36 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup> (32)	52,15 $\pm$ 4,53 <sup>a</sup> (45)	9,49 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup> (8)	0,00 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup> (0)
MEL/FSH/LH	86	32,92 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup> (28)	46,14 $\pm$ 4,53 <sup>a</sup> (41)	20,14 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup> (16)	0,79 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup> (1)

Grau 1: fragmentação do DNA inexistente ou minimamente visível; grau 2: fragmentação pequena; grau 3: fragmentação média e grau 4: fragmentação acentuada. Controle: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 acrescidos de 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH; MEL: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; MEL/FSH/LH: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina, 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH. NS = não-significativo ( $P > 0,05$ ).

#### 5.4. Experimento 4: Efeito da melatonina na produção *in vitro* de embriões

O quarto experimento teve como objetivo avaliar o efeito da adição de melatonina no meio de maturação na taxa de clivagem e no desenvolvimento embrionário no D-7 (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido/eclodido). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em nenhuma das variáveis analisadas (TABELA 5). A percentagem de ovócitos clivados após a FIV não foi significativamente influenciada pelo tratamento com melatonina quando comparado com o grupo controle variando de 85,65  $\pm$  2,47 a 88,52  $\pm$  2,47.

Tabela 5. Desenvolvimento embrionário (média  $\pm$  erro padrão) no dia 7 de cultivo a partir de ovócitos submetidos à maturação *in vitro* com ou sem melatonina no meio de cultivo.

Tratamentos	Ovócitos (n°)	CLIV	Desenvolvimento Embrionário (%) no dia 7				Total
			Mórula	BL Inicial	BL	BL/EXP/ ECL	
Controle	208	85,70 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>	10,17 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup> (22)	4,28 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup> (9)	21,64 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup> (45)	18,39 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup> (37)	54,47 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup> (112)
MEL	205	88,52 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>	12,07 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup> (26)	6,14 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup> (13)	23,44 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup> (47)	18,37 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup> (35)	60,01 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup> (121)
MEL/FSH/LH	207	85,65 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>	6,68 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup> (14)	10,16 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup> (21)	23,57 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup> (48)	17,99 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup> (36)	58,40 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup> (119)

CLIV: clivados; BL: blastocisto; EXP/ECL: blastocisto expandido/eclodido. Controle: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 acrescidos de 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH; MEL: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina; MEL/FSH/LH: ovócitos maturados *in vitro* em meio B199 com 1  $\mu$ g/mL de melatonina, 0,5  $\mu$ g/mL de FSH e 5,0  $\mu$ g/mL de LH. NS = não-significativo ( $P > 0,05$ ).



## 6. DISCUSSÃO

No experimento 1 foi observado que a adição de melatonina no meio de maturação não influenciou na maturação citoplasmática (microtúbulos e grânulos corticais) e nuclear (estádios da meiose) dos ovócitos após 24 horas de cultivo.

No presente estudo, houve migração periférica dos grânulos corticais (GC) em apenas um pouco mais da metade dos ovócitos que retomaram a meiose. Estudos prévios mostraram que aqueles ovócitos coletados de folículos de diâmetro maior têm uma maior competência em se desenvolver (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; CEOZT et al., 1995). Este achado sugere que os ovócitos adquirem competência em se desenvolver progressivamente durante o crescimento folicular. O desarranjo da vesícula germinativa só foi observado em ovócitos quando o diâmetro excedeu 91  $\mu\text{m}$ , e a formação do corpúsculo polar em ovócitos com diâmetros que ultrapassaram 101  $\mu\text{m}$  (SATO et al., 1990). A alta porcentagem de maturação incompleta é observada em ovócitos com diâmetro inferior a 120  $\mu\text{m}$  sugerindo que o desenvolvimento da capacidade de maturação é adquirido em um processo demorado. A capacidade para sofrer o desarranjo da vesícula germinativa e progredir até a metáfase I é adquirido no início da fase de crescimento, mas a habilidade para progredir para metáfase II é adquirida posteriormente (MOTLIK; FULKA, 1986). Além disso, são necessárias a síntese e armazenamento de certas formas de RNAm e proteínas durante a MIV e no início do desenvolvimento embrionário, essenciais para o desenvolvimento seguinte (MOTLIK; FULK, 1986; THIBault et al., 1987).

Estudos demonstraram que alguns fatores podem melhorar a competência ovocitária elevando significativamente o número de blastocistos produzidos *in vitro* (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998). Apesar de sabermos da influência dos meios e condições de cultivo, são os próprios constituintes originais do ovócito que são os responsáveis por controlar a habilidade de responder as condições mais adequadas de cultivo (SIRARD, 2001).

Durante a maturação *in vitro* (MIV), a progressão da meiose e a migração dos GC na maioria dos ovócitos bovinos, na fase de MII, apresentam uma distribuição de GC periférica (NIIMURA, HOSOE, 1995). Este padrão de distribuição também foi observado em suínos (CRAN; CHENG, 1985; WANG et al., 1997) e éguas

(CARNEIRO, 2002b). No estudo em questão, nos grupos controle e tratados, o padrão observado em outros estudos previamente mencionados também foi constatado, entretanto houve certo percentual de ovócitos em metáfase II que apresentaram distribuição geral dos grânulos corticais, característica de ovócitos imaturos. Em bovinos, após a fertilização, a exocitose de GC está completa e a formação de agregados está relacionada com a maturação citoplásmica anormal e fertilização com poliespermia (HYTTEL; XU; GREVE, 1988). A poliespermia é a penetração de dois ou mais espermatozóides no ovócito, o qual resultará em um desenvolvimento embrionário anormal. Caso ocorra a poliespermia, são formados fusos extras ou multipolares, resultando na falha da segregação de cromossomos durante a divisão celular, geralmente, cessando o desenvolvimento embrionário. O bloqueio à poliespermia mais importante em mamíferos se dá pela extrusão dos grânulos corticais (ALBERTS et al., 2002). A incidência da poliespermia aumenta em casos como: ovócitos imaturos, pois não tem boa habilidade em liberar os grânulos corticais; ovócitos velhos, provavelmente pela menor atividade enzimática, redução de responsividade da zona pelúcida e/ou degeneração citoplasmática; anormalidades na conformação das camadas de matriz da zona; elevado número de espermatozóides capacitados no sítio de fertilização, não tendo tempo do ovócito desencadear o sistema de bloqueio; e, condições no momento da fecundação, como os meios utilizados na fertilização *in vitro* (FIV) (temperatura, pH, suplementos protéicos e concentração de cálcio) (WANG; DAY; WU, 2003).

