

Samir Saldanha Nicolau

**Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos
frescos e criopreservados produzidos *in vitro***



São Paulo

2012

Samir Saldanha Nicolau

Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos
frescos e criopreservados produzidos *in vitro*

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof. Dra. Mayra Elena Ortiz
D'Ávila Assumpção

São Paulo
2012

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

ef
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
31/5/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2588
FMVZ

Samir Saldanha Nicolau

Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro* / Samir Saldanha Nicolau. -- 2012.

100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Apoptose. 3. Cotômetria de capilar.
4. TBARS. 5. Vitrificação. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro*", protocolado sob o nº 2430/2011, utilizando ovários de bovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Mayra Elena D'Avila Ortiz Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Evaluation of melatonin antioxidant properties upon fresh and cryopreserved *in vitro* produced bovine embryos", protocol number 2430/2011, utilizing ovaries of cattle, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena D'Avila Ortiz Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NICOLAU, Samir Saldanha

Título: Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro*

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Desejo ser

*o fazendeiro sortudo que cava,
não para encontrar ouro,
mas para plantar idéias.*

o homem que não fica sem a carne

a raposa que observa a vida

o rato, que decidiu tentar colocar o sino no gato.

o garoto com as mãos cheias, de letras

o corvo sedento, de saber

a arvore, que oculta algo valioso

o leão forte e o criativo homem.

Eu quero vencer com a persuasão do Sol

À minha avó Ilva Gomes.
Aos meus pais, irmãs e avó
Jaqueline.

*“Isso meu filho, você também
conseguirá, estude com afinco. Vá
sem medo, assim como eu fui para
o Rio de Janeiro e consegui,
estude, mostre para todos que
você é competente”*

Ilva Gomes, vovó

Para fazer a terceira geração
de mestres

The Farmer and Fortune

A farmer was ploughing one day in his farm when he turned up a pot of golden coins with his plough. He was overjoyed at his discovery and from that time forth made an offering daily at the shrine of the Goddess of the Earth. Fortune was displeased at this and came to him and said,

‘My man, why do you give Earth the credit for the gift which I bestowed upon you? You never thought of thanking me for your good luck. But should you be unlucky enough to lose what you have gained, I know very well that I, Fortune, should then come in for all the blame.’

Show gratitude were gratitude is due.

Esopo

Agradecimientos

Agradecimentos

Aos meus Pais Antônio José Hiluy Nicolau e Lídia Saldanha Nicolau pelo amor, apoio e carinho, por me impulsionar, me impedir de recuar.

As minhas irmãs Sâmia e Samira Nicolau, pelo amor, carinho, apoio e companheirismo.

A Doutora Camilla M. Mendes. Ca, te agradeço imensamente, não somente pelas inúmeras vezes em que você ficou comigo no fluxo, nas quais os oócitos, de 300 passaram a 500, e na metade do tempo. Não somente pelos sábados, ou pelos dias em que fiz a Laurinha ficar pedindo pra ir pra casa, e você me ajudando a resolver os meus problemas. Principalmente, minha amiga, te agradeço pelas inúmeras vezes em que você apoiou a mão em meu ombro e disse: “Calma, tudo vai dar certo.” Este carinho, apoio, amizade, companheirismo levo pra sempre, jamais esquecerei.

As amigas sempre presentes, Ana Paula Chaves Araújo, Renata Koblitz, Lílian M. Diaz Kirsh e Kiky.

Aos colegas dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal: Adriano Felipe Siqueira, Fernanda Sevciuc Maria, Flavia Regina Barros, Giana Carla Saurin Pimentel, Jéssica Ispada, Julia Maria Baldrighi, Juliana de Carvalho Delgado, Letícia Signori de Castro, Marcia Monteiro, Mariana Ianello Giassetti, Mariana Groke Marques, Mariana Ramos Queiroz, Patrícia Monken de Assis, Pedro Henrique Bugallo Risolia, Renata Simões, Rafaela Sanches, Robinson Worst, Thaís Rose dos Santos Hamilton, agradeço pelo companheirismo, os momentos bons, alegres, os que deixam saudade.

Em especial à Letícia Signori de Castro, Patrícia Monken de Assis e Juliana de Carvalho Delgado espero ter passado a vocês um pouco da minha experiência. À Rafaela Sanches pela indispensável ajuda com o ensaio de TUNEL. E a Thaís Rose dos Santos Hamilton, por “parar de rodar a força do teste” e me ajudar a entender um pouco da estatística.

Aos demais colegas do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As amigas de graduação Giovanna Rocha, Maria Eugenia Carreteiro, Thaís Granato, Cinthia Midori Kaminishi Kawahara e Marina Herrfeld.

Tias e tios Yvone, Yeda, Márcia, Flávia, Violeta, Dmitri, Reinaldo, Roberto, a prima Marina, minha família aqui em São Paulo.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA) por todos os ensinamentos. Em especial a minha mentora e amiga Professora Doutora Anneliese de Souza Traldi.

À Professora Doutora Valquíria Hyppolito Barnabe pelo uso do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP para as dosagens de TBARS.

Ao Doutor Marcílio Nichi pela inestimável ajuda nas dosagens de TBARS e sua interpretação.

Aos funcionários do VRA, Dona Silvia e Dona Sandra, Irailton (Ira), Miguel, Luis, Belau, Jocimar, Thaís, Alice, Anderson, Roberta e Priscila, e em especial a Harumi por toda a paciência com que me ajudou a vencer as burocracias da pós graduação.

A todos os funcionários da biblioteca, principalmente a Elza Faquim.

Ao Frigorífico Angelelli (Piracicaba-SP), pelos ovários cedidos para este experimento.

Agradezco a Pepín y Adriana por los protocolos de dilución de la melatonina. Al Doctor Ramiro por traer los medios KSOM para estos estudios, sin los cuales jamás tendría concluido todo.

A CAPES pelo apoio financeiro, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) a instituição imaterial que todos nós passamos a chamar de casa, defender e amar ao longo dos anos, que na realidade refere-se ao espírito de companheirismo, respeito, carinho e amizade que predomina no local.

À minha orientadora Professora Doutora Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção. “Ma”, “Chefa”, você é uma amiga incrível, profissional excepcional e orientadora fantástica. Entre nós muito já foi dito, na verdade falei até demais, infelizmente o poeta estava certo, a palavra dita é como flecha disparada, fere e não se pode voltar atrás, se pudesse o faria. Mas

algumas coisas, as que são realmente importantes, precisam ser repetidas sempre:

Embora não vá permanecer em São Paulo, estarei sempre ao seu lado, afinal, o Maranhão é aqui do lado.

Sempre lembrarei de nossas conversas, brincadeiras, momentos de confidências, seus conselhos e principalmente seu exemplo de **coerência, dignidade e bondade**.

Muito obrigado pelo exemplo e pela oportunidade. Estar aqui foi realizar um sonho, trabalhar com **você**, a professora que dá **as** aulas, com quem eu concordo em gênero número e grau, não em concordância cega, porque é você que fala, mas simplesmente porque você está certa.

Conte sempre comigo e lembre-se do que sempre dissemos um ao outro: "se algum dia duvidar de si, se veja com meus olhos". Já te prometi que farei o mesmo.

The Rose and the Amaranth

A Rose and an Amaranth blossomed side by side in a garden, and the Amaranth said to her neighbor, "How I envy you your beauty and your sweet scent! No wonder you are such a universal favorite." But the Rose replied with a shade of sadness in her voice, "Ah, my dear friend, I bloom but for a time: my petals soon wither and fall, and then I die. But your flowers never fade, even if they are cut; for they are everlasting."

"Greatness carries its own penalties."

Esopo

Testemunhei a tua grandeza e o preço que pagas. Fazes inveja para as rosas e para os amarantos, tua grandeza dura para sempre e vai além da efêmera beleza, se constitui de dignidade e amor.

Dignidade e amor são eternos.

RESUMO

NICOLAU, S. S. **Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro***. [Evaluation of melatonin antioxidant properties upon fresh and cryopreserved *in vitro* produced bovine embryos]. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2012

Este estudo objetivou avaliar os efeitos da melatonina sobre a qualidade e as taxas de blastocistos bovinos PIV. A melatonina é um poderoso eliminador de radicais livres e tem efeitos benéficos na PIV de algumas espécies. Foram feitas sessões de PIV (n=12), sendo aspirados os folículos (2 a 7 mm) de ovários obtidos de abatedouro. Complexos cumulus oócito (COCs) que apresentavam cumulus compacto e oócito com citoplasma homogêneo foram selecionados e randomicamente distribuídos entre os grupos controle (GC) e tratado com Melatonina (GM). Submetidos a MIV por 22h em 400µl de TCM199(Dia-1). Para a FIV COCs foram transferidos para 400µl de meio de fertilização, inseminado com sêmen descongelado previamente submetido ao gradiente descontínuo de Percoll[®], e incubados por 18h (dia0). As células do cumulus dos presumíveis zigotos foram removidas com hialuronidase e pipetagem sucessiva, sendo então cultivados (CIV) em 400µl de KSOM- BSA (Dia 1). No Dia 3, foi avaliada a taxa de clivagem em estereomicroscópio e adicionados 400µl KSOM-20% SFB. No Dia 5, 200µl de meio foram removidos e 400µl KSOM-10% SFB adicionado. No dia 7 foi avaliado o estágio de desenvolvimento dos embriões, e as porcentagens calculadas em relação ao total de presumíveis zigotos. Todos os procedimentos foram realizados em placa de 4 poços (Nunc Multidishes[®]) sem cobertura de óleo mineral Na MIV e no CIV, os grupos receberam ou 0ng/ml ou 50ng/ml de melatonina, GC e GM, respectivamente. No Dia 7, de 4 sessões de PIV, todos os blastocistos expandidos foram corados com Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342. Os demais blastocistos expandidos, das outras sessões, foram vitrificados, assim como todos os presentes no Dia 8. Uma amostra deste meio foi retirada para avaliação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Posteriormente os embriões foram descongelados e cultivados para a avaliação do efeito da melatonina sobre

os embriões no cultivo pós-descongelamento. A análise estatística foi feita usando SAS system for Windows 9.2[®]. Dados paramétricos foram submetidos ao teste T de Student e os não paramétricos ao Wilcoxon, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Blastocistos expandidos do GM apresentaram maior número de células, sendo que estas apresentaram porcentagem menor de ruptura de membrana que os do GC. A melatonina não influenciou as taxas de clivagem, de blastocistos no Dia 7 nem a taxa de blastocistos passíveis de vitrificação. Não foi observado efeito da melatonina sobre a tolerância dos embriões à vitrificação nem no período de cultivo após o descongelamento. Inesperadamente, a melatonina aumentou a concentração de TBARS no meio. A melatonina melhorou a qualidade embrionária, contudo suas propriedades antioxidantes não foram evidenciadas.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; Apoptose; Cotômetria de capilar; TBARS; Vitrificação

ABSTRACT

NICOLAU, S. S. **Evaluation of melatonin antioxidant properties upon fresh and cryopreserved *in vitro* produced bovine embryos.** [Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos *in vitro*]. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2012

This aimed to evaluate melatonin effect over bovine embryo quality and rates on *in vitro* embryo production procedures (IVP). Melatonin is an effective free radical scavenger and beneficial effects of melatonin have been demonstrated in IVP for some species. Embryo production sessions (12) were performed; follicles (2 to 7 mm) were aspirated from slaughterhouse-derived ovaries. Cumulus–oocyte complexes (COCs) who had a compact cumulus and oocyte with homogeneous cytoplasm were selected and randomly allocated (35 to 55 per group) on either control Group (CG) or Melatonin Treatment Group (MG). COC's underwent *in vitro* maturation (IVM) for 22 hours in 400µl of TCM199 (Day -1). For *in vitro* fertilization (IVF) COC's were moved to fertilization medium 400µl and were inseminated with previously submitted to discontinuous Percoll™ gradient, frozen–thawed semen, incubated for 18 hours (Day 0). After IVF presumptive zygotes were striped from remaining cumulus cells by incubation with hyaluronidase and gentle pipetting, then moved to 400µl of KSOM- BSA (Day 1). On Day 3 embryos were inspected under a stereomicroscope to evaluate cleavage rate, and 400µl KSOM-20% FCS was added. On Day 5 200µl of medium were removed and 400µl KSOM-10% FCS was added. On Day 7 embryos were evaluated regarding their developmental stage, percentages (%) were calculated over the total of presumptive zygotes, expanded blastocysts were vitrified. All procedures were performed on a Nunc Multidishes™ 4 well dish without mineral oil overlay. During IVM and IVC groups received either 0ng/ml or 50 ng/ml of melatonin, CG and MG respectively. On Day 7 out of 4 replicates all expanded blastocysts were dyed with Propidium Iodide and Hoechst. Remaining expanded blastocysts as well as all the expanded blastocysts on Day 8 were vitrified. A medium sample was withdrawn for thiobarbituric acid assay (TBARS). Latter embryos were thawed and cultured aiming to evaluate

melatonin effect over cryotolerance and post thaw culture system. Statistical analysis was performed using SAS system for Windows 9.2™ parametric data was submitted to student T-test and non parametric to Wilcoxon. Differences were considered meaningful when $p < 0,05$. Expanded blastocysts from MG presented more cells and less cells with ruptured membrane than the ones from CG. But melatonin treatment neither influenced cleavage nor Blastocyst rates on Day 7, nor the rate of blastocysts that can be vitrified. Neither over embryos cryotolerance nor over post thaw culture system. Unexpectedly melatonin increased TBARS levels on medium. Melatonin improves bovine embryo quality however its antioxidant properties were not demonstrated.

Keywords: Reactive oxygen species; Apoptosis; Capillary cytometry; TBARS; Vitrification.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	21
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	23
2.2.1	Vitrificação de embriões	25
2.2.2	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões após a vitrificação	25
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	26
2.3.1	Uso de antioxidantes nos sistemas de produção <i>in vitro</i> de embriões e no cultivo após a vitrificação	27
2.4	MELATONINA	28
2.4.1	A melatonina como antioxidante	29
2.4.2	Uso da melatonina na produção <i>in vitro</i> de embriões	30
3	HIPÓTESE	32
4	OBJETIVOS	34
5	MATERIAL E MÉTODO	36
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
5.2	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMMULUS APÓS A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
5.2.1	Obtenção dos oócitos	38
5.2.2	Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	38
5.2.3	Avaliação da viabilidade das células do cummulus	39
5.2.4	Avaliação do potencial de membrana das mitocôndrias	39
5.2.5	Avaliação da viabilidade celular e do estresse oxidativo	40
5.2.6	Avaliação do Ciclo Celular	40
5.3	EXPERIMENTO 2: PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	41
5.3.1	Obtenção dos oócitos	42
5.3.2	Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos (MIV)	42
5.3.3	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	42
5.3.4	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV)	43
5.3.5	Avaliação do número de blastômeros total e viáveis dos embriões	44
5.4	VITRIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES	45
5.5	DESCONGELAÇÃO DOS EMBRIÕES	46
5.6	EXPERIMENTO 3: EFEITO DA MELATONINA NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> APÓS A DESCONGELAÇÃO	46
5.6.1	Avaliação do número de blastômeros total e viáveis dos embriões após a descongelação	47
5.6.2	Ensaio de TUNEL dos embriões	47

5.7	Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6	RESULTADOS	53
6.1	AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS	53
6.2	AVALIAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	54
6.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA QUALIDADE DOS EMBRIÕES	55
6.4	NÚMERO DE BLASTOCISTOS PASSÍVEIS DE VITRIFICAÇÃO	57
6.5	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	58
6.6	CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS DO CULTIVO E TBARS	59
6.7	REEXPANSÃO E ECLOSÃO DOS BLASTOCISTOS NO CULTIVO APÓS A DESCONGELAÇÃO	59
6.8	ENSAIO DE TUNEL	61
6.9	VIABILIDADE CELULAR E NÚMERO TOTAL DE BLASTÔMEROS DOS EMBRIÕES APÓS 48 HORAS DE CULTIVO PÓS-DESCONGELAÇÃO	64
7	DISCUSSÃO	67
8	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76
	Anexos 84	
	Apêndices	93

The Oxen and the Butchers

Once upon a time the oxen determined to be revenged upon the butchers for the havoc they wrought in their ranks, and plotted to put them to death on a given day. They were all gathered together discussing how best carry out the plan, and the more violent of them were engaged in sharpening their horns for the fray, when an old ox got up upon his feet and said, 'My brothers, you have good reason, I know, to have these butchers, but, at any rate, they understand their trade and do what they have to do without causing unnecessary pain. But if we kill them, others, who have no experience, will be set to slaughter us, and will by their bungling inflict great sufferings upon us. For you may be sure that even though all the butchers perish, mankind will never go without their beef.'

Esopo

1 INTRODUÇÃO

O termo produção *in vitro* de embriões (PIV) é geralmente usado para denominar os procedimentos laboratoriais que incluem a maturação, a fecundação e as etapas do cultivo embrionário, necessárias para produzir embriões *in vitro*, a partir de oócitos imaturos. No Brasil, esta técnica é amplamente usada na espécie bovina, sendo que mais de 255.000 embriões foram produzidos em 2009, o que representa 85,8% do total de embriões produzidos no país (VIANA et al., 2010).

A criopreservação é a principal técnica para o armazenamento de embriões viáveis por longos períodos, o que viabiliza a formação de bancos de material genético (DOBRINSKY, 2002; TSANG; CHOW, 2010). Além de viabilizar a difusão de material genético superior, possibilita o transporte local ou global dos embriões (DOBRINSKY, 2002).

Dentre as técnicas de criopreservação de embriões, destaca-se a vitrificação. Processo no qual ocorre a solidificação, amorfa e livre de cristais, das soluções crioprotetoras (VAJTA, 2010). Dentre as vantagens do uso da vitrificação em comparação com outras técnicas de criopreservação de embriões está a redução de custos com equipamentos, a menor necessidade de capacitação da mão de obra e a maior praticidade do método (WAGTENDONK-DE LEEUW, VAN et al., 1997).

Contudo, o atual estado de desenvolvimento destas biotecnologias dista do ideal, em cada sessão de aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (ovum pick-up; OPU) são obtidos em média 19,9 complexos *cumulus oophorus* (COCs) que uma vez submetidos à PIV, resultam em 35,4% de embriões, que, quando transferidos, apenas 38,5% destes resultam em gestação (VIANA et al., 2010). Embriões produzidos *in vitro* ainda são menos tolerantes ao processo de vitrificação (RIZOS, et al., 2001), que quando

transferidos geram menos prenhezês que embriões PIV não criopreservados (STEWART et al., 2011).

Após a criopreservação, os embriões são mais suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo, resultando em peroxidação lipídica e danos às membranas celulares (KITAGAWA et al., 2004). O estresse oxidativo em níveis patológicos incapacita o desenvolvimento *in vitro* de embriões de mamíferos. Alguns estudos já demonstraram o efeito benéfico da adição de agentes antioxidantes aos meios de PIV (FEUGANG et al., 2004; HOSSEINI et al., 2009).

A melatonina e seus metabólitos são poderosos agentes antioxidantes, e quando adicionados aos sistemas *in vitro* de produção, protegem os oócitos humanos, murinos, (TAMURA et al., 2008), suínos (KANG et al., 2009) e bovinos (EL-RAEY et al., 2011; PAPIS et al., 2007; TAKADA et al., 2012) e os embriões suínos (CHOI et al., 2008), murinos (ISHIZUKA et al., 2000) e bubalinos (MANJUNATHA et al., 2009) dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio.

Efeitos benéficos do uso da melatonina foram descritos na PIV de embriões bovinos (PAPIS et al., 2007), e também quando acrescentada ao meio de cultivo após a descongelação em embriões ovinos vitrificados (ABECIA et al., 2002). Tendo em vista as valiosas propriedades da melatonina, destaca-se a importância de estudos *in vitro* e clínicos da utilização da melatonina, em especial na reprodução assistida (ANISIMOV, 2003; ANISIMOV, et al., 2006; REITER, et al., 2009). Assim este trabalho buscou estudar os efeitos da melatonina nas etapas de PIV de embriões bovinos e em seu cultivo *in vitro* após a vitrificação e descongelamento.

