UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HUGO FERNANDES

**A melatonina e seu efeito citoprotetor na
maturação de oócitos murinos**

HUGO FERNANDES

**A melatonina e seu efeito citoprotetor na
maturação de oócitos murinos**

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Lima Verde Leal.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

F363m Fernandes, Hugo
 A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação
de oócitos murinos / Hugo Fernandes. -- Pirassununga,
2015.
 85 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Medicina Veterinária.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

 Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal.

 1. Antioxidante 2. Antiapoptótico 3. N-acetil 5-
metoxitriptamina 4. PCR em tempo real 5. Camundongo.
I. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor”

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: **FERNANDES, Hugo**

Título: **A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação de oócitos murinos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Data de aprovação: 02/10/2015.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal

Instituição: FZEA - USP

Assinatura: _____

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Instituição: FZEA - USP

Assinatura: _____

Julgamento: Aprovado

Dra. Yeda Fumie Watanabe

Instituição: WTA - Tecnologia Animal

Assinatura: _____

Julgamento: Aprovado

DEDICO:

*À minha orientadora, **Cláudia**,
pelos ensinamentos e apoio mediante as
dificuldades e desafios enfrentados.
Obrigado pela paciência e compreensão.*

*Aos meus pais, **Carlos Alberto
Fernandes e Márcia Regina de Souza
Fernandes**, pelo amor, incentivo,
dedicação, paciência e apoio
incondicional frente aos desafios
encontrados durante a execução deste
mestrado. Por acreditarem na minha
capacidade e idealizarem junto comigo
esta conquista. Por serem meu porto
seguro e meus maiores exemplos de
valores, perseverança, sabedoria e
honestidade. Obrigado pela enorme força
e confiança em mim depositados.
Obrigado pelo amor e por abdicarem dos
seus próprios sonhos para sonharem os
meus. Amo muito vocês!!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guardar e confortar nos momentos mais difíceis. Por me dar forças para recomeçar, lutar e tomar as decisões corretas.

*A todos os meus familiares, avós, primos e primas, tios e tias pelo carinho, por sempre me apoiarem e ajudarem, principalmente durante a realização do estágio nos Estados Unidos. Neste tempo, soube o verdadeiro significado da palavra **família**. Muito obrigado.*

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cláudia Lima Verde Leal, exemplo de profissionalismo e dedicação ao magistério e a pesquisa, pela dedicação, confiança, apoio, paciência, amizade, ensinamentos, convivência e por compartilhar seu conhecimento, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Agradeço imensamente pela oportunidade, por acreditar em mim, por não hesitar e nem medir esforços para que fosse possível a realização deste mestrado e do estágio de pesquisa no exterior.

A todos os companheiros de trabalho do Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Daniela Paschoal, Kátia Regina Lancellotti Schwarz, Lígia Garcia Mesquita, Maria Carolina Rodrigues Valerino da Cunha, Maria Helena Coelho Cruz, Ramon Cesar Botigelli pela companhia, apoio, compreensão, auxílio e, sobretudo pelos agradáveis momentos partilhados e pela amizade concedida.

A companheira de trabalho, Fernanda Cavallari de Castro e ao amigo Leandro Christopher Bueno de Souza pela amizade, apoio, força, companheirismo e compreensão durante esses anos de pós-graduação. Obrigado por me acolherem e ajudarem no que fosse preciso, principalmente quando eu mais precisei. Vocês são minha família aqui em Pirassununga e eu não tenho palavras que expressem tamanha gratidão.

Aos membros integrantes do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e do Desenvolvimento (LMMD) e Parasitologia desta FZEA pelo companheirismo, amizade e aprendizado compartilhados.

Aos amigos externos à universidade, em especial aos de longa data, Kleberton, Rafael e Felipe pelo apoio, companheirismo e ajuda. E, também a todos aqueles que de alguma maneira me apoiaram, meu muito obrigado.

A Dr^a. Margarita L. Dubocovich da Universidade de Buffalo, Buffalo – NY, EUA pelos ensinamentos científicos e orientação. Agradeço também a todos os membros pertencentes ao laboratório sob sua supervisão, Michele, Marina, JJ, Shannon ChongYang, Ekue, David, e também ao Dr. Fraser Sim e Melani, que me ajudaram muito e contribuíram tanto para meu crescimento profissional, quanto pessoal.

Aos amigos que fiz durante o estágio em Buffalo, Carleara, André, Camila, Mariana, Bruno, Felipe e Dyego. Muito obrigado pelos momentos inesquecíveis, tanto bons, como ruins pelo qual passamos e, pelo companheirismo durante os seis meses de estágio. Espero encontrar com vocês em breve.

Aos professores Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, Dr. Felipe Perecin, Dr. Flávio Vieira Meirelles e Dr. Heidge Fukumasu e suas equipes pela colaboração e gentileza em fornecer alguns equipamentos utilizados nesta pesquisa.

Ao funcionário Antonio Fernandes dos Santos Júnior (China), Técnico de Laboratório do Biotério da FZEA, pelo apoio, cuidado com os animais utilizados nesta pesquisa, ajuda e pela amizade concedida.

A estagiária Letícia Schefer, graduanda em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras, pelo auxílio na manutenção, manipulação e utilização dos animais de laboratório durante a execução dos experimentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e estágio de pesquisa no exterior (BEPE) e, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e disponibilização dos laboratórios.

*“Eu não disse que seria fácil.
Apenas disse que valeria a pena”.*
Dom Bosco

RESUMO

FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação de oócitos murinos**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Diversos são os fatores que estão envolvidos no controle da maturação oocitária e na qualidade e competência do oócito. A melatonina (MEL) é um hormônio que apresenta diversas funções, como atividade antioxidante e antiapoptótica, além de influenciar diferentes vias de sinalização celular. Ainda há poucos estudos sobre o papel da MEL na maturação de oócitos e o camundongo, por sua rápida reprodução e menor custo de manutenção, é um excelente modelo amplamente utilizado para estudos *in vitro* e, particularmente *in vivo*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da MEL sobre a maturação *in vivo* e *in vitro* e sua possível ação como protetor celular (antioxidante e/ou antiapoptótico) de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) murinos. No experimento 1, os animais receberam injeções de MEL nas concentrações de 0 (controle), 10 e 20 mg/kg/i.p./dia por 4 dias. Os CCOs foram maturados *in vivo* e recuperados 17 horas após a última injeção. No experimento 2, os animais receberam MEL nas mesmas dosagens do experimento anterior, porém por 3 dias. Os CCOs foram coletados 24 horas após a última injeção e maturados *in vitro* com hormônio folículo estimulante (0,5 µg/mL; FSH). No experimento 3, os CCOs foram maturados *in vitro* na presença de três diferentes doses de MEL (10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M) ou em FSH (controle FSH). Por fim, no experimento 4, a melhor concentração de MEL (10^{-9} M) eleita no experimento 3, foi utilizada sozinha ou em associação com peróxido de hidrogênio (300µM; H₂O₂). Os CCOs foram maturados como no experimento anterior. Para os quatro experimentos foram avaliados a taxa de maturação mediante a extrusão do primeiro corpúsculo polar (1º CP) e a expressão de genes relacionados à apoptose (Bax e Bcl2l1) e enzimas antioxidantes (Gpx1, Sod1 e Sod2) por qPCR-RT tanto para as células do cumulus (CC), quanto para os oócitos (OO). No experimento 1, o tratamento com 20 mg/kg de MEL apresentou maior taxa de maturação *in vivo* de 80,3%, seguido do controle (69,4%) e 10 mg/kg de melatonina (62,4%; P>0,05). Para a expressão gênica não houve efeito de nenhum tratamento (P>0,05). No experimento 2, a taxa de maturação variou de 39 a 53,2% entre os tratamentos (P>0,05). Em CC, a expressão gênica foi

diminuída de Bcl2l1 e aumentada de Gpx1 tratados com 20 mg/kg de MEL ($P<0,05$). Já para OO, somente houve aumento da expressão de Gpx1 para ambos os tratamentos com MEL ($P<0,05$). No experimento 3, a taxa de maturação foi de 48,9%, 53,7%, 56% e 57,3% para 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M de MEL e FSH, respectivamente ($P>0,05$). As concentrações de 10^{-9} e 10^{-6} M de MEL aumentaram a expressão dos genes Gpx1 e Sod1 em CC ($P<0,05$). Em OO, somente houve aumento da expressão gênica de Bax na concentração de 10^{-6} M de MEL ($P<0,05$). No último experimento, não houve diferença significativa quanto à taxa de maturação, variando de 51,8% para o tratamento com H_2O_2 a 60% para o controle FSH ($P>0,05$). Em CC, Gpx1 e Sod1 tiveram suas expressões aumentadas em todos os tratamentos ($P<0,05$). De maneira contrária, o gene Bcl2l1 teve sua expressão diminuída ($P<0,05$). Com base nestes dados, conclui-se que a MEL aplicada *in vivo* não foi capaz de melhorar a taxa de maturação *in vivo* e *in vitro*, porém, em condições *in vitro* induziu a progressão da meiose em oócitos murinos. Além disso, em condições *in vitro*, genes antioxidantes como Gpx1 e Sod1 foram mais expressos em CC do que em OO em resposta ao tratamento com MEL, indicando a indução de um possível efeito protetor frente à condições de cultivo *in vitro*.

Palavras-Chave: Antioxidante; Antiapoptótico; N-acetil 5-metoxitriptamina; PCR em tempo real; Camundongo

ABSTRACT

FERNANDES, H. **Melatonin and its cytoprotector effect on oocyte maturation in mice**. 2015. 85 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Many factors are involved in the control of oocyte maturation and developmental competence. Melatonin (MEL) is a hormone showing varied functions including antioxidant and antiapoptotic activities, besides influencing many cell signaling pathways. There are few studies on the role of MEL in oocyte maturation and the mouse, due to its quick reproduction and lower maintenance cost, is an interesting model widely used for *in vitro* and particularly *in vivo* studies. The aim of this work was to study the effects of MEL on *in vivo* and *in vitro* maturation and its cytoprotective action (antioxidant/antiapoptotic) in murine *cumulus*-oocyte complexes (CCOs). In experiment one, mice received MEL injections at concentrations of 0 (control), 10 and 20 mg/kg/i.p./day for 4 days. CCOs were *in vivo* matured and recovered 17 hours after the last injection. In experiment 2, the animals received MEL in the same dosages of the previous experiment, but for 3 days. CCOs were collected 24 hours after the last injection and *in vitro* matured with follicle stimulating hormone (FSH). In experiment 3, CCOs were *in vitro* matured with three MEL concentrations (10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M) or FSH (FSH control). Finally, in the fourth experiment, the best concentration of MEL (10^{-9} M) selected in experiment 3 was used alone or in association with hydrogen peroxide (300 μ M; H_2O_2). CCOs were matured as in the previous experiment. For all four experiments maturation rates were evaluated by extrusion of the first polar body and the expression of genes related to apoptosis (Bax and Bcl2l1) and antioxidant enzymes (Gpx1, Sod1 and Sod2) by qPCR-RT both cumulus cells (CC), and for the oocytes (OO) were assessed as well. In experiment 1, treatment with 20 mg/kg MEL showed a higher rate of *in vivo* maturation of 80.3%, followed by the control (69.4%) and 10 mg/kg MEL (62.4%; $P>0.05$). No effect for gene expression treatments ($P>0.05$) was observed. In experiment 2, maturation rate ranged from 39 to 53.2% between treatments ($P>0.05$). In CC, the gene expression was reduced for Bcl2l1 and enhanced for Gpx1 in animals treated with 20 mg/kg MEL ($P<0.05$). For OO, only Gpx1 expression was increased for both MEL treatments ($P<0.05$). In experiment 3,

the maturation rates were 48.9, 53.7, 56 e 57.3% for MEL 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M and FSH, respectively ($P>0.05$). MEL concentrations of 10^{-6} and 10^{-9} M increased expression of Gpx1 and Sod1 genes in CC ($P<0.05$). For OO, only Bax increased the gene expression in 10^{-6} M MEL concentration ($P<0.05$). In the last experiment, there was no significant difference in maturation rate, ranging from 51.8 for H_2O_2 to 60% for FSH control ($P>0.05$). Gpx1 and Sod1 genes had their expression increased in all the treatments in CC ($P<0.05$). For Bcl2l1 gene, the expression was decreased in CC as well ($P<0.05$). Based on these data, we conclude that MEL treatment *in vivo* was unable to promote maturation rate *in vivo* and *in vitro*, but under *in vitro* conditions it induced meiosis progression in murine oocytes. In addition, Gpx1 and Sod1 antioxidant genes were more expressed in CC than OO in response to MEL treatments *in vitro* indicating induction of a possible protective effect against *in vitro* culture conditions.