Em suínos, Cran; Cheng (1986) mostraram que a exocitose de GC é incompleta e atrasada em ovócitos de MIV quando comparado com ovócitos maturados *in vivo* enquanto Wang et al. (1997) não encontraram diferenças na liberação dos GCs depois da fertilização em ovócitos derivados da ovulação *in vivo* e os de MIV.

Ainda no experimento 1, após a MIV, nos ovócitos em metáfase II, os microtúbulos encontravam-se organizados próximos ao segundo fuso meiótico na maioria dos grupos, controle e tratados com melatonina. Os microtúbulos são observados nos ovócitos bovinos maturados e estão certamente envolvidos na reconstrução da cromatina durante a maturação meiótica. Microtúbulos não são requeridos para quebra da vesícula germinativa, mas são necessários para o movimento cromossomal, divisão celular, formação da metáfase e extrusão do corpúsculo polar (KIM et al., 2000). Condições inadequadas durante a MIV/FIV

possivelmente prejudique a função das organelas citoplásmicas, inclusive microtúbulos e microfilamentos que resultam em anormalidades após a fertilização e início do desenvolvimento embrionário (HYTTEL; XU; GREVE, 1988; KIM et al., 2000). Citoesqueleto anormal e posicionamento incorreto da cromatina na metáfase freqüentemente foram observados em ovócitos suínos e bovinos maturados *in vitro* ao contrário de ovócitos maturados *in vivo* (KIM et al., 1996). Dessa forma, a habilidade de desenvolvimento do ovócito bovino maturado *in vitro* até as fases de mórula/blastocisto é menor do que dos ovócitos maturados *in vivo* e essa diminuição pode ser devido à incompleta maturação citoplasmática (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987; SIRARD; BLONDIN, 1996).

No experimento 2 observou-se que a adição de melatonina no meio de maturação induziu uma diminuição da apoptose das células do *cumulus* quando comparados com os grupos controle e MEL/FSH/LH. Esses resultados concordam com os obtidos por Na et al. (2005) observaram uma diminuição da apoptose e um aumento na expressão do receptor de melatonina das células do *cumulus* de camundongos, após avaliarem o efeito de 1  $\mu$ M melatonina sobre a maturação ovocitária, apoptose das células do *cumulus*, e a expressão do RNAm das células do *cumulus in vitro*. Estes autores concluíram que a melatonina tem um importante papel na maturação e redução da apoptose das células do *cumulus in vitro*, em parte devido a influencia do mecanismo do receptor de RNAm das células do *cumulus*.

As células do complexo *cumulus*-ovócito (COC) exercem um importante papel na regulação da maturação do ovócito, na fertilização *in vitro* e no desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 1995; NAGAI, 2001). A capacidade de o ovócito imaturo desnudo sofrer maturação e formação prónuclear e desenvolvimento pre-implantação é comprometido quando comparado aos ovócitos providos de células do *cumulus* (ZHANG et al., 1995; FULKA; FIRST; MOOR, 1998). Alguns estudos têm demonstrado que os ovócitos imaturos desnudos das células do *cumulus* completam a meiose, são fertilizados e iniciam a clivagem mais rápida, entretanto subseqüentemente são bloqueados (ANDERIESZ; TROUSON, 1995; HASHIMOTO et al., 1998; GOUD et al., 1998).

Segundo Pocar et al., (2005) a qualidade das células do *cumulus* é considerada um fator crucial que influencia no resultado da maturação dos ovócitos e na sua competência de desenvolvimento subseqüente.

Sabe-se que a apoptose é um mecanismo que leva a perda celular durante a atresia folicular (YU; MILLER; SCOSMOND, 2004). Já a detecção de apoptose na célula da granulosa tem sido amplamente utilizada para identificar folículos atrésicos, existindo poucas evidências de sua utilização como indicador da qualidade do ovócito. Existe um estudo que mostrou uma diminuição do desenvolvimento do ovócito relacionado com morte celular ou apoptose das células foliculares antes da detecção dos sinais morfológicos de atresia (JEWGENOW; HEERDEGEN; MULLER, 1999), mas há outro sugerindo que um alto grau de atresia não é necessariamente prejudicial, e que a competência do ovócito somente será comprometida por estágios avançados de atresia (HAGEMANN et al., 1999).

O complexo *cumulus*-ovócito é a última porção do folículo que é afetada pela atresia e, mesmo em estados avançados de atresia folicular, apenas 25% dos complexos apresentam sinais claros de degeneração (HENDRIKSEN et al., 2000). Folículos com mais de 73% de células apoptóticas ainda podem oferecer ovócitos competentes (HAGEMANN et al., 1999). Estágios iniciais de atresia folicular não afetam negativamente o potencial do ovócito e, pelo contrário, parecem estimular a competência do ovócito para desenvolver-se (BLONDIN et al., 1997).

A expansão das células do *cumulus* de ovócitos também está relacionada a apoptose das células da granulosa e não possui relação com o tamanho dos folículos. No momento da colheita, as proporções de ovócitos com *cumulus* compacto e expandido que se encontra em estágio de vesícula germinativa, portanto imaturos, são similares (HINRICHS, 1997). Ovócitos com *cumulus* expandidos de folículos atrésicos possuem cromatina compacta e demonstram maior competência meiótica em relação aos ovócitos com *cumulus* compacto (HINRICHS; WILLIAMS, 1997), porém não possuem melhores índices de ativação após injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) do que ovócitos com *cumulus* compacto (DELL'AQUILA et al., 2003).