The Lion, the Fox and the Ass

*A lion, a fox and an ass went out hunting together. They had soon taken a large booty, with the lion requested ass to divide between them. The ass divided it all into three equal parts, and modestly begged the others to take their choice; at which the lion bursting with fury, sprang upon the ass and tore him to pieces. Then, glaring at the fox, he bade him make a fresh division. The fox gathered almost the whole in one great heap for the lions share, leaving only the smallest possible morsel for himself. 'My dear friend', said the lion, 'how did you get the knack of it so well?' The fox replied, 'Me? Oh, I took a lesson from the ass'.
Happy is he who learns from the misfortunes of others.*

*Esopo***Revisão de Literatura**

2 REVISÃO DE LITERATURA

Bioteχνologias da reprodução são ferramentas para aumentar o número de crias de animais geneticamente superiores. Dentre as bioteχνologias aplicadas comercialmente para a espécie bovina no Brasil destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIV) (VIANA et al., 2010).

No ano de 2008 foram produzidos, no Brasil, 289.952 embriões bovinos, o que representou 26,9% dos embriões produzidos no mundo (VIANA et al., 2010). Em se tratando de embriões produzidos *in vitro*, o Brasil é o líder mundial, em 2008 os 220,425 embriões PIV no país representaram 66% do total mundial.

Entre as vantagens desta técnica destacam-se a maximização do uso do sêmen (FABER et al., 2003) e a obtenção de maior progênie das fêmeas no mesmo espaço de tempo (PONTES et al., 2009). Contudo, a PIV ainda é uma bioteχνologia considerada de baixa eficiência (VIANA et al., 2010), pois os sistemas são sub-ótimos (RIZOS 2002; FAIR; et al., 2002).

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Após o nascimento de Louise Brown, o primeiro bebe derivado de fecundação *in vitro*, em 1978, não tardou para a técnica ser aplicada a espécie bovina (WAGTENDONK-DE LEEUW, et al., 2006), e em 1981 nasceu Virgil o primeiro bezerro derivado de fecundação *in vitro* (BRACKETT et al., 1982). Estes foram produzidos a partir de oócitos maturados *in vivo*, recolhidos via percutânea na mulher e cirurgicamente na vaca, fecundados *in vitro* e transferidos no estágio de 4 células.

Muitos foram os avanços tecnológicos descritos que permitiram atingir o atual estado de desenvolvimento desta tecnologia, que hoje, pode ser considerada uma tecnologia madura (WAGTENDONK-DE LEEUW, et al.,

2006). Atualmente, em programas comerciais no Brasil, oócitos imaturos são obtidos por aspiração folicular guiado por ultrassonografia transvaginal (ovum pick-up; OPU), maturados, fecundados e cultivados *in vitro* podendo ser mantidos em cultivo até o estágio de blastocisto expandido, quando são transferidos individualmente para receptoras (PONTES et al., 2009; VIANA et al., 2010; WAGTENDONK-DE LEEUW, et al., 2006).

Embora possa ser considerada uma tecnologia madura, a PIV ainda é considerada de baixa eficiência (VIANA et al., 2010). Embriões PIV resultam em menor taxa de prenhez (33,52%) do que embriões produzidos *in vivo* (41,52%) derivados das mesmas doadoras (PONTES et al., 2009). A viabilidade econômica da PIV está sempre diretamente relacionada ao número de oócitos viáveis recuperados por doadora. Animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) produzem rotineiramente mais oócitos viáveis por sessão de OPU do que animais taurinos (*Bos taurus taurus*). Assim, devido ao predomínio das raças zebuínas na pecuária brasileira, o crescimento da PIV de embriões, no país foi impulsionado (VIANA et al., 2010).

Embriões PIV possuem ultraestrutura diferente dos produzidos *in vivo*, pois apresentam mais lipídeos, menos microvilosidades e mais debris celulares (RIZOS 2002; FAIR; et al., 2002). Estas diferenças resultam em menor taxa de gestação após transferência a fresco (PONTES et al., 2009) e menor tolerância à criopreservação e estão diretamente ligadas ao sistema de PIV em que foram gerados (FEUGANG et al., 2004; SHIRAZI et al., 2009). Por este motivo, diferentes sistemas de PIV, na tentativa de aumentar a criotolerância dos embriões foram vastamente estudados (SEIDEL, 2006).

Dentre as alterações dos sistemas de PIV descritas, a adição de antioxidantes (LONERGAN, et al., 1999; RIZOS, et al., 2001) , o uso de substitutos ao soro fetal bovino (SFB) (GÓMEZ et al., 2008; MOORE et al., 2007) e o uso do meio simplex otimizado de potássio (do inglês Potassium Simplex Optimized Medium - KSOM) (FELMER, R. N. et al., 2011) resultaram em melhorias na qualidade dos embriões, o que poderia resultar melhor criotolerância.

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

Algumas doadoras se comportam de forma constante nas repetidas sessões de OPU, sendo recuperados sempre quantidades muito próximas de oócitos viáveis, outras, no entanto, apresentam grande variação entre sessões (PONTES et al., 2009). Embora a média de oócitos viáveis recuperados seja de aproximadamente 20 por doadora, relatos de doadoras que esporadicamente produziram mais de 50 são frequentes e já foram reportados casos de recuperação de grandes quantidades de oócitos viáveis (superiores a 500), de um mesmo animal em uma única sessão de OPU (VIANA et al., 2010).

Esta variação dificulta a estimativa da produção de embriões, e assim do número receptoras necessárias. Quando da ocorrência de um inesperado resultado muito superior à média de oócitos recuperados da doadora (cujo resultado é variável ou é desconhecido) ou da resposta insuficiente das receptoras ao protocolo de TETF, embriões de qualidade acabam sendo desperdiçados pela falta de receptoras aptas.

Visando melhores resultados de taxa de prenhez recorre-se aos protocolos hormonais para a transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Estes protocolos envolvem o uso de dispositivos de liberação de progesterona, administração de prostaglandinas, estradiol e gonadotrofina coriônica equina (eCG). Do início do protocolo até a TETF decorrem 17 dias (BARUSELLI et al., 2010). Portanto, para a transferência a fresco dos embriões, faz-se necessário preparar as receptoras com certa antecedência, antes mesmo da OPU das doadoras, o que agrega custos.

Nestes casos, a criopreservação dos embriões seria uma excelente alternativa, preservando-os até a disponibilidade de outras receptoras. Contudo, apenas 5% dos embriões produzidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* em 2005, no Brasil são criopreservados (VIANA et al., 2010). Este baixo percentual de criopreservação de embriões denota o desestímulo do mercado em relação

a esta técnica que viabilizaria ainda o transporte global de material genético e a formação de bancos de germoplasma (DOBRINSKY, 2002).

A formação de bancos de germoplasma é crucial para a preservação de material genético quando da ocorrência de surtos de doenças altamente contagiosas e de alto impacto econômico, cuja principal medida de controle é o abate sanitário dos animais (ex. Febre Aftosa), ocorre como dano colateral à perda de recursos genéticos de valor inestimável (DOBRINSKY, 2002).

No Brasil, a EMBRAPA desenvolve o Programa de Pesquisa em Recursos Genéticos, que desde 1983 passou a incluir a criopreservação de material genético animal de raças ameaçadas de extinção, por exemplo, o Bovino Pantaneiro e o Curraleiro (MARIANTE et al., 2011). Contudo, este programa não contempla as principais raças usadas em larga escala nos rebanhos comerciais do país, como a Nelore, cuja formação de bancos de germoplasma ficou a cargo da iniciativa privada. No entanto, este setor não demonstrou interesse por esta tecnologia, mesmo como alternativa para proteger a genética de animais superiores dos riscos sanitários, uma vez que embriões PIV vitrificados geram porcentagens de gestação mais baixas do que os transferidos a fresco (STEWART et al., 2011), pois a grande maioria dos embriões, no Brasil, é produzida *in vitro*.

Após o nascimento do primeiro bezerro derivado de um embrião congelado por Wilmut e Rowson em 1973, muitos protocolos foram desenvolvidos para a criopreservação de embriões da espécie bovina. Estes protocolos baseiam-se na exposição dos embriões a diferentes concentrações de substâncias crioprotetoras e no resfriamento destes embriões a baixas temperaturas.

A movimentação da água e dos crioprotetores através da membrana celular dos embriões ocorre por difusão simples ou facilitada. A difusão facilitada depende de canais de membrana, proteínas como as da família das aquaporinas. A expressão destes canais se dá ao longo do desenvolvimento embrionário, logo embriões mais desenvolvidos como blastocistos expandidos apresentam proporcionalmente mais canais e maior permeabilidade aos

crioprotetores do que oócitos e embriões menos desenvolvidos como mórulas e blastocistos iniciais (JIN et al., 2011).

2.2.1 Vitriificação de embriões

A mais notável tecnologia utilizada com o intuito de criopreservar embriões foi o processo de vitriificação (JIN et al., 2011). O fenômeno físico de vitriificação foi introduzido com sucesso na criopreservação de embriões murinos (RALL, 1987) e logo a técnica foi aplicada em larga escala na espécie bovina (WAGTENDONK-DE LEEUW, *et al.*, 1997).

A vitriificação já foi aplicada em embriões PIV de bovinos com resultados semelhantes a das outras técnicas de criopreservação (ASSUMPÇÃO et al., 2008). Com as vantagens de menor necessidade de equipamentos e capacitação dos recursos humanos para aplicação em larga escala (WAGTENDONK-DE LEEUW, VAN et al., 1997).

A técnica ainda carece de desenvolvimento tecnológico para obter melhores resultados com embriões PIV, uma vez que embriões PIV resultam significativamente em menor número de gestações quando transferidos pós-vitriificação do que quando transferidos a fresco (BLOCK et al., 2009; STEWART et al., 2011).

2.2.2 Cultivo *in vitro* de embriões após a vitriificação

O cultivo *in vitro* de embriões após vitriificação e descongelação é uma importante ferramenta para pesquisa servindo como avaliação da tolerância dos embriões ao processo de criopreservação (ASSUMPÇÃO et al., 2008; BLOCK et al., 2009; CAMPOS-CHILLÓN et al., 2006; GAO et al., 2012; GÓMEZ et al., 2008).

O cultivo *in vitro* após a criopreservação, tanto de embriões PIV quanto os produzidos *in vivo*, pode ser uma estratégia para minimizar custos relacionados à transferência de embriões não viáveis e ainda elevar a segurança na transferência de material genético entre zonas geográficas com status sanitário diferente. Para tanto os sistemas de cultivo *in vitro* precisam ser melhorados. A adição de antioxidantes é uma das estratégias mais promissoras, sendo que a adição de betamercaptoetanol mostrou ser efetiva, porém não definitiva na otimização do cultivo pós-descongelamento (HOSSEINI et al., 2009; NEDAMBALE, TSHIMANGADZO LUCKY; DU, FULIANG; et al., 2006).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Entre os fatores responsáveis pela baixa eficiência dos sistemas de PIV, está o estresse oxidativo, cuja definição está no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species* - ROS) e os agentes antioxidantes (FEUGANG et al., 2004).

As ROS são metabólitos do oxigênio (O_2), que em baixas concentrações desempenham papel importante nos processos fisiológicos, no entanto em altas concentrações podem danificar moléculas e estruturas celulares acarretando efeitos deletérios na função celular levando à apoptose (BASINI et al., 2008). Agentes antioxidantes são compostos capazes de destruir, eliminar ou suprimir a formação das ROS.

Diversos estudos associam o estresse oxidativo com falhas na reprodução. No macho está associado à diminuição do número e da presença de defeitos na cromatina dos espermatozoides (AITKEN; KOPPERS, 2011). Na fêmea está associado à diminuição da competência oocitária em quadros patológicos, como na síndrome dos ovários policísticos em mulheres (CHATTOPADHAYAY et al., 2010) e falhas na reprodução, inclusive na PIV de

embriões (DAS et al., 2006; ORAL et al., 2006; RUDER et al., 2008; TAMURA et al., 2008).

No trato genital da fêmea acredita-se que os embriões sejam protegidos das ROS por antioxidantes não enzimáticos como a glutathione, e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e principalmente a glutathione peroxidase (LAPOINTE; BILODEAU, 2003).

Já *in vitro* devido às condições artificiais de cultivo e a manipulação dos gametas, oócitos e embriões estão expostos a ação dos ROS, uma vez que, sem a proteção do oviduto, a produção de antioxidantes é diminuída e que a geração de ROS é aumentada (GUÉRIN et al., 2001).

2.3.1 Uso de antioxidantes nos sistemas de produção *in vitro* de embriões e no cultivo após a vitrificação

A produção de embriões *in vitro*, no que se refere à qualidade e à capacidade de sobrevivência ao processo de criopreservação está diretamente ligada à qualidade do sistema de PIV utilizado (RIZOS, et al., 2001). Portanto, a melhoria dos sistemas, por estratégias como a adição de agentes antioxidantes, pode tanto melhorar as taxas de produção quanto a qualidade dos embriões PIV (FEUGANG et al., 2004).

Na tentativa de superar a exposição dos oócitos e dos embriões às espécies reativas de oxigênio nos sistemas de PIV, diversos antioxidantes foram testados. Betamercaptoetanol, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, vitaminas C e E, taurina, hipotaurina, quelantes metálicos (EDTA), glutathione e estimulantes da síntese de glutathione, em diferentes concentrações e nas diferentes etapas da PIV foram utilizados (FEUGANG et al., 2004). Entretanto, em alguns estudos nenhum efeito foi observado ou foram dependentes de outros fatores como exposição a diferentes concentrações de oxigênio (LIU, Z.; FOOTE, 1995; TAKADA et al., 2012) e glicose (IWATA et al., 1998).

De forma geral o efeito dos antioxidantes é dose dependente, e em vários estudos com diferentes antioxidantes as concentrações que resultaram em melhorias na qualidade embrionária ou nas taxas de embrião não foram as maiores (FEUGANG et al., 2004; LIU, Z.; FOOTE, 1995; LONERGAN, P et al., 1999; TAKADA et al., 2012) o que pode ser explicado pelo fato de os ROS representarem papel fundamental em alguns processos fisiológicos, agindo até como segundo mensageiros, modulando expressão genica (TAMURA et al., 2012).

2.4 MELATONINA

O hormônio melatonina (N-acetil-5-medroxytryptamina) é derivado do triptofano, secretado pela glândula pineal dos mamíferos, mas também encontrado em vários outros tecidos, incluindo ovários, testículos, medula óssea e retina. Classicamente descrito devido à ação reguladora do ciclo circadiano nos mamíferos (ANISIMOV, et al., 2006). A melatonina foi descrita ainda em aves, répteis, anfíbios, peixes, fungos, protistas, procariotos, algas e plantas superiores (KOLÁR; MACHÁCKOVÁ, 2005).

Como mamífero, a regulação circadiana dos bovinos se dá pelo fotoperíodo, cuja interpretação neuroendócrina é mediada pela melatonina, e embora os bovinos sejam animais poliéstricos anuais, efeitos da administração de melatonina exógena sobre o início da puberdade já foram demonstrados (TORTONESE; INSKEEP, 1992). Ainda, a presença de receptores de melatonina nos COCs bovinos já foi evidenciada, e a melatonina pode desempenhar um papel fisiológico na maturação dos oócitos nesta espécie (EL-RAEY et al., 2011).

2.4.1 A melatonina como antioxidante

A melatonina age como antioxidante indireto, sendo um poderoso eliminador de radicais livres. Possui ação independente de receptores e protege as células contra peroxidação lipídica de membranas, tendo ainda significativa ação citoprotetora (TEIXEIRA et al., 2003). Ao contrário de outros agentes antioxidantes, a melatonina é solúvel tanto em água quanto em lipídeos (SHIDA et al., 1994). Atua diretamente sobre diversas espécies reativas de oxigênio, estimula a ação de enzimas antioxidantes endógenas, incluindo a superóxido dismutase, a glutathione redutase e a catalase e inibe a ação de enzimas pró-oxidantes, como a ciclooxigenase (ANISIMOV, et al., 2006).

A ação antioxidante da melatonina está ligada a estrutura química. Possui um anel indol heterocíclico e duas cadeias laterais, um grupo 5-metoxi e um grupo 3-amida. Esta estrutura molecular permite que tanto o anel indol heterocíclico quanto as cadeias laterais possuam a capacidade de detoxificar radicais livres pela adição de radicais OH, pela doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio, pela substituição de átomos de hidrogênio por radicais OH ou pela ligação ao óxido nítrico (TAN, D.-XIAN et al., 2002).

Não apenas a melatonina, mas também os metabólitos gerados em decorrência de ação enzimática e interação desta com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são agentes antioxidantes (TAN, D.-XIAN et al., 2002).

A melatonina possui ainda ação reparadora em moléculas oxidadas, virtualmente, não possui efeitos tóxicos, mesmo em doses elevadas e combate de forma eficiente os efeitos deletérios do envelhecimento de mitocôndrias (CARRETERO et al., 2009; REITER et al., 2001).

2.4.2 Uso da melatonina na produção *in vitro* de embriões

Efeitos benéficos da adição de melatonina aos sistemas de PIV já foram descritos nas diferentes etapas, maturação (EL-RAEY et al., 2011; KANG et al., 2009; TAKADA et al., 2012; TAMURA et al., 2008), fecundação (ISHIZUKA et al., 2000) e cultivo (ISHIZUKA et al., 2000; MANJUNATHA et al., 2009; PAPIS et al., 2007), em distintas espécies.

Na PIV de embriões bovinos, o uso da melatonina foi descrito na maturação *in vitro* de oócitos, com efeitos benéficos tanto na maturação nuclear, quanto na dispersão das mitocôndrias no citoplasma (EL-RAEY et al., 2011), e efeitos na redução da fragmentação do DNA das células do cumulus (TAKADA et al., 2012) e no cultivo *in vitro* dos embriões (PAPIS et al., 2007).

O sistema de cultivo no período pós-vitrificação afeta dramaticamente a capacidade de sobrevivência dos embriões (RIZOS, et al., 2001). Os significativos efeitos protetores da melatonina no período de cultivo pós-vitrificação foram descritos em mórulas e blastocistos ovinos vitrificados (ABECIA et al., 2002).

The Mice in Council

Once upon a time all the mice met together in council and discussed the best means of securing themselves against the attacks of the cat. After several suggestions had been debated, a mouse of some standing and experience got up and said, 'I think I have hit upon a plan which will ensure our safety in the future, provided you approve and carry it out. It is that we should fasten a bell round the neck of our enemy cat, which will by its tinkling warn us of her approach'. This proposal was warmly applauded, and it had been already decided to adopt it, when an old mouse got upon his feet and said, 'I agree with you all that the plan before us is an admirable one. But may I ask who is going to bell the cat?'

Æsop

Hipótese

3 HIPÓTESE

A hipótese central é de que a melatonina protege os oócitos e os embriões das espécies reativas de oxigênio, resultando em melhor desenvolvimento embrionário, que se traduzirá em menor sensibilidade aos danos causados pelo processo de vitrificação e melhora na retomada do desenvolvimento pós-vitrificação.

The Boy and the Filberts

A boy put his hand into a jar of filberts and grasped as many as his fist could possibly hold. But when he tried to pull it out again he found he couldn't do so, for the neck of the jar was too small to allow the passage of so large a handful. Unwilling to lose his nuts but unable to withdraw his hand, he burst into tears. A bystander, who saw where the trouble lay, said to him, 'Come, my boy, don't be so greedy. Be content with half the amount, and you'll be able to get your hand out without difficulty.'

Do not attempt too much at once.

Esopo

Objetivos

4 OBJETIVOS

De forma geral objetivou-se avaliar a eficácia da melatonina na suplementação do meio de maturação e no de cultivo *in vitro*, para a produção de embriões mais resistentes ao processo de vitrificação, avaliando-se a re-expansão destes após a vitrificação. A hipótese foi testada, sendo o objetivo geral atingido com o rol dos objetivos específicos a seguir:

Avaliar o efeito da suplementação dos meios nas diferentes etapas de produção *in vitro* de embriões com melatonina, sobre o desenvolvimento embrionário.