Keywords: Antioxidants; Antiapoptotic; N-acetyl-5-methoxytryptamine; qPCR-RT; Mouse

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento folicular em mamíferos. (Fonte: Li e Albertini, 2013).....	7
Figura 2 - Vias de biossíntese clássicas de melatonina em vertebrados. TPH, triptofano hidroxilase; AAAD, descarboxilase de aminoácidos aromáticos; NAT, aril-alquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT, hidroxil-indol-O-metiltransferase; MelDA, melatonina deacetilase; a linha tracejada representa uma via de menor importância de biossíntese de melatonina (Fonte: TAN et al., 2012).....	15
Figura 3 – Representação esquemática dos experimentos desenvolvidos neste projeto de mestrado. CC, células do cumulus; MEL, melatonina; MIV, maturação <i>in vitro</i> ; OO, oócitos; TM, taxa de maturação; qPCR-RT, PCR quantitativo em tempo real.....	31
Figura 4 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina administrada <i>in vivo</i> em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	34
Figura 5 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina administrada <i>in vivo</i> em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	35
Figura 6 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina <i>in vivo</i> sobre a maturação <i>in vitro</i> em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	37

Figura 7 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina *in vivo* sobre a maturação *in vitro* em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 38

Figura 8 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro* em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 40

Figura 9 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro* em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 41

Figura 10 - Perfil de expressão gênica do efeito dos tratamentos *in vitro* com melatonina e/ou peróxido de hidrogênio em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Tratamentos de FSH (0,5 μ g/mL), MEL (10^{-9} M), H_2O_2 (300 μ M) e MEL + H_2O_244

Figura 11 - Perfil de expressão gênica do efeito dos tratamentos *in vitro* com melatonina e/ou peróxido de hidrogênio em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Tratamentos de FSH (0,5 μ g/mL), MEL (10^{-9} M), H_2O_2 (300 μ M) e MEL + H_2O_246

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para a análise da expressão gênica.....	27
Tabela 2 - Taxa de maturação oocitária <i>in vivo</i> com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).....	33
Tabela 3 - Taxa de maturação oocitária <i>in vitro</i> com base na extrusão 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).....	36
Tabela 4 - Taxa de maturação oocitária <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de melatonina com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).....	39
Tabela 5 - Taxa de maturação oocitária <i>in vitro</i> em diferentes meios com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Hipótese.....	3
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Ovário	6
2.2 Desenvolvimento folicular e aspectos morfológicos.....	6
2.3 Maturação e capacitação oocitária	9
2.4 Sistemas de cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	12
2.4.1 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	12
2.5 A melatonina.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Local dos experimentos	22
3.2 Animais.....	22
3.3 Superovulação.....	22
3.4 Obtenção dos complexos cumulus-oócito (CCOs) maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
3.5 Maturação <i>in vitro</i>	24
3.6 Avaliação da taxa de maturação oocitária	24
3.7 Extração do RNA total pelo método de TRIzol®.....	24
3.8 Digestão com DNase I.....	25
3.9 Transcrição reversa (RT)	25
3.10 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT)	26
3.11 Análise estatística	29
3.12 Delineamento experimental	29
3.12.1. Experimento 1: Efeito do tratamento <i>in vivo</i> de melatonina sobre a maturação <i>in vivo</i>	29
3.12.2. Experimento 2: Efeito do tratamento <i>in vivo</i> de melatonina sobre a maturação <i>in vitro</i>	30
3.12.3. Experimento 3: Efeito da melatonina sobre a maturação <i>in vitro</i>	30

3.12.4. Experimento 4: Avaliação da capacidade citoprotetora da melatonina durante a maturação <i>in vitro</i>	30
4 RESULTADOS	33
4.1 Efeito do tratamento <i>in vivo</i> de melatonina sobre a maturação <i>in vivo</i>	33
4.2 Efeito do tratamento <i>in vivo</i> de melatonina sobre a maturação <i>in vitro</i>	36
4.3 Efeito da melatonina sobre a maturação <i>in vitro</i>	38
4.4 Avaliação da capacidade citoprotetora da melatonina durante a maturação <i>in vitro</i>	42
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Várias biotecnologias da reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva. Dentre as biotécnicas reprodutivas já desenvolvidas até o momento, a produção *in vitro* (PIV) de embriões tem se destacado em várias espécies, contudo ainda está longe de atingir níveis satisfatórios, principalmente em comparação com embriões produzidos *in vivo*.

A PIV envolve uma série de etapas que vão desde a obtenção, seleção, maturação e fecundação de oócitos *in vitro*, seguida do cultivo dos embriões obtidos até o estágio de blastocisto para a posterior transferência a receptoras sincronizadas ou criopreservação. No entanto, a manipulação neste ambiente *in vitro* pode afetar a fisiologia do desenvolvimento, levando a anomalias futuras (THOMPSON, 1997).

Alguns trabalhos têm levantado indícios de que as taxas de desenvolvimento e a qualidade dos embriões PIV estariam intimamente relacionadas à qualidade intrínseca dos oócitos e às condições de cultivo *in vitro* (LONERGAN et al., 2002; RIZOS et al., 2002a, 2002b). Dentre os diversos fatores que podem interferir nos resultados da PIV, a maturação *in vitro* (MIV), certamente consiste em uma das etapas de maior importância deste processo, sendo alvo de inúmeros estudos.

A melatonina é um hormônio sintetizado na pineal e que atua no controle do ciclo circadiano e da estacionalidade reprodutiva de algumas espécies. Suas funções, porém, têm se mostrado mais abrangentes, incluindo atividade antioxidante e antiapoptótica em vários tipos celulares, além de influenciar diferentes vias de sinalização celular (REITER et al., 2009; TAMURA et al., 2009). Sabe-se que muitos órgãos, tecidos e células também têm a capacidade de produzir melatonina (REITER et al., 2013a). Este hormônio já foi detectado inclusive em fluido folicular de ovários humanos, bovinos e suínos (COELHO et al., 2013; NILES et al., 1999; SHI et al., 2009; TIAN et al., 2014) e seus receptores já foram localizados em tecidos reprodutivos (ovário, útero e placenta), oócitos, células do cumulus, células da granulosa e tecais de diferentes espécies de mamíferos (HE et al., 2015; SAMPAIO et al., 2012; SOARES et al., 2003; WANG et al., 2014, 2012).

Estudos *in vitro* têm apontado efeitos benéficos da utilização de melatonina na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de embriões, embora os resultados sejam por vezes contraditórios. Ainda há poucos estudos sobre o papel da melatonina na

maturação de oócitos e, o camundongo, por sua rápida reprodução e menor custo de manutenção, consiste num excelente modelo amplamente utilizado para estudos *in vitro* e, particularmente, *in vivo*, que são bem mais demorados e custosos em espécies domésticas. Portanto, a utilização de camundongos como modelos experimentais torna-se de suma importância na PIV, proporcionando resultados mais fisiológicos.

Desta forma, considerando o potencial efeito benéfico da melatonina sobre a produção embrionária, um melhor entendimento acerca de sua ação na maturação e competência oocitária torna-se de suma importância para incrementar os índices produtivos. Portanto, o presente trabalho objetivou estudar o efeito da melatonina sobre a maturação *in vivo* e *in vitro* e sua possível ação como citoprotetor (antioxidante e antiapoptótico) em complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) murinos.

1.1 Hipótese

A melatonina tem efeito benéfico na maturação *in vivo* e *in vitro*, melhorando a maturação oocitária e apresentando efeito citoprotetor.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Estudar a importância da melatonina na maturação *in vivo* e *in vitro* de oócitos murinos, considerando seu efeito citoprotetor (antioxidante e antiapoptótico) e promotor da maturação oocitária.

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliaram-se as taxas de maturação (extrusão do primeiro corpúsculo polar - 1º CP) e a expressão de genes relacionados à apoptose (Bax e Bcl1l2) e de enzimas antioxidantes (Gpx1, Sod1 e Sod2), mediante diferentes tratamentos com os objetivos de:

- 1) Determinar o efeito do tratamento *in vivo* com melatonina sobre CCOs obtidos após a maturação *in vivo*;

- 2) Determinar o efeito do tratamento *in vivo* com melatonina sobre CCOs submetidos à maturação *in vitro*;
- 3) Determinar o efeito da melatonina sobre CCOs submetidos à maturação *in vitro*;
- 4) Determinar o efeito da melatonina na reversão de efeitos provocados nos CCOs pela indução de estresse oxidativo durante a maturação *in vitro*.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário

Em mamíferos, durante o desenvolvimento fetal e neonatal, os ovários são formados após migração das células germinativas primordiais, de origem extragonadal, do saco vitelino mesentérico para as cristas genitais. Em seguida, múltiplas divisões mitóticas dão origem às oogônias (precursoras dos oócitos) que, por sua vez, iniciam a meiose I, sendo então bloqueadas no estágio de diplóteno da prófase, morfologicamente denominado como vesícula germinativa (HAFEZ; HAFEZ, 2004; PEPLING, 2006). Em camundongos, o término da proliferação de oogônias coincide com o bloqueio meiótico dos oócitos (PEPLING; SPRADLING, 2001) e ocorre aproximadamente aos 13,5 dias pós-cópula (dpc) (KOCER et al., 2009).

Ao se desenvolver, o ovário passa a ser envolto mais externamente por um epitélio germinativo, seguido da túnica albugínea e região cortical que contém os oócitos envolvidos por células somáticas em estruturas chamadas de folículos ovarianos, e/ou corpos lúteos em vários estágios de desenvolvimento e regressão. Mais internamente, encontra-se a porção medular, bastante vascularizada e constituída de tecido conjuntivo fibroelástico, distribuído de maneira irregular, e por nervos extensos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Além da produção de gametas (gametogênese), os ovários têm função estereidogênica, ou seja, são responsáveis pela produção de hormônios relacionados ao ciclo reprodutivo feminino.

2.2 Desenvolvimento folicular e aspectos morfológicos

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas e uma lâmina basal, que delimita o folículo e o estroma ovariano adjacente. Sua classificação é dada de acordo com o estágio de desenvolvimento, podendo ser dividido em folículos pré-antrais ou não cavitários, que representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, e folículos antrais ou cavitários (FIGUEIREDO et al., 2007).

A foliculogênese pode ser definida como um processo contínuo de formação, crescimento e maturação folicular, tendo início com a gênese do folículo primordial e

culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório ou antral (DRUMMOND, 2006; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Na categoria de folículos pré-antrais são incluídos os folículos primordiais, primários e secundários (Figura 1). Os folículos primordiais possuem o oócito retido em diplóteno da prófase da meiose I, envolto em uma única camada de células somáticas achatadas precursoras da granulosa. No ovário de camundongos, aproximadamente 67% dos folículos primordiais sofrem apoptose (morte celular programada) entre o primeiro e o quinto dia de vida pós-natal (PEPLING; SPRADLING, 1998). A partir do início da puberdade, que ocorre por volta da quinta semana de vida em fêmeas murinas, diariamente um pequeno grupo de folículos primordiais é recrutado e inicia seu crescimento (NAGY et al., 2003).

Figura 1 – Estágios do desenvolvimento folicular em mamíferos. (Fonte: Li e Albertini, 2013).

A ativação folicular é um processo irreversível, cíclico e gradual, pelo qual os folículos primordiais iniciam o crescimento. Após a ativação, os folículos primordiais dão origem aos primários, com o aumento gradual no diâmetro dos oócitos e proliferação das células da granulosa, ocorrendo mudança da conformação de achatadas para cubóides (PICTON, 2001). A ativação ocorre continuamente e, portanto não está relacionada com o padrão cíclico de liberação de hormônios gonadotróficos (WEBB; CAMPBELL, 2007). Além disso, fatores de crescimento transformadores secretados pelos oócitos, tais como os da superfamília β (TGF- β), como BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*) e GDF9 (*growth differentiation factor 9*), são expressos nos folículos primordiais e estão envolvidos na ativação folicular (CARABATSOS et al., 1998; CHOI; RAJKOVIC, 2006; DONG et al., 1996;

GALLOWAY et al., 2000). Estes fatores parácrinos derivados do oócito também promovem a proliferação das células da granulosa e a esteroidogênese (ELVIN et al., 1999; HAYASHI et al., 1999; SOLOVYEVA, 2000). A comunicação entre oócito e as células somáticas adjacentes é essencial para o desenvolvimento de ambos, assegurando que o oócito ovulado esteja apto a sofrer fertilização e posterior embriogênese (EPPIG; WIGGLESWORTH; PENDOLA, 2002)

A transição entre folículo primordial e primário é reforçado por fatores exógenos de crescimento como BMP4 e BMP7 (DRUMMOND, 2005). As junções comunicantes do tipo gap, existentes entre as células da granulosa e o oócito, facilitam a comunicação bidirecional e permitem a transferência de nutrientes e metabólitos. Embora haja receptores de gonadotrofinas em folículos primários em camundongos (O'SHAUGHNESSY, 1997), a foliculogênese pré-antral é independente de gonadotrofinas (WEBB; CAMPBELL, 2007) e, portanto, deve ser conduzida por estímulos parácrinos e autócrinos ou por outro sinal endócrino.

Os folículos secundários são caracterizados pela proliferação exponencial das células da granulosa, formando duas ou mais camadas celulares ao redor do oócito, o qual se encontra em intenso crescimento. Durante este aumento de volume oocitário, há a formação, ao redor do oócito, de uma camada glicoprotéica homogênea protetora denominada de zona pelúcida. Além disso, uma camada de células da teca se desenvolve em torno das células da granulosa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

A formação de uma cavidade cheia de fluido, o antro, circundado de múltiplas camadas da granulosa é característica de folículos antrais (Figura 1). Nesta fase, as células da granulosa diferenciam-se em células do cumulus, que circundam o oócito, e células da granulosa murais, que formam a parede folicular. O fluido folicular é repleto de substâncias derivadas do sangue e secreções de células foliculares como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento protéicos, que permitem a continuação do desenvolvimento folicular até a ovulação, aumentando a proliferação das células da granulosa e o número de receptores de FSH, os quais se tornam responsivos (BINELLI; MURPHY, 2010; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os oócitos atingem a capacidade de retomar a meiose juntamente com a formação do antro (EPPIG, 1996b).