O FSH induz a expansão do *cumulus*, conduzindo a dissociação progressiva mediana e periférica dessas células e nessas regiões observou-se uma incidência maior de apoptose (SZOLTYIS; TABAROWSKI; PAWLIK, 2000). Aparentemente esta perda de contato é importante para a finalização da maturação citoplasmática e preparação para a fertilização (EPPIG; DOWNS, 1987). Durante a MIV, o processo de expansão das células do *cumulus* tem um impacto na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto (CHEN et al., 1993; FURNUS

et al., 1998), mas alguns estudos têm sugerido que a presença das células do *cumulus* poderia ser necessária para expressar a competência de desenvolvimento do ovócito, sendo que sua expansão não seria exigida para melhorar essa competência (LUCIANO et al., 1999; ALI; SIRARD, 2002).

No grupo controle as células do *cumulus* se expandiram mais do que as dos grupos MEL e MEL/FSH/LH, podendo em parte ser pela falta de gonadotrofinas no grupo MEL onde a expansão das células do *cumulus* foi menos evidente. Contudo, quando os COCs do grupo MEL foram submetidos à fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* (experimento 4), a taxa de blastocistos obtida foi similar à do grupo controle. Esse resultado, além de confirmar o que já foi postulado em pesquisas as quais demonstraram que a expansão das células do *cumulus* não constitui um fator condicionador do desenvolvimento embrionário *in vitro* (LUCIANO et al., 1999; ALI; SIRARD, 2002), também mostra que a melatonina quando adicionada ao meio de maturação pode suportar o desenvolvimento embrionário produzindo taxas de blastocistos equivalentes ao sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos.

De fato, no presente estudo, a habilidade dos ovócitos de se desenvolverem até o estágio de blastocistos foi semelhante em todos os grupos estudados (controle, MEL, MEL/FSH/LH), não interferindo nas taxas de clivagem e nos diversos estádios de desenvolvimento embrionário no sétimo dia de cultivo *in vitro* (D-7). A taxa de blastocisto deste experimento foi semelhante aos de outras pesquisas previamente realizadas (MOORE et al., 2007; ADONA et al., 2008; CORRÊA et al., 2008).

Embora a melatonina não tenha influenciado significativamente na taxa de clivagem no presente estudo, um resultado inesperado foi descrito por Rodriguez-Osório; Kim e Wang, (2007), os quais relataram alta taxa de clivagem dos embriões cultivados por 3 hr a 40°C com suplementação de melatonina. Mesmo que esta temperatura não pareça interferir na taxa de clivagem, a adição de melatonina promoveu um aumento da taxa de clivagem. Isto sugere uma exploração dos efeitos moleculares da melatonina em outra apoptose como em genes relacionados à temperatura (RODRIGUEZ-OSÓRIO; KIM; WANG, 2007).

Segundo Chang e Ng (1994) e McElhinny, Davis e Warner (1996) a melatonina não alterou o desenvolvimento embrionário de camundongos após a fertilização *in vitro*. Já Ishizuka et al., (2000) demonstraram que a adição de

melatonina no início da pré-implantação de embriões de camundongos melhorou seu desenvolvimento. Em alguns estudos realizados *in vitro* ou *in vivo*, não foi observado efeito prejudicial da melatonina no desenvolvimento embrionário e nem quanto à toxicidade analisada (CHAN; NG, 1994; McELHINNY; DAVIS; WARNER, 1996; JAHNKE et al., 1999). Outro estudo demonstrou que houve um aumento da taxa de blastocisto de embriões de ovelhas vitrificado mantidos em cultivo *in vitro* com melatonina por 24 e 48 h após o re-aquecimento (ABECIA; FORCADA; ZUNIGA, 2002).

Neste estudo não foram constatados nenhum efeito tóxico sobre os ovócitos e embriões produzidos relacionado com a adição de 1 µg/mL de melatonina no meio de maturação. Foi observado que a suplementação de melatonina ao meio de cultura do embrião, a uma concentração de  $10^{-9}$  M, teve um efeito positivo na taxa de clivagem e nos números de células dos blastocistos de suínos (RODRIGUEZ-OSÓRIO; KIM; WANG 2007). Estes resultados previamente concordam com estudos em que a concentração de melatonina de  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  M aumentou o desenvolvimento embrionário de murinos e bovinos (TAN et al., 1993; SIU et al., 2006). A suplementação do meio de cultura com  $10^{-12}$  M de melatonina não apresentou o mesmo resultado, provavelmente porque a concentração foi abaixo da quantidade necessária para proteger os embriões dos radicais livres. Ao contrário, McElhinnys; Davis e Warner (1996) encontraram em seu estudo, resultados que sugere um efeito negativo da melatonina com concentrações mais altas ( $10^{-3}$  M), com um declínio tanto das taxas de clivagem como na de blastocisto. Este achado poderia indicar um grau de atividade tóxica. Porém, a concentração mais alta usada por Rodriguez-Osório; Kim e Wang (2007) foi 100 vezes maior do que o usado por McElhinny; Davis; Warner (1996). Embora Ishizuka et al. (2000) informaram um efeito positivo da melatonina a  $10^{-6}$  M em embriões de camundongos em desenvolvimento; resultados descritos por Rodriguez-Osório, Kim e Wang (2007) não mostraram nenhuma diferença estatística significativa na taxa de clivagem ou de blastocisto nesta concentração.

Como já mencionado anteriormente, a adição de melatonina no meio de maturação protegeu as células do *cumulus* contra fragmentação do DNA (baixa taxa de apoptose) quando comparado com o grupo controle, mas não foi capaz de melhorar o grau de apoptose dos embriões após a fertilização (experimento 3).

O índice de apoptose nos embriões encontrado neste experimento foi relativamente baixo para todos os grupos tratados estando de acordo com outros estudos (BYRNE et al., 1999; KNIJN et al., 2003). Em nosso estudo, apesar do baixo número de embriões com apoptose, todos os grupos apresentaram pelo menos um embrião com fragmentação DNA em cada repetição. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram morte em algumas células de quase todos os embriões produzidos *in vitro* (BYRNE et al., 1999; MATWEE; BETTS; KING, 2000; VAN SOOM et al., 2002). Hardy (1999) observou que acima de 80% dos embriões produzidos *in vivo* também apresentaram um ou mais núcleos fragmentados sugerindo um papel da apoptose no desenvolvimento normal.