Avaliar o efeito da suplementação de melatonina nas etapas de produção *in vitro* e no cultivo *in vitro* pós-descongelamento sobre a tolerância dos embriões ao processo de vitrificação.

The Crow and the Pitcher

A thirsty crow found a pitcher with some water in it, but so little was there that, try as she might, she could not reach it with her beak, and it seemed as though she would die of thirst within sight of the remedy. At last she hit upon a clever plan. She began dropping pebbles into the pitcher, and with each pebble the water rose a little until at last it reached the brim, and the knowing bird was enabled to quench her thirst
“Necessity is mother of invention”

Esopo

Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, Laboratório de Biologia do Espermatozoide e do Laboratório de Andrologia, do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A menos que mencionada outra origem todos os reagentes usados eram da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em 3 experimentos:

EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMMULUS APÓS A MATURAÇÃO *IN VITRO*

EXPERIMENTO 2: PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

EXPERIMENTO 3: EFEITO DA MELATONINA NO CULTIVO *IN VITRO* APÓS A DESCONGELAÇÃO

Nos experimentos 1 e 2 o delineamento foi inteiramente casualizado. Os oócitos foram randomicamente distribuídos entre os grupos Controle (GC) ou tratado com 50ng/ml de melatonina (GM)

O experimento 3 foi delineado em arranjo fatorial dois por dois, conforme descrito na figura 1. Estes embriões foram produzidos no Experimento 2 suplementados ou não com melatonina e distribuídos no experimento 3 cultivados ou não com melatonina no período pós-descongelação.

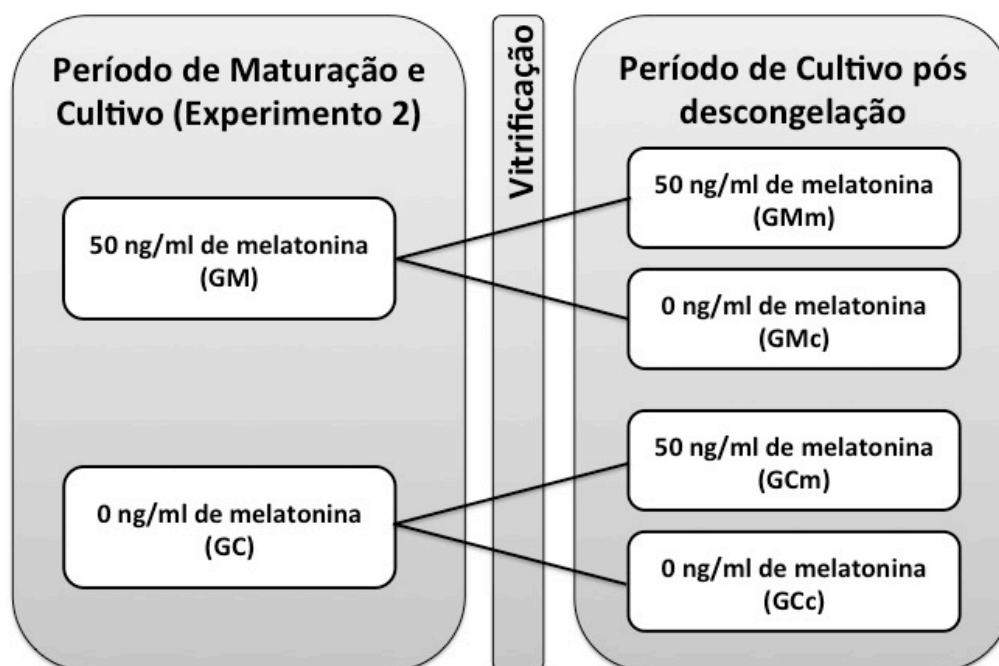
GCc – acréscimo de 0ng/ml de melatonina durante a PIV e cultivo após a descongelação com acréscimo de 0ng/ml de melatonina.

GCm - acréscimo de 0ng/ml de melatonina durante a PIV e cultivo após a descongelação com de 50ng/ml de melatonina.

GMc - suplementação com 50ng/ml de melatonina e cultivo após a descongelação com acréscimo de 0ng/ml de melatonina

GMm - suplementado com 50ng/ml de melatonina e cultivo após a descongelação com 50ng/ml de melatonina.

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental do Experimento 3 - São Paulo - 2012



5.2 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMMULUS APÓS A MATURAÇÃO *IN VITRO*

Para a realização do experimento de avaliação das células do cumulus após a maturação *in vitro* foram realizadas seis replicatas, com uma unidade experimental de cada tratamento. Foi considerado como unidade experimental o poço contendo de 35 a 45 complexos cumulus oócito (do inglês: cumulus oocyte complex, COC).

5.2.1 Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos foram obtidos em abatedouro comercial localizado em Piracicaba – SP. Os ovários foram transportados em recipiente térmico contendo solução fisiológica aquecida a 37°C. No laboratório, estes foram lavados em solução fisiológica aquecida a 37°C acrescida de penicilina (0,1mg/ml) e estreptomicina (100UI/ml), sendo em seguida, aspirados os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm, com agulha de calibre 21G acoplada à seringa de 5ml.

O líquido folicular aspirado foi depositado em tubo cônico de 15ml, permanecendo em repouso por 10 minutos para decantação dos COCs. Após este período, o sedimento de cada tubo foi colocado em placa de petri (90mm) com meio de colheita (Anexo A) para recuperação dos COCs.

Foram selecionados para maturação *in vitro* COCs apresentando camada de células do *cumulus* espessa, compacta e o citoplasma do oócito homogêneo.

5.2.2 Maturação *in vitro* dos oócitos

Após a seleção, grupos de 35 a 45 oócitos foram lavados três vezes no meio pré-MIV (Anexo A) acrescido de 0 ou 50ng/ml de melatonina, GC e GM respectivamente, em placas de 4 poços (Nunc Multidishes Nunclon®). Os oócitos foram mantidos por 22 a 24 horas em incubadora a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade.

Após o período de maturação, os COCs foram lavados rapidamente em uma gota de 200µl de solução tampão fosfato (do inglês, Phosphate Buffered Saline, PBS) sem cálcio e sem magnésio, aquecida a 37°C. Em seguida, os oócitos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,75ml,

contendo 400µl de TrypLE Express GIBCO[®], aquecido a 37°C, para a remoção enzimática das células do cumulus, e incubação por 10 minutos. Aos 5 minutos de incubação, procedeu-se a remoção mecânica das células do cumulus por pipetagem, seguido de lavagem, após 10 minutos de ação enzimática. Ao fim do período de incubação, oócitos e grumos visíveis de células do cumulus foram removidos. O conteúdo foi centrifugado, a 9000g por 1 minuto, para sedimentação das células, o sobrenadante removido e o sedimento ressuspenso em 200µl de DMEN GIBCO[®] previamente incubado a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade.

5.2.3 Avaliação da viabilidade das células do cumulus

Uma alíquota de 35µl do sedimento ressuspenso foi acrescida de 0,75µl de solução de 0,5mg/ml de Iodeto de Propídeo e incubada por 5 minutos. Ao término da incubação foram acrescentados 300µl de PBS sem cálcio e sem magnésio (GIBCO[®]), e imediata avaliação por citometria de capilar (Guava Easy Cyte Mini[®] Millipore[®]), sendo avaliados 10.000 eventos por amostra. Para a avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo 8.7 para MAC. Foram considerados como células os eventos ocorrentes entre 10² e 10³ logaritmo da avaliação do tamanho das células (Forward Scatter). Para avaliação das subpopulações de células foi determinado o valor máximo de fluorescência vermelha de 10² logaritmo, para determinar a população de células viáveis, não coradas com Iodeto de Propídeo.

5.2.4 Avaliação do potencial de membrana das mitocôndrias

Uma alíquota de 35µl do sedimento ressuspenso foi acrescida de 0,5µl de solução de 153mM de 5,5',6,6'-iodeto de tetracloro-1,1',3,3'-

tetraethylbenzimidazolocarboanina (JC1) e incubada por 5 minutos. O procedimento de coloração e análise pelo citômetro ocorreu conforme descrito no item 5.2.3. Para avaliação das subpopulações de células, os eventos foram determinados, em logaritmo da fluorescência em amarelo, sendo adotados valores máximo de 10^1 , para as células com baixo potencial de mitocôndrias; mínimo de 10^2 para células com alto potencial de mitocôndrias e entre 10^1 e 10^2 para células com médio potencial de mitocôndrias.

5.2.5 Avaliação da viabilidade celular e do estresse oxidativo

A uma alíquota de 50µl do sedimento ressuspensionado foi acrescentado de 5µl de solução de 1mM de diacetato de 5-6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (carboxy-H₂DCFDA) e incubada por 25 minutos em incubadora a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade. Após este período foi acrescentado 1µl de solução de 0,5mg/ml de Iodeto de Propídeo e incubação por 5 minutos. O procedimento de coloração e análise pelo citômetro ocorreu conforme descrito no item 5.2.3. Para avaliação das subpopulações de células foi determinado o valor máximo de fluorescência vermelha de 10^2 logaritmo, para determinar a população de células íntegras, não coradas com Iodeto de Propídeo. Dentro da subpopulação de células íntegras foi determinado o valor mínimo de 10^2 logaritmo de fluorescência verde para determinar a subpopulação em estresse oxidativo.

5.2.6 Avaliação do Ciclo Celular

Uma alíquota de 80µl do sedimento ressuspensionado foi centrifugada a 9000g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento novamente

suspendido em 200µl de etanol 70%, gelado, para fixação e permeabilização das células. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da avaliação.

Para a análise, as amostras foram centrifugadas a 9000g por 1 minuto e ressuspensas em PBS sem cálcio e sem magnésio (GIBCO®) acrescido de 10µl da solução 5mg/ml de Iodeto de Propídio e 10µl da solução 10mg/ml de RNase A e incubadas por 1 hora a 42°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6000g por 1 minuto e ressuspensas em 300µl de PBS sem cálcio e sem magnésio e avaliadas no citômetro Guava Easy Cyte Mini® Millipore®, sendo avaliados no mínimo 10.000 eventos por amostra.

Para a avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo 8.7 para MAC.

5.3 EXPERIMENTO 2: PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Foram realizadas 12 sessões de PIV de embriões seguindo o cronograma descrito no quadro 1. Cada sessão de PIV ocorreu com no mínimo 1 unidade experimental de cada grupo. Foi considerada a unidade experimental o poço contendo de 35 a 55 COCs. Para o grupo Melatonina (GM) foram avaliadas 41 unidades experimentais totalizando 1843 COCs e para o grupo Controle GC, 42 unidades experimentais totalizando 1863 COCs.

Quadro 1 - Cronograma da Produção *in vitro* de embriões - São Paulo - 2012

Dia -1	MIV Maturação <i>in vitro</i>
Dia 0	FIV Fecundação <i>in vitro</i>
Dia 1	CIV Cultivo <i>in vitro</i>
Dia 2	
Dia 3	Avaliação da taxa de embriões clivados e 1º Feeding (acrécimo de 400ul de meio)
Dia 4	
Dia 5	2º Feeding (retirada de 200ul de meio e acréscimo de 400ul de meio novo)
Dia 6	
Dia 7	Avaliação da taxa de Blastocistos e de Viabilidade ou de Vitrificação
Dia 8	Vitrificação

5.3.1 Obtenção dos oócitos

Os oócitos foram obtidos conforme descrito no item 5.2.

5.3.2 Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

O procedimento de maturação *in vitro* foi descrito no item 5.2.2.

5.3.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Nesta etapa da produção *in vitro* (PIV) de embriões não foi aplicado nenhum tratamento de melatonina aos grupos.

Os oócitos maturados *in vitro* (40 a 50) foram lavados três vezes no meio pré-FIV (Anexo B), em seguida mais três vezes em meio FIV (Anexo B), e transferidos para um poço contendo 400µl de meio de fecundação em placas de 4 poços (Nunc Multidishes Nunclon®).

Uma palheta de sêmen foi descongelada em água à 37°C por 30 segundos e o conteúdo centrifugado em gradiente descontínuo de Percoll® (Anexo C) a 9000g por 5 minutos, para separação dos espermatozoides vivos e mortos.

O sedimento, contendo as células viáveis foi lavado em 800µl de meio TL-Sêmen (Anexo B), sendo novamente centrifugado a 9000g por 3 minutos. Deste sedimento, a concentração espermática foi ajustada para inseminar os oócitos em cada poço da placa NUNC, com volume fixo de 16µl e concentração final de 1×10^6 espermatozoides por mililitro de meio de fecundação.

Os oócitos e os espermatozoides foram mantidos por 18 horas em incubadora a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade

5.3.4 Cultivo in vitro dos embriões (CIV)

Os presumíveis zigotos, no D1 (D0= dia da FIV) foram retirados do meio de fecundação, lavados em meio pré FIV e incubados por 10 minutos em PBS sem Ca⁺⁺ e sem Mg⁺⁺ acrescido de 0,1% de hialuronidase (Anexo D), sendo então realizado a remoção mecânica das células do cúmulo, por pipetagem sucessiva.

Os presumíveis zigotos foram cultivados em 400µl meio KSOM-BSA (Anexo D) acrescido de 0 ou 50ng/ml de melatonina, GC e GM, respectivamente, em placa de 4 poços (Nunc Multidishes Nunclon[®]), por 7 dias, em incubadora a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade, até o estágio de blastocisto.

No D3 e no D5, foram realizados dois acréscimos de 400µl meio de cultivo (*feeding*), no primeiro *feeding* acrescentou-se KSOM enriquecido com 20% de SFB (Anexo D) acrescido de 0 ou 50ng/ml de melatonina, de acordo com o tratamento, GC e GM respectivamente, de forma que a concentração final de SFB ficasse em 10%. No segundo *feeding*, foram retirados 200µl de meio para realização do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e em seguida outro acréscimo de KSOM 10% SFB (Anexo D), acrescido de 0 ou 50ng/ml de melatonina, GC e GM respectivamente.

A avaliação da clivagem foi realizada por estereomicroscópio no Dia 3 juntamente com o primeiro *feeding*. Já a avaliação do estágio de

desenvolvimento embrionário foi realizada no Dia 7. Para cada unidade experimental foram calculadas as variáveis conforme descritas no quadro 2

Quadro 2 - Descrição das variáveis calculadas em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário - São Paulo - 2012

Variável	Descrição
% de Clivados	Porcentagem de presumíveis zigotos que clivaram
% de Iniciais	Porcentagem de presumíveis zigotos que se desenvolveram até Blastocisto Inicial
% de Blastocistos	Porcentagem de presumíveis zigotos que se desenvolveram até Blastocistos
% de Expandidos	Porcentagem de presumíveis zigotos que se desenvolveram até Blastocistos Expandidos
% Total de Blastocistos	Porcentagem de presumíveis zigotos que se desenvolveram até Blastocistos independente do estágio de desenvolvimento
% Expandidos/Blastocistos	Porcentagem de Blastocistos independente do estágio de desenvolvimento chegaram até Blastocistos Expandidos

5.3.5 Avaliação do número de blastômeros total e viáveis dos embriões

No Dia 7, 68 blastocistos expandidos de um total de 4 replicatas foram submetidos à coloração com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo para avaliação do número total de blastômeros e da porcentagem de blastômeros não íntegros, respectivamente.

Os embriões foram lavados em gota de 400µl de solução tampão PBS sem cálcio e sem magnésio, aquecida a 37°C, e em seguida transferidos para uma gota contendo 5µg/ml de Hoechst 33342 e 10µg/ml de Iodeto de Propídeo, e incubados por 10 minutos. Em seguida, os embriões foram colocados sobre uma gota de glicerol entre lâmina e lamínula e avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus® IX80, Tóquio, Japão).

Cada embrião foi analisado quanto ao número total de células (núcleos

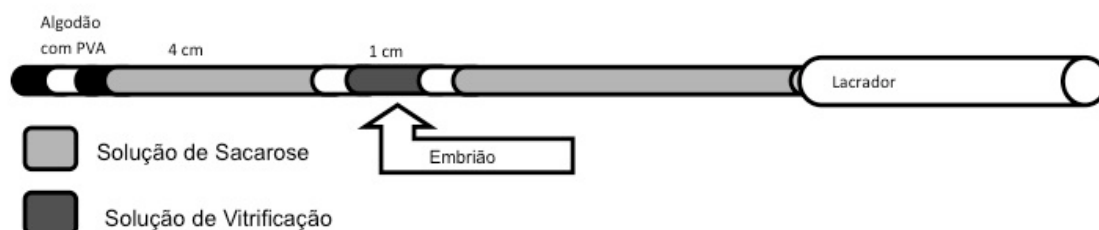
azuis) e ao número de blastômeros lesados (núcleos vermelhos), sendo utilizados filtros para Hoechst 33342 (excitação máxima de 355nm e emissão máxima de 465nm) e Iodeto de Propídio (excitação máxima de 530nm e emissão máxima de 615nm), respectivamente.

5.4 VITRIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES

No Dia 7 e no Dia 8 foram considerados passíveis de vitrificação apenas blastocistos expandidos. Para cada unidade experimental foram calculadas as variáveis conforme descritas no quadro 3.

Os embriões foram retirados do meio de cultivo, lavados em uma gota de 200 μ l de meio de manutenção (Anexo E), sendo em seguida transferidos em grupos de 5 embriões para uma gota de 200 μ l de meio de equilíbrio 1, contendo 10% de Glicerol (Anexo E), aguardando-se 5 minutos. Após este período, os embriões foram transferidos para uma gota de 200 μ l de meio de equilíbrio 2, contendo 10% de Glicerol e 20% de Etileno Glicol (Anexo E) por 5 minutos. Os embriões foram então lavados em uma gota de 200 μ l de meio de vitrificação contendo 25% de Glicerol e 25% de Etileno Glicol (Anexo E) e imediatamente transferidos para uma coluna de 1cm deste meio em uma palheta, previamente montada com solução de sacarose 0,3M (Anexo E) e meio de vitrificação conforme a figura 2e submergido em nitrogênio líquido, sendo todo este processo com duração máxima de 30 segundos.

Figura 2 - Representação esquemática da montagem da palheta para vitrificação - São Paulo - 2012



Quadro 3 - Descrição das variáveis calculadas em relação ao número de blastocistos passíveis de vitrificação - São Paulo - 2012

Variável	Descrição
% Vitrificados D7	Porcentagem dos presumíveis zigotos que se desenvolveram até blastocisto, passíveis de vitrificação no D7
% Vitrificados D8	Porcentagem dos presumíveis zigotos que se desenvolveram até blastocistos, passíveis de vitrificação no D8
% Vitrificados Total	Porcentagem dos presumíveis zigotos que se desenvolveram até blastocistos, passíveis de vitrificação no D7 e no D8

5.5 DESCONGELAÇÃO DOS EMBRIÕES

As palhetas contendo os embriões foram retiradas do nitrogênio líquido, mantidas por 10 segundos em ar e em seguida imersas em água a 25°C por 20 segundos. O conteúdo das palhetas foi despejado em uma gota de 200µl de solução de sacarose 0,3M (Anexo E), na qual permaneceu por 5 minutos e depois transferido para uma placa contendo meio de Manutenção (Anexo E).

5.6 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA MELATONINA NO CULTIVO *IN VITRO* APÓS A DESCONGELAÇÃO

Para avaliar a descongelação de cada grupo foram utilizadas 7 unidades experimentais, sendo cada uma um poço contendo de 7 a 11 blastocistos.

Após a descongelação, os embriões foram lavados em 3 gotas de TCM 199 (Anexo E) e cultivados em grupos de 10, em poços contendo 100µl de TCM 199 (Anexo E), acrescido de 0 (GCc e GMc) ou 50ng/ml (GCm e GMm) de melatonina, conforme tratamento. O cultivo foi realizado durante 48 horas em incubadora a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade. Após 24 e 48 horas de cultivo pós-descongelação, os embriões foram avaliados quanto a reexpansão da blastocèle e a eclosão, respectivamente.