A transição de folículo antral inicial para pré-ovulatório é caracterizada pelo rápido aumento em volume total do folículo, devido à proliferação das células da

granulosa e expansão do antro, juntamente com remodelação morfológica e bioquímica das células somáticas (HUNZICKER-DUNN; MAIZELS, 2006). Nesta fase, os folículos adquirem receptores de LH e capacidade de síntese de estrogênios pelas células da granulosa (BINELLI; MURPHY, 2010). A liberação cíclica de FSH pela hipófise e a produção de estrógeno são responsáveis pelo recrutamento de grupos de folículos antrais iniciais para o desenvolvimento. O estrógeno atua inibindo gradualmente a secreção de FSH, o que culmina com a atresia da maioria dos folículos recrutados, e apenas folículos responsivos ao LH prosseguem o desenvolvimento, sendo chamados de folículos dominantes (GINTHER et al., 2002).

O progresso no desenvolvimento de folículos dominantes, quando alcançado na fase de estro, caracterizado por altos picos de secreção de LH pela hipófise, em resposta ao estrógeno folicular, garante aos folículos o crescimento até a fase pré-ovulatória (BINELLI; MURPHY, 2010). Nesta fase, que ocorre algumas horas antes da ovulação, o LH garante o bloqueio da proliferação das células da granulosa e a expansão do *cumulus oophorus* (DUGGAVATHI; MURPHY, 2009). No oócito, ocorre a progressão da meiose I, iniciada durante a vida intra-uterina, e expulsão do primeiro corpúsculo polar (1º CP) (TSAFRIRI; MOTOLA, 2007). Além da retomada da meiose I, o LH é responsável pelo início da proteólise da parede folicular, seguido da ruptura e liberação do complexo *cumulus*-oócito (CCO) maduro (DUGGAVATHI; MURPHY, 2009).

Em camundongos, o processo total de crescimento folicular, desde o estágio primordial até folículo ovulatório, compreende cerca de dez a quinze dias. Além disso, o ciclo estral nesta espécie tem duração de quatro a cinco dias e, dependendo da linhagem utilizada, cerca de oito a doze oócitos são liberados em condições normais (NAGY et al., 2003).

2.3 Maturação e competência oocitária

A maturação oocitária é definida pelo período de progressão entre o primeiro e o segundo bloqueio meiótico, e envolve dois programas celulares, a maturação nuclear e a citoplasmática, que permitem ao oócito adquirir a competência necessária para fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (EPPIG, 1996a; KRISHER, 2003). Estes processos são altamente complexos e sua interação

é regulada por uma série de eventos moleculares sequenciais. Assim, a adequada maturação oocitária é de suma importância para o posterior desenvolvimento embrionário e, portanto consiste numa das fases mais importantes da PIV.

Anteriormente à ovulação, o oócito encontra-se em bloqueio meiótico, o qual é mantido através de sinais parácrinos inibidores oriundos das células do cumulus (NORRIS et al., 2009), além de altos níveis intraoocitários de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (COTICCHIO et al., 2015). Uma complexa cascata de sinalização envolvida no reinício e regulação da meiose é ativada em resposta a uma onda ovulatória de LH (DUMONT et al., 2005).

Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação), reguladas por AMPc e, da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Dessa forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito hábil à fecundação e ao desenvolvimento de um embrião viável (GOTTARDI; MINGOTI, 2010).

A maturação nuclear consiste na progressão do ciclo meiótico, desde vesícula germinativa (prófase da meiose I) até o segundo bloqueio meiótico em metáfase II (MII), com condensação dos cromossomos e quebra da vesícula germinativa (JONES, 2004). Na sequência, os cromossomos homólogos ($2n$) são divididos em dois grupos, com metade do número original de cromossomos permanecendo no oócito (célula haplóide), e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (CAN; SEMIZ; ÇINAR, 2003), gerando duas células de tamanhos distintos: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, denominada oócito secundário. Após a maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (MII) até a fecundação (MAYES; SIRARD, 2001) ou ativação partenogenética (YI; PARK, 2005).

Na maturação citoplasmática ocorrem alterações metabólicas altamente complexas que envolvem vários processos simultâneos, sendo dividida em três eventos principais: migração e reorganização das organelas citoplasmáticas, alteração/reorganização dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

A análise ultra-estrutural demonstra que as mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, grânulos corticais e o complexo de Golgi assumem posições diferentes durante a transição do estágio de vesícula germinativa para MII. Os

microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto presentes no citoplasma promovem esta remodelação estrutural e agem sobre a segregação cromossômica. A maturação molecular, por sua vez, consiste no processo de transcrição, armazenamento e processamento de RNAm materno, que serão posteriormente traduzidos em proteínas pelos ribossomos (FERREIRA et al., 2009). Após a retomada da meiose, não haverá mais qualquer expressão gênica e, portanto, os transcritos produzidos durante a fase de crescimento e maturação deverão ser metabolizados no momento adequado (SIRARD, 2001). Por isso, as maiores causas de falha da maturação oocitária ocorrem devido ao armazenamento, processamento e recrutamento inapropriado do RNAm materno. Estes eventos precedem a penetração do espermatozoide, fecundação e subsequente ativação embrionária (ROTH; HANSEN, 2005).

A fase de ativação do genoma embrionário difere consideravelmente entre as espécies. Em murinos, o desenvolvimento inicial é dependente do acúmulo de transcritos estáveis no citoplasma do oócito durante o processo de maturação e capacitação oocitária. A partir do estágio de 2 células, o genoma embrionário murino deve ser ativado, quando este passa a processar seus próprios transcritos (EPPIG et al., 1994).

Mesmo sendo processos distintos, a maturação nuclear e a citoplasmática devem ocorrer em sincronia para garantir a qualidade e o desenvolvimento embrionário após a fertilização (EPPIG, 1996a; HEGELE-HARTUNG, 1999). Caso contrário, a maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (LI; ALBERTINI, 2013; XU; GREVE, 1988).

Além do exposto, a expansão das células do cumulus é descrita como um processo crítico e determinante para o desenvolvimento e fertilização dos oócitos, já que oócitos cuja maturação não está associada à expansão do cumulus têm potencial limitado para a implantação. A expansão do complexo *cumulus-oophorus* foi ainda relacionada por facilitar a maturação, ovulação, captura do oócito pelas fímbrias do oviduto e, além disso, por auxiliar a penetração espermática (CASTRO, 2014; FÜLÖP et al., 2003).

2.4 Sistemas de cultivo *in vivo* e *in vitro*

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação dos oócitos, preparando-os para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário. Mesmo com todos os avanços e melhorias realizados no processo de maturação oocitária *in vitro*, os índices de produção e desenvolvimento embrionário *in vivo* superam a produção *in vitro* em espécies domésticas (THOMPSON, 1997). Diferente das condições naturais, os oócitos maturados *in vitro*, sofrem consideráveis alterações metabólicas e, por isso, têm seu potencial de desenvolvimento embrionário reduzido. Dentre os inúmeros fatores que tornam as taxas de PIV reduzidas, destacam-se as deficiências no meio de maturação e a redução da habilidade intrínseca do oócito (KRISHER, 2003).

Na tentativa de incrementar os índices da PIV, a suplementação do meio de MIV com diferentes aditivos tem sido bastante utilizada, visando não só aumentar a taxa final de produção de embriões, como também melhorar a qualidade das estruturas obtidas. Os aditivos mais comumente utilizados são gonadotrofinas, visto que a expansão das células do cumulus e a maturação oocitária são processos induzidos pelo pico pré-ovulatório de LH *in vivo* e pelo FSH em CCOs isolados *in vitro* (DIAZ et al., 2006). O FSH é responsável por promover a competência oocitária e, portanto, é amplamente utilizado em protocolos de MIV, a fim de melhorar a expansão do cumulus, fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (CALDER et al., 2003). Além das gonadotrofinas, substâncias como antibióticos, piruvato sódico e soro fetal bovino também são comumente adicionados ao meio de MIV a fim de melhorar as condições de cultivo (CHAVES; FIGUEIREDO, 2010).

2.4.1 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

De maneira geral, os processos fisiológicos que ocorrem no interior do ambiente folicular para propiciar a capacitação do oócito, são regulados pela energia celular disponível, anteriormente produzida pelo metabolismo oxidativo. No entanto, para a produção energética, realizada a partir do metabolismo oxidativo, ocorre uma produção simultânea de moléculas derivadas de oxigênio formadas como produtos intermediários do metabolismo celular, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas moléculas, quando em concentrações fisiológicas, são responsáveis

por regular várias funções celulares (DENNERY, 2007). No entanto, quando em altas concentrações agem como oxidantes poderosos, resultando em danos celulares, tanto estruturais como funcionais (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009).

Cultivos *in vitro* são mantidos sob concentração de oxigênio mais elevada quando comparados a produção *in vivo*, resultando em maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) neste sistema (TATEMOTO et al., 2004). A geração de EROs é um fenômeno causador de estresse oxidativo e que, consequentemente, prejudica o desenvolvimento de oócitos *in vitro* e posterior desenvolvimento embrionário (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009). O estresse oxidativo surge sempre quando o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é alterado (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Dentre os diversos tipos de EROs, destacam-se o radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conhecidos por serem prejudiciais ao oócito, provocando deterioração dos lipídeos da membrana celular, destruição do DNA, bloqueio do desenvolvimento embrionário em estágio de duas células, apoptose e inibição da fertilização em camundongos e hamsters (NODA et al., 1991; ZUELKE; JONES; PERREAULT, 1997). Em adição, altos níveis de H_2O_2 têm sido correlacionados com embriões humanos fragmentados e oócitos não fertilizados (YANG et al., 1998).

Já foi documentado que as células do cumulus foram eficazes em proteger oócitos contra danos celulares causados pelo estresse oxidativo durante a MIV. Após a MIV, complexos *cumulus*-oócitos tiveram aumento significativo nas concentrações do antioxidante glutathione peroxidase (Gpx) intracelular, enquanto que o conteúdo de Gpx de oócitos desnudos foi acentuadamente diminuído, e a exposição destes últimos à EROs resultou em aumento de morte celular por apoptose. Além disso, a proteção dos oócitos contra o estresse oxidativo durante a MIV aumentou eficientemente a aquisição da competência para o desenvolvimento após a fertilização (TATEMOTO, 2000, 2001).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser neutralizadas por um elaborado sistema de defesa que consiste em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009). Os antioxidantes são capazes de anular os efeitos dos EROs pelo sequestro de seu excedente, promovendo um equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Enzimas como a superóxido dismutase (Sod), catalase e Gpx consistem antioxidantes enzimáticos

endógenos, enquanto que os não enzimáticos são representados por vitaminas C e E, taurina, hipotaurina, zinco, selênio, caroteno e beta-carotenóides, entre outros (AGARWAL et al., 2012).

2.5 A melatonina

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina; MEL) está presente em quase todos os organismos, incluindo bactérias, algas, fungos, plantas e animais (MERCOLINI; MANDRIOLI; RAGGI, 2012; TAN et al., 2012; ZHAO et al., 2013). Trata-se de uma indolamina que foi isolada a partir da glândula pineal de bovino por Lerner et al. (1958, 1959) e possui um padrão circadiano de secreção controlado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo (REITER et al., 2011; TAMURA et al., 2014). Em mamíferos, a informação fotoperiódica é captada pela retina e transmitida para a pineal, onde a mensagem modula o ritmo de secreção de melatonina (HASTINGS; MAYWOOD; REDDY, 2008). Uma das principais funções do ritmo de secreção de melatonina é transmitir informação sobre o comprimento do período escuro diário para os sistemas circadiano e circanuais (REITER, 1993), essencial para o sono, regulação da temperatura, assim como para alterações reprodutivas sazonais (ARENDT, 1998, 2003; REVEL et al., 2009).

A síntese de melatonina (Figura 2) se inicia a partir do aminoácido triptofano, o qual é convertido inicialmente em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) que em seguida é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina) por uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD). A serotonina é então acetilada pela enzima aril-alquilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT), seguida de metilação pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT atualmente chamada de ASMT) para formar a melatonina (revisado por TAN et al., 2012).

Figura 2 - Vias de biossíntese clássicas de melatonina em vertebrados. TPH, triptofano hidroxilase; AAAD, descarboxilase de aminoácidos aromáticos; NAT, aril-alquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT, hidroxí-indol-O-metiltransferase; MelDA, melatonina deacetilase; a linha tracejada representa uma via de menor importância de biossíntese de melatonina (Fonte: TAN et al., 2012).

Em teoria, cada célula possui a capacidade de sintetizar melatonina, uma vez que se acredita ser produzida na mitocôndria (TAN et al., 2013; VENEGAS et al., 2012). Além da glândula pineal, a melatonina é produzida em tecidos periféricos onde parece atuar na regulação de processos fisiológicos locais (HE et al., 2015; REITER et al., 2014).

Não somente os pinealócitos, localizados na glândula pineal, são responsáveis pela biossíntese de melatonina, mas uma lista de sítios de produção extrapineal está em crescente expansão (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; VENEGAS et al., 2012). Muitos órgãos, tecidos e células (cérebro, trato gastrointestinal, testículos, ovários, medula espinhal, linfócitos, retina, córnea e pele) têm a capacidade de produzir melatonina (REITER et al., 2013), mas o ritmo noturno de melatonina no sangue é, quase que exclusivamente, devido a sua secreção pela glândula pineal (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

As funções da melatonina vão muito além da regulação da competência reprodutiva sazonal (MAURIZ et al., 2013; TAN; CHEN; POEGGELER, 1993),

podendo exercer ação antioxidante, antiapoptótica, antiinflamatória, estando também envolvida no controle do comportamento sexual de algumas espécies animais (TAMURA et al., 2009; TAN et al., 2010) e na atividade esteroidogênica gonadal (WEBLEY; LUCK, 1986; WOO et al., 2001).