A apoptose pode acontecer provavelmente devido às condições sub-ótimas durante o cultivo *in vitro* (SOOM et al., 2000). Alguns resultados confirmam esses estudos (BYRNE et al., 1999; WATSON et al., 2000) mostrando que as células dos blastocistos de bovinos produzidos *in vitro* sofrem apoptose. Quase 87% dos blastocistos apresentaram uma reação positiva pela técnica TUNEL em um ou mais blastômeros. Estes dados são comparáveis a outro resultado (BYRNE et al., 1999) cujos embriões foram cultivados em meio SOF sem inositol. Um índice de apoptose de cerca de 9% foi obtido com blastocistos maturados em meio TCM 199 e cultivados em meio SOF (WATSON et al., 2000).

O efeito benéfico da melatonina sobre a apoptose das células dos *cumulus* se deve provavelmente as suas propriedades antioxidante e anti-apoptóticas (REITER et al., 2004; JOU et al., 2004; JUKNAT et al., 2005). Esse efeito não foi observado nos embriões provavelmente devido ao meio de cultivo para o desenvolvimento embrionário não conter melatonina. Segundo Papis et al. (2007), após a testarem em diferentes níveis de tensão de oxigênio durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, as ações benéficas da melatonina só foram evidenciadas sob tensão de oxigênio atmosférica elevada. Esta ação foi observada no aumento da taxa de blastocisto e uma tendência clara no aumento do número de células dos blastocistos analisados. De forma interessante, foi a produção de embriões em meio de cultura contendo melatonina durante 2 dias sob alto nível de oxigênio que resultou em uma taxa de blastocisto igual aos cultivados sem melatonina com baixa tensão de oxigênio. Isto sugere que a melatonina administrada durante pouco tempo pode reverter possíveis efeitos tóxicos atribuídos aos altos níveis de oxigênio.

Dados de outros relatos sugerem que outros anti-oxidantes e/ou redutores de radicais livres foram menos eficientes do que a melatonina (FUJITANI et al., 1997; IWATA et al., 1998). De acordo com Iwata et al., (2003), o uso de alguns antioxidantes durante a aspiração de ovócitos tiveram efeitos benéficos na produção de embrião. A taurina foi descrita por inverter a alta tensão de oxigênio em embriões bovinos quando adicionada a uma fase posterior do desenvolvimento embrionário, a partir do terceiro dia (LIU; FOOTE, 1995). Em camundongos, a concentração de  $10^{-6}$  M de melatonina pode agir imediatamente e 20 h de tratamento direto com melatonina melhorou as taxas de clivagem e de blastocistos derivados de embriões cultivados sob de 5% CO<sub>2</sub> em ar (ISHIZUKA et al., 2000). Nessa experiência a utilização de melatonina 4 h após a inseminação provavelmente afetou a primeira divisão mitótica de zigotos de camundongos (NATSUYAMA et al., 1993; ISHIZUKA et al., 2000). Sabe-se que existem diferenças entre espécies no tempo do curso de transição materno–zigótica do controle genômico entre camundongos e bovinos, e relevante bloqueio do desenvolvimento observado sob certas circunstâncias *in vitro* em uma fase de duas células em embriões de rato e na fase de 8 a 16-células em bovino. A vantagem de usar a melatonina ao redor do tempo de transição do genoma materno–zigótica: 4 a 24h pós-inseminação em camundongo (ISHIZUKA et al., 2000) ou 24 a 72 hr em bovino pode influenciar na função biológica do embrião. O mecanismo fisiológico deste efeito permanece obscuro, apesar do fato de que muitos testaram que redutores de radicais livres apresentaram atividade *in vitro* ao redor deste período específico no embrião em desenvolvimento (LEGGE; SELLENS, 1991; GOTO; NODA; NARIMOTO, 1992; ISHIZUKA et al., 2000) contribuindo possivelmente para proteção de DNA e/ou mecanismos do ciclo celular (NATSUYAMA et al., 1993). A melatonina é um protetor de radical de óxido nítrico (NODA; MORI; LIBURTY, 1999) e um de seus metabólitos inibe a atividade da síntese do óxido nítrico (LEON; ESCAMES; RODRIGUES, 2006) que exerce influência sobre o consumo de oxigênio em embriões de camundongos na fase de blastocisto (MANSER; LEESE; HOUGHTON, 2004).

Apesar da adição de melatonina ter diminuído a apoptose das células do *cumulus* dos ovócitos do grupo MEL e MEL/FSH/LH, ele não influenciou na produção de embriões produzido no D-7. Os resultados recomendam o uso de melatonina nas concentrações de  $10^{-9}$  M no meio de cultura para PIV de embriões suínos, como um potente antioxidante para reduzir os radicais livres e na habilidade



da atividade anti-apoptótica. Embora o uso de  $10^{-9}$  Mm de melatonina aumentasse ambas as taxas rapidamente, o fato de que não houve diferença estatística poderiam sugerir que as concentrações fisiológicas de melatonina não podem proteger os embriões da apoptose induzida (RODRIGUEZ-OSÓRIO; KIM; WANG, 2007). Isto poderia sugerir uma atividade anti-apoptótica mais alta de melatonina na fertilização e sistema de cultura *in vitro*. O efeito positivo da melatonina no número total de células dos blastocistos foi bem evidente, o que poderia explicar o seu efeito anti-apoptótico nos blastômeros individuais (RODRIGUEZ-OSÓRIO; KIM; WANG, 2007).

## 7. CONCLUSÕES

A adição de melatonina durante o cultivo *in vitro* para maturação de ovócitos bovinos:

- Não afetou a maturação nuclear e nem a distribuição dos grânulos corticais e microtúbulos.
- Promoveu a diminuição da incidência de apoptose das células do *cumulus oophorus*, mas não foi capaz de alterar o grau de apoptose dos embriões produzidos.
- Foi capaz de suportar o desenvolvimento embrionário produzindo taxas de embriões no sétimo de cultivo *in vitro* similares as obtidas no sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões.

## 6. Referências Bibliográficas\*

ABECIA, J.A., FORCADA, F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonin on secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro* **Vet. Res. Commun**, v. 26; P. 151-158, 2002.