Embriões não congelados, produzidos conforme o protocolo padrão dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP (Apêndice A) para cultivo

em paralelo aos embriões descongelados. Resumidamente, os embriões foram produzidos seguindo os mesmos procedimentos do Experimento 2 para o GC, porém todas as etapas da PIV foram realizadas em grupos de 25 a 30 estruturas em gotas de 90µl de meio, sob óleo mineral. Na etapa do cultivo foi utilizado o meio fluido de oviduto sintético (do inglês Synthetic Oviduct Fluid, SOF) com co-cultivo em monocamada de células da granulosa. No Dia7 de cultivo, blastocistos expandidos foram transferidos para o cultivo em paralelo aos embriões descongelados, objetivando-se descartar eventuais efeitos deletérios do sistema de cultivo no período após a vitrificação e descongelação. As imagens destes embriões submetidos ao Ensaio de TUNEL estão no apêndice B e a avaliação do número de blastômeros totais e viáveis no apêndice C.

5.6.1 Avaliação do número de blastômeros total e viáveis dos embriões após a descongelação

Após 48 horas de cultivo, os embriões foram submetidos assim como no item 5.3.5 à coloração com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo para avaliação do número total de blastômeros e da porcentagem de blastômeros não íntegros, respectivamente.

5.6.2 Ensaio de TUNEL dos embriões

Após 24 horas de cultivo, os embriões foram submetidos ao ensaio de TUNEL (do inglês, TdT-mediated-dUTP nick end labeling) para avaliação da apoptose embrionária.

Os embriões foram submetidos ao ensaio de TUNEL utilizando o kit comercial *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics, USA) (PAULA-LOPES *et al.*, 2003).

Os embriões foram lavados 3 vezes em solução de PBS-PVP (Anexo F) e fixados em paraformaldeído 4% (Anexo F) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões foram lavados novamente em PBS-PVP e mantidos em 400µl desta solução, em geladeira, até o dia da leitura.

No dia da leitura, os embriões foram submetidos à solução de permeabilização (Anexo F) em câmara escura e úmida e temperatura ambiente por 2 horas e depois lavados 2 vezes em PBS-PVP. Os controles positivos para o ensaio de TUNEL e os embriões de cada grupo experimental foram lavados em PBS/PVP e incubados com 25 µL de mistura de reação de TUNEL (contendo *fluorescein isothiocyanate-conjugated dUTP* e a enzima *desoxinucleotidil transferase terminal*, preparados segundo instruções do fabricante) por 1 hora à 37°C em câmara úmida e escura. Os controles negativos para o ensaio de TUNEL foram incubados sem a enzima *desoxinucleotidil transferase terminal* por 1 hora à 37°C em câmara úmida e escura, imagens fotográficas dos embriões dos grupos controle de técnica positivo e negativo no apêndice B.

Depois de corados, para a reação de TUNEL, os embriões foram lavados novamente em solução de PBS-PVP e corados com Hoechst 33342 (5µg/ml) (Anexo F) por 10 minutos em temperatura ambiente. Os embriões foram então lavados 6 vezes em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO; Anexo F) para avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus® IX80, Tóquio, Japão). Cada embrião foi analisado, sendo o número total de células (núcleos azuis) e o número de células embrionárias em apoptose (núcleos verdes), visualizados pelos filtros DAPI Hoechst 33342 (excitação máxima de 355nm e emissão máxima de 465nm) e FITC Hoechst 33342 (excitação máxima de 490nm e emissão máxima de 550nm), respectivamente.

5.7 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Às amostras de meio de cultivo, aliqüotadas no Dia 5 (Feeding) e no Dia 8, ao fim do cultivo foi adicionado ácido tricloroacético gelado a 10% (TCA 10%) na proporção de 1:2 v/v (Anexo G). As amostras foram centrifugadas a 16.000g por 15 minutos para precipitar as proteínas e recuperar o sobrenadante. Todas as amostras foram congeladas (-20°C) para posterior leitura.

No dia da leitura, uma alíquota de 500µl de TBA 1%, dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) a 0,05N (Anexo G) foi acrescida a 500µl do sobrenadante, anteriormente congelado. A mistura foi submetida à água fervente (100°C) por 15 minutos e posteriormente resfriada em gelo (0°C) para interromper a reação. O produto a ser mensurado da peroxidação lipídica é o malodialdeído (MDA). A mensuração do MDA ocorre em condições de alta temperatura e baixo pH (pH < 3), resultando em uma solução de coloração rosa que é então quantificada por espectrofotometria. A mensuração do MDA foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, por espectrofotometria com comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão feita com MDA previamente estabelecida no laboratório. A concentração dos TBARS foi determinada empregando como coeficiente de extinção molar do MDA, $1,56 \times 10^5 \text{ X M}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978). A peroxidação lipídica no meio de cultivo foi expressa em nanogramas de TBARS por ml de meio de cultivo.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS® System for Windows versão 9.2. Os dados dos experimentos 1 e 2 foram testados em relação a normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias. Sendo obedecidas estas premissas utilizou-se o teste T de Student

(PROC TTEST) para comparações das médias dos 2 tratamentos (0 ou 50ng/ml de melatonina). Os dados que não obedeceram às premissas foram transformados e aqueles que permaneceram em discordância com as premissas estatísticas foram avaliados por estatística não paramétrica utilizando teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY). O nível de significância menor ou igual que 0,05 foi considerado para rejeitar a hipótese de nulidade.

As correlações Spearman foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis: porcentagem de clivados; % de Iniciais; % de Blastocistos; % de Expandidos; % Total de Blastocistos; % Expandidos/Blastocistos; % Vitricados D7; % Vitricados D8; % Vitricados Total avaliação do TBARS no Dia 5 no Dia 8, sendo os resultados expressos pelo coeficiente de correlação (r) e respectivo nível de significância (p).

Para análise dos resultados da avaliação das células do cumulus após a maturação *in vitro* por citometria de capilar. Os dados da subpopulação de células viáveis (item 5.2.3) foram submetidos à avaliação estatística paramétrica, assim como os dados das subpopulações com médio e baixo potencial de mitocôndrias (item 5.2.4). Os dados das subpopulações com alto potencial de mitocôndrias (item 5.2.4) assim como os dados da subpopulação de células íntegras e em estresse oxidativo (item 5.2.5) foram transformados e então avaliados por estatística paramétrica.

Para análise dos resultados da avaliação da porcentagem de clivados (item 5.3.4) a variável foi transformada. As variáveis calculadas em relação à avaliação no Dia 7, % de Iniciais; % de Blastocistos; % de Expandidos; % Total de Blastocistos; % Expandidos/Blastocistos (item 5.3.4) foram transformados e ainda permaneceram em discordância com as premissas estatísticas, assim, foram avaliadas por estatística não paramétrica.

Na análise dos resultados da avaliação do número de blastômeros (item 5.3.5) a variável foi transformada para raiz quadrada, atendendo assim as premissas estatísticas. Para análise da variável porcentagem de blastômeros lesados (item 5.3.5), os dados foram transformados e ainda permaneceram em discordância com as premissas estatísticas, assim, foi realizada a análise estatística não paramétrica.

Para análise dos resultados das variáveis calculadas em relação ao número de blastocistos passíveis de vitrificação (item 5.4), os dados foram transformados e ainda permaneceram em discordância com as premissas estatísticas, logo, foram avaliados por estatística não paramétrica.

Na análise dos resultados da avaliação do TBARS no Dia 5 (item 5.7), os dados atenderam as premissas e foram avaliados por estatística paramétrica. Já os resultados da avaliação do TBARS no Dia 8 (item 5.7) foram transformados e então avaliados por estatística paramétrica.

Na avaliação do efeito da melatonina nas etapas da PIV, (Experimento 3- Controle vs. Melatonina), da melatonina no meio de cultivo pós-vitrificação (Controle vs. Melatonina), assim como da interação entre os dois (Controle vs. Melatonina) sobre a Criotolerância dos embriões (item 5.6) e sobre a porcentagem de células totais e apoptóticas (item 5.6.2) foram realizadas análises de variância (PROC GLM) para avaliar possíveis efeitos de interação. Na comparação entre os tratamentos com melatonina foi utilizado o teste de Wilcoxon para variáveis não paramétricas.

Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e respectivos erros padrões, média \pm erro padrão da média, ou as medianas e quartis dos dados originais, mediana (primeiro quartil; terceiro quartil), para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente.

Em respeito aos princípios da contemporaneidade e da igualdade das condições experimentais entre os objetos de estudo não foi realizada comparação estatística entre os dados dos grupos e dos embriões não vitrificados no Experimento 3 (item 5.6).

The Peasant and the Apple Tree.

A Peasant had an apple tree growing in his garden, which bore no fruit, but merely served to provide a shelter from the heat for the sparrows and grasshoppers, which sat and chirped in its branches. Disappointed at its barrenness he determined to cut it down, and went and fetched his axe for the purpose. But when the sparrows and grasshoppers saw what he was about to do, they begged him to spare it, and said to him, "If you destroy the tree we shall have to seek shelter elsewhere, and you will no longer have our merry chirping to enliven your work in the garden." He, however, refused to listen and set to work a will to cut through the trunk. A few strokes showed that it was hollow inside and contained a swarm of bees and a large store of honey. Delighted with his find he threw down his axe, saying, "The old tree is worth keeping after all".

Utility is most men's test of worth.

Esopo

Resultados

6 RESULTADOS

Os itens a seguir, descrevem os resultados dos 3 experimentos.

6.1 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS

Os dados da avaliação do ciclo celular (item 5.2.6) não puderam ser analisados. Os gráficos resultantes da citometria de capilar apresentavam grande variabilidade entre as amostras e não foram condizentes com os padrões estabelecidos na rotina do laboratório ou com os da literatura. Acredita-se que esta variabilidade foi consequente da pronunciada presença de grumos celulares nas amostras, fato também observado nas outras avaliações. Nas demais avaliações, o problema com os grumos celulares pôde ser contornado na definição da população celular, como selecionando somente eventos com valores máximos de 10^2 do logaritmo da avaliação do tamanho das células (Foward Scatter), no entanto esta definição não foi efetiva na avaliação do ciclo celular. Para estudos futuros propõe-se separar uma amostra de oócitos após a maturação apenas para a avaliação do ciclo celular. Estes oócitos deverão permanecer incubados por um período maior e mecanicamente em um agitador de tubos – vórtex, o que não foi possível neste estudo, pois um período maior de incubação ou a desagregação mecânica do oócito acarretaria danos excessivos às células, o que poderia alterar os resultados das demais avaliações.

Não foi observada diferença significativa entre a proporção de subpopulações de células do cumulus nos tratamentos Melatonina e Controle. Os valores de média, erro padrão da média e significância estatística na comparação entre os grupos Melatonina e Controle estão descritos na tabela 1, para as subpopulação de células viáveis, com alto, médio ou baixo potencial de mitocôndrias e subpopulação de células íntegras e em estresse oxidativo.

Tabela 1 - Valores de média, erro padrão da média e significância estatística (p) entre os grupos Melatonina e Controle, para as subpopulações celulares - São Paulo - 2012.

Subpopulação	Melatonina		Controle		P
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
Viáveis	74,49	6,99	70,29	7,01	0,6802
Alto potencial de mitocôndrias	13,76	8,95	10,45	7,95	0,9126
Médio potencial de mitocôndrias	63,09	7,46	68,44	5,50	0,6346
Baixo potencial de mitocôndrias	23,86	7,59	21,35	7,01	0,7947
Íntegras em estresse oxidativo	1,11	0,53	0,43	0,11	0,6680

As correlações entre as subpopulações foram significativas e coerentes entre a subpopulação com baixo potencial de mitocôndrias e viabilidade celular ($r = -0.67501$, $p = 0.0160$) e entre a subpopulação em estresse oxidativo e alto potencial de mitocôndrias ($r = 0,85897$, $p = 0,0015$). Os demais valores de correlação e suas respectivas significâncias estão descritos no apêndice D.

6.2 AVALIAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A porcentagem de estruturas clivadas no Dia 3 não apresentou diferença significativa entre os grupos Melatonina e Controle (p). Os valores média, erro padrão e significância estatística na comparação entre os grupos (p) estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de média, erro padrão da média e significância estatística (p) entre os grupos Melatonina e Controle, para porcentagem de estruturas clivadas - São Paulo - 2012.

	Melatonina		Controle		P
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
% Clivados	73,94	2,23	73,11	2,46	0,8209

Não foram encontradas diferenças significativas entre as variáveis avaliadas no Dia 7, % de blastocistos iniciais; % de blastocistos; % de blastocistos expandidos; % Total de blastocistos e % expandidos/blastocistos entre os grupos. Valores de medianas, primeiro e terceiro quartis, e significância estatística na comparação entre os grupos (p) estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de medianas, primeiro e terceiro quartis, e significância estatística na comparação entre os grupos Melatonina e Controle (p), para as variáveis avaliadas no Dia 7 - São Paulo - 2012.

	Melatonina	Controle	P
	mediana	mediana	
% de Iniciais	2,27 (0 ; 2,94)	2,47 (1,67 ; 4,55)	0,1024
% Blastocistos	8,51 (6,15 ; 12,24)	10 (5,88 ; 9,62)	0,3997
% Expandidos	6,25 (3,03 ; 10,53)	5,96 (3,17 ; 9,62)	0,3348
% Total de Blastocistos	19,72 (12,82 ; 26,53)	20,92 (14,67 ; 28,57)	0,2931
% Expandidos / Blastocistos	37,5 (23,53 ; 50)	26,97 (16,67 ; 42,86)	0,0947

6.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA QUALIDADE DOS EMBRIÕES

Na avaliação da viabilidade e qualidade dos embriões com a coloração de Hoechst e PI, exemplos na figura 3, o grupo Melatonina apresentou média de $44,87 \pm 2,36$ blastômeros totais por blastocisto expandido no Dia 7, enquanto o grupo Controle apresentou em média $30,82 \pm 2,02$ blastômeros totais, representados na figura 4, o que foi significativamente diferente ($p < 0,0001$).

Figura 3 – Fotografia de blastocistos corados com Hoechst e Iodeto de Propídeo, em microscopia de epifluorescência, no Dia7. Embriões GM (a, c) e 2 (b, d) visualizados no filtro com excitação para Hoechst 33342 (a, b) e Iodeto de Propídeo (c, d) - São Paulo - 2012

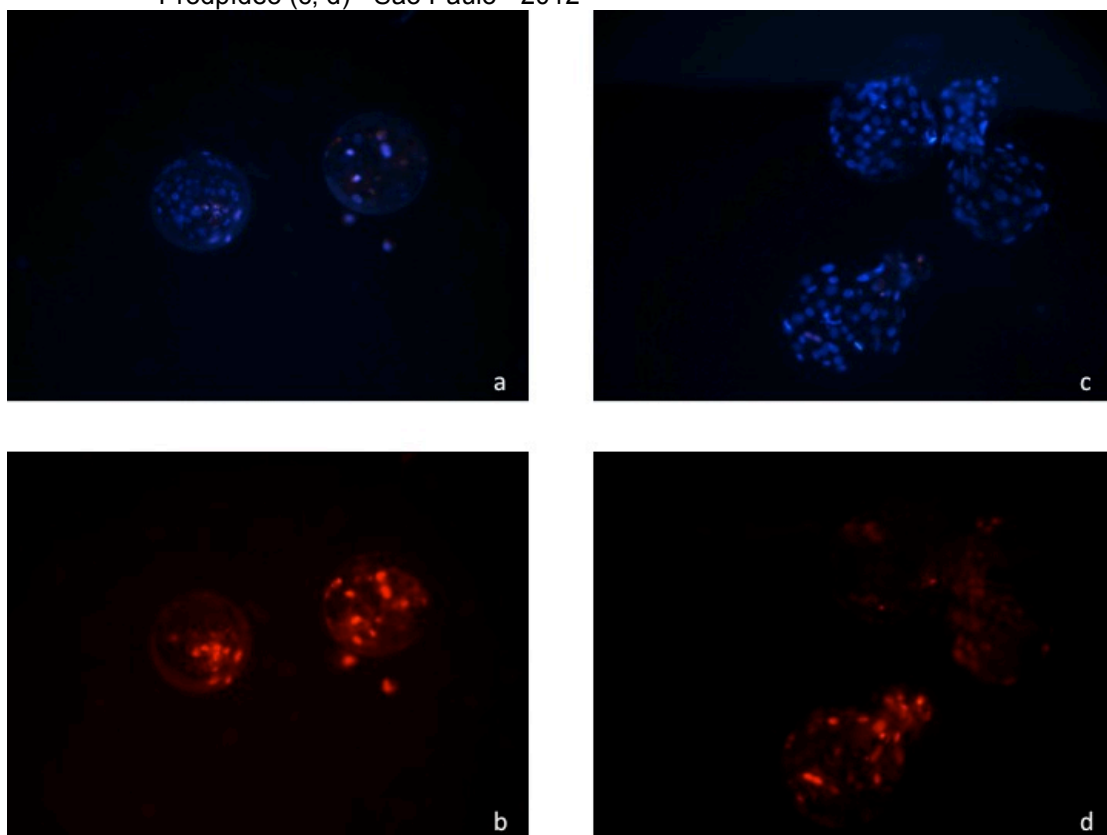
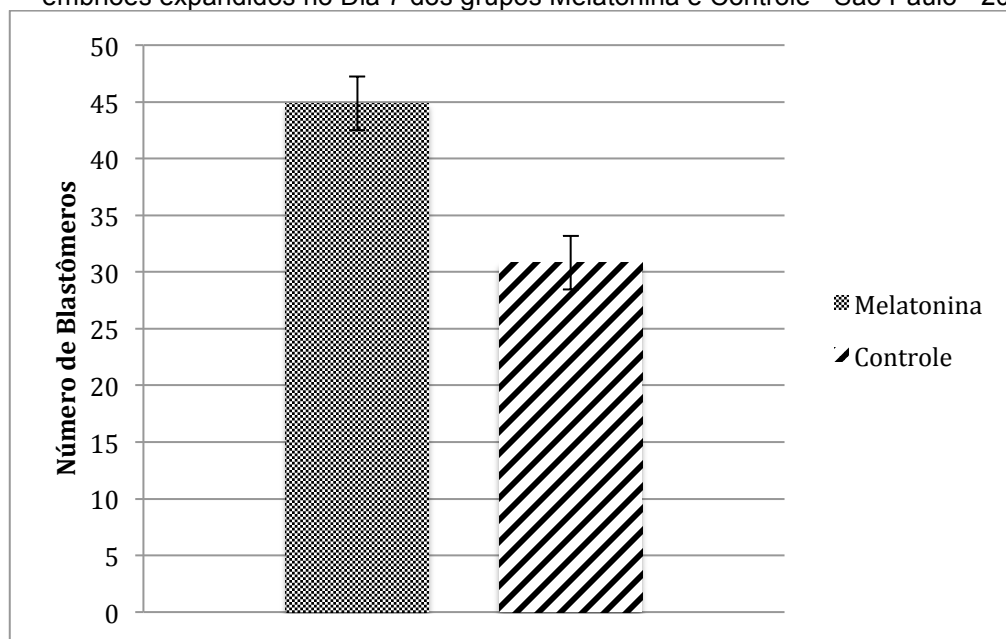
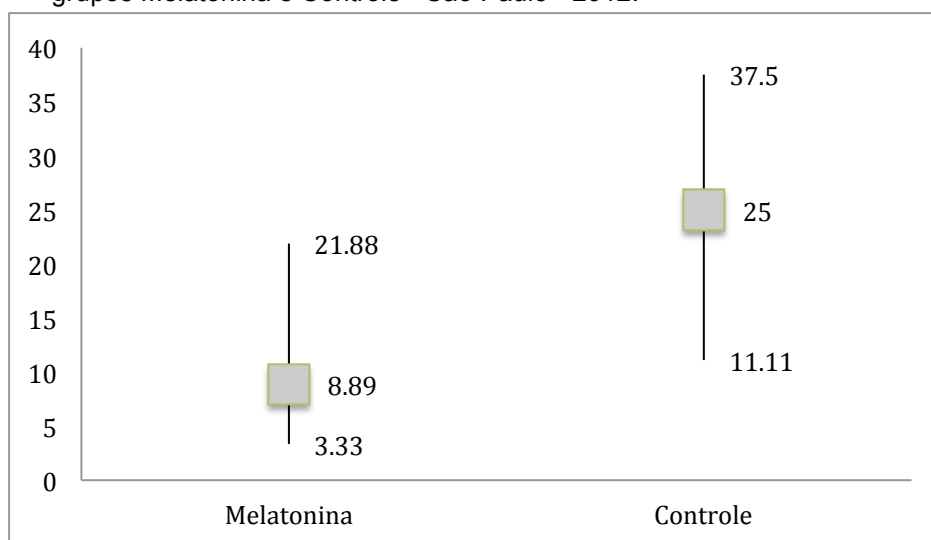


Figura 4 - Representação gráfica das médias e desvio padrão do número de blastômeros dos embriões expandidos no Dia 7 dos grupos Melatonina e Controle - São Paulo - 2012.