A melatonina tem uma infinidade de ações nas células, podendo agir de forma indireta, através de receptores de membrana, ou de forma direta, independente de receptores (REITER et al., 2007). Os receptores de melatonina MT₁ e MT₂ pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G, embora tenham estruturas moleculares, propriedades farmacológicas e localizações cromossômicas distintas um do outro (CHEN et al., 2013). Estes dois receptores, presentes em todos os vertebrados, têm distribuição no sistema nervoso e tecidos periféricos, e estão relacionados à ativação de múltiplas vias de sinalização, dentre elas a modulação de funções reprodutivas e metabólicas para MT₁, e inibição de liberação de dopamina pela retina para MT₂ (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). Além disso, um terceiro receptor de melatonina denominado de MT₃, pertencente a um grupo de redutases, está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo. A expressão do RNAm e/ou proteínas dos receptores MT₁ e MT₂ foram identificadas em tecidos reprodutivos em humanos (WOO et al., 2001), bovinos (SAMPAIO et al., 2012; WANG et al., 2014, 2012) e camundongos (HE et al., 2015; SOARES et al., 2003). Nesta última espécie, já foram produzidas linhagens com depleção genética (*knockout*) dos receptores MT₁, MT₂ e MT₁/MT₂, o que permite o estudo funcional da ação de melatonina dependente desses receptores (DUBOCOVICH et al., 2005a, b; HUDSON et al., 2005).

A secreção endógena de melatonina pode divergir entre as diferentes linhagens murinas mais utilizadas em pesquisas científicas. Camundongos C57BL6J (C57) e C3H/HeN (C3H) produzem, respectivamente, baixo e alto níveis circadianos de melatonina (VON GALL et al, 2000; ADAMAH-BIASSI et al, 2013). No entanto, a capacidade deste hormônio em modular diferentes funções fisiológicas, não depende somente dos níveis (concentrações) internos circulantes de melatonina, mas também da ativação e expressão adequada de seus receptores.

A expressão do receptor MT₁ foi reportada como reduzida em ovários de ratas após o nascimento (LEE et al., 2001), e significativamente superior no tecido ovariano de ratas durante o proestro quando comparadas com ratas no metaestro

(SOARES et al., 2003). Isso demonstra que a melatonina pode desempenhar um importante papel na foliculogênese, ovulação e regulação do ciclo estral.

A melatonina é um poderoso agente antioxidante e antiapoptótico, devido à sua eliminação direta de derivados de oxigênio tóxicos e a sua capacidade de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), prevenindo danos oxidativos e nitrosativos em todas as macromoléculas e compartimentos celulares (HARDELAND et al., 2011; REITER et al., 2000; TAN et al., 2002). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre espécies oxidantes celulares, tais como EROs e antioxidantes, e tem efeito tóxico direto nas células, o que acarreta em peroxidação lipídica, oxidação protéica e dano ao DNA (TAMURA et al., 2014). Em contraste a outros antioxidantes que são de natureza hidrofílica ou lipofílica, a melatonina é anfifílica e de pequeno tamanho, atravessando facilmente todas as barreiras morfofisiológicas; desse modo, é capaz de reduzir o dano oxidativo em toda a célula (REITER et al., 2013). Como um antioxidante, a melatonina protege o DNA nuclear e mitocondrial, ácidos graxos e proteínas do dano induzido pelos radicais livres (REITER et al., 2000). Além disso, os metabólitos da melatonina que são formados quando esta indolamina funciona como sequestrante de radicais livres também são eficazes, podendo ser inclusive mais eficientes que a própria melatonina na desintoxicação de derivados de oxigênio prejudiciais (GALANO; TAN; REITER, 2013). Assim, a melatonina contribui para a homeostase por reduzir e prevenir o estresse oxidativo mitocondrial, reduzindo assim, subsequentes eventos apoptóticos (JOU et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a melatonina e os seus metabólitos protegem as células contra os radicais livres e estresse oxidativo, incluem a eliminação direta de radicais e produtos de radicais, a indução da expressão de enzimas antioxidantes e de genes antiapoptóticos, a redução da ativação de enzimas pró-oxidantes, e a manutenção da homeostase mitocondrial (TAMURA et al., 2014; ZHANG; ZHANG, 2014). A principal vantagem da melatonina é a sua natureza multifuncional e distribuição universal (REITER et al., 2013b). Isso contrasta com a maioria dos outros sequestrantes de radicais conhecidos (HARDELAND; PANDI-PERUMAL, 2005; LEÓN et al., 2005).

Tem sido demonstrado que a melatonina é capaz de aumentar a atividade da glutathione peroxidase no córtex cerebral de ratos, bem como a expressão gênica para outras enzimas antioxidantes (ANWAR et al., 2015; KOTLER et al., 1998). Além

disso, ela também é capaz de estimular a atividade da enzima superóxido dismutase e glutathione peroxidase em outras espécies (TAMURA et al., 2009).

Na fisiologia reprodutiva, a melatonina também desempenha importante papel na regulação das funções ovarianas (REITER et al., 2009, 2013), incluindo a maturação oocitária em diferentes espécies de mamíferos (ADRIAENS et al., 2006; COELHO et al., 2015; EL-RAEY et al., 2011; KANG et al., 2009; MANJUNATHA et al., 2009; TIAN et al., 2014).

A concentração de melatonina nos ovários e fluido folicular humano é maior que a circundante no sangue (REITER et al., 2009) e esta concentração é diretamente proporcional ao tamanho do folículo, tendo seu maior pico anteriormente à ovulação (NAKAMURA et al., 2003). Foi demonstrado que a concentração de melatonina nos ovários exibe uma variação fásica, como na glândula pineal e no soro, apresentando alto nível em meados da fase escura e baixo nível em meados da fase clara em hamsters cíclicos (TAMURA et al., 1998). Estudos têm indicado que a melatonina presente no líquido folicular não é proveniente somente do sangue circundante, mas também de outras fontes, tais como o próprio ovário (ITOH et al., 1998, 1999), incluindo células da granulosa, células do cumulus (AMIREAULT; DUBÉ, 2005; EL-RAEY et al., 2011) e oócito (SAKAGUCHI et al., 2013).

Devido ao incremento nos dados relativos a outros papéis da melatonina, mais atenção tem sido dada à possibilidade de seu uso para melhorar a qualidade de oócitos. *In vivo*, observou-se que sua utilização na forma de implantes vaginais em pequenos ruminantes promoveu a melhoria da qualidade dos oócitos, mesmo em animais em anestro (VALASI et al., 2006), com aumento na clivagem e produção de blastocistos (BERLINGUER et al., 2009). Em humanos, o tratamento oral com melatonina também melhorou a qualidade dos oócitos e, conseqüentemente, as taxas de fecundação e de gestação, principalmente por seu efeito antioxidante (TAMURA et al., 2008).

Em estudos de cultivo *in vitro*, a melatonina melhorou a maturação oocitária ou apresentou um efeito positivo sobre embriões em várias espécies como camundongos (BAHADORI et al., 2013; DEGHANI-MOHAMMADABADI et al., 2014; ISHIZUKA et al., 2000; NA et al., 2005; TAMURA et al., 2008; WANG et al., 2013), bovinos (TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014), ovinos (ABECIA; FORCADA; ZÚÑIGA, 2002; CASAO et al., 2010), suínos (CHOI et al., 2008; KANG et al., 2009; SHI et al., 2009), humanos (LYU et al., 2008; PARK et al., 2006; WEI et al., 2013) e

búfalos (MANJUNATHA et al., 2009). A suplementação com melatonina no meio de maturação reduz EROs (NAKANO; KATO; TSUNODA, 2012) e melhora o desenvolvimento oocitário (KANG et al., 2009; SHI et al., 2009).

Pang et al. (2012) observaram que células doadoras de núcleo tratadas com melatonina (10^{-10} M) aumentaram sua eficiência na reconstrução de embriões clonados. Além disso, os embriões clonados incubados com melatonina na concentração de 10^{-9} ou 10^{-12} M melhoraram significativamente seu desenvolvimento, acompanhado por uma redução na expressão de genes relacionados à apoptose, como Bax e p53.

Baixas concentrações de melatonina (10^{-9} a 10^{-8} M) podem melhorar a taxa de maturação nuclear em oócitos de diferentes espécies (BAHADORI et al., 2013; SHI et al., 2009; TIAN et al., 2014), enquanto que altas concentrações (10^{-5} e 10^{-3} M) não surtiram efeito ou influenciaram negativamente a maturação em ovinos e humanos, respectivamente (CASAO et al., 2010; WEI et al., 2013). Ishizuka et al. (2000) relataram que a melatonina na faixa de 10^{-4} a 10^{-6} M aumentou a taxa de fertilização *in vitro* em camundongos, enquanto que a faixa de 10^{-6} a 10^{-8} M promoveu o desenvolvimento *in vitro* de embriões iniciais.

Tian et al. (2010) também observaram que embriões de duas células murinos cultivados em meio contendo 10^{-9} M de melatonina melhoraram a taxa de produção de blastocistos e blastocisto eclodido. Além disso, estudos sobre o mecanismo de ação revelaram que os efeitos benéficos da melatonina (10^{-9} M) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* foram parcialmente atribuídos à sua capacidade antioxidante acompanhada por níveis elevados de glutathione peroxidase e redução da produção de EROs. Estas alterações levaram à redução de apoptose de blastocistos e em embriões de duas células vitrificados (GAO et al., 2012).

Outro exemplo do potencial antioxidante da melatonina foi relatado por Tamura et al. (2008), em que oócitos murinos cultivados com H_2O_2 para induzir estresse oxidativo, sofreram queda nas taxas de maturação, a qual foi revertida pela presença da melatonina durante o cultivo. Em um estudo em humanos, observou-se que a presença de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) no fluido folicular correlacionava-se com menor qualidade oocitária, mas quando as pacientes foram tratadas com melatonina oral, houve diminuição do estresse oxidativo intrafolicular e concomitante melhora nas taxas de fecundação e gestação (TAMURA et al., 2008).

No cenário atual, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar as condições de produção embrionária. Apesar da ampla utilização da melatonina em várias destas etapas de produção, as informações ainda são limitadas e falta uma avaliação comparativa entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* e, da associação do efeito sobre a maturação dos oócitos, e o efeito citoprotetor sobre as células do cumulus.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos

Os experimentos referentes a esta dissertação de mestrado foram desenvolvidos no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo - USP, *Campus* de Pirassununga - São Paulo, Brasil.

3.2 Animais

Fêmeas de camundongo híbridas F1 variando entre dois a três meses de idade, provenientes do acasalamento entre as linhagens C57BL/6 para fêmeas e CBA para machos, foram utilizadas neste estudo como doadoras de CCOs. As linhagens progenitoras foram adquiridas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP; Campinas - SP, Brasil) para a formação de colônias. Tanto os animais utilizados como matrizes, quanto os utilizados na pesquisa foram mantidos no biotério da FZEA sob ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. A pesquisa foi realizada mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da FZEA/USP, sob número de protocolo 13.1.2250.74.2.

3.3 Superovulação

Todos os animais utilizados nesta pesquisa receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon, Intervet) para estimular o crescimento folicular. Quando mencionado e dependendo do experimento, após 48 horas, uma segunda injeção (i.p.) de 5 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorulon, Intervet) também foi administrada para indução da ovulação. As injeções foram realizadas em momentos aleatórios do ciclo estral, sempre às 17 horas e, para ambos os hormônios, foi utilizado o volume de 0,1mL por animal/administração.

3.4 Obtenção dos complexos cumulus-oócito (CCOs) maturados *in vivo* e *in vitro*

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 17 horas após a injeção de hCG (10 horas do dia seguinte) e tiveram os ovidutos removidos para a obtenção dos CCOs maturados *in vivo*. Já para os CCOs que foram coletados imaturos para posterior MIV, a remoção dos ovários foi realizada 48 horas após a injeção de eCG.

As estruturas coletadas dos animais (ovidutos e ovários) foram alocadas em placas de Petri (100mm, estéril, TPP) em solução fisiológica. A placa contendo as estruturas foi transferida para fluxo laminar previamente esterilizado, e colocada sobre placa aquecedora à 37°C.

Os CCOs maturados *in vivo* foram obtidos mediante a abertura (divulsão romba) da ampola dilatada do oviduto em meio de lavagem M2 (M2; MR-015-D; Millipore®) com auxílio de agulha 30G, pinça de ponta fina e lupa estereoscópica (SMZ1000; Nikon). Já para obtenção dos CCOs imaturos, os ovários foram seccionados e manipulados nas mesmas condições. Todos os CCOs recuperados foram transferidos para gotas de 50 µL de M2, de acordo com os tratamentos/experimentos (item 3.12) em placas de Petri (60mm, estéril, TPP).

Os CCOs imaturos passaram por MIV, e após o cultivo, o processamento das amostras foi realizado da mesma maneira tanto para estes CCOs maturados *in vitro*, quanto para CCOs maturados *in vivo*.

Os CCOs foram tratados com hialuronidase (2 µg/mL em PBS livre de cálcio e magnésio com 0,1% de PVP - PBS; H3884; Sigma-Aldrich) em gota de 80 µL para remoção das células do cumulus (CC). Os oócitos viáveis obtidos (sem degenerações visíveis) foram recuperados com o auxílio de pipeta Pasteur de vidro. Em seguida, os oócitos foram lavados em três gotas de 60 µL de meio KSOMaa (MR-106-D; Millipore®) e alocados em gotas de 100 µL deste mesmo meio e levados à incubadora, até que a taxa de maturação fosse avaliada. Neste período (cerca de 30 minutos), o procedimento foi destinado à manipulação das CC.