**Commun**, v. 26; P. 151-158, 2002.

ABBOTT, A.L.; DUCIBELLA, T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. **Front. Biosci.**; v. 6: p. d792-d806, 2001.

ADONA, P.R., et al., Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Anim. Reprod. Sci.** v. 104 389–397, 2008.

ADRIAENS, I., et al., Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, p. 333–343, 2006.

ALBERTS, B.; et al., Molecular biology of the cell, 4. ed., New York: Garland **Science**, 1463 p., 2002.

ALI A.; SIRARD M. A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation. **Biol. Reprod.**; V. 66, P. 901-905, 2002.

ALISCH, A, et al., Cumulus cell apoptosis as a predictor for oocyte quality in artificial reproduction technique. **Zentralbl. Gynakol.**; v. 125: p. 452–7, 2003.

ANDERIESZ, C.; TROUSON, A.O. The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocyte in vitro. **Human. Reprod.**; v.10, p. 2377-2381, 1995.

ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman Hall, p. 331, 1995.

\* Conforme as normas e diretrizes para apresentação de dissertação e teses na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo FZEA-USP, 2004, 72p.

ARENDR, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Rev. Reprod.** v.3, p. 13–22, 1998.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BLONDIN, P., et al., In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**. v. 47, p. 1061-1075, 1997.

BLONDIN, P., et al., Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol Reprod**; v. 66, p. 38–43, 2002.

BRACKETT, B..G.; et al. Normal development following *in vitro* fertilization in cow. **Biol. Reprod.**, p. 147-158, 1982.

BRZEZINSKI, A., et al., Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.64, p. 865-867, 1987.

BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.**; v. 43: p. 543-547, 1990.

BUCHANAN, K.L.; YELLON, S.M. Delayed puberty in the male Djungarian hamster: effect of short photoperiod or melatonin treatment on the Gn-RH neuronal system. **Neuroendocrinology**, v. 54, p. 96–102, 1991.

BYRNE, A.T., et al., Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J Reprod Fertil.** v. 117, p. 97-105, 1999.

CARNEIRO, G.F., et al., Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 63: p. 451–458, 2002a.

CARNEIRO, G.F. Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos. **Ciênc. Tecnol. Vet.**, v.2, p. 5-10, 2002b.

- CEOZT, N., AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **J. Reprod. Fertil.**; v. 103, p. 293-298, 1995.
- CHAN, W.Y., NG T.B. Development of pre-implantation mouse embryos under the influence of pineal indoles. **J. Neural Transm. Gen. Sect.**; v. 96: p. 19–29, 1994;.
- CHATTORAJ, A., et al., Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**; v. 140, p. 145–155, 2005.
- CHEN, L., RUSSELL, P.T., LARSEN, W.J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Mol. Reprod. Dev.**; v. 34: p. 87-93, 1993.
- CHERR, G., DROBNIS, E.; KATZ, D. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **J. Exp. Zool.** v. 246, p. 81–93, 1988.
- CHILD, T.J. et al., In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**; v. 76: p. 936–942, 2001.
- COMBELLES, C.M.H., et al., Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in vitro matured human oocytes. **Hum. Reprod.** v. 17, p. 1006–1016, 2002.
- CORRÊA, G. A. et al., Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Anim. Reprod. Sci.**; v. 104, p. 132–142, 2008.
- CRAN, D.G.; CHENG, W.K.T. Changes in cortical granules during porcine oocytes maturation. **Gamete Res.**, 11:311–319, 1985.
- CRAN D.G., CHENG W.K.T. The cortical reaction in pig oocytes during in vitro and in vivo fertilisation. **Gamete Res.**, v. 13: p. 241–251, 1986.
- DEKEL, N., GAKLIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonatropins at different stages of follicular development. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 517–521, 1988.

DELL'AQUILA M.E., et al., Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. **Biol. Reprod.**; v.68, p.2065-2072, 2003.

DOMINKO, T.; FIRST N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Mol. Reprod. Dev.** v. 47: p. 456–67, 1997.

DOWNS, S., SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Developmental capacity of mouse oocytes following maintenance of meiotic arrest in vitro. **Gamete Res.**, v. 15: p. 305-316 1986.

DOWNS, S.M. A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. **Zygote**; v. 9: p. 71–82, 2001.

DUCIBELLA, T, et al., Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with egg-induced modification of the zona pellucida. **Dev. Biol.**, v. 137: p. 46–55, 1990.

DUCIBELLA, T, et al., Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and *Zona Pellucida* modifications induced by Inositol 1,4,5-Trisphosphate and an activator of protein Kinase C'. **Biol. Reprod.**, v.48, p.1251-1257, 1993.

DUCIBELLA, T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. **Human. Reprod. Update** v. 2: p. 29–42, 1996.

EPPIG J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, v. 13, p. 569-574, 1991.

EPPIG, J. J.; DOWNS, S. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. **Dev. Biol.**, v. 119, p. 313-321, 1987.

FAGBOHUN, C.E.; DOWNS, S.M. Metabolic coupling and ligand stimulated meiotic maturation in the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Biol. Reprod.**; v. 45: p. 851-859, 1991.

FAIR, T., HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 42, p. 437–442, 1995.

FERNANDEZ, B., et al., Maternal pineal gland participates in prepubertal rat's ovarian oocyte development. **Anat. Rec.** v. 243: p. 461-465, 1995.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, R.A.N.; AMORIM C.A. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais MOIFOPA **Biotécnicas Aplicada a Reprodução Animal** v.1, cap. 11, p. 227-260, 2002.

FISKE, V.M., et al., Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the *in vitro* secretion of estrogens or progesterone by granulosa cells of rats. **Endocrinology** v. 114, p. 407–410, 1984.

FORTUNE J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod.**, v. 50: p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E., The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 135-63, 2003.

FRAZER, S., et al., DIRECT RADIOIMMUNOASSAY FOR MELATONIN IN PLASMA. **CLIN. CHEM.**, v. 29, p. 396-7, 1983.

FREI, R.E., SCHULTZ, G.A., CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. **J Reprod. Fertil.**; v. 86: p. 637-641, 1989.

