

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

***HUGO FERNANDES***

**A melatonina e seu efeito na retomada da  
meiose e desenvolvimento embrionário em  
bovinos**

---

Pirassununga – SP

2020

**HUGO FERNANDES**

**A melatonina e seu efeito na retomada da  
meiose e desenvolvimento embrionário em  
bovinos**

**"Versão corrigida"**

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

Área de Concentração: Teriogenologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Lima Verde Leal.

---

Pirassununga – SP

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363m      Fernandes, Hugo  
            A melatonina e seu efeito na retomada da meiose  
            e desenvolvimento embrionário em bovinos / Hugo  
            Fernandes ; orientadora Cláudia Lima Verde Leal. --  
            Pirassununga, 2020.  
            116 f.

            Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
            Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e  
            Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

            1. Melatonin. 2. Fator promotor da maturação  
            (MPF). 3. Espécies Reativas de oxigênio (EROs). 4.  
            Antioxidantes. 5. Produção in vitro. I. Leal,  
            Cláudia Lima Verde, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A melatonina e seu efeito na retomada da meiose e desenvolvimento embrionário em bovinos", protocolada sob o CEUA nº 1603160518, sob a responsabilidade de **Hugo Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 22/06/2018.

We certify that the proposal "Melatonin and its effect on meiosis resumption and embryo development in cattle ", utilizing 200 Bovines (200 females), protocol number CEUA 1603160518, under the responsibility of **Hugo Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 06/22/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2018](#) a [07/2020](#) Área: [Biotecnologia Animal](#)

Origem:	<a href="#">Animais provenientes de doação espontânea</a>		
Espécie:	<a href="#">Bovinos</a>	sexo:	<a href="#">Fêmeas</a>
		idade:	<a href="#">1 a 10 anos</a>
		N:	<a href="#">200</a>
Linhagem:	<a href="#">Mestiça</a>	Peso:	<a href="#">480 a 600 kg</a>

Resumo: A melatonina (MEL) é uma indolamina que pode atuar na competência reprodutiva, ter atividade antioxidante e antiapoptótica, assim como influenciar diferentes vias de sinalização celular. Estudos in vitro têm apontado efeitos benéficos da utilização de MEL na maturação e cultivo in vitro (CIV) de oócitos e embriões bovinos, respectivamente. Além disso, a MEL é capaz de induzir a retomada da meiose, porém o mecanismo pelo qual este estímulo ocorre ainda é desconhecido. Neste estudo, propomos investigar o envolvimento do fator promotor da maturação (MPF) e da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) na retomada da meiose estimulada pela MEL, assim como seu efeito no desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro. No experimento 1, complexos cumulus-oócito (CCOs) serão cultivados por 9 h de maturação in vitro (MIV) com MEL (10-11M, 10-9M e 10-7M) ou FSH (controle) e será avaliada a taxa de retomada da meiose. A melhor concentração (maior % de retomada da meiose) será selecionada para os experimentos seguintes. No segundo experimento, CCOs submetidos a 0, 3, 6, 9 e 12 h de MIV na presença de MEL serão avaliados quanto à presença da proteína CDK1 fosforilada (unidade catalítica do MPF) por western blotting. No experimento 3, os níveis de AMPc oocitários serão mensurados nos tempos de 0, 1, 2, 3, 6 e 9 h de MIV na presença ou ausência de MEL. No experimento 4, a MEL será suplementada ao meio de MIV por 24h em associações com gonadotrofinas: 1) FSH; 2) FSH+LH; 3) MEL; 4) FSH+MEL e 5) FSH+LH+MEL. Os oócitos serão avaliados quanto à progressão da meiose. A melhor combinação de MEL e gonadotrofinas (maior % de MII) será utilizada no experimento 5 em que CCOs maturados serão submetidos à fertilização in vitro (FIV), seguida de CIV com MEL (0, 10-11, 10-9 e 10-7M). Os embriões serão avaliados quanto à taxa de clivagem e de blastocistos, e análise da qualidade por TUNEL. No experimento 6, os embriões com melhores taxas de desenvolvimento do experimento 5 serão vitrificados, aquecidos e submetidos à CIV por até 72 h para determinar a taxa de reexpansão e eclosão embrionária.

Local do experimento: Todos os experimentos serão desenvolvidos no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga-SP.

Pirassununga, 22 de junho de 2018



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

**HUGO FERNANDES****A melatonina e seu efeito na retomada da meiose e desenvolvimento  
embrionário em bovinos**

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

Área de Concentração: Teriogenologia.