As CC foram recuperadas a partir da gota de hialuronidase e transferidas para microtubos de 600 µL devidamente identificados. As CC foram lavadas duas vezes por centrifugação (300 x g a 4°C por 10 minutos) em PBS, tiveram o sobrenadante descartado e os *pellets* celulares formados foram então tratados com 1,5 µL de

solução inibidora RNaseOUT em PBS (1 UI/ μ L; RNase; 10777-019; Invitrogen), sendo imediatamente imersos em nitrogênio líquido (N₂) e estocados em freezer -80°C para análises posteriores.

Quanto aos oócitos, após a avaliação da taxa de maturação, estes foram lavados em três gotas de 60 μ L de PBS e posteriormente em uma gota de 5 μ L de solução RNase. Em seguida, os oócitos foram armazenados em microtubos de 600 μ L contendo 2,5 μ L de solução RNase. Estes tubos foram imediatamente imersos em N₂ e estocados em freezer -80°C.

3.5 Maturação *in vitro*

Os CCOs imaturos foram selecionados e lavados três vezes em gotas 50 μ L de meio M2. Grupos de 20 a 25 CCOs foram maturados *in vitro* em 500 μ L/poço do meio de maturação em placas de 4 poços (estéril, Ingamed). O meio de maturação utilizado foi o TCM199 sem Hepes (M5017; Sigma-Aldrich) acrescido de 10 μ g/mL de gentamicina (G1272; Sigma-Aldrich), 44 μ g /mL de piruvato sódico (P5280; Sigma-Aldrich) e 3 mg/mL de BSA (A9647; Sigma-Aldrich), sendo denominado de meio padrão de maturação *in vitro* (MP). Este meio MP foi suplementado de acordo com os experimentos propostos no item 3.12. Os CCOs foram cultivados por 17 horas em estufa à 37°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada e, posteriormente avaliados quanto à taxa de maturação oocitária.

3.6 Avaliação da taxa de maturação oocitária

Após a maturação *in vivo* ou *in vitro*, os oócitos foram avaliados quanto à taxa de maturação, com base na extrusão do 1º corpúsculo polar (1º CP) sob microscopia de luz invertida (Elipse TS100; Nikon). As amostras de oócitos submetidas a esta avaliação foram armazenadas para análises subsequentes por PCR quantitativo em tempo real.

3.7 Extração do RNA total pelo método de TRIzol®

As amostras de oócitos e células do cumulus foram separadamente submetidas à extração de RNA total segundo o protocolo de TRIzol® (15596-026; Invitrogen).

Inicialmente, a amostra foi homogeneizada com 110 μL de uma solução contendo 100 μL de TRIzol®, 2 μL de acrilamida linear (5 mg/mL; AM9520; Ambion®) e 8 μL de água ultrapura tratada com DEPC e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 20 μL de clorofórmio (Merck) foram adicionados e incubou-se por 3 minutos, também em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O RNA presente na fase aquosa foi recuperado (60 μL), transferido para um novo microtubo de 200 μL e precipitado com adição de 60 μL de álcool isopropílico (Merck), seguido de uma incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e 20 minutos em freezer -20°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 100 μL de álcool etílico (Merck) a 75% e, posteriormente centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante obtido foi descartado e a amostra de RNA solubilizada em 10 μL de água ultrapura tratada com DEPC e mantida a 4°C. Por fim, as amostras de RNA total tiveram suas concentrações mensuradas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

3.8 Digestão com DNase I

Após a mensuração do RNA, todas as amostras tiveram seu volume ajustado a fim de conter 1.000 ng de RNA cada. Este quantitativo foi submetido ao procedimento de digestão com a enzima DNase I - Amplification Grade (18068-015; Invitrogen). Cada amostra de RNA (1.000 ng) foi tratada com 1 μL de DNase (1 UI/ μL), 1 μL de tampão DNase, 0,25 μL de RNaseOUT e água ultrapura livre de DNase e RNase suficiente para completar um volume final de 10 μL . Esta solução foi mantida em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, acrescida de 1 μL de EDTA (25 mM) e incubada a 70°C por 10 minutos para inativação da DNase. Após este procedimento, as amostras de RNA foram resfriadas a 4°C.

3.9 Transcrição reversa (RT)

Para a transcrição reversa (RT) e síntese do RNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (4368813; Applied Biosystems). Foram adicionados a cada amostra de RNA previamente tratada com

DNase, 10 µL de solução composta por 2 µL do tampão RT 10x, 0,8 µL do mix de nucleotídeos dNTP 25x (100 nM), 2 µL de *primers* randômicos 10x, 0,25 µL de RNaseOUT, 1 µL da enzima MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 UI/µL) e, por fim, 3,95 µL de água ultrapura tratada com DEPC. A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler® nexus; Eppendorf) e as amostras incubadas em três etapas consecutivas: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Ao final deste ciclo, as amostras de cDNA obtidas foram resfriadas a 4°C no próprio termociclador e posteriormente armazenadas em freezer -20°C.

3.10 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT)

Após a RT, as amostras de cDNA obtidas foram submetidas à amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo em tempo real, para avaliação da expressão gênica e quantificação relativa de RNAm, tanto para genes alvos, quanto para genes endógenos. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para avaliar a expressão de genes alvos relacionados à apoptose (Bax e Bcl2l1) e antioxidantes (CuZn superóxido dismutase - Cu,ZnSod; Sod1, Mn superóxido dismutase - MnSod; Sod2 e glutathiona peroxidase - Gpx; Gpx1), desenhados a partir de sequências murinas conhecidas, disponíveis no banco de dados GenBank, com o auxílio do software Primer-BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Já os *primers* dos genes endógenos H2afz, Hprt1 e Ppia foram obtidos a partir de sequências já validadas disponíveis na literatura (MAMO et al., 2007). O sistema de detecção adotado foi SybrGreen® seguindo as recomendações do fabricante. As sequências dos *primers* utilizados na quantificação dos referidos genes estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados para a análise da expressão gênica.

Genes	Sequência de nucleotídeos (5'–3')	Número de acesso do GenBank	Tamanho do produto (pb)
Genes endógenos			
H2afz	F 5' ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA 3'	NM_016750	202
H2A histone family, member Z	R 5' TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA 3'		
Hprt1	F 5' GCTTGCTGGTGAAGGACCTCTCGAAG 3'	NM_013556	117
Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	R 5' CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT 3'		
Ppia	F 5' CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG 3'	NM_008907	150
Peptidylprolyl isomerase A	R 5' TGTAAGTCACCACCCTGGCACAT 3'		
Genes alvos			
Bax	F 5' TCTCCGGCGAATTGGAGATG 3'	NM_007527.3	70
BCL2-associated X protein	R 5' CGTGTCCACGTGAGCAATCA 3'		
Bcl2l1	F 5' GCAGTCAGCCAGAACCTTATCT 3'	NM_009743.4	78
BCL2-like 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein	R 5' GCTCACTTACTGGGTCTGCT 3'		
Gpx1	F 5' GATCCGGGACTACACCGAGA 3'	NM_008160.6	106
glutathione peroxidase 1	R 5' GCCATTCTCCTGGTGTCCGA 3'		
Sod1	F 5' CTGTACCAGTGCAGGACCTC 3'	NM_011434.1	98
superoxide dismutase 1, soluble	R 5' CAGTCACATTGCCAGGTCT 3'		
Sod2	F 5' GTGTCTGTGGGAGTCCAAGG 3'	NM_013671.3	125
superoxide dismutase 2, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	R 5' AGCGGAATAAGGCCTGTTGT 3'		

* F: sequência forward; R: sequência reverse

Inicialmente, a técnica de qPCR-RT foi padronizada utilizando amostras de cDNA a fim de se identificar a melhor concentração destas e dos *primers* a serem utilizados nos experimentos. Tais testes foram realizados tanto para as amostra de cDNA de células do cumulus, quanto de oócitos. A concentração para as amostra de cDNA diluídas na razão de 1:8 e de *primers* à 200 nM foram eleitos para ambos os tipos celulares.

Cada reação de amplificação foi preparada com 6 µL do reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (4367659; Applied Biosystems), 200 nM de cada *primer* (F e R), 4 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase, e 2 µL de cDNA da amostra, totalizando um volume final de 12 µL por reação.

Foram adotadas as seguintes condições de termociclagem para as reações de qPCR-RT, utilizadas para todos os genes listados: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos. A curva de dissociação foi iniciada em 60°C com + 0,1°C de incremento até atingir a temperatura de 95°C.

Cada amostra foi sempre avaliada em duplicata para cada um dos genes utilizados e como controles negativos da reação, adicionou-se água ultrapura livre de DNase e RNase em substituição ao cDNA. As reações de qRT-PCR foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Segundo Mamo et al. (2007), os genes H2afz, Hprt1 E Ppia são os mais estáveis em todos os estágios do desenvolvimento inicial murino (de oócito a blastocisto) e condições de cultivo, seja *in vivo* ou *in vitro*. Assim, estes três genes foram utilizados nas reações e após uma avaliação quanto à melhor eficiência e estabilidade (disponível em: <http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>), elegeu-se os dois genes mais estáveis como controle endógeno, sendo o menos estável descartado. Esta padronização foi realizada para cada experimento e tipo celular.

Os valores de expressão obtidos dos genes alvos foram normalizados pela expressão dos genes endógenos selecionados e as diferenças nas frequências dos transcritos foram calculadas pelo método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito na literatura (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Inicialmente, foi feita a média das duplicatas referente a cada amostra de cDNA para cada gene alvo estudado e a média geométrica entre os dois genes endógenos eleitos mais estáveis. Em seguida, calculou-se a diferença entre a média dos Cts de cada gene alvo e a média geométrica dos Cts dos genes endógenos (ΔCt). Posteriormente, fez-se a média dos ΔCt s para o grupo controle (ΔCt médio) e calculou-se a diferença entre este e o ΔCt de cada amostra para cada gene alvo. Por fim, a análise foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os Cts de todos os genes avaliados neste trabalho foram obtidos após

traçado uma linha de *threshold* no ponto médio da amplificação exponencial para cada tipo celular e gene estudado.

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 5.0. As porcentagens da determinação da maturação oocitária foram transformadas em arco-seno e analisadas por ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Do mesmo modo, as análises da expressão gênica, tanto das células do cumulus, quanto dos oócitos, foram realizadas empregando os mesmos testes. Para os grupos que apresentaram diferença significativa quando comparados ao(s) controle(s) foi realizada uma nova análise por ANOVA *one-way* seguido de teste de Bonferroni e, quando oportuno, utilizou-se o teste *t*, a fim de se comparar os tratamentos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (Erro Padrão Médio) e foram realizadas de quatro a cinco repetições por experimento. Foi considerado o nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

3.12 Delineamento experimental

3.12.1. Experimento 1: Efeito do tratamento *in vivo* de melatonina sobre a maturação *in vivo*

Vinte e cinco fêmeas de camundongo F1 (C57BL/6 x CBA) foram divididas aleatoriamente em gaiolas, sendo dois a três animais pertencentes a cada tratamento de 0, 10 e 20 mg/kg/dia de melatonina (MEL) por animal. O tratamento com MEL foi administrado via i.p. uma vez ao dia, 24 horas antes (D-1), juntamente com a primeira injeção hormonal (eCG, D0), 24 horas após (D1) e terminou junto com a injeção da segunda dose hormonal (hCG, D2). Após 17 horas de maturação *in vivo*, os CCOs foram coletados como já descrito e os oócitos e células do cumulus separados, sendo os primeiros avaliados quanto à taxa de maturação (extrusão do 1º CP). Células do cumulus e oócitos foram analisados por qPCR-RT em relação à expressão de genes de apoptose (Bax e Bcl2l1) e antioxidantes (Gpx1, Sod1 e Sod2).

3.12.2. Experimento 2: Efeito do tratamento *in vivo* de melatonina sobre a maturação *in vitro*

Fêmeas híbridas (n=24; C57BL/6 x CBA) foram alocadas igualmente em gaiolas contendo dois animais pertencentes a cada tratamento de 0, 10 e 20 mg/kg/dia de MEL por repetição (n=4). Neste experimento, os animais foram tratados com eCG e MEL i.p. como descrito acima, porém, não foram injetados no D2 (hCG + última injeção de MEL), quando os ovários foram coletados e seccionados com o auxílio de agulha 30G para liberação dos oócitos imaturos dos folículos. Os CCOs coletados foram maturados por 17 horas em MP com adição 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin® V; Bioniche) em placas de 4 poços contendo 500 µL de meio por poço. Oócitos e células do cumulus foram avaliados separadamente quanto à taxa de maturação e expressão gênica, como já descritos.

3.12.3. Experimento 3: Efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro*

Neste experimento, vinte fêmeas murinas F1 receberam somente injeção de eCG e tiveram os ovários coletados 48 horas após. Os CCOs imaturos obtidos sem tratamento prévio das fêmeas com MEL foram maturados em MP com a adição de MEL (10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} molar; M) ou FSH (meio controle FSH; 0,5 µg/mL) durante 17 horas. Foram maturados *pools* de 20 a 25 CCOs por tratamento. O MP continha ou a MEL em suas diferentes concentrações ou FSH (meio controle FSH), nunca os dois hormônios juntos. Foram realizadas as mesmas análises do experimento anterior.