FUJITANI, Y., et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. **J. Anim. Sci.**; v. 75: p. 483–489, 1997.

FULKA, J.R., MOTLIK J.; CROZET. N. Inhibition of nuclear maturation *in* fully grown porcine and mouse oocytes after their fusion with growing porcine oocytes. **J. Exp. Zool.** v. 235: p. 255, 1985.

FULKA, J.R., FIRST N.L.; MOOR R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4: p. 41–9, 1998.

FURNUS CC, DE MATOS DG, MOSES DF. *Cumulus* expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51: p. 76–83, 1998.

GARCIA, J.M., et al., Produção de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. **Rev. Bras. Repod. Anim.**, v.27, n.2, 2003.

GOLDMAN, B.D., et al., Physiology of pineal melatonin in three hamster species. In: Klein, D.C. (Ed.), **Melatonin Rhythm Generating System**. Karger, Basel, pp. 210–231, 1982.

GOUD, P.T., et al., *In vitro* maturation of human germinal vesicles stages oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture médium. **Human. Reprod.**; v. 13, p. 1638-1644, 1998.

GOTO, Y., NODA, Y.; NARIMOTO, K., et al. Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. **Free Rad. Biol Med**; v. 13: p. 47–53, 1992.

GRAHAM, L.H., et al., Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 61, p. 1061-1076, 2004.

GULER, A., et al., Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v.54, p. 209-218, 2000.

HAGEMANN, L. J., BEAUMONT, S. E.; BERG, M., et al. Development during sIVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 451-458, 1999.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Rev. Reprod.**; v. 4, p. 125-134, 1999.

HASHIMOTO S, et al. Effects of cumulus cell density during *in vitro* maturation of



---

the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49: p. 1451-1463, 1998.

HASHIMOTO S, et al., Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus–oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**; v. 51, p. 757–765, 1999.

HASLER, J.F. Commercial production of *in vitro*-derived bovine embryos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Supl. 24, p.117-134, 1996.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. follicular development and its effect **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000.

HINRICHS, K. Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes: A new hypothesis. **Equine Vet. J. Suppl.**, n.25, p.43-46, 1997.

HINRICHS, K., WILLIAMS, K.A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biol. Reprod.**; v.57, p.377-384, 1997.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Ver. Cytol.** v. 124, p. 43-101, 1991.

HOSOE, M. SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–376, 1997.

HOST, E., et al., Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**; v. 79: p. 936–40, 2000.

HYTTEL, P., XU, K.; GREVE, T. Ultrastructural abnormalities of *in vitro* fertilization of *in vitro* mature bovine oocytes. **Anat. Embryol.**, v. 178: p. 47–52, 1988.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 38, p. 35-47, 1989.

HYTTEL, P, et al., Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.

**Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IKEDA, S., IMAI, H., YAMADA, M. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. **Reproduction**, v.125, p. 369–376, 2003.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fert.**, v.35,p.39-54, 1987.

ISHIZUKA, B., et al., M. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **J. Pineal Res.**; v.28, p.48-51, 2000.

IWATA, H., et al. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**; v. 50: p. 365–375, 1998.

IWATA H, et al., Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. **Zygote**; v. 11: v. 1–5, 2003.

IZADYAR, F., ZEINSTRA, E.; BEVERS, M.M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51: p. 339-345, 1998.

JAHNKE, G., et al. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered Melatonin affects bovine embryo development 325 orally to pregnant Sprague–Dawley rats. **Toxicol Sci**; v. 50: p. 271–279, 1999.

JEWGENOW, K., HEERDEGEN, B.; MULLER, K. *In vitro* development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. **Theriogenology**; v. 51, p. 745-756, 1999.

JOU, M.J., et al., Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. **J. Pineal Res.**; v. 37: p. 55–70, 2004.

- JUKNAT, A.A., et al. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. **J. Pineal Res.**; v. 38: p. 84–92, 2005.
- KIM, N.H., et al., Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilization in the porcine oocyte. **Zygote** v. 4: p. 145– 149, 1996a.
- KIM, N.H., et al., The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote** v. 8, (February), p. 25-32, 2000.
- KNIJN, H.M., et al., Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biol. Reprod.** v. 69: p. 1371-1378, 2003.
- KRUIP, T., et al., Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gamete Res.** v. 8, p. 29-47, 1983.
- LEE, C. S., KOO, D.B.; FANG, N., et al. Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**; v. 57: p. 48–54, 2000.
- LEGGE, M.; SELLENS, M.H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture **Hum. Reprod**; v. 6: p. 867–871, 1991.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., et al., Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** v. 36, p. 376-383, 1987.
- LEON, J., et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, brain metabolite of melatonin. **J. Neurochem.**; v. 98: p. 2023–2033, 2006.
- LIN, L., LEE, C., MOOR, R.M. DNA synthesis, microtubule and nuclear dynamics in porcine parthenotes. **Zygote**, v.4, p.139-144, 1996.
- LIU, Z.; FOOTE R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. **Biol. Reprod.**; v. 53: p. 786–790, 1995.

---

LONERGAN, P., et al., Effect of follicles size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.** v. 37, p. 48-53, 1994.

LONERGAN, P., et al., Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and perimplantation embryo development *in vitro*. **Biol. Reprod.** v.54, p.1420-29, 1996.

LUCIANO, A. M., et al., Effect of different levels of intracellular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. **Mol. Reprod. Develop.**; v. 54, p. 86-91, 1999.

MAHAL, H.S., SHARMA, H.S.; MUKHERJEE, T. Antioxidant properties of melatonin: a pulse of radiolysis study. **Free Radic. Biol. Med.**; v. 26: p. 557–565, 1999.

MALPAUX, B., et al., Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.109-117, 1997.

MANSER, R.C., LEESE H.J.; HOUGHTON F.D. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. **Biol Reprod**; v. 71: p. 528–533, 2004.

MATSUMOTO, K., et al., Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) may enhance the survival of granulosa cells thus indirectly affecting oocyte survival. **Mol. Reprod. Dev.**; v. 54: p. 103–111, 1999.

MATWEE, C., BETTS, D.H.; KING W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote** v. 8, p. 57-68, 2000.