Na variável porcentagem de blastômeros lesados, o grupo melatonina apresentou mediana de 8,89 (3,33;21,88), representados na figura 5, significativamente diferente ($p < 0,0006$) do grupo controle, que apresentou mediana 25 (11,11;37,50).

Figura 5 - Representação gráfica das medianas, primeiro e terceiro quartis da variável porcentagem de blastômeros lesadas dos blastocistos expandidos no Dia 7, dos grupos Melatonina e Controle - São Paulo - 2012.



6.4 NÚMERO DE BLASTOCISTOS PASSÍVEIS DE VITRIFICAÇÃO

As variáveis calculadas em relação ao número de blastocistos passíveis de vitrificação, % Vitrificados D7; % Vitrificados D8 e % Vitrificados Total, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Melatonina e Controle. Os valores de medianas, primeiro e terceiro quartis, e significância estatística na comparação entre os grupos (p) estão descritos na tabela 4.

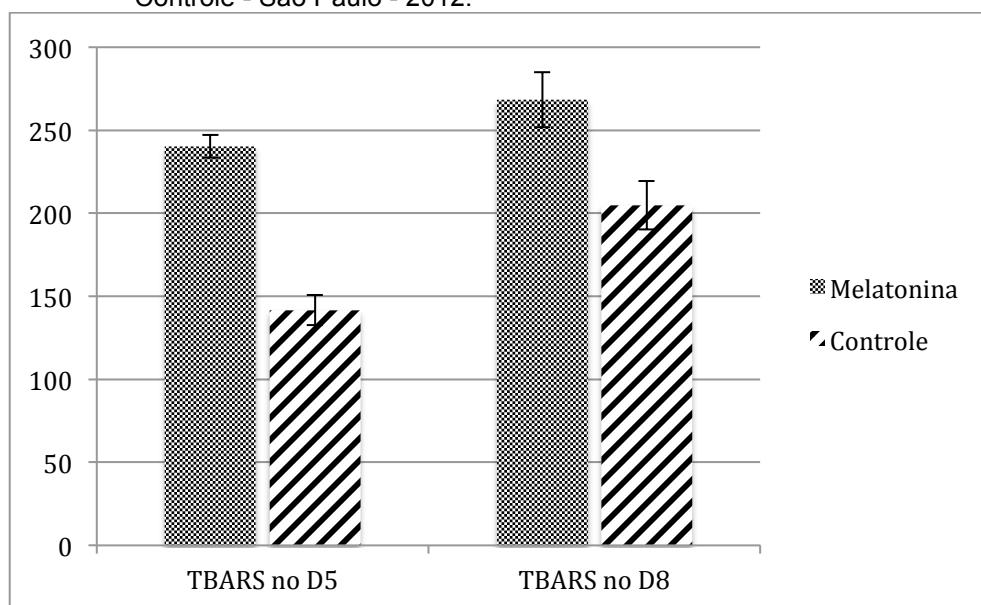
Tabela 4 - Valores de medianas, primeiro e terceiro quartis, e significância estatística na comparação entre os grupos Melatonina e Controle (p), para as porcentagens das variáveis calculadas em relação ao número de blastocistos passíveis de vitrificação - São Paulo - 2012

	Melatonina	Controle	P
	mediana	Mediana	
% Vitrificados D7	6,25 (3,03 ; 10,53)	5,96 (3,17 ; 9,62)	0,3348
% Vitrificados D8	4,17 (2,5 ; 10,2)	3,96 (1,82 ; 8,11)	0,2444
% Vitrificados Total	12,82 (8,82 ; 18,37)	10,94 (4,76 ; 19,05)	0,2657

6.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Nas amostras de meio de cultivo recolhidas no Dia 5 foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre o grupo controle (média de $141,7 \pm 6,87$) e o grupo melatonina (média de $240,4 \pm 9,04$) nanogramas de TBARS por ml de meio de cultivo. De forma similar, no Dia 8 ao fim do cultivo foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre o grupo controle (média de $204,8 \pm 14,53$) e o grupo melatonina (média de $268,3 \pm 16,68$) nanogramas de TBARS por ml de meio de cultivo (Figura 6).

Figura 6 - Representação gráfica das medias e desvio padrão da concentração de TBARS em nanogramas por ml de meio de cultivo nos Dia 5 e Dia 8 dos grupos Melatonina e Controle - São Paulo - 2012.



6.6 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS DO CULTIVO E TBARS

As correlações entre as variáveis % de clivados, calculadas no Dia7 e concentrações de TBARS, foram significativas e coerentes entre as porcentagens de clivados e a % Vitrificados D7 ($r= 0,33$ $p=0,0018$); % Vitrificados D8 ($r= 0,49$ $p<0,0001$); % Vitrificados Total ($r= 0,59$ $p<0,0001$). Ainda foi observada correlação entre a avaliação do TBARS no Dia 5 e avaliação do TBARS no Dia 8 ($r= 0,28$ $p=0,0101$). Os demais valores de correlação e suas respectivas significâncias estão descritos no apêndice E.

6.7 REEXPANSÃO E ECLOSÃO DOS BLASTOCISTOS NO CULTIVO APÓS A DESCONGELAÇÃO

A criotolerância dos embriões foi avaliada pela reexpansão da blastocelule ou pela eclosão, respectivamente no período de 24 horas após a descongelação (7 unidades experimentais por grupo) e de 48 horas após a descongelação (4 unidades experimentais por grupo). Em relação ao efeito da melatonina nas etapas da PIV (Período PIV; Tabela 6 e Tabela 9) e no período de cultivo pós-descongelação (Período Pós; Tabela 7 e Tabela 1), não foram observadas diferenças significativas entre a porcentagem de blastocistos reexpandidos ou eclodidos. Não foram observados efeitos de interação entre a utilização da melatonina no Período PIV e no Período Pós (Tabela 5 e Tabela 8).

Tabela 5 - Significância estatística (p) do uso da melatonina no Período PIV e Período Pós e da interação entre os períodos, para as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 24 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

24 horas	Período PIV	Período Pós	Período PIV x Período Pós
% Reexpandidos	0,1892	0,5191	0,6145
% Eclodidos	0,1403	0,4719	0,4719

Tabela 6 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período PIV sobre as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 24 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

Período PIV	Melatonina mediana	Controle mediana	p
% Reexpandidos 24h	11,11 (9,09 ; 25)	23,61 (20 ; 33,33)	0,0694
% Eclodidos 24h	0 (0 ; 11,11)	0 (0 ; 0)	0,0750

Tabela 7 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período Pós sobre as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 24 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

Período Pós	Melatonina mediana	Controle mediana	p
% Reexpandidos 24h	21,11 (9,09 ; 27,27)	21,11 (11,11 ; 33,33)	0,2841
% Eclodidos 24h	0 (0 ; 10)	0 (0 ; 0)	0,3269

Tabela 8 - Significância estatística do uso da melatonina no Período PIV e Período Pós e da interação entre os períodos, para as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 48 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

48 horas	Período PIV	Período Pós	Período PIV x Período Pós
% Reexpandidos	0,7720	0,3860	0,1046
% Eclodidos	0,5483	0,5483	0,6300

Tabela 9 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período PIV sobre as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 48 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

Período PIV	Melatonina mediana	Controle mediana	p
% Reexpandidos 48h	5 (0 ; 11,11)	10,55 (0 ; 11,80)	0,3322
% Eclodidos 48h	0 (0 ; 5)	0 (0 ; 0)	0,2732

Tabela 10 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período Pós sobre as variáveis porcentagem de reexpandidos e porcentagem de eclodidos, 48 horas após a descongelação - São Paulo - 2012

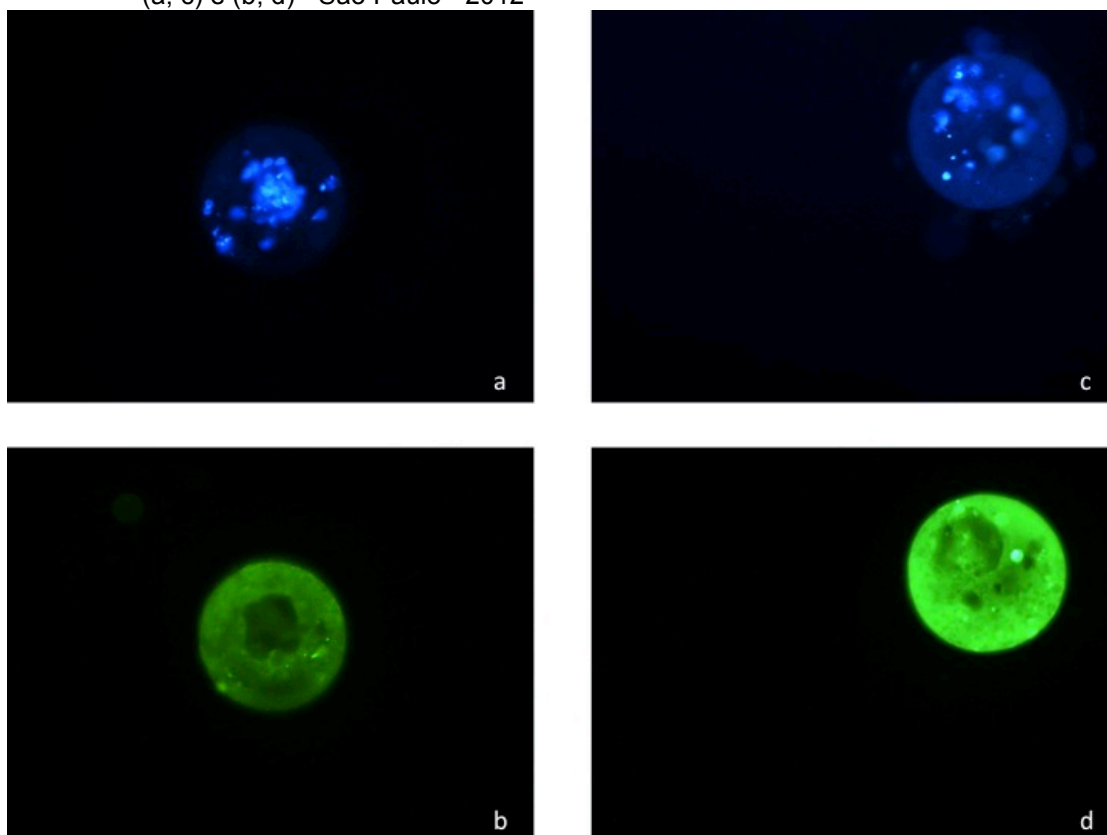
Período Pós	Melatonina	Controle	p
	mediana	mediana	
% Reexpandidos 48h	10,55 (5,00 ; 11,11)	0 (0 ; 11,80)	0,2585
% Eclodidos 48h	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 5)	0,2733

6.8 ENSAIO DE TUNEL

Após a descongelação, blastocistos foram cultivados por 24 horas, fixados e submetidos ao ensaio de TUNEL para avaliação do número total de blastômeros e porcentagem de blastômeros apoptóticos. Grande parte dos blastocistos não apresentou definição dos blastômeros apoptóticos, assim como na avaliação da viabilidade celular e do número de blastômeros. Logo não foi possível avaliar o número total de blastômeros ou a porcentagem de blastômeros apoptóticos, conforme exemplo na figura 7. Estes blastocistos foram considerados em estágio avançado de apoptose. Os dados não puderam ser submetidos ao tratamento estatístico e estão apresentados na forma de porcentagem do total de blastocistos do grupo no quadro 4. Eventuais efeitos deletérios do sistema de cultivo no período após a vitrificação e descongelamento foram descartados, pois nenhum dos embriões não congelados cultivados em paralelo apresentou este elevado grau de apoptose.

Os blastocistos que apresentaram maior definição celular (Figura 8) foram avaliados quanto ao número total de blastômeros e a porcentagem de blastômeros apoptóticos, contudo, não foram observadas diferenças significativas em relação ao efeito da melatonina nas etapas da PIV (Período PIV, Tabela 12) e no período de cultivo pós descongelação (Período Pós, Tabela 13). Efeitos de interação entre a utilização da melatonina no Período PIV e no Período Pós, sobre estas variáveis também não foram observados (Tabela 11).

Figura 7 – Fotografia de blastocistos submetidos ao ensaio de TUNEL, em microscopia de epifluorescência, após 24 horas de cultivo pós-descongelamento classificados em estágio avançado de apoptose. Embriões visualizados no filtro para Hoechst 33342 (a, c) e (b, d) - São Paulo - 2012



Quadro 4 - Porcentagem de blastocistos submetidos ao ensaio de TUNEL considerados em estágio avançado de apoptose de acordo com o grupo experimental - São Paulo - 2012.

Grupo	Porcentagem de blastocistos em estágio avançado de apoptose (n)
GCc	61,11 % (11/18)
GCm	65,22 % (15/23)
GMc	73,68 % (14/19)
GMm	66,67 % (14/21)

Figura 8 – Fotografia de blastocistos submetidos ao ensaio de TUNEL, em microscopia de epifluorescência, após 24 horas de cultivo pós-descongelamento que apresentaram definição dos blastômeros apoptóticos. Embriões do GCc (a,e), GCm (b, f), GMc (c, g) e GMm (d, h), visualizados no filtro para Hoechst 33342 (a, b, c, d) e (e, f, g, h) - São Paulo - 2012

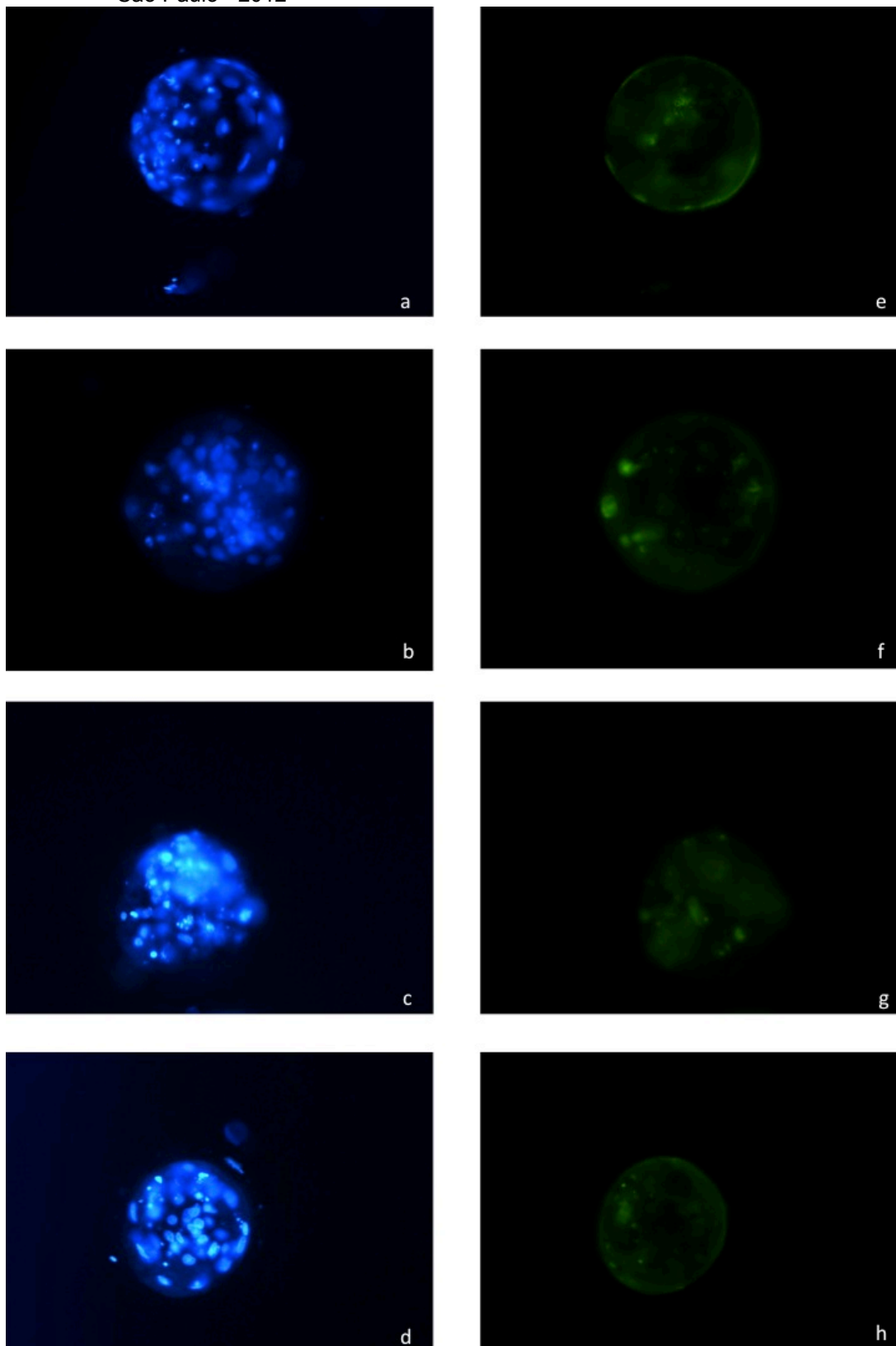


Tabela 11 - Significância estatística (p) do uso da melatonina no Período PIV e Período Pós e da interação entre ambos, para as variáveis total de blastômeros e porcentagem de blastômeros apoptóticos, após a descongelação - São Paulo - 2012

	Período PIV	Período Pós	Período PIV x Período Pós
Total de blastômeros	0,4956	0,7040	0,5212
% de blastômeros apoptóticos	0,6759	0,0805	0,8850

Tabela 12 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período PIV sobre as variáveis, total de blastômeros e porcentagem de blastômeros apoptóticos, após a descongelação - São Paulo - 2012

Período PIV	Melatonina	Controle	p
	mediana	mediana	
Total de blastômeros	31 (16 ; 54)	45 (26 ; 53)	0,2863
% de blastômeros apoptóticos	19,35 (6,25 ; 44)	13,33 (7,55 ; 35,71)	0,3500

Tabela 13 - Valores de mediana, primeiro e terceiro quartis e significância estatística (p), para o efeito da melatonina no Período Pós sobre as variáveis, total de blastômeros e porcentagem de blastômeros apoptóticos, após a descongelação - São Paulo - 2012

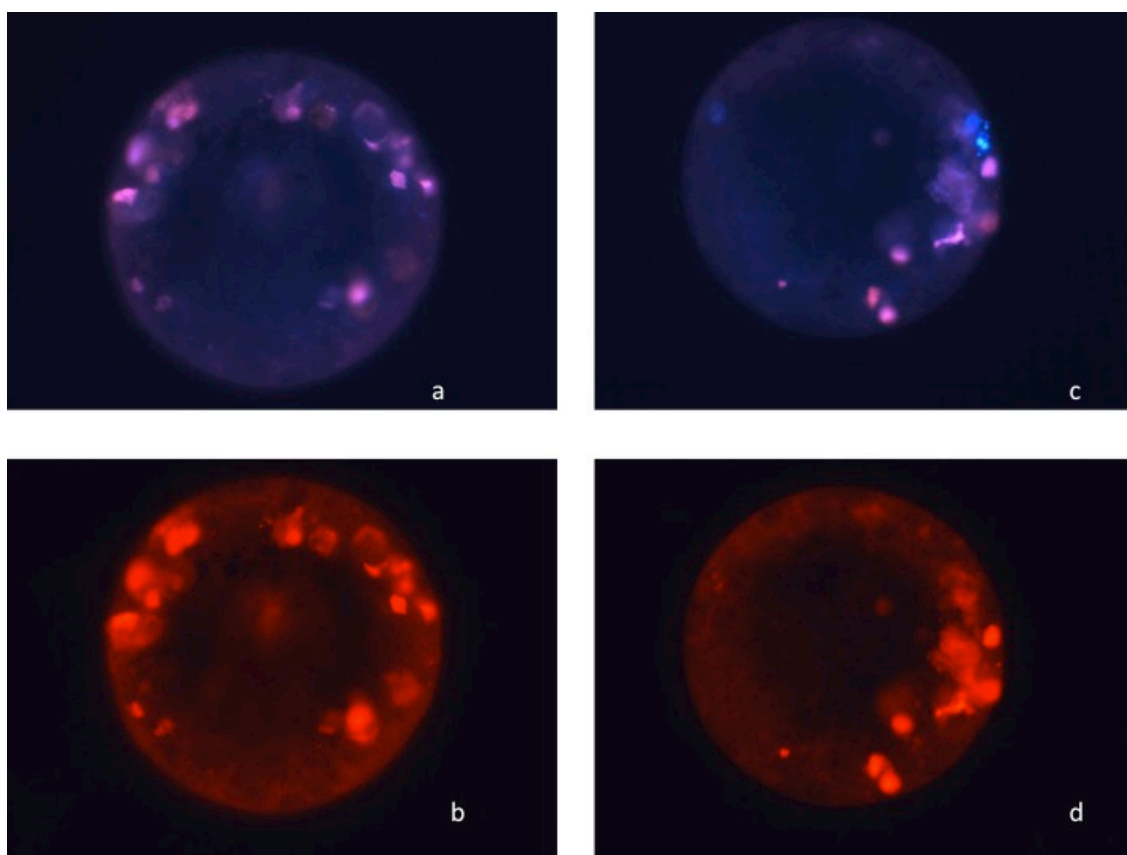
Período Pós	Melatonina	Controle	p
	mediana	mediana	
Total de blastômeros	37 (25 ; 53)	33 (15 ; 53)	0,3220
% de blastômeros apoptóticos	10,34 (5,26 ; 20)	19,35 (8,70 ; 73,08)	0,0827

6.9 VIABILIDADE CELULAR E NÚMERO TOTAL DE BLASTÔMEROS DOS EMBRIÕES APÓS 48 HORAS DE CULTIVO PÓS-DESCONGELAÇÃO

Após a descongelação, blastocistos foram cultivados por 48 horas e corados para avaliação da viabilidade celular e do número de blastômeros. No entanto, os blastocistos não apresentaram definição das células não íntegras, coradas com Iodeto de Propídeo. Logo, não foi possível avaliar o número total de blastômeros ou a porcentagem de blastômeros lesados conforme (Figura 9). Eventuais efeitos deletérios do sistema de cultivo no período após a vitrificação e descongelação foram descartados, pois nenhum dos embriões não

congelados cultivados em paralelo não apresentou definição das células não íntegras, coradas com Iodeto de Propídeo.