3.12.4. Experimento 4: Avaliação da capacidade citoprotetora da melatonina durante a maturação *in vitro*

Fêmeas de camundongo F1 (n=44) receberam somente injeção de eCG, conforme descrito anteriormente. Para averiguar a capacidade citoprotetora da MEL, utilizou-se em um grupo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 300 µM) como indutor de apoptose no MP. Além disso, a concentração de 10^{-9} M de MEL, que obteve melhores resultados no experimento 3, foi utilizada sozinha ou em associação com o H_2O_2 . Como controle adicional, foi incluído um grupo maturado somente com FSH. Os CCOs foram maturados nas mesmas condições do experimento 3, e os oócitos e as células do cumulus foram avaliados separadamente quanto à taxa de maturação e expressão gênica, como já descrito.

Figura 3 – Representação esquemática dos experimentos desenvolvidos neste projeto de mestrado. CC, células do cumulus; MEL, melatonina; MIV, maturação *in vitro*; OO, oócitos; TM, taxa de maturação; qPCR-RT, PCR quantitativo em tempo real. A 18,14 L 15,6

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento *in vivo* de melatonina sobre a maturação *in vivo*

Neste experimento foi avaliado o efeito da melatonina administrada via i.p. durante quatro dias consecutivos *in vivo*, nas concentrações de 0, 10 e 20 mg/kg/dia, sobre a maturação oocitária em microscópio invertido de luz. Além disso, a expressão de genes relacionados à apoptose e antioxidantes também foram avaliados para oócitos e células do cumulus.

As taxas de maturação foram de 69,4%, 62,4% e 80,3% para os tratamentos de 0, 10 e 20 mg/kg/dia de melatonina, respectivamente. Tais resultados não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$), porém, a administração *in vivo* de melatonina a 20 mg/kg durante o período de tratamento superovulatório parece ter um efeito positivo, aumentando numericamente esta taxa de maturação avaliada pela extrusão do 1º corpúsculo polar (1ºCP). Os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Taxa de maturação oocitária *in vivo* com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).

Tratamentos (mg/kg/dia de MEL)	Nº de animais	Oócitos		Taxa de maturação (%)
		Total	1º CP	
		Média ± EPM	Média ± EPM	
0 (Controle)	10	111 ± 3,6	77 ± 2,5	69,4 ± 5,4
10	7	85 ± 5,7	53 ± 2,6	62,4 ± 7,3
20	8	76 ± 2,9	61 ± 2,3	80,3 ± 2,7

* $P>0,05$; ANOVA. Dados referentes a cinco repetições realizadas.

Além da avaliação da taxa de maturação, foram analisados o efeito da melatonina administrada *in vivo* na expressão de genes relacionados à apoptose (Bax e Bcl2l1) e antioxidantes (Gpx1, Sod1 e Sod2) em células do cumulus e oócitos após a maturação *in vivo*. Os resultados da expressão gênica relativa para CC estão dispostos abaixo (Figura 4):

* $P > 0,05$; ANOVA.

Figura 4 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina administrada *in vivo* em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Não foi identificada diferença ($P > 0,05$) na expressão gênica para nenhum dos genes estudados em células do cumulus em resposta ao tratamento *in vivo* com melatonina quando comparado ao grupo controle.

Para oócitos, a figura 5 apresenta a expressão gênica para os genes alvos pesquisados.

*P>0,05; ANOVA.

Figura 5 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina administrada *in vivo* em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Conforme observado, em ambos os tipos celulares (CC e OO), não houve diferenças ($P>0,05$) na expressão gênica dos grupos tratados com melatonina *in vivo* quando comparados ao controle. Os maiores valores relativos de expressão para células do cumulus foram obtidos nos grupos tratados com 10 e 20 mg/kg de MEL para o gene antiapoptótico Bcl2l1.

Já para oócitos, também houve alta expressão do gene Bcl2l1 nos grupos tratados com MEL nas duas concentrações utilizadas em relação ao controle, porém semelhantes entre si ($P>0,05$). Além disso, a maior expressão do gene pró-apoptótico Bax foi registrado no grupo tratado com 20 mg/kg de melatonina, sugerindo que altas concentrações podem ser nocivas aos oócitos.

Foram observadas alterações na expressão gênica dos grupos tratados com melatonina *in vivo* para ambos os tipos celulares, porém, tal diferença não surtiu efeito significativo.

4.2 Efeito do tratamento *in vivo* de melatonina sobre a maturação *in vitro*

Avaliou-se neste experimento a influência da administração via i.p. de melatonina *in vivo* durante três dias consecutivos, nas concentrações de 0,10 e 20 mg/kg/dia, sobre a maturação oocitária *in vitro*. Portanto, os CCOs imaturos de animais previamente tratados com melatonina foram recuperados e maturados *in vitro* com FSH (0,5 µg/mL) por 17 horas para todos os tratamentos. A avaliação por qPCR-RT também foi realizada.

Para a taxa de maturação oocitária de 46,6%, 53,2% e 39% para 0, 10 e 20 mg/kg/dia de MEL, respectivamente, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de maturação oocitária *in vitro* com base na extrusão 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).

Tratamentos (mg/kg/dia de MEL)	Nº de animais	Oócitos		Taxa de maturação (%)
		Total Média ± EPM	1º CP Média ± EPM	
0 (Controle)	8	189 ± 4,8	88 ± 2,2	46,6 ± 4,3
10	8	186 ± 7,6	99 ± 3,8	53,2 ± 2,2
20	8	218 ± 8,7	85 ± 2,1	39,0 ± 7,1

* $P>0,05$; ANOVA. Dados referentes a quatro repetições realizadas.

Não houve diferença na taxa de maturação *in vitro* ($P>0,05$) para os animais previamente tratados com injeções de MEL em diferentes concentrações e dias consecutivos, quando comparados com o controle. O grupo tratado com 10 mg/kg de MEL obteve a maior taxa numérica de maturação de 53,2% porém não diferiu dos demais grupos.

Em seguida, na Figura 6, estão apresentadas as análises obtidas por qPCR-RT para as células do cumulus.

*a,b,ab $P < 0,05$; ANOVA.

Figura 6 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina *in vivo* sobre a maturação *in vitro* em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

*Letras diferentes para o mesmo gene indicam diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$).

O tratamento de 20 mg/kg de MEL *in vivo* para o gene antiapoptótico Bcl2l1 influenciou negativamente ($P < 0,05$) quando comparado com o controle. De maneira contrária, este mesmo tratamento apresentou diferença significativa frente o grupo tratado com 10 mg/kg de MEL para o gene Gpx1, surtindo efeito benéfico, porém, não diferiu do controle. Assim, o tratamento *in vivo* dos animais com MEL seguido de maturação *in vitro* surtiu efeito benéfico somente para o gene glutathione peroxidase (Gpx1) em células do cumulus (somente quando 20 mg/kg comparado com 10 mg/kg).

Para oócitos, a maioria dos tratamentos aumentou a expressão dos genes avaliados, porém, somente houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos em comparação ao controle para o gene Gpx1, independente da dose de melatonina utilizada (Figura 7).

*a,b $P < 0,05$; ANOVA.

Figura 7 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina *in vivo* sobre a maturação *in vitro* em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos Hprt1 e Ppia. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

*Letras diferentes para o mesmo gene indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

De maneira geral, o tratamento de 20 mg/kg de MEL *in vivo* seguido de maturação *in vitro* aumentou significativamente ($P < 0,05$) a expressão gênica da enzima Gpx1 tanto para células do cumulus quanto para oócitos conforme apresentados nos resultados acima.

4.3 Efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro*

Objetivou-se avaliar o efeito da melatonina, nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M durante a maturação *in vitro* por 17 horas, sobre a taxa de maturação oocitária avaliada sob microscopia de luz invertida. Como controle, um grupo foi

maturado somente na presença de FSH (0,5 µg/mL). Também foram avaliadas as expressões gênicas para os genes relacionados à apoptose e antioxidantes.

Os dados referentes à avaliação da taxa de maturação estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Taxa de maturação oocitária *in vitro* em diferentes concentrações de melatonina com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).

Tratamentos (M de MEL)	Oócitos		Taxa de maturação (%)
	Total n	1º CP Média ± EPM	
0 (Controle FSH)	96	55 ± 2,6	57,3 ± 3,3
10 ⁻⁹	100	56 ± 1,7	56,0 ± 6,7
10 ⁻⁶	95	51 ± 1,7	53,7 ± 6,5
10 ⁻³	88	43 ± 1,4	48,9 ± 4,2

*P>0,05; ANOVA. Dados referentes a quatro repetições realizadas.

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os grupos que foram maturados *in vitro* com a adição de melatonina, nas suas diferentes dosagens (56%, 53,7%, 48,9% para 10⁻⁹, 10⁻⁶ e 10⁻³ M, respectivamente) ao meio de maturação, em comparação com o grupo controle FSH (57,3%). Para os grupos tratados com melatonina, a taxa de maturação aumentou ligeiramente conforme a concentração do hormônio decresceu, porém, a maior taxa obtida foi observada no grupo controle.

Os resultados da expressão dos genes estudados para células do cumulus estão apresentados na Figura 8.

*a,b $P < 0,05$; ANOVA.

Figura 8 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro* em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

*Letras diferentes para o mesmo gene indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$); ** Grupo controle FSH (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e sem adição de MEL.

Para os genes relacionados à apoptose, não houve diferença entre os diferentes tratamentos com melatonina e o controle FSH ($P > 0,05$). As concentrações

de 10^{-9} e 10^{-6} M de melatonina suplementadas ao meio de maturação oocitária aumentaram significativamente ($P < 0,05$) a expressão dos genes antioxidantes Gpx1 e Sod1 em células do cumulus quando comparadas ao controle FSH. Já para Sod2, 10^{-6} M de melatonina elevou a expressão gênica, apresentando tendência à significância ($P = 0,066$) quando comparado ao controle.

A expressão dos genes estudados para oócitos no período de maturação *in vitro* estão apresentados na Figura 9.

*a,ab,b $P < 0,05$; ANOVA.

Figura 9 - Perfil de expressão gênica do efeito da melatonina sobre a maturação *in vitro* em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax,

Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

*Letras diferentes para o mesmo gene indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$); ** Grupo controle FSH (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e sem adição de MEL.

Para o grupo tratado com 10^{-6} M de MEL, observou-se indução negativa com diferença estatística ($P = 0,0208$) na expressão do gene promotor da apoptose Bax em comparação com o grupo controle FSH durante o período de maturação em oócitos murinos. Para os demais genes avaliados não houve diferença ($P > 0,05$).

Levando-se em consideração a avaliação da maturação e expressão gênica em células do cumulus e oócitos, a concentração de 10^{-9} M de MEL obteve os melhores resultados dentre as demais testadas, ora significativos ($P > 0,05$), ora somente numericamente distintos. Sendo assim, esta concentração foi eleita para ser novamente utilizada no experimento 4, frente a um indutor de estresse oxidativo (H_2O_2).

Como observado na maturação nuclear, a melatonina pareceu exercer mais efeitos (mais genes com expressão afetada pelo tratamento) diante de condições *in vitro* que em condições de tratamento *in vivo*. Condições *in vitro* normalmente induzem efeitos de estresse oxidativo e a melatonina poderia exercer seus efeitos diante de tais condições.

4.4 Avaliação da capacidade citoprotetora da melatonina durante a maturação *in vitro*

Neste experimento foi utilizada a concentração de 10^{-9} M de melatonina que obteve melhores resultados quando analisados taxa de maturação e expressão gênica de ambos os tipos celulares no experimento 3 frente ao H_2O_2 (indutor de estresse oxidativo). Objetivou-se avaliar a capacidade citoprotetora da melatonina durante a maturação *in vitro* e expressão gênica perante a indução de estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2 .

Os dados referentes à avaliação da taxa de maturação estão dispostos abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Taxa de maturação oocitária *in vitro* em diferentes meios com base na extrusão do 1º CP em camundongos F1 (C57BL/6 x CBA).

Tratamentos	Oócitos		Taxa de maturação (%)
	Total n	1º CP Média ± EPM	
Controle FSH	75	45 ± 0,3	60,0 ± 3,3
10 ⁻⁹ M de MEL	82	49 ± 1,1	59,8 ± 3,3
300 µM H ₂ O ₂	83	43 ± 0,8	51,8 ± 4,2
10 ⁻⁹ M de MEL + 300 µM H ₂ O ₂	84	50 ± 0,5	59,5 ± 5,0

*P>0,05; ANOVA. Dados referentes a quatro repetições realizadas.

Não houve diferença (P>0,05) entre os grupos maturados com adição de melatonina (59,8%), H₂O₂ (51,8%) ou associação de ambos (59,5%), em comparação com o grupo controle FSH (60%). Embora o tratamento com H₂O₂ tenha diminuído a taxa de maturação, não foi suficiente para atingir significância (P>0,05). Já quando este indutor de apoptose foi associado com melatonina (10⁻⁹ M), a taxa de maturação foi aumentada numericamente quando comparada tanto ao tratamento controle FSH, quanto ao 10⁻⁹ M de melatonina. Assim, a utilização de H₂O₂ nestas condições de estudo não causou efeito negativo significativo sobre a maturação, de forma que sua associação com melatonina não trouxe efeitos benéficos.

A expressão dos genes estudados para células do cumulus está disposta na Figura 10.

*a,ab,b P<0,05; ANOVA.