MCELHINNY, A.S., DAVIS, F.C.; WARNER, C.M. The effect of melatonin on cleavage rate of C57BL/6 and CBA/Ca preimplantation embryos cultured *in vitro*. **J. Pineal Res**; v. 21: p. 44–48, 1996.

MESSINGER, S.M.; ALBERTINI, D.F. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. **J. Cell. Sci.**, v. 100, p. 289-298, 1991.

---

MILOVANOV, C.; SIRARD, M.A. Manipulation of chromossome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.41, p.819-827, 1994.

MOORE, K. et al., In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology** ; v. 68, p. 1316–1325, 2007.

MOTLIK, J., et al., Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro. **J. Exp. Zool.** v. 205: p. 377-383, 1978.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. **Theriogenology**, v. 25, p. 87-96, 1986a.

MOTLIK, J., FULKA, J., FLECHON, J.E. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. **J. Reprod Fertil.** v. 76, p. 31-37, 1986b.

MOTLIK, J. Cytoplasmatic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **J. Reprod. Fertil.**; v. 38, p. 17-25, 1989.

MOTLIK, J.; KUBELKA, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.27, p. 366-375, 1990.

NA, K., et al., Effect of melatonin on the maturation of mouse GV oocytes and apoptosis of *cumulus* cells *in vitro*. **Fertility & Sterility**, p. 0-249, 2005.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

NATSUYAMA, S., NODA, Y.; YAMASHITA, M. et al. Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block. **Biochimica and Biophysica Acta**; v. 1176: p. 90–94, 1993.

NIIMURA, S; HOSOE, M. Changes in cortical granule distribution within bovine oocytes during maturation and fertilization *in vitro*. **J. Reprod. Dev.**, v. 30: p. 493–497, 1995.

NODA, Y., MORI, A.; LIBURTY, R. et al. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J. Pineal Res.**; v. 27: p. 159– 163, 1999.

PAPIS, K., et al., A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **J. Pineal Res.**; v. 43: p. 321–326, 2007.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.193-210, 2001.

POCAR P., et al Apoptosis in bovine cumulus–oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during *in vitro* maturation. **Reproduction**; v. 130, p. 857-868, 2005.

RANKIN, T., SOYAL, S.; DEAN, J., The mouse zona pellucid: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. **Mol. Cel. End.**, v.163, p. 21-25, 2000.

REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **End. Rev.**, v.12, p.151-180, 1991.

REITER, R., et al., Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. **Pol. J. Pharmacol.**; v. 56, p. 159–170, 2004.

RIBELAYGA, C.; et al., Drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **Am. J. Physiol.**, v. 278, p.R1339-R1345, 2000.

RIZOS, D., et al., Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev.**, v. 61: p. 234–48, 2002.

ROBERTS, R., FRANKS, S.; HARDY, K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. **Hum.Reprod.**; v.17: p. 2950–2956, 2002.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine *cumulus* oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v. 61, p. 1499–1511, 2004.

RODRIGUEZ-OSÓRIO, N., KIM, I.J.; WANG, H., et al., Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. **J. Pineal Res.**; v. 43: p. 283–288, 2007.

SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. Ultrastructure of cortical granules release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized *in vitro*. **Gamete Res.**, v. 6: p. 225–234, 1982.

SATO, E., MATSUO, M.; MIYAMOTO, H. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3,5'-monophosphate' **J. Anim. Sci.** v. 68, p. 1182-1187, 1990.

SCHMELL, E.D., GULYAS, B.J.; HEDRICK, J.L. Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to poly spermy. In: Hartmann JF, editor. Mechanism and control of animal fertilization. New York: Academic Press. pp 365–413, **Reprod. Dev.**, v. 59: p. 192–198, 1983.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells, a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol. Hum. Reprod.**; v. 8: p. 612–618, 2002.

SIRARD, M.A., COENEN, K., BILODEAU, S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.39-57, 1992.

SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v. 42, p. 417-426, 1996.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SIROTKIN, A.V.; SCHAEFFER, H-J. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. **J. Endocrinol.**, v. 154, p. 1-5, 1997.

SIU AW, et al. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. **J. Pineal Res.**; v. 40: p. 101–109, 2006.

SOOM, A.V. et al., Apoptosis in in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**; v. 53: p. 367, 2000.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **User's guide**; Release 8.02 ed. Cary: SAS Institute, 1686p., 1995.

SÜSS, U., WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes maturation *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.38, p.871-880, 1988.

SUTTON, M.L., GILCHRIST, B.; THOMPSON, G. Effects of in-vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum. Reprod. Update**; v. 9: p. 35–48, 2003.

SZOLTYS, M., TABAROWSKI, Z., PAWLIK, A. Apoptosis of postovulatory cumulus granulosa cells of the rat. **Anat. Embryol.** (Berl); v. 202: p. 523–529, 2000.

TAKAHASHI, M. et al., Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**; v. 54, p. 137–145, 2000.

TAKAHASHI, M., NAGAI, T.; OKAMURA, N., et al. Promoting effect of b-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol Reprod.**; v. 6: p. 562–567, 2002.

TAKASAKI, H. et al., Melatonin is a new drug for improving oocyte quality. **Reprod. Med. Biol.**; v. 2, p. 139-144, 2003.

TAN, D.X., CHEN, L.D.; POEGELLER, B. et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine J.**; v. 1:, p. 57–60, 1993

TANGHE S. et al., Minireview: function of the cumulus ophorous during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Mol. Reprod. Dev.**; v. 61: p. 414-424, 2002.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Rev. Reprod.**; v. 1, p. 162–172, 1996.



---

THOMPSON, J.G., et al., Effect of glucose level in culture medium on survival of *in vitro* cultured sheep embryos following transfer to recipient ewes. **Proc. NZ Soc. Anim. Prod.**, v. 52, p. 255-256, 1992a.

THOMPSON, J.G., et al., Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 253-257, 1992b.

TSAFRIRI A, et al., Capacity of immunologically purified FSH to stimulate cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in Graafian follicles and to induce ovum maturation and ovulation in the rat. **Endocrinology**; v. 98, p. 655-61, 1976.