Figura 9 - Fotografia de blastocistos corados com Hoechst e Iodeto de Propídeo, em microscopia de epifluorescência, após 48 horas de cultivo pós-descongelamento. Embriões 1 (a, b) e 2 (c, d) visualizados no filtro com excitação para Hoechst 33342 (a, c) e Iodeto de Propídeo (b, d) - São Paulo – 2012



The Man and the Lion

A man and a lion were companions in a journey, and in course of conversation they began to boast about their powers, and each claimed to be superior to the other in strength and courage. They were still arguing with some heat when they came to a crossroad where there was a statue of a man strangling a lion. 'There!' said the man triumphantly. 'Look at that! Doesn't that prove to you that we are stronger than you?' 'Not so fast, my friend', said the lion. 'That is only your view of the case. If we lions could make statues, you may be sure that in most of them you would see man underneath'.

There are two sides to every question.

Esopo

Discussão

7 DISCUSSÃO

A melatonina é uma molécula anfifílica, possuidora de características hidrofóbicas e hidrofílicas, e quando dissolvida em solução aquosa permanece estável e com atividade conservada por 12 dias, quando mantida a 4°C (SHIDA et al., 1994). Foi demonstrado que a melatonina interage com bicamadas lipídicas por interações hidrofóbicas de forma preferencial com as interfaces, como é característico de moléculas anfifílicas (COSTA et al., 1997). Contudo a exata determinação da interação desta molécula com o meio aquoso ou lipídico quando não disposto na forma de bicamada ainda não foi realizada. O uso da melatonina em sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões em gotas, microgotas ou mesmo em poços com sobrecamada de óleo mineral não parece ser o mais adequado, pois como molécula anfifílica, a melatonina se distribui de forma preferencial pela interface entre estes meios, não estando disponível aos objetos de estudo no meio aquoso. Por esta razão evidencia-se que, nos trabalhos os quais foram observados os efeitos da adição da melatonina em sistemas de PIV com o uso de sobrecamada de óleo mineral, em geral, descrevem efeitos da adição desta em concentrações superiores à proposta no presente estudo (50 ng/ml) de melatonina (KANG et al., 2009; MANJUNATHA et al., 2009; PAPIS et al., 2007; SHI et al., 2009).

Especificamente em bovinos, usando um sistema de PIV baseado no cultivo em gotas de 100 microlitros sob óleo mineral, a adição de melatonina na concentração de 10^{-4} M ($2,32 \times 10^{-7}$ g/ml) nos dois primeiros dias de cultivo *in vitro*, resultou em maior porcentagem de blastocistos independente da concentração de oxigênio atmosférico (7% ou 20%) (PAPIS et al., 2007). Já quando usada em concentração menor 10^{-9} M ($2,32 \times 10^{-12}$ g/ml) na maturação *in vitro*, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (TAKADA et al., 2012).

A concentração de 50ng/ml de melatonina foi escolhida, para o presente estudo, baseado nos resultados descritos na literatura, nos quais foram testadas as concentrações de 0, 10, 50 e 100ng/ml sem cobertura de óleo mineral na maturação de oócitos bovinos. As concentrações de 10 e 50ng/ml

resultaram em maior porcentagem de oócitos em metáfase II, maior porcentagem de COCs apresentando expansão das células do cummulus, maior porcentagem de oócitos apresentando dispersão das mitocôndrias e redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio no citoplasma dos oócitos. Ressalta-se ainda que a concentração de 100ng/ml não apresentou diferenças em relação ao grupo controle, logo a melatonina, assim como outros antioxidantes age de forma dose dependente, sendo que em concentrações muito elevadas podem apresentar efeitos negativos (EL-RAEY et al., 2011).

Não foram encontradas informações acerca da estabilidade da melatonina em meio aquoso quando mantida a 39°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade, condições necessárias para PIV de embriões em bovinos. Assim elegeu-se a concentração de 50ng/ml em detrimento da de 10ng/ml, na tentativa de assegurar, que mesmo com a ocorrência de degradação da melatonina, a concentração presente no meio se mantivesse entre estas duas concentrações, durante os 7 dias de cultivo dos embriões.

A ausência de efeitos da melatonina sobre as subpopulações de células do cummulus avaliada pela citometria de capilar destoa do esperado, uma vez que, embora seja um agente antioxidante, a melatonina não reduziu a subpopulação em estresse oxidativo. El-Raey et al. (2011) utilizando o mesmo marcador para espécies reativas de oxigênio, a carboxy-H₂DCFDA encontrou redução nos níveis de fluorescência no citoplasma dos oócitos maturados na presença de melatonina e igualmente usando esta técnica, relataram a redução na fluorescência do citoplasma de oócitos ovinos maturados na presença de cisteamina (MATOS, et al., 2002). A subpopulação de células em estresse oxidativo foi proporcionalmente muito pequena, denotando que os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) na maturação *in vitro* dos oócitos não fossem elevados. De forma geral, os efeitos da adição de antioxidantes são demonstrados em situações de estresse oxidativo, no qual há o desequilíbrio entre as concentrações de ROS e de antioxidantes (ORAL et al., 2006).

Já foi demonstrada a ação protetora da melatonina sobre as mitocôndrias em situações de estresse oxidativo *in vivo*, por exemplo, os causados pela isquemia na placenta de ratos (OKATANI et al., 2001), pela

exposição ao bisfenol A nas mitocôndrias testiculares de murinos (ANJUM et al., 2011). Carretero et al. (2009) relatam efeito protetor da melatonina nas mitocôndrias das células cerebrais do envelhecimento (já que *in vitro*, protege dos danos causados pelo estresse oxidativo e de cálcio em mitocôndrias de astrócitos). Contudo, neste estudo não foram observadas alterações no perfil de sub-populações de acordo com o potencial de mitocôndrias das células do cummulus.

Não foi realizado tratamento com melatonina na etapa da fecundação *in vitro*, pois não são conhecidos os efeitos da melatonina sobre os espermatozoides bovinos *in vitro*, que sabidamente são susceptíveis as ROS, sendo que um efeito deletério refletiria em menores taxas de embriões (HENDRICKS; HANSEN, 2010). Infere-se que a adição de melatonina neste período pode trazer benefícios as técnicas de PIV, contudo estudos específicos para este fim são necessários. A decisão de não tratar os grupos nesta fase da PIV foi baseada na hipótese de que a ação da melatonina seria dependente da qualidade seminal assim, efeitos mais pronunciados da melatonina seriam observados quando do uso de sêmen em estresse oxidativo e ou mais susceptíveis ao estresse oxidativo, fugindo do escopo deste trabalho.

A ausência de efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento embrionário, evidenciada pela não diferença entre os grupos para a porcentagem de embriões clivados e para as variáveis avaliadas no D7 é condizente com observações feitas para outros agentes antioxidantes, que demonstraram melhora na qualidade embrionária, mas não evidenciaram alterações nas porcentagens de blastocistos (FEUGANG et al., 2004; GONÇALVES et al., 2010; IWATA et al., 1998). O desenvolvimento embrionário envolve eventos variados, ativação do genoma embrionário, mitoses e alterações na ultraestrutura das células e do próprio embrião (FELMER, et al., 2011; RIZOS, et al., 2003; RIZOS, et al., 2001; RIZOS; FAIR; et al., 2002; RIZOS; WARD; et al., 2002), assim embora sejam creditadas ao estresse oxidativo várias diferenças entre embriões PIV e produzidos *in vivo* (LAPOINTE; BILODEAU, 2003; RIZOS; WARD; et al., 2002), é razoável que

somente a redução do estresse oxidativo não seja suficiente para mitigar estas diferenças.

A significativa diferença entre o número de blastômeros e a porcentagem de blastômeros lesados observada entre os embriões tratados ou não com melatonina sugere maior qualidade e viabilidade dos embriões produzidos na presença de melatonina. Contudo, o número geral de blastômeros dos embriões ainda foi baixo quando comparado aos resultados previamente descritos (ARIAS, et al., 2011; NEDAMBALE; DU; et al., 2006). Já se tem conhecimento de que embriões produzidos em KSOM, meio utilizado no presente estudo, para o cultivo embrionário, resultam em embriões com menor número de blastômeros totais do que os produzidos em outros sistemas, como o sequencial em fluido sintético de oviduto (SOF), CR1 ou cultivo sequencial KSOM-SOF (NEDAMBALE; et al., 2006). Esta diferença deve estar associada às diferenças no sistema de cultivo proposto, sem óleo mineral e com a suplementação de BSA seguida da adição de SFB suplementar.

Não foi evidenciada associação entre a supracitada melhoria na qualidade dos embriões e a esperada redução na concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pela ação antioxidante da melatonina. Pode-se inferir que a melatonina esteve restrita aos embriões e não ao meio de cultivo, interagindo diretamente com as bicamadas lipídicas da membrana celular por ser anfifílica, ou que a melhoria na qualidade dos embriões foi relacionada a uma ação independente da sua ação antioxidante uma vez que já foi proposta uma ação epigenética da melatonina (KORKMAZ; 2008). Logo o aumento das concentrações de TBARS no meio de cultivo do grupo tratado com melatonina observado no experimento 2 pode ter sido resultante da restrição da ação da melatonina ao compartimento intracelular dos embriões e ou pelo aumento do metabolismo celular destes embriões, resultante da possível modulação da expressão genica ou ainda da ação da melatonina sobre as mitocôndrias dos embriões, embora não se tenha observado efeito da melatonina sobre as mitocôndrias das células do cummulus não se refuta o potencial papel da melatonina na proteção das mitocôndrias em especial contra o estresse oxidativo (CARRETERO et al., 2009).

Ainda deve-se levar em conta que a avaliação do TBARS é um método indireto de avaliação e que alguns aldeídos teciduais e açúcares também reagem com o ácido tio barbitúrico, por exemplo, o acetaldeído e a sacarose (BUEGE; AUST, 1978), logo a eventual alteração no metabolismo dos embriões causado pela melatonina pode ter gerado o acúmulo de uma destas substâncias levando ao observado aumento da concentração de TBARS.

Os efeitos benéficos da melatonina na PIV sobre a criotolerância dos embriões não foram evidenciados. De forma geral embriões bovinos PIV são pouco tolerantes ao processo de vitrificação (ASSUMPÇÃO et al., 2008), e menos do que embriões bovinos produzidos *in vivo* (RIZOS, et al., 2001). Esta baixa tolerância ao protocolo de vitrificação utilizado resultou em embriões altamente degenerados, o que comprometeu a avaliação. Também por este motivo, os efeitos da melatonina no período de cultivo *in vitro* após a vitrificação e a descongelação, como os descritos na espécie ovina (BLOCK et al., 2009; MORATÓ et al., 2010; YU et al., 2010) não puderam ser observados, pois os embriões bovinos PIV são menos tolerantes ao processo de vitrificação do que os ovinos produzidos *in vivo*. Entretanto, estes resultados não refutam a possibilidade da melatonina ser um importante agente na recuperação dos embriões de diversas espécies após a criopreservação.

Em experimentos futuros é aconselhável a utilização de um protocolo de vitrificação mais adequado para embriões PIV bovinos, como a vitrificação em Cryotop[®] ou Open Pulled Straw que já apresentaram resultados mais adequados para estes tipos de embrião (BLOCK et al., 2009; MORATÓ et al., 2010; YU et al., 2010). Ainda, buscar sistemas e protocolos mais adequados já que os supracitados apresentam respectivamente maior custo ou sua segurança sanitária é questionável (BIELANSKI; LALONDE, 2009; BIELANSKI et al., 2000).

Buscando-se o termo melatonina no indexador da US. National Library of Medicine, o PubMed, mais de 17.000 artigos científicos são facilmente encontrados. Descrições de suas muitas propriedades e aplicabilidades nas ciências biomédicas abrangem de tratamentos clínicos em humanos, desde fibromialgia, a infertilidade, incluindo sua aplicabilidade em tratamentos de

isquemias agudas como a torção testicular e o infarto do miocárdio (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2012; KANTER, 2010; REITER, R.J. et al., 2007; TAMURA et al., 2008), a estudos *in vitro* que apontam suas propriedades no controle e redução de diversos tipos de câncer e de doenças degenerativas no sistema nervoso central como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer, descrições de suas propriedades antioxidantes e até geroprotetoras são vastas (AKBULUT, et al., 2009; ANISIMOV, et al., 2006; BORAH; MOHANAKUMAR, 2009; CARRETERO et al., 2009; LANOIX et al., 2012; OLCESE et al., 2009; WILHELMSSEN et al., 2011). E em se avaliando estes trabalhos, pode-se facilmente ficar convencido de que esta molécula é a solução para muitos desafios tecnológicos que as ciências biomédicas tentam superar.

Neste, as propriedades antioxidantes da melatonina não foram evidenciadas, embora discretos efeitos benéficos tenham sido encontrados. Contudo, esta pode sim ser uma importante ferramenta na melhoria da PIV bovina, ressaltando-se a importância de buscar a concentração adequada em um sistema de PIV livre de óleo mineral, ou ainda, determinar a proporção da concentração que permaneceria no meio aquoso quando usada em sistemas com sobrecamada de óleo mineral, uma vez que o uso do óleo mineral é predominante em sistemas de PIV.

The North Wind and the Sun

A dispute arose between the north wind and the sun, each claiming that he was stronger than the other. At last agreed to try their powers upon a traveller, to see which could soonest strip him of his cloak. The north wind had the first try; and, gathering up all his force for the attack, he came whirling furiously down upon the man, and caught up his cloak as though he would wrest it from him by one single effort. But the harder he blew, the more closely the man wrapped it round himself. Then came the turn of the sun. At first he became gently upon the traveller, who soon unclasped his cloak and walked on with his hanging loosely about his shoulders. Then he shone forth in his full strength, and the man, before he had gone many steps, was glad to throw his cloak right off and complete his journey more lightly clad.

Persuasion is better than force.

Esopo

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Conclui-se que a melatonina agiu melhorando a qualidade embrionária. Contudo, esta melhora não se traduziu em menor sensibilidade aos danos causados pelo processo de vitrificação ou melhora na retomada do desenvolvimento pós-vitrificação. Ainda, não foi identificado, nas condições propostas ação da melatonina na redução das espécies reativas de oxigênio.

The Ass Carrying the Image

A certain man put an image on the back of his ass to take it to one of the temples of the town. As they went along the road all the people they met uncovered and bowed their heads out of reverence for the image; but the ass thought they were doing it out of respect for himself, and began to give himself airs accordingly. At last he became so conceited that he imagined he could as he liked, and, by way of protest against the load he was carrying, he came to a full stop and flatly declined to proceed any further. His driver, finding him so obstinate, hit him hard and long with his stick, saying the while, 'Oh, you dunderheaded idiot, do you suppose it's come to this, that men pay worship to an ass?'

Rude shocks await those who take to themselves the credit that is due to others.

Esopo

As Fábulas de Esopo foram extraídas de: Aesop's Fables, Collector's Library CRW, Londres, 2006

Referências

REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZÚÑIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. **Veterinary research communications**, v. 26, n. 2, p. 151-8, fev 2002.
- AITKEN, R. J.; KOPPERS, A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 36-42, jan 2011.
- AKBULUT, K. G.; GONUL, B.; AKBULUT, H. The role of melatonin on gastric mucosal cell proliferation and telomerase activity in ageing. **Journal of pineal research**, v. 47, n. 4, p. 308–312, 2009.
- ANISIMOV, V N. Effects of exogenous melatonin--a review. **Toxicologic pathology**, v. 31, n. 6, p. 589-603, 1 out 2003.
- ANISIMOV, VLADIMIR N; POPOVICH, I. G.; ZABEZHINSKI, M. A. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 573-89, 2006.
- Anjum, S.; Rahman, S.; Kaur, M.; Ahmad, F.; Rashid, H.; Ansari, R. A., Raisuddin, S. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 11, p. 2849-54, 5 nov 2011.
- ARIAS, MARIA ELENA; SANCHEZ, R.; FELMER, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, p. 1-9, 24 mar 2011.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; MILAZZOTTO, M. P.; SIMÕES, R. NICACIO, A. C.; MENDES, C M; MELLO, M. R. B.; VISINTIN, J. A. In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. **Anim. Reprod**, v. 5, n. 3/4, p. 116-120, 2008.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F. S. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 67-74, jan 2010.
- BASINI, G.; SIMONA, B.; SANTINI, S. E.; GRASSELLI, F. Reactive oxygen species and antioxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 2, p. 269-74, jan 2008.
- BIELANSKI, A; LALONDE, A. Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 919-25, 15 out 2009.
- BIELANSKI, A; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 110-6, mar 2000.
- BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1063-71, 15 abr 2009.