Figura 10 - Perfil de expressão gênica do efeito dos tratamentos *in vitro* com melatonina e/ou peróxido de hidrogênio em células do cumulus. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de 2^{-ΔΔCt}. Tratamentos de FSH (0,5 μ g/mL), MEL (10⁻⁹ M), H₂O₂ (300 μ M) e MEL + H₂O₂.

*Letras diferentes para o mesmo gene indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

A adição de melatonina na concentração de 10^{-9} M, a associação desta com H_2O_2 e até mesmo o H_2O_2 sozinho durante o período de maturação oocitária diminuíram significativamente ($P < 0,05$) a expressão do gene antiapoptótico Bcl2l1 em células do cumulus quando comparadas ao controle FSH. Já para Gpx1 e Sod1, todos os tratamentos diferiram ($P < 0,05$) do controle FSH com aumento de expressão. Para o gene Sod2, o tratamento com melatonina a 10^{-9} M obteve o maior nível de expressão e diferiu ($P < 0,05$) do grupo tratado com a associação desta e H_2O_2 , porém não houve diferença para ambos quando comparados com o controle FSH ($P > 0,05$).

Para oócitos, a expressão gênica para os genes estudados está discriminada na Figura 11.

*P>0,05; ANOVA.

Figura 11- Perfil de expressão gênica do efeito dos tratamentos *in vitro* com melatonina e/ou peróxido de hidrogênio em oócitos. Níveis de expressão relativa para os genes Bax, Bcl2l1, Gpx1, Sod1 e Sod2, normalizados pela média geométrica da expressão dos genes endógenos H2afz e Hprt1. Dados em médias $\pm$ EMP (n=4 repetições) e foram determinados pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Tratamentos de FSH (0,5 μ g/mL), MEL (10^{-9} M), H₂O₂ (300 μ M) e MEL + H₂O₂.

Não houve diferença na expressão dos genes avaliados para oócitos (P>0,05).

Discussão

5 DISCUSSÃO

A melatonina está intimamente relacionada à reprodução, promovendo efeitos benéficos na maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário de várias espécies de mamíferos (CASAO et al., 2010; ISHIZUKA et al., 2000; MANJUNATHA et al., 2009; SHI et al., 2009; TIAN et al., 2014). Alguns estudos demonstraram que os benefícios da melatonina na fisiologia reprodutiva se devem principalmente como um agente sequestrador de radicais livres e por aumento na expressão de genes antioxidantes ou supressão dos relacionados com apoptose (CRUZ et al., 2014; TAMURA et al., 2014).

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da adição de melatonina e o seu envolvimento tanto na maturação oocitária *in vivo*, quanto *in vitro*, mediante a determinação da taxa de extrusão do 1º corpúsculo polar. Além disso, a abundância relativa para transcritos de genes relacionados à apoptose (Bax e Bcl2l1) e de enzimas antioxidantes (Gpx1, Sod1 e Sod2) também foram avaliados em oócitos e células do cumulus expostos aos mesmos tratamentos.

No primeiro experimento, o tratamento *in vivo* com melatonina não diferiu entre os tratamentos quanto à taxa de maturação oocitária. Vários estudos correlacionam a taxa de maturação *in vitro* com diferentes dosagens de melatonina, mas a avaliação da maturação *in vivo* é escassa (BAHADORI et al., 2013; K. NA, J. KIM, J. LEE, T. YOON, K. CHA, 2005; TAMURA et al., 2008). No entanto, o efeito benéfico da melatonina *in vivo* na aquisição da competência oocitária e desenvolvimento folicular já foi descrito em ovelhas anéstricas (TSILIGIANNI et al., 2009). Em humanos, o tratamento oral em pacientes apresentando sinais de estresse oxidativo intrafolicular resultou em melhores taxas de fecundação e gestação indicando o efeito benéfico do uso da melatonina (TAMURA et al, 2008). A falta de efeito evidente da melatonina pode ter sido devido ao tempo de aplicação do tratamento ter sido curto (quatro dias) e/ou à dosagem ter sido insuficiente. Ainda, é possível que o efeito benéfico só se dê em condições de estresse oxidativo como reportado em humanos.

Nas análises de expressão gênica, a melatonina não foi capaz de alterar o padrão de expressão entre os tratamentos empregados no experimento 1, tanto para células do cumulus, quanto para oócitos. No entanto, foi relatado que a melatonina quando administrada na mesma concentração deste trabalho (10 mg/kg), por sete

dias consecutivos, foi capaz de aumentar a atividade antioxidante de enzimas superóxido dismutase (Sods) no fígado de roedores (ÖZTÜRK et al., 2000). De maneira similar, porém administrada em dose única e concentração inferior (5 mg/kg), a melatonina também foi capaz de melhorar a atividade de Sods no rim, fígado e cérebro de ratos (LIU; NG, 2000). Assim, a melatonina é capaz de influenciar a atividade de enzimas antioxidantes quanto a níveis de RNAm celulares (MAYO et al., 2002).

É possível que o tempo de tratamento e/ou a dose de melatonina utilizada não tenham sido suficientes para alterar o padrão de expressão gênica como também observado para a taxa de maturação *in vivo*. Além disso, em experimentos realizados sob condições *in vivo*, inúmeras variáveis endógenas podem mascarar os resultados obtidos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; MENEZES, 2013).

No segundo experimento, o ambiente de maturação oocitária passou a ser *in vitro* e os camundongos previamente tratados com melatonina por três dias consecutivos. Nesse caso, também não foram observadas alterações significativas na taxa de maturação entre os tratamentos. Estudos correlacionando o tratamento *in vivo* com melatonina sobre a posterior taxa de maturação *in vitro* não foram encontrados, mas pode-se inferir, que assim como no experimento anterior, talvez a dose e/ou duração do tratamento, que foi ainda mais curto (três dias), tenham sido insuficientes para provocar um efeito ou até mesmo que o tratamento *in vivo* não tenha efeitos sobre a maturação oocitária *in vitro* posterior.

Em relação à expressão gênica de CCOs maturados *in vitro* após o tratamento *in vivo* prévio com melatonina apresentou alguns efeitos. Ao contrário do que se esperava, diminuiu a expressão do gene antiapoptótico Bcl211 em células do cumulus quando comparado ao controle no grupo tratado com 20 mg/kg/dia. Há relatos de que o tratamento *in vitro* com melatonina (10^{-7} M) estimula a expressão gênica de Bcl-2 durante o desenvolvimento de embriões pronucleares murinos em relação àqueles não tratados (WANG et al., 2013). Por outro lado, HE e colaboradores (2015) também observaram diminuição da expressão de Bcl-2 em blastocistos murinos, porém esta não chegou a ser significativa entre o controle e o grupo tratado com melatonina (15 mg/kg; ip; 12/12 horas por quatro dias), mesmo a concentração dos níveis de melatonina sérica tendo aumentado 3,6 vezes em relação ao valor basal (1,8 ng/mL). Assim, apesar do tipo celular não ser o mesmo, a melatonina tem mostrado efeitos contraditórios para este gene.

Para o gene da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (Gpx1), porém, houve aumento de transcritos no tratamento com 20 mg/kg/dia de melatonina quando comparado com o grupo tratado com a metade desta concentração. Esta mesma concentração (20 mg/kg/dia) proporcionou aumento significativo do Gpx1 em oócitos quando comparado ao grupo controle. Ratas gestantes tratadas com 10 mg/kg de melatonina (dose única; i.p.) aumentaram significativamente a concentração de melatonina circundante e a atividade de Gsh-px e Sods no cérebro fetal (OKATANI; WAKATSUKI; KANEDA, 2000). Assim, a melatonina pareceu exercer um efeito benéfico ao menos em relação ao antioxidante Gpx1. Aparentemente, a exposição dos CCOs a um ambiente *in vitro* durante a maturação, permitiu a expressão de alguns efeitos do tratamento *in vivo* prévio com melatonina. As condições de cultivo *in vitro* sabidamente podem resultar em estresse oxidativo (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009), e diante de condições assim, a melatonina poderia exercer efeito.

No terceiro experimento, a taxa de maturação oocitária não diferiu entre os grupos maturados com diferentes concentrações de melatonina (10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M;) quando comparados ao controle maturado com FSH.

Já foi reportado em camundongos que melatonina (na concentração de 10^{-8} M) promoveu aumento da maturação oocitária e de desenvolvimento embrionário até blastocisto em condições *in vitro* (BAHADORI et al., 2013). A mesma ação, porém em concentração distinta (10^{-9} M) foi capaz de promover a melhora da taxa de maturação *in vitro* em bovinos e suínos (SHI et al., 2009; TIAN et al., 2014). Todos os trabalhos citados acima utilizaram em algum momento a associação de melatonina com um ou mais hormônios (FSH, LH, E_2 , hCG) e/ou adição de soro fetal bovino ou fluido folicular ao meio. Sabe-se que no fluido folicular ovariano, assim como no soro fetal bovino, também há melatonina (SHI et al., 2009).

No presente estudo, no entanto, os resultados foram obtidos somente pela ação da melatonina durante a maturação *in vitro*, excluindo-se a chance de interferência de outras variáveis acrescidas ao meio de maturação (falso-positivo). Como não houve a associação de outros hormônios ou de soro com a melatonina, pode-se afirmar que a melatonina sozinha foi capaz de induzir a progressão da meiose em oócitos murinos, de forma similar aos resultados obtidos com FSH. Observação similar foi reportada em bovinos (CUNHA, 2014), sugerindo, que em

condições de maturação *in vitro*, a melatonina seja capaz de estimular a meiose em oócitos.

O mecanismo pelo qual a melatonina poderia estimular a meiose é desconhecido, mas poderia ser relacionado a uma possível ação da indolamina sobre a via do MPF (fator promotor da meiose). Há relatos de que em oócitos de carpas, a melatonina levou à ativação de componentes do MPF que estão envolvidos no controle da meiose (CHATTORAJ et al., 2005; MAITRA; CHATTORAJ; BHATTACHARYYA, 2005). Estudos adicionais serão necessários para avaliar tal hipótese.

A expressão de genes relacionados à apoptose e enzimas antioxidantes para células do cumulus e oócitos também foi avaliada nas mesmas condições de cultivo. Para células do cumulus, a expressão gênica não foi afetada para Bax e Bcl2l1. Porém, houve aumento significativo dos grupos tratados com 10^{-9} e 10^{-6} M de melatonina para os genes antioxidantes Gpx1 e Sod1, sugerindo que em condições *in vitro*, a melatonina apresentou efeitos positivos estimulando a expressão de genes antioxidantes de forma a melhorar a proteção das células contra condições potencialmente indutoras de estresse oxidativo. São escassos estudos envolvendo a expressão gênica das células do cumulus durante a maturação oocitária. No entanto, sabe-se que as células do cumulus estão intimamente conectadas umas às outras e ao oócito, promovendo uma comunicação bidirecional essencial para o desenvolvimento e funções de ambos (SU; SUGIURA; EPPIG, 2009). Assim, as células do cumulus são mais susceptíveis do que os oócitos a alterações do meio quando cultivados *in vitro* (EROs) e, o aumento da atividade antioxidante sugere que estes mecanismos de defesa sejam importantes para a proteção dos oócitos (EL MOUATASSIM, 1999; TAMURA et al., 2008).

Ao contrário do que se esperava, porém, a expressão do gene pró-apoptótico Bax foi aumentada para o tratamento de 10^{-6} M de melatonina quando comparado ao controle nos oócitos. Rodriguez-Orsorio e colaboradores (2007) observaram diferença não significativa para genes relacionados à apoptose Bax e Bcl2l1 tratados com melatonina a 10^{-9} M em comparação ao controle, porém em blastocistos suínos. Por outro lado, a concentração de 10^{-6} M proporcionou diminuição significativa da expressão de Bax e Bcl-xl em blastocistos provenientes de embriões murinos de 2-células vitrificados (DEGHANI-MOHAMMADABADI et al., 2014).

Assim, é relatado que a melatonina é um potente agente inibidor de apoptose, contudo, seus resultados mostraram-se por vezes, contraditórios.

No experimento 4, a concentração mais eficiente de melatonina (10^{-9} M) eleita no experimento anterior foi utilizada frente a presença ou ausência do indutor de apoptose H_2O_2 . Novamente, a melatonina foi capaz de manter os mesmos níveis de maturação obtidos com FSH, reforçando seu potencial promotor da meiose. O tratamento com o indutor de apoptose (300 μ M de H_2O_2) não diferiu significativamente do controle, porém resultou na menor taxa de maturação dentre os tratamentos empregados, indicando o efeito prejudicial desse peróxido. Já, quando foi empregada a associação de melatonina com H_2O_2 , houve uma recuperação da taxa de maturação oocitária *in vitro* quando comparada ao tratamento somente com FSH ou melatonina, não diferindo de forma significativa, mas sugerindo um possível efeito citoprotetor da melatonina durante a maturação *in vitro*.

Tamura e colaboradores (2008) ao estudarem oócitos desnudos, submetidos à maturação com adição de fatores de crescimento e FSH e, avaliados quanto à taxa de maturação após 12 horas de incubação, observaram redução na taxa de maturação quando o H_2O_2 na mesma concentração deste trabalho foi adicionado ao meio. Além disso, a associação de melatonina (10 ng/mL) com H_2O_2 (300 μ M) ao meio de maturação *in vitro* reverteu significativamente a taxa de maturação de 28,6 para 62,5%, porém, quando comparado ao controle (92,3%; sem adição de melatonina ou H_2O_2), não diferiu. Tais resultados podem ter sido influenciados pela presença de outras substâncias em conjunto ao meio de maturação, tais como FSH e soro fetal e, as ações atribuídas à melatonina podem ter sido diminuídas.