VAN DEN HURK R., BEVERS M.M., BECKERS J.F. *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VANDERHYDEN B.C.; TELFER, E.E.; EPPIG, J.J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cell from preantral and antral follicles *in vitro*. **Biol. Reprod.** v. 46: p. 1196-204, 1992.

VANDERHYDEN B.C.; TONARY A.M. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. **Biol. Reprod.**; 53:1243-1250 1995.

VAN SOOM A., et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology**; v. 57: p. 1453-1465, 2002.

Van TOL H.T., et AL., Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45: p. 218-224, 1996.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordials follicles and their environment *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v..55, p. 1003-1011, 1996.

VERLHAC, M.H. et al., Microtubule and o chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocyte. **Development.** v.120: p. 1017-1025, 1994.

VELILLA, E. et al., Distribution of puerbertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study, **Mol. Reprod. Dev.**, v. 68: p. 507-514, 2004.

VIGNOLA, A.H.; PRADO, A.; VALENTE, A. Técnicas de coloração cromossômica para estádios específicos da maturação nuclear de ovócitos bovinos. **Ciê. Rural**, v.24, p.583-589, 1994.

VISVARDIS, E.E., TASSIOU, A.M.; PIPERAKIS, S.M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, v. 383, p. 71–80, 1997.

WANG, W.H., et al., Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. **Biol. Reprod.**, v. 56: p 1376–1382, 1997.

WANG, W.H.; DAY, B.N.; WU, G.M. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Micr. Res. Techn.**, v. 61(6-7): p. 335-41, 2003.

WARRIACH, M.; CHOCHAN K.R. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. **J. Vet. Sci.**; v. 5 (3): p. 247-51, 2004.

WATSON, A.J., et al., Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biol. Reprod.**; v. 62: p. 355-364, 2000.

WEBB, R, et al., Molecular mechanisms regulation follicular recruitment and selection. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.54, p.33-48, 1999.

WEBLEY, G.E.; LUCK, M.R.; HEARN, J.P. Stimulation of progesterone secretion by cultured human granulosa cells with melatonin and catecholamines. **J. Reprod. Fert.**, v.84, p. 669-677, 1988.

WOO, M.M.M. et al., Direct action of melatonin in human granulosa luteal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**; v.86, p. 4789–4797, 2001.

---

Xia G.L. et al., Short time priming of pig cumulus-oocyte complexes with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulates cumulus cells to secrete a meiosis-activating substance. **Theriogenology**; v. 53: p. 1807–1815, 2000.

YANG Y., et AL., Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. **Science**; v. 288: p. 874–877, 2000.

YIE, S., NILES, L.; YOUNGLAI, E., Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 80, p. 1747–1749, 1995a.

YIE, S.M. et al., Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: Seasonal variations and granulosa cell steroid production. **Human Reprod.**, v.10, p.50-55, 1995b.

YOO, Y.M. et al., Melatonin suppresses NO-induced apoptosis via induction of Bcl-2 expression in PGT-beta immortalized pineal cells. **J. Pineal Res.**; v. 33: p. 146–150, 2002.

YU, Q., MILLER; SCOSMOND, D.G. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. **J. Pineal Res.**; v. 29: p. 86–93, 2000.

Zhang L., et AL., Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**; v. 40: p. 338–44, 1995.

## Anexos

<b>Anexo 1 Solução de Percoll 90%</b>			
<b>Componentes</b>	<b>1/2 receita (1 touros)</b>	<b>volume</b>	
Percoll Amersham B./17-0891-01		1,8 ml	
Solução 10 X		200 µL	
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		4 µL	
MgCl <sub>2</sub> -6 H <sub>2</sub> O		7,8 µL	
Acido Láctico		7,4 µL	
NaHCO <sub>3</sub>		0,0042 µL	

<b>Anexo 2 Solução de Percoll 45 %</b>			
<b>Componentes</b>	<b>1</b>	<b>volume</b>	
Percoll 90% (anexo 16)		500 µL	
TL-sêmen (anexo 14)		500 µL	

<b>Anexo 3 Meio TL-Stock e TL- sêmen</b>			
<b>Componentes</b>	<b>TL –Stock</b>	<b>TL-sêmen</b>	
Volume	100 mL	100 mL	
Água Milli Q	100 mL	100 mL	
NaCL Sigma/S-9625	666 mg	582 mg	
KCL Merck 74,56	24 mg	23 mg	
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	10 mg	8,0 mg	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sigma/S-5515	4,1 mg	3,5 mg	
NaHCO <sub>3</sub>	210 mg	210 mg	
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	30 mg	30 mg	
Acido láctico Sigma/P-5280	143 µL	310 µL	
Phenol Red Sigma P-5530	1 mg	1 mg	
Hepes ácido		238 mg	

<b>Anexo 4 Meio FIV-gotas</b>	
<b>Componentes</b>	<b>1/2 receita (2 touros)</b>
TL stock (anexo 3)	3,6 mL
Gentamicina	20 µL
Piruvato	8 µL
PHE final	160 µL
Heparina	40 µL
BSA Sigma A-6003	0,024 µL

<b>Anexo 5 Meio PHE</b>	
<b>Componentes</b>	<b>volume</b>
Sol. salina 0,9%	4,0 mL
Penicilamina	2,5 mL
Hipotaurina	2,5 mL
Epinefrina	2,0 mL

<b>Anexo 6 Meio SOF</b>					
<b>Componentes</b>	<b>Solução A</b>	<b>Solução B</b>	<b>Solução C</b>	<b>Solução D</b>	<b>L-</b>
	<b>Sódio 10 x</b>	<b>Bicarbonato</b>	<b>Piruvato</b>	<b>Cloreto de Ca</b>	<b>Glutamina</b>
Água Milli Q	9,84 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 ML
NaCL	0,629 g	-	-	-	-
KCL	0,0534 g	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0162 g	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,0182 g	-	-	-	-
Acido lático	60 µL	-	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>		0,210 g	-	-	-
Phenol Red		0,001 g	-	-	-
Acido piruvico		-	0,110 g	-	-
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O		-	-	0,262 g	-
L-Glutamina		-	-	-	0,2923g