- BORAH, A.; MOHANAKUMAR, K. P. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. **Journal of pineal research**, p. 293-300, 2009.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-58, ago 1982.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-10, jan 1978.
- CAMPOS-CHILLÓN, L. F.; WALKER, D. J.; TORRE-SANCHEZ, J. F. DE LA; SEIDEL, G. E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1200-14, 1 abr 2006.
- CARRETERO, M.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. **Journal of pineal research**, v. 47, n. 2, p. 192-200, set 2009.
- CHATTOPADHAYAY, R.; GANESH, A.; SAMANTA, J. Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 69, n. 3, p. 197-202, jan 2010.
- CHOI, J.; PARK, S.-M.; LEE, E. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 7, p. 1127-35, jul 2008.
- COSTA, E. J.; SHIDA, C. S.; BIAGGI, M. H.; ITO, A. S.; LAMY-FREUND, M. T. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. **FEBS letters**, v. 416, n. 1, p. 103-6, 13 out 1997.
- DAS, S.; CHATTOPADHYAY, R.; GHOSH, S. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 9, p. 2403-7, set 2006.
- DOBRINSKY, J. R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 285-302, 1 jan 2002.
- DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A.; ABREU-GONZALEZ, P.; REITER, RUSSEL J. Melatonin and cardioprotection in the acute myocardial infarction: A promising cardioprotective agent. **International journal of cardiology**, p. 1-2, 14 maio 2012.
- EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 78, n. 4, p. 250-62, abr 2011.
- FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L.; VANDER ZWAAG, D. F.; FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 125-38, 1 jan 2003.
- FELMER, R. N.; ARIAS, M. E.; MUÑOZ, G. A.; RIO, J. H. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 78, n. 6, p. 403-14, 12 jun 2011.
- FEUGANG, J.-M.; ROOVER, R. DE; MOENS, A. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of

apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 71-90, 1 jan 2004.

GAO, C.; HAN, H.-B.; TIAN, X.-Z. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal of pineal research**, v. 52, n. 3, p. 305-11, abr 2012.

GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 1, p. 129-35, fev 2010.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human reproduction update**, v. 7, n. 2, p. 175-89, 2001.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 1013-21, maio 2008.

HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. **Australian veterinary journal**, v. 88, n. 8, p. 307-10, ago 2010.

HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, n. 6, p. 355-64, jun 2009.

ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, M. T. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of pineal research**, v. 28, n. 1, p. 48-51, jan 2000.

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 365-75, ago 1998.

JIN, B.; KAWAI, Y.; HARA, T. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 4, p. 834-47, out 2011.

KANG, J.-T.; KOO, O.-J.; KWON, D.-K. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 1, p. 22-8, jan 2009.

KANTER, M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. **Experimental and molecular pathology**, v. 89, n. 3, p. 314-20, dez 2010.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186-97, 1 out 2004.

KOLÁR, J.; MACHÁCKOVÁ, I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. **Journal of pineal research**, v. 39, n. 4, p. 333-41, nov 2005.

KORKMAZ, A.; REITER, RUSSEL J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? **Journal of pineal research**, p. 41-44, 2008.

LANOIX, D.; LACASSE, A.A.; REITER, RUSSEL J; VAILLANCOURT, C. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 1-11, 2 jan 2012.

LAPOINTE, J.; BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1157-64, abr 2003.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p. 786-90, out 1995.

LONERGAN, P; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1565-76, jun 1999.

MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 44, n. 1, p. 12-6, fev 2009.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.

MATOS, D. G. DE; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J. G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1443-51, 15 mar 2002.

MOORE, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M. 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, n. 9, p. 1316-25, dez 2007.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 7, p. 1141-7, jan 2010.

NEDAMBALE, T L; DU, F; XU, J. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1951-60, nov 2006.

NEDAMBALE, TSHIMANGADZO LUCKY; DU, FULIANG; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal reproduction science**, v. 93, n. 1-2, p. 61-75, jun 2006.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; SHINOHARA, K.; TANIGUCHI, K.; FUKAYA, T. Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. **Journal of pineal research**, v. 31, n. 2, p. 173-8, set 2001.

OLCESE, J. M.; CAO, C.; MORI, T. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. **Journal of pineal research**, v. 47, n. 1, p. 82-96, 2009.

ORAL, O.; KUTLU, T.; AKSOY, E. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 23, n. 2, p. 81-5, fev 2006.

PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal of pineal research**, v. 43, n. 4, p. 321-6, nov 2007.

PAULA-LOPES, F.; JOUSAN, F. D.; ROTH, Z.; SOTO, P.; HANSEN, P. J. **TUNEL PROCEDURE IN BOVINE EMBRYOS**. Disponível em: <<http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/tunel.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2011.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-7, 1 mar 2009.

RALL, W. F. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos by Vitrification'. **CRYOBIOLOGY**, v. 402, n. 24, p. 387-402, 1987.

REITER, R J; TAN, D. X.; MANCHESTER, L C; QI, W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 34, n. 2, p. 237-56, jan 2001.

REITER, RUSSEL J; TAN, D.-XIAN; MANCHESTER, LUCIEN C; Melatonin and reproduction revisited. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445-56, set 2009.

REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D. Melatonin therapy in fibromyalgia. **Current Pain and Headache Reports**, v. 11, n. 5, p. 339-342, 2007.

RIZOS, DIMITRIOS; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, MAURICE P; LONERGAN, PATRICK. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 62, n. 3, p. 320-7, jul 2002.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-43, 14 jan 2003.

RIZOS, DIMITRIOS; WARD, F; BOLAND, M P; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, n. 01, p. 1-16, 1 jul 2001.

RIZOS, DIMITRIOS; WARD, FABIAN; DUFFY, P.; BOLAND, MAURICE P; LONERGAN, PATRICK. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234-48, fev 2002.

RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Human reproduction update**, v. 14, n. 4, p. 345-57, 2008.

SEIDEL, GEORGE E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228-35, 7 jan 2006.

- SHI, J.-M.; TIAN, X.-Z.; ZHOU, G.-B. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of pineal research**, v. 47, n. 4, p. 318-23, nov 2009.
- SHIDA, C. S.; CASTRUCCI, A. M.; LAMY-FREUND, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. **Journal of pineal research**, v. 16, n. 4, p. 198-201, maio 1994.
- SHIRAZI, A; NAZARI, H.; AHMADI, E.; HEIDARI, B.; SHAMS-ESFANDABADI, N. Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 59, n. 3, p. 285-90, dez 2009.
- STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3437-45, jul 2011.
- TAKADA, L.; JUNIOR, A M.; MINGOTI, G. Z. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 1, p. 124-7, fev 2012.
- TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 3, p. 280-7, abr 2008.
- TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of ovarian research**, v. 5, n. 1, p. 5, jan 2012.
- TAN, D.-XIAN; REITER, RUSSEL J; MANCHESTER, LUCIEN C; Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181-97, fev 2002.
- TEIXEIRA, A.; MORFIM, M. P.; CORDOVA, C. A. S. DE; Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxyxynitrite. **Journal of pineal research**, v. 35, n. 4, p. 262-8, nov 2003.
- TORTONESE, D. J.; INSKEEP, E. K. Effects of melatonin treatment on the attainment of puberty in heifers. **Journal of animal science**, v. 70, n. 9, p. 2822-7, set 1992.
- TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Cryopreservation of mammalian embryos: Advancement of putting life on hold. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 90, n. 3, p. 163-75, set 2010.
- VAJTA, G. Vitrification in ART – getting closer ? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 2, p. 565-572, 2010.
- VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; ALMEIDA CAMARGO, L. S. DE. Use of in vitro Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 2, p. s661–s674, 2010.
- WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. VAN. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 914-25, 15 mar 2006.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. VAN; DAAS, J. H. DEN; RALL, W. F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1071-84, nov 1997.

WILHELMSSEN, M.; AMIRIAN, I.; REITER, RUSSEL J; ROSENBERG, J.; GÖGENUR, I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. **Journal of pineal research**, p. 270-277, 18 abr 2011.

YU, X. L.; DENG, W.; LIU, F. J. Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 474-9, 1 mar 2010.

Anexos

Anexos

ANEXO A - Meios de Maturação *in vitro* MIV

- Meio de colheita

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
TCM 199	GIBCO	31100-035	
NaHCO ₃	Sigma	S5761-500G	2,2g
H ₂ O Mili-Q			QSP 1 litro

Armazenar em geladeira

- Meio de Colheita uso

Reagente	Volume
Meio de colheita	50 ml
SFB + Heparina	0,5 ml
Penicilina –Estreptomicina	50 µl

- Meio de lavagem MIV (Pré-MIV)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
M-199 com HEPES	Gibco	12380-028	9 ml
SFB	Gibco	16140-014	1 ml
Pyruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	20 µl
Gentamicina 50µg/ml	Sigma	G-1264	50 µl

Filtrar em 0,22 µm

- Meio de maturação *in vitro* (MIV)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
M-199 com BICARBONATO	Gibco	11150-026	9 ml
SFB	Gibco	16140-014	1 ml
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	20 µl
Gentamicina 50µg/ml	Sigma	G-1264	50 µl
FSH 0,5µg/ml	Bioniche	Folltropin-V	10 µl
hCG 7UI/ml	Intervet	Chorulon	100 µl
Filtrar em 0,22 µm			
Estradiol 1µg/ml	Sigma	E-4389	10 µl

ANEXO B - Meios de Fecundação *in vitro* – FIV• **Meio de lavagem Pré-FIV**

M-199 com Hepes	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
BSA-V	0,015 g	0,03 g	0,045 g	0,06 g
Pyruvato	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl
Kanamicina ou Gentamicina	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl

Filtrar em 0,22 µm.

• **Meio FIV**

TL-Stock	2,5	5	10	15
BSA livre de Ácidos Graxos	0,015 g	0,03 g	0,06 g	0,09 g
Pyruvato	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl
Kanamicina ou Gentamicina	12,5 µl	25 µl	50 µl	100 µl

Filtrar em 0,22 µm.

• **FIV Gota**

Meio FIV	3,64 µl	1,82 µl
Heparina	40 µl	20 µl
PHE	160 µl	80 µl

Filtrar em 0,22 µm.

• **Percoll 90%**

Percoll Centrifugado	0,9ml
Solução 10X	0,1ml
Solução CaCl₂ 2H₂O	2 µl
Solução MgCl₂ 6H₂O	3,9 µl
Ácido Láctico (Lactato de Sódio – C₃H₅NaO₃)	3,7 µl
Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)	0,0021g

• **Percoll 45%**

Percoll 90%	300 µl
TL-Sêmen	300 µl

ANEXO C - Preparo do gradiente descontínuo de Percoll

Em um tubo de micro centrifuga de volume 1,5 ml colocar 400µl de Percoll 45% em seguida e com muito cuidado coloca-se os outros 400µl de Percoll 90% por baixo, evitando misturar as fases.

Descongelar a palheta de sêmen (37 C por 30 segundos) e despejar suavemente o conteúdo por cima do Percoll 45% (palheta de 0,25 toda; de 0,50 metade).

Centrifugar por 5 minutos a 9000xG

Recolher o sedimento e resuspender em 800 µl de TL sêmen aquecido a 37°C em outro tubo de microcentrifuga. Centrifugar por 3 minutos a 9000xG. Recolher o sedimento, medir e guardar em um tubo de microcentrifuga aquecido.

Retirar 5 µl do sedimento e colocar em um tubo de microcentrifuga contendo 245µl de água para avaliar a concentração.

Retirar 5 µl do sedimento e colocar em um tubo de microcentrifuga contendo 250 µl de TL-sêmen para avaliar a motilidade

As gotas devem ser inseminadas com a concentração espermática ajustada para 1×10^6 células/ml. Para tanto a conta é:

$$\text{(Soma dos 5 campos} \times 0,0\text{Motilidade} \times \text{volume do pellet)} = \text{volume final}$$
$$\text{volume final} = \text{volume do pellet} + \text{volume de meio a ser acrescentado}$$

Inseminar o poço de 400µl com 16µl de sêmen.

ANEXO D - Meios de Cultivo *in vitro* CIV**KSOM “Potassium simplex optimization medium”**• **KSOM-BSA, CIV**

KSOM MRD-106-D	1,8 ml	5 ml
BSA EFAF (3mg/ml)	0,0054 g	0,015 g
Gentamicina	0,45 µl	1,25 µl
AA's Não Essenciais	9 µl	25 µl

Meio KSOM Millipore (Merck) MRD-106-D

• **KSOM-SFB 20%, Feeding Dia3**

KSOM MRD-106-D	1,68 ml	4 ml
SFB	360 µl	1 µl
Gentamicina	0,45 µl	25 µl
AA's Não Essenciais	9 µl	25 µl

Meio KSOM Millipore (Merck) MRD-106-D

• **KSOM-SFB 10%, Feeding Dia5**

KSOM MRD-106-D	1,8 ml	4,5 ml
SFB	180 µl	500 µl
Gentamicina	0,45 µl	25 µl
AA's Não Essenciais	9 µl	25 µl

Meio KSOM Millipore (Merck) MRD-106-D

ANEXO E - Meios de Vitriificação

- Meio de Manutenção

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
M199 com HEPES	Gibco	12350-039	8 ml
SFB	Gibco	16140-014	2 ml

Filtrar em 0,22 μ m

- Meio de equilíbrio 1 (10% de Glicerol)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
Meio de Manutenção			4,5 ml
Glicerol	Sigma	G2025-500	0,5 ml

- Meio de equilíbrio 2 (10% de Glicerol + 20% de Etileno Glicol)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
Meio de Manutenção			3,5 ml
Glicerol	Sigma	G2025-500	0,5 ml
Etileno Glicol	Baker	9300-01	1 ml

- Meio de Vitriificação (25% de Glycerol e 25% de Etileno Glicol)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
Meio de Manutenção			2,5 ml
Glicerol	Sigma	G2025-500	1,25 ml
Etileno Glicol	Baker	9300-01	1,25 ml

- Solução de sacarose 0,3 M

Reagente	Volume
TMC 20%SFB	5 ml
Sacarose	0,5 g

- TCM 199

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
M199 com Bicarbonato	Gibco	11150-059	9 ml
SFB	Gibco	16140-014	1 ml

Filtrar em 0,22 μ m

ANEXO F - Soluções para realização do TUNEL

- Solução de PBS 0.2M

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
K₂HPO₄ 0.2M	Sigma	P-5655	34,83g
NaCl	Sigma	S-5886	9g
Água Milli Q			1L

pH 7.4

- Solução de PBS 10mM

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1l
K₂HPO₄ 10mM	Sigma	P-5655	1,742g
NaCl	Sigma	S-5886	9g
Água Milli Q			1l

pH 7.4

- Solução de PBS-PVP

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1l
PBS 10mM			1000ml
Polivinilpirrolidona (PVP)	Sigma	P-0930	1g

- Solução de Hidróxido de Sódio 2N

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1l
NaOH 2N	Synth	H 1017.01.AH	80g
Água Milli Q			QSP 1l

- Solução de Paraformaldeído 8% (estoque)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1l
Paraformaldeído	EMS	19210	8g
Água Milli Q(55-60°C)			QSP 1l

* adicionar algumas gotas de NaOH 2N até a solução ficar incolor. Filtrar (0,22µm) e estocar a -20°C

- Solução de Paraformaldeído 4% (uso)

* fazer uma solução 1:1 de paraformaldeído 8% e PBS 0.2M no momento do uso.

- Solução de Permeabilização

Reagentes	Fabricante	Catálogo	200ml
Triton X-100 0,5%	Sigma	X-100	1ml
Solução de Citrato de Sódio 0,1%			199ml

- Solução de citrato de sódio 0,1%

Reagentes	Fabricante	Catálogo	200ml
Citrato de Sódio	Sigma	S-4641	2g
Água MilliQ			200ml

- Solução de DNase (50U/ml)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	100µl
DNase I (RNase free)	BioLabs	M0303S	2,5µl
PBS-PVP			97,5µl

* preparar a solução apenas no momento do uso

- Solução de Hoechst 33342 (5µg/ml) – Estoque

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1ml
Hoechst 33342	Sigma	B-2261	5 µg
PBS	Nutricell	01.002.1000	1ml

Estocar a -20°C

- Solução de Hoechst 33342 – Uso

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1ml
Solução de Hoechst 33342 estoque			1µl
PBS-PVP			1ml

* Preparar apenas no momento do uso

- Solução de DABCO

Reagentes	Fabricante	Catálogo	10ml
1,4-Diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO)	Sigma	D-2522	0,23g
Tris 0.5M, pH 8.0	Fluka	93363	0,4ml
Glicerol	Sigma	G-5516	5ml
Água destilada			4,6ml

Manter a 4°C, abrigado da luz.

ANEXO G - Soluções para ensaio de TBARS

- Sulfato de Ferro 4mM

Reagentes	Fabricante	Catálogo	50ml
Sulfato de Ferro	Sigma	F-8263	0,05560g
Água MilliQ			50ml

Manter em temperatura ambiente e abrigado da luz

- Ascorbato 20mM

Reagentes	Fabricante	Catálogo	50ml
Ascobarto	Sigma	A-4034	0,17615g
Água MilliQ			QSP 50ml

Manter em temperatura ambiente e abrigado da luz

- Ácido Tricloroacético 10% (TCA 10%)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1 L
TCA 10%	Sigma	T-9195	0,17615g
Água MilliQ q.s.p			QSP 1l

- Ácido Tiobarbitúrico (TBA 1%)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	100ml
TBA 1%	Sigma	T-5500	1g
NaOH 0,05N	Synth	H1017.01.AH	100ml

Preparar apenas no momento do uso

Apêndices

Apêndices

Apêndice A – Protocolo padrão dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP

Cronograma da PIV

-1	0	1	2	3	4	5
MIV(22h): h	FIV(18h): h	CIV: h		Clivados Feeding 1	*Feeding α	Feeding 2
6	7	8	9	10	11	12
	BL		BL			Eclosão

*Ou faz os Feedings 1 e 2 ou o Feeding α

• **D -1 – Maturação *in vitro* MIV**

Preparar meios:

MIV

Pré MIV

Colheita

Preparar para a MIV:

Bancada para aspiração (fornada com papel craft e organizada para a chegada dos ovários)

Banho Maria a 37°C

Becker grande para os Ovários

Tubos cônicos de 15 ml, marcados para evitar preenchimento excessivo.

Seringas de 5 ml

Agulhas de 21G

Sempre que possível montar as placas de MIV com antecedência de pelo menos 2 horas e deixar equilibrando na incubadora. Caso isso não seja viável colocar o óleo e o meio separadamente para equilibrar na incubadora, e montar a placa na hora.

Montagem da placa de MIV

Em uma placa pequena (35mm) marque até 6 gotas de 35 μ l de meio MIV, em seguida colocar óleo mineral para envolver completamente as gotas porém sem cobrir, completar o volume das gotas com 55 μ l de meio MIV (Total de 90 μ l), por fim completar com o óleo até cobrir as gotas usando o pitado automático. Cuidado para não encher demais com o óleo.

Procura-se preservar a proporção de 3/1 ou seja, 3 a 4,5 μ l de meio para um oócito, em geral colocam-se entre 20 e 30 oócitos por gota de 90 μ l.

Caso tenha muitos grupos opte por placas maiores.

Aspiram-se os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm

Após a aspiração dos oócitos deixar decantar o conteúdo dos tubos cônicos por alguns minutos, em seguida com uma pipeta de 2ml recolher o pellet e despejar em uma placa de 120 mm previamente marcada (caneta de cor clara) para o rastreamento com linhas

paralelas separadas por aproximadamente 1cm. Caso seja necessário diluir o pellet em meio pré MIV e dividir para mais placas para facilitar o rastreamento.

Todos os COC's devem ser transferidos para uma placa pequena com meio pré-MIV, onde serão selecionados.

Os COC's grau 1 (citoplasma homogêneo e camadas de células do *cumulus oophorus* aderidas) devem ser transferidos para outra placa em gota de meio pré MIV de aproximadamente 200 µl em seguida lavados em mais duas gotas de meio pré MIV. Em seguida lava-se em mais três gotas de meio MIV. Em seguida transferir os COC's para a placa de MIV

Estas gotas devem ser usadas para lavar no máximo 120 oócitos, devendo-se trocar as gotas.

Levar a placa de MIV para a incubadora, 38,5°C 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

A maturação *in vitro* em bovinos dura 22-24 horas (Melhor mais próximo a 22 horas que passar de 24).

- **D 0 – Fecundação *in vitro* FIV**

Preparar meios:

FIV gota

Pré FIV

SOF

Percoll 45

Percoll 90 (manter aberto na Estufa)

TALP-sêmen (TL-sêmen)

Preparar para a FIV:

“Fertilize” com água e aquecido ou Banho Maria a 37°C

Mesa aquecida e platina para análises imediatas do sêmen.