As células do cumulus têm papel muito importante na proteção contra o estresse oxidativo e apoptose. Tatemoto (2000) demonstrou pela primeira vez que as células do cumulus estão diretamente envolvidas na proteção de oócitos suínos contra o dano celular causado por EROs durante a MIV. Porém, nas condições estudadas para este experimento, a expressão das células do cumulus nos grupos melatonina (10^{-9} M), H_2O_2 (300 μ M) e a associação destes (MEL + H_2O_2) foram diminuídas em relação ao controle para o gene antiapoptótico Bcl2l1. Já a expressão de Gpx1 e Sod1 em células do cumulus foi aumentada em todos os tratamentos de maneira similar quando comparada ao grupo tratado somente com FSH, indicando uma maior expressão destes antioxidantes.

Os oócitos não apresentaram nenhum efeito significativo para os genes estudados. Estudos relatam que o peróxido de hidrogênio, adicionado ao meio, inibe a maturação oocitária pela produção de EROs, enquanto a melatonina demonstra atividade protetora contra o estresse oxidativo causado por este indutor apoptótico (REITER; TAN; GALANO, 2014; TAMURA et al., 2008, 2012). Sendo assim, a ausência de diferença significativa em oócitos corrobora os relatos de que as células do cumulus combatem o estresse oxidativo, sendo essenciais para o pleno desenvolvimento oocitário e fertilização (FATEHI et al., 2005; TATEMOTO, 2000).

No geral, o efeito da melatonina exógena pode não ter sido observado em condições exclusivas *in vivo* devido ao fato de que tais condições gerarem menos espécies reativas, acarretando menor expressão dos genes relacionados a este processo de ativação/recuperação. Porém, houve incremento na expressão dos genes antioxidantes para este mesmo tipo celular em condições *in vitro* e à medida que se aumentou tal exposição (aumento de Gpx1 na maturação *in vitro* precedida de tratamento *in vivo* com melatonina e, Gpx1 e Sod1 quando somente maturação *in vitro* com melatonina).

Conclusões

6 CONCLUSÕES

O tratamento *in vivo* com melatonina não influenciou a maturação *in vivo* e a expressão de genes relacionados à apoptose e antioxidantes em células do cumulus e oócitos murinos.

O tratamento *in vivo* com melatonina não influenciou a maturação *in vitro*, porém alterou a expressão gênica em células do cumulus e oócitos, reduzindo a expressão do gene antiapoptótico Bcl2l1 em células do cumulus e elevando o da enzima antioxidante Gpx1 em células do cumulus e em oócitos.

Em condições exclusivamente *in vitro*, a melatonina estimulou a maturação de forma similar ao FSH e também afetou a expressão gênica, elevando os transcritos dos genes antioxidantes Gpx1 e Sod1 em células do cumulus e o gene pró-apoptótico Bax em oócitos.

O desafio de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio não afetou a maturação *in vitro*, de forma que não foi possível evidenciar um efeito citoprotetor da melatonina neste parâmetro. A expressão gênica (Bcl2l1, Gpx1 e Sod1) foi afetada apenas em células do cumulus tratadas com melatonina e/ou peróxido de hidrogênio, de forma que não houve efeito de reversão da ação do peróxido de hidrogênio pela melatonina.

Em síntese, o tratamento *in vivo* com melatonina não influenciou a taxa de maturação oocitária *in vivo* ou *in vitro*, porém, quando utilizada em condições totalmente *in vitro* foi capaz de induzir a progressão da meiose em oócitos murinos, indicando efeitos sobre o controle da meiose oocitária. A melatonina afetou a expressão gênica apenas com a exposição dos CCOs a condições de cultivo *in vitro*, sendo as células do cumulus mais influenciadas que os oócitos. O tratamento com peróxido de hidrogênio não induziu efeitos sobre a maturação *in vitro* ou expressão gênica distintos da melatonina ou da associação, de forma que não foi possível estabelecer um efeito citoprotetor mediante desafio de estresse oxidativo nas condições estudadas.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 151–158, 2002.

AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 10, p. 1634–50, out. 2010.

BAHADORI, M. H. et al. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11–18, 2013.

BERLINGUER, F. et al. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 4, p. 383–391, 2009.

BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 8 jan. 2010.

CALDER, M. D. et al. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, n. 1, p. 14, 2003.

CAN, A.; SEMİZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, n. 12, p. 749–756, 1 dez. 2003.

CARABATSOS, M. J. et al. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. **Developmental biology**, v. 204, n. 2, p. 373–84, 15 dez. 1998.

CASAO, A et al. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 1, p. 35, 1 mar. 2010.

CASTRO, F. C. **Silenciamento gênico do BMPRII em células da granulosa bovinas**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2014.

CHATTORAJ, A. et al. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): Induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 145–155, 2005.

CHAVES, R. N.; FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. p. 37–49, 2010.

CHOI, J. et al. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 7, p. 1127–1135, 2008.

CHOI, Y.; RAJKOVIC, A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 5, p. 579–90, mar. 2006.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.

COELHO, M. B. et al. Assessing melatonin and its oxidative metabolites amounts in biological fluid and culture medium by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 5, n. 24, p. 6911, 21 nov. 2013.

COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864–880, 2009.

COTICCHIO, G. et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 4, p. 427–454, 1 jul. 2015.

CRUZ, M. H. C. et al. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. **Animal Reproduction Science**, v. 145, n. 3-4, p. 150–160, 2014.

CUNHA, M. C. R. V. DA. **A melatonina na maturação in vitro de oócitos bovinos**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2014.

DEHGHANI-MOHAMMADABADI, M. et al. Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 4, p. 453–461, 2014.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 81, n. 3, p. 155–62, set. 2007.

DIAZ, F. J. et al. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. **Developmental biology**, v. 299, n. 1, p. 91–104, 1 dez. 2006.

DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 531–535, 10 out. 1996.

DRUMMOND, A. E. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. **Cell and tissue research**, v. 322, n. 1, p. 107–15, out. 2005.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 4, p. 16, 2006.

DUGGAVATHI, R.; MURPHY, B. D. Ovulation Signals. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 890–891, 15 maio 2009.

DUMONT, J. et al. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 2, p. 227–31, 25 abr. 2005.

EL MOUATASSIM, S. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 8, p. 720–725, 1 ago. 1999.

ELVIN, J. A. et al. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. **Molecular Endocrinology**, 2 jul. 1999.

EPPIG, J. J. et al. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developmental biology**, v. 164, n. 1, p. 1–9, jul. 1994.

EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction, fertility, and development**, v. 8, n. 4, p. 485–9, jan. 1996a.

EPPIG, J. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 197–207, 1 jan. 1996b.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2890–4, 5 mar. 2002.

FATEHI, A. N. et al. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v. 13, n. 2, p. 177–185, 20 jul. 2005.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–48, 15 mar. 2009.

FIGUEIREDO, J. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FÜLÖP, C. et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development (Cambridge, England)**, v. 130, n. 10, p. 2253–61, maio 2003.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–83, jul. 2000.

GAO, C. et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 3, p. 305–311, 2012.

GINTHER, O. et al. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 475–482, 1 out. 2002.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Desenvolvimento Do Embrião. **Medicina**, p. 82–94, 2010.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Baueri, SP: Manole, 2004.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. **Nutrition & metabolism**, v. 2, n. 1, p. 22, 10 set. 2005.

HAYASHI, M. et al. Recombinant Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) Enhances Growth and Differentiation of Cultured Early Ovarian Follicles 1. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1236–1244, 1 mar. 1999.

HE, C. et al. Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 3, p. 300–309, 2015.

HEGELE-HARTUNG, C. Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Mouse Oocytes After Treatment with Synthetic Meiosis-Activating Sterol In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 5, p. 1362–1372, 1 nov. 1999.

HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. **Cellular signalling**, v. 18, n. 9, p. 1351–9, set. 2006.

ISHIZUKA, B. et al. 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.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2004.

K. NA, J. KIM, J. LEE, T. YOON, K. CHA, D. L. Effect of Melatonin of Mouse GV Oocytes and apoptosis of Cumulus Cells In Vitro. n. lvm, p. 2005, 2005.

KANG, J. T. et al. 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. 22–28, 2009.

KOCER, A. et al. Germ cell sex determination in mammals. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 4, p. 205–13, 1 abr. 2009.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13_suppl, p. E14–E23, 10 out. 2003.

LEÓN, J. et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 1, p. 1–9, 2005.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 3, p. 141–52, mar. 2013.

LIU, F.; NG, T. B. Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 447–453, 3 abr. 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 5, p. 427–437, 2002.

LYU, S. W. et al. **Supplementation of melatonin in vitro maturation (IVM) medium improves the efficiency of human IVM-IVF-ET program for the fertility treatment** *Fertility and Sterility* American Society for Reproductive Medicine, , 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1635>>

MAITRA, S. K.; CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYYA, S. Implication of melatonin in oocyte maturation in Indian major carp *Catla catla*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 31, n. 2-3, p. 201–7, abr. 2005.

MAMO, S. et al. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. **BMC developmental biology**, v. 7, p. 14, 2007.

MANJUNATHA, B. M. et al. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 12–16, 2009.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911–922, mar. 2001.

MAYO, J. C. et al. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002.

MENEZES, S. M. P. N. J. M. F. E. W. DE. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. **Usp**, p. 234 p., 2013.

NAGY, A. et al. **Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual**. Third ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

NAKANO, M.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 20, n. 2, p. 199–207, 1 maio 2012.

NILES, L. P. et al. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 156, n. 1-2, p. 107–110, 1999.

NODA, Y. et al. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, n. 4, p. 356–360, abr. 1991.

NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 11, p. 1869–78, 1 jun. 2009.

O'SHAUGHNESSY, P. J. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 3, p. 602–608, 1 set. 1997.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; KANEDA, C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 2, p. 89–96, mar. 2000.

ÖZTÜRK, G. et al. The Effect of Melatonin on Liver Superoxide Dismutase Activity, Serum Nitrate and Thyroid Hormone Levels. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 50, n. 1, p. 149–153, 22 jun. 2000.

PANG, Y.-W. et al. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. n/a–n/a, nov. 2012.

PARK, E. et al. Addition of melatonin in in vitro maturation (IVM) medium increases maturation and fertilization of immature human oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 2, p. S168, 2006.

PEPLING, M. E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 44, n. 12, p. 622–32, dez. 2006.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental biology**, v. 234, n. 2, p. 339–51, 15 jun. 2001.

PEPLING, M.; SPRADLING, A. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. **Development**, v. 125, n. 17, p. 3323–3328, 1 set. 1998.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, abr. 2001.

REITER, R. J. et al. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445–456, 2009.

REITER, R. J. et al. **Peripheral reproductive organ health and melatonin: Ready for prime time.** [s.l: s.n.]. v. 14

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

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations. **Physiology**, v. 29, n. 5, p. 325–333, 2014.

RIZOS, D. et al. 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. 320–327, 2002a.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002b.

RODRIGUEZ-OSORIO, N. et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal of pineal research**, v. 43, n. 3, p. 283–8, out. 2007.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 235–244, 2005.

SAMPAIO, R. V et al. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 10, p. 103, 2012.

SHI, J. M. et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 318–323, 2009.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, abr. 2001.

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

SOLOVYEVA, E. V. Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Rat Theca-Interstitial Cell Androgen Biosynthesis. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1214–1218, 1 out. 2000.

SU, Y.-Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Seminars in reproductive medicine**, v. 27, n. 1, p. 32–42, jan. 2009.

TAKADA, L. et al. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 393–398, 2010.

TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p. 280–287, 2008.

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328–343, 2009.

TAMURA, H. et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.

TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2014.

TATEMOTO, H. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 805–810, 1 set. 2000.

TATEMOTO, H. Enhancement of Developmental Competence after In Vitro Fertilization of Porcine Oocytes by Treatment with Ascorbic Acid 2-O- β -Glucoside During In Vitro Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 6, p. 1800–1806, 1 dez. 2001.

TATEMOTO, H. et al. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1150–7, 1 out. 2004.

THOMPSON, J. G. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 341, 1 jan. 1997.

TIAN, X. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 3, p. 239–247, 2014.

TIAN, X.-Z. et al. Effects of Melatonin on In Vitro Development of Mouse Two-Cell Embryos Cultured in HTF Medium. **Endocrine Research**, v. 35, n. 1, p. 17–23, 31 jan. 2010.

TSAFRIRI, A.; MOTOLA, S. Are steroids dispensable for meiotic resumption in mammals? **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 18, n. 8, p. 321–7, out. 2007.

TSILIGIANNI, T. et al. EFFECTS OF MELATONIN TREATMENT ON FOLLICULAR DEVELOPMENT AND OOCYTE QUALITY IN CHIOS EWES - SHORT COMMUNICATION. **ACTA VETERINARIA HUNGARICA**, v. 57, n. 2, p. 331–335, 2009.

VALASI, F. et al. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 341, 2006.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–51, 1 abr. 2005.

WANG, F. et al. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 267–274, 2013.

WANG, F. et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 3, p. 333–342, 2014.

WANG, S. J. et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1517–1526, 2012.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 141–63, 1 jan. 2007.

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

XU, K. P.; GREVE, T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 127–134, 1 jan. 1988.

YANG, H. W. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 998–1002, 1998.

YI, Y. J.; PARK, C. S. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 3-4, p. 297–304, abr. 2005.

ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, p. 131–146, 2014.

ZUELKE, K. A; JONES, D. P.; PERREAULT, S. D. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1413–1419, 1997.