Lâminas e lamínulas aquecidas

Câmara de NeuBauer espelhada

Um tubo de micro centrífuga com 245 µl de água

Um tubo de micro centrífuga com 250 µl TL-sêmen aquecido a 37°C

Um tubo de micro centrífuga com 800 µl de TL-sêmen aquecido a 37°C

Sempre montar as placas de FIV com antecedência e deixe equilibrando na incubadora.

Montagem da placa de FIV

Em uma placa pequena (35mm) marque o mesmo número de gotas da sua placa MIV com 35 µl de meio FIV, em seguida coloque óleo mineral para envolver completamente as gotas porém sem cobrir, complete o volume das gotas com 55 µl de meio FIV (Total de 90 µl), por fim complete com o óleo até cobrir as gotas. Cuidado para não encher demais com o óleo. Deixar na incubadora para equilibrar por 2 horas.

Coloca-se neste momento também o meio SOF para equilibrar.

Procedimento de FIV

Retira-se os COC's da placa de MIV, passa por 3 gotas de 200 µl meio pré FIV e em seguida por 3 gotas de meio FIV gota para então transferir para a placa de FIV.

Estas gotas devem ser usadas para lavar no máximo 120 oócitos, devendo-se trocar as gotas.

Retornar a placa para a incubadora e retirar o material e montar o Percoll.

Procedimento para o Percoll

Em um tubo de micro centrífuga de volume 1,5 ml colocar 400 µl de Percoll 45 em seguida e com muito cuidado coloca-se os outros 400 µl de Percoll 90 por baixo, evitando misturar as fases.

Descongelar a palheta de sêmen e despejar suavemente o conteúdo em cima do Percoll (palheta de 0,25 toda; de 0,50 metade).

Centrifugar por 5 minutos a 9000xG (12000 rpm na centrífuga eppendorf que está na FIV).

Recolher o pellet e com volume máximo de 100 µl e resuspender em 800 µl de meio FIV aquecido a 37°C em outro tubo de microcentrífuga. Centrifugar por 3 minutos a 9000xG (12000 rpm na centrífuga eppendorf que está na FIV) recolher o pellet, medir e guardar em um tubo de microcentrífuga aquecido.

Retirar 5 µl e colocar em um tubo de microcentrífuga contendo 245 µl de água para avaliar a concentração.

Retirar 5 µl e colocar em um tubo de microcentrífuga contendo 250 µl de fiv gota para avaliar a motilidade

As gotas devem ser inseminadas com a concentração espermática ajustada para 1×10^6 células/ml. Para tanto a conta é:

$$\begin{aligned} (\text{Soma dos 5 campos} \times 0,0 \text{ Motilidade} \times \text{volume do pellet}) &= \text{volume final} \\ \text{volume final} &= \text{volume do pellet} + \text{o que tem que adicionar} \end{aligned}$$

Para inseminar a gota de 90 µl com 4 µl de sêmen.

Retorna as placas de FIV e CIV para a incubadora, 38,5°C 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

A fecundação *in vitro* em bovinos dura 18 horas

Preparo da placa de CIV

A antiga placa de MIV deve ser preparada para a CIV, retira-se o restante de meio MIV, coloca-se no mesmo local (virando o espelho da lupa fica fácil ver a marcação) 90µl de meio SOF para lavar a gota, em seguida retira-se o meio SOF e novamente coloca-se 90µl de meio SOF. Marcar a tampa com CIV.

• **D 1 – Cultivo *in vitro* CIV**

Pré FIV

SOF

Deixar na incubadora para equilibrar por 2 horas.

Procedimento para cultivo

Retira-se os presumíveis zigotos da placa de FIV passa por 3 gotas de 250 µl meio pré FIV, em cada gota, com a pipeta automática de 200 µl ajustada para 120 - 150 µl pipeta-se gentil, porém, vigorosamente com a pipeta inclinada (Puxando com mais devagar e soltando com mais velocidade para formar um turbilhão, movimento contínuo e rítmico). Os presumíveis zigotos que já após a primeira denudação ficarem desnudos podem ser transferidos diretamente para a terceira gota, evitando-se assim um estresse desnecessário.

Em seguida passar os presumíveis zigotos por 3 gotas de meio SOF para então transferir para a placa de CIV.

Retorna a placa de CIV para a incubadora, pode descartar a placa de FIV.

• **D 3 – Feeding 1**

Preparar meio:

SOF

Deixar na incubadora para equilibrar por 1 hora.

Procedimento de Feeding 1

Soltar gentilmente os embriões da monocamada de células da granulosa cutucando com a pipeta de vidro. Retirar o excesso de células da monocamada e descartar.

Apenas acrescentar 90 µl de SOF

Retorna a placa de CIV para a incubadora.

- **D 5 – Feeding 2**

Preparar meio:

SOF

Deixar na incubadora para equilibrar por 1 hora.

Procedimento de Feeding 2

Soltar gentilmente os embriões da monocamada de células da granulosa cutucando com a pipeta de vidro.

Retirar 90 µl de meio da gota e acrescentar 90 µl de SOF

Retorna a placa de CIV para a incubadora.

- **D 4 Feeding α**

Preparar meio:

SOF

Deixar na incubadora para equilibrar por 1 hora.

Procedimento de Feeding α

Soltar gentilmente os embriões da monocamada de células da granulosa cutucando com a pipeta de vidro.

Apenas acrescentar 90 µl de SOF

Retorna a placa de CIV para a incubadora.

- **MEIO SOF-Stock**

	Volume final de 100ml
NaCl	0,6294g
KCl	0,0534g
KH₂PO₄	0,0162g
NaHCO₃	0,2106g
Lactato de Sódio	0,0370g
Ácido Piruvico	0,0034g
Vermelho fenol	0,00013g
L-glutamina	0,0146g
MgCl₂·7H₂O	0,0098g
CaCl₂	0,0252g
Água Mili-Q QSP	100 ml

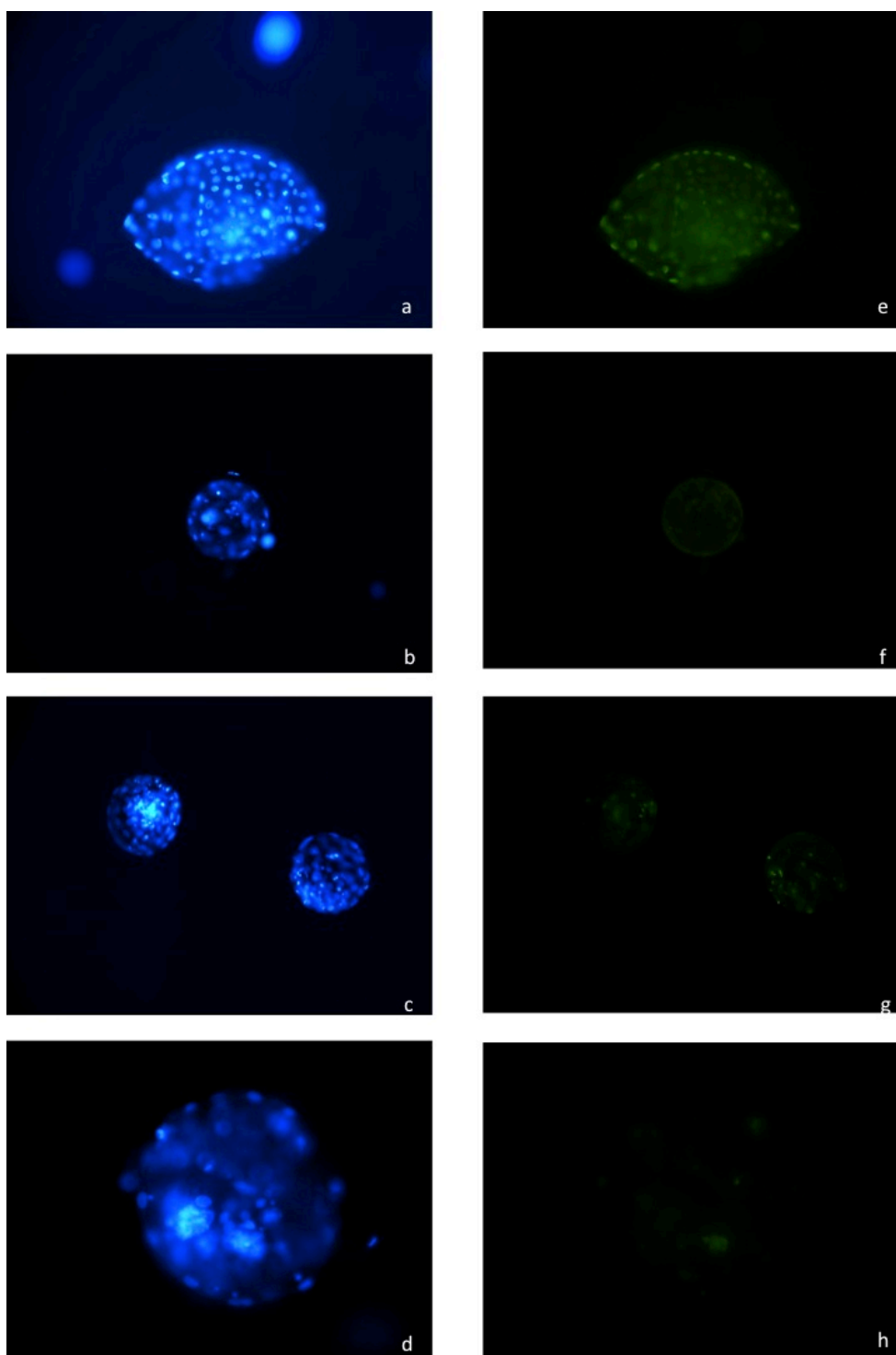
Pesar em separado para evitar precipitação de sais na hora da diluição.

- **Meio SOF-Uso**

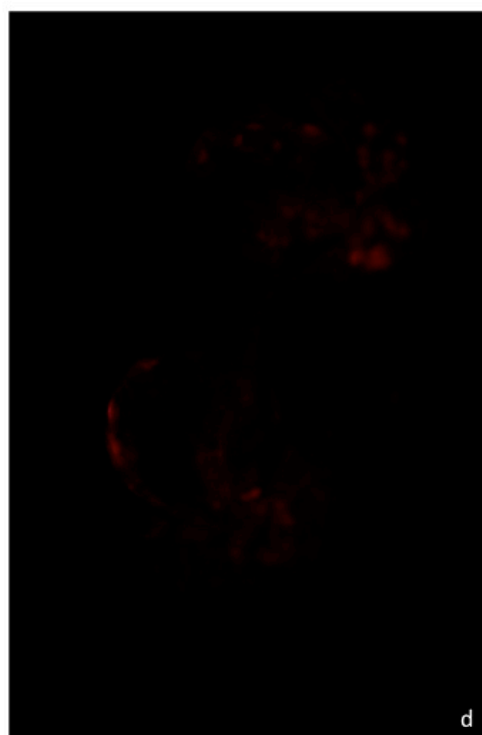
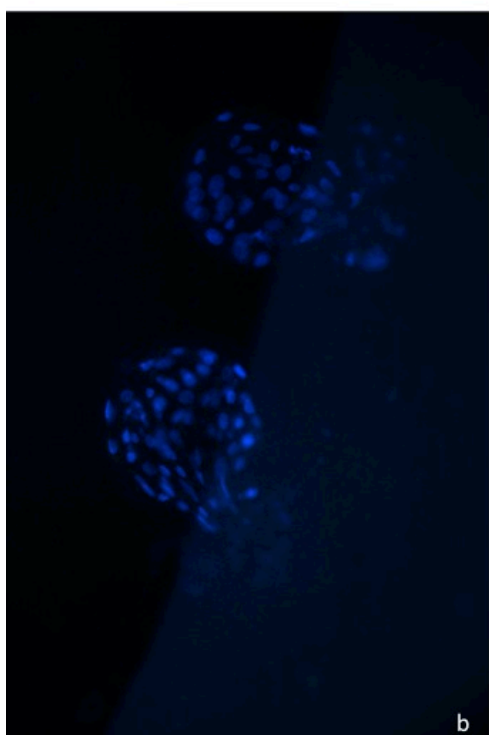
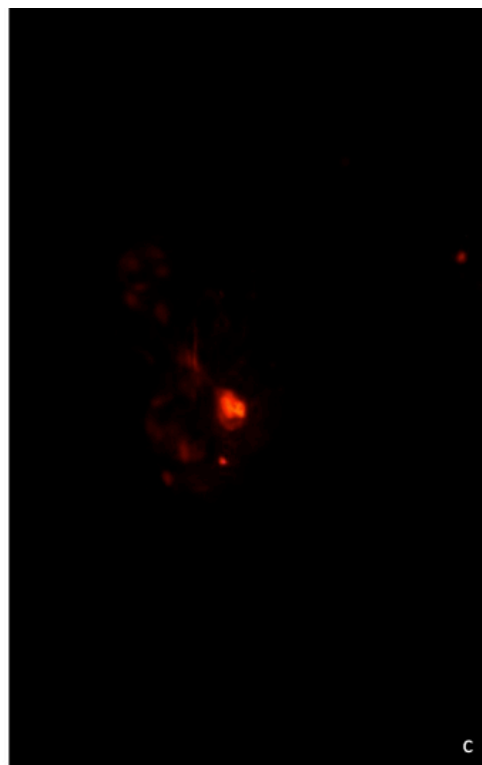
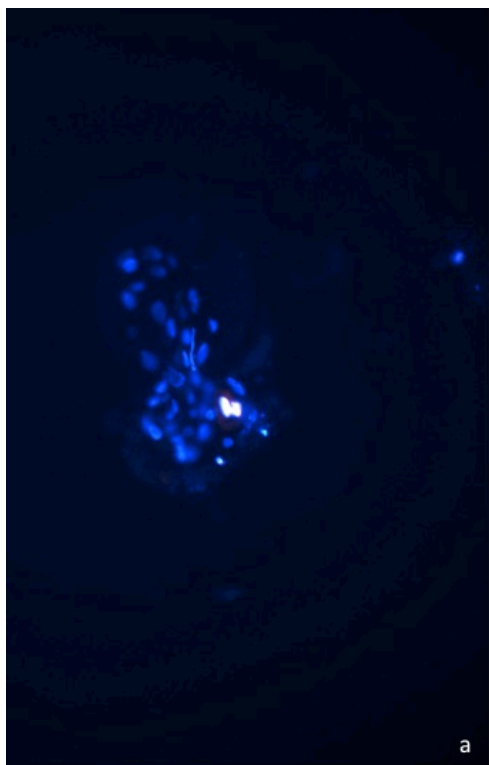
	5	10
Meio SOF estoque	4,6 ml	9,2 ml
SFB	250 µl	500 µl
Amino ácidos essenciais	100 µl	200 µl
Amino ácidos não essenciais	50 µl	100 µl

Este meio tem validade de 7 dias em geladeira.

Apêndice B - Imagem fotográfica em microscopia de epifluorescência de blastocistos não vitrificados, submetidos ao ensaio de TUNEL, após 24 horas de cultivo em paralelo aos embriões descongelados (c, d, g, h). Embriões dos controles de técnica positivo(a, e) e negativo(b, f) do ensaio de TUNEL. Embriões visualizados no filtro para Hoescht 33342 (a, b, c, d) e PI (e, f, g, h)



Apêndice C - Imagem fotográfica em microscopia de epifluorescência de blastocistos não vitrificados, corados com Hoechst e Iodeto de Propídeo, após 48 horas de cultivo em paralelo aos embriões descongelados. Embriões visualizados no filtro para Hoescht 33342 (a, b) e FITC (c, d)



Apêndice D - Tabela das correlações e significância estatística da correlação entre as subpopulações de células do cumulus

Subpopulações R p	Viáveis	Alto potencial de mitocôndrias	Médio potencial de mitocôndrias	Baixo potencial de mitocôndrias	Íntegras em estresse oxidativo
Viáveis	1	-0.08863 0.7842	0.65483 0.0208	-0.67501 0.0160	-0.17056 0.6376
Alto potencial de mitocôndrias	-0.08863 0.7842	1	-0.69589 0.0120	-0.49268 0.1037	0.85897 0.0015
Médio potencial de mitocôndrias	0.65483 0.0208	-0.69589 0.0120	1	-0.28168 0.3751	-0.51561 0.1272
Baixo potencial de mitocôndrias	-0.67501 0.0160	-0.49268 0.1037	-0.28168 0.3751	1	0.06591 0.8564
Íntegras em estresse oxidativo	-0.17056 0.6376	0.85897 0.0015	-0.51561 0.1272	0.06591 0.8564	1

Apêndice E - Tabela das correlações e significância estatística da correlação entre as variáveis: do Dia 7, % Vitriificados D7; % Vitriificados D8; % Vitriificados Total; avaliação do TBARS no Dia 5 e no Dia 8

% Correlação p	Clivados	Iniciais	Blastocistos	Expandidos	Total de Blastocistos	Expandidos /Blastocistos	Vitriificados D7	Vitriificados D8	Vitriificados Total	TBARS no Dia 5	TBARS no Dia 8
Clivados	1	0,28274 0,0096	0,47479 <0,0001	0,33683 0,0018	0,54285 <0,0001	0,11161 0,3151	0,33683 0,0018	0,491 <0,0001	0,59086 <0,0001	0,07158 0,5202	0,21751 0,0482
Iniciais	0,28274 0,0096	1	0,37785 0,0004	0,04663 0,6755	0,45251 <0,0001	-0,30037 0,0058	0,04663 0,6755	0,31796 0,0034	0,24898 0,0232	-0,15337 0,1663	0,28548 0,0064
Blastocistos	0,47479 <0,0001	0,37785 0,0004	1	0,21736 0,0484	0,78193 <0,0001	-0,28642 0,0087	0,21736 0,0484	0,64254 <0,0001	0,60350 <0,0001	-0,04624 0,6781	0,29675 0,0064
Expandidos	0,33683 0,0018	0,04663 0,6755	0,21736 0,0484	1	0,67871 <0,0001	0,78862 <0,0001	1	0,09567 0,3896	0,68907 <0,001	0,00387 0,9723	0,11571 0,2975
Total de Blastocistos	0,54285 <0,0001	0,45251 <0,0001	0,78193 <0,0001	0,67871 <0,0001	1	0,17338 0,1170	0,67871 <0,0001	0,53866 <0,0001	0,8593 <0,0001	-0,06117 0,5828	0,32219 0,003
Expandidos /Blastocistos	0,11161 0,3151	-0,30037 0,0058	-0,28642 0,0087	0,78862 <0,0001	0,17338 0,1170	1	0,78862 <0,0001	-0,26386 0,0159	0,30067 0,0057	0,10643 0,3383	-0,05663 0,6111
Vitriificados D7	0,33683 0,0018	0,04663 0,6755	0,21736 0,0484	1	0,67871 <0,0001	0,78862 <0,0001	1	0,09567 0,3896	0,68907 <0,0001	0,00387 0,9723	0,11571 0,2975
Vitriificados D8	0,491 <0,0001	0,31796 0,0034	0,64254 <0,0001	0,09567 0,3896	0,53866 <0,0001	-0,26386 0,0159	0,09567 0,3896	1	0,72361 <0,0001	0,08730 0,4326	0,24271 0,0270
Vitriificados Total	0,59086 <0,0001	0,24898 0,0232	0,60350 <0,0001	0,68907 <0,001	0,8593 <0,0001	0,30067 0,0057	0,68907 <0,0001	0,72361 <0,0001	1	0,05473 0,6232	0,26459 0,0156
TBARS no Dia 5	0,07158 0,5202	-0,15337 0,1663	-0,04624 0,6781	0,00387 0,9723	-0,06117 0,5828	0,10643 0,3383	0,00387 0,9723	0,08730 0,4326	0,05473 0,6232	1	0,28096 0,0101
TBARS no Dia 8	0,21751 0,0482	0,28548 0,0064	0,29675 0,0064	0,11571 0,2975	0,32219 0,003	-0,05663 0,6111	0,11571 0,2975	0,24271 0,0270	0,26459 0,0156	0,28096 0,0101	1