Data de aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**Banca Examinadora**

Prof.(a) Dr.(a): Cláudia Lima Verde Leal

Instituição: FZEA/USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): Juliano Rodrigues Sangalli

Instituição: FZEA/USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): Lígia Garcia Mesquita

Instituição: FMVZ/USP, Pirassununga

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): Gisele Zoccal Mingoti

Instituição: FMVA/UNESP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): Simone Cristina Méo Niciura

Instituição: Embrapa Pecuária Sudeste

Julgamento: \_\_\_\_\_

**DEDICO:**

*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 doutorado. 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. Meu muito obrigado de coração.*

*A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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.*

*A minha namorada Daniela Hipolito Maggio por sempre me apoiar, incentivar, discutir e estimular meu pensamento científico. Por me ajudar em todos os momentos que precisei, por me dar forças quando fraquejei, por ser calma em meio ao turbilhão de sentimentos que afloraram ao longo do desenvolvimento desse doutorado. Obrigado por tudo e por tanto! Devo a você essa conquista. Obrigado, obrigado e mais uma vez, obrigado.*

*A todos os companheiros de trabalho do Laboratório de Citologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Letícia Schefer, Daniela Paschoal, Fernanda Castro e Sophia Carrijo pela companhia, apoio, compreensão, auxílio e, sobretudo pelos agradáveis momentos partilhados e pela amizade concedida.*

*Aos membros integrantes do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e do Desenvolvimento (LMMD), Ramon, Naira, Gabriella, Juliano, Ana Clara, Alessandra, Aline, Maite, Cibele e Dewinson desta FZEA pelo companheirismo, amizade e aprendizado partilhados.*



*Ao grande amigo Prof Dr. Antônio Augusto Mendes Maia e aos amigos do Laboratório de Parasitologia, Carol, Tiago, Mateus e Márcia pelos bons momentos compartilhados e pelas longas conversas durante os cafezinhos pós almoço. Meu muito obrigado.*

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

*A minha família pirassununguense, Fernando (Dinho), Nídia, Larissa, Leandro, Ângela, Heraldo, Léo, Airton, Ivonete e a todos os outros amigos que fiz aqui durante esses oito anos em que vivi em Pirassununga. Também não poderia deixar de agradecer aos amigos Kássia e Eduardo Capodifoglio por me receberem tão bem, pela amizade concedida e pelos bons momentos compartilhados. Muito obrigado!*

*A Dra. Rebecca L. Krisher do Colorado Center for Reproductive Medicine - CCRM, Lone Tree, Colorado – EUA, a qual tive o prazer de trabalhar por um ano e três meses durante meu estágio no exterior. Agradeço pelos ensinamentos, pelas oportunidades, por confiar em meu trabalho e por compartilhar todo seu conhecimento científico. Agradeço também a todos os amigos, membros pertencentes ao laboratório sob sua supervisão, Sandeep, Ben, Didi, Courtney, Heidi, Kati, Rachel, Shaihla, Becca e Ye que me ajudaram muito e contribuíram tanto para meu crescimento profissional, quanto pessoal.*

*Aos amigos que fiz durante meu estágio em Denver, Guilherme, Amanda, Vine, Diego e Jardel. Muito obrigado pelos momentos inesquecíveis, tanto bons, como ruins pelo qual passamos e, pelo companheirismo. Também agradeço aos meus primos Mateus e Nádja por me receberem tão bem por duas vezes em Boston! Espero encontrar com vocês em breve.*

*Aos professores Dr. Felipe Perecin, Dr. Flávio Vieira Meirelles, Dr. Juliano da Silveira e Dr. Heidge Fukumasu e suas equipes pela colaboração e gentileza em fornecer alguns equipamentos utilizados nesta pesquisa.*

*Ao Leonardo Amaral, nosso motoboy responsável pela coleta de ovários em abatedouros, pelo comprometimento e responsabilidade diante da realização desta pesquisa*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (2016/24884-3) e estágio de pesquisa no exterior (BEPE; 2018/19852-0) e, pelo apoio financeiro (auxílio: 2019/18019-6) 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 Doutorado e disponibilização dos laboratórios.*

*"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"*

*"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"*

## RESUMO

FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito na retomada da meiose e desenvolvimento embrionário em bovinos.** 2020. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2020.

A melatonina (MLT) é uma indolamina que pode atuar na competência reprodutiva, ter atividade antioxidante e antiapoptótica, assim como influenciar diferentes vias de sinalização celular. Estudos *in vitro* têm apontado efeitos benéficos da utilização de MLT na maturação e cultivo *in vitro* (CIV) de oócitos e embriões, respectivamente. Além disso, a MLT parece ser capaz de induzir a retomada da meiose, porém, o mecanismo pelo qual este estímulo ocorre ainda é desconhecido. Neste estudo, investigamos o envolvimento do fator promotor da maturação (MPF) e da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) na retomada da meiose estimulada pela MLT, assim como seu efeito no desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. O presente trabalho foi dividido em 2 artigos. No artigo 1, com o título: “A melatonina e seu efeito na retomada da meiose em bovinos”, foram desenvolvidos os seguintes experimentos: 1) Efeito de diferentes concentrações de melatonina na retomada e progressão da meiose e abundância de transcritos nas células do cumulus; 2) Efeito da melatonina na proteína CDK1; e 3) Efeito da melatonina nos níveis de AMPc. Já no artigo 2, com o título: “Antioxidant roles of melatonin on bovine cumulus-oocyte complexes and embryos produced *in vitro*”, foram desenvolvidos os experimentos: 1) Efeito da MEL sozinha ou em combinação com gonadotrofinas durante a MIV em maturação, níveis de ROS e função mitocondrial em oócitos e transcritos de enzimas antioxidantes em células do cumulus; 2) Efeito da MLT durante a CIV no desenvolvimento e qualidade do embrião; 3) Efeitos da MLT e antioxidantes mitocondriais durante a MIV na maturação de oócitos, níveis de ROS, e função mitocondrial; 4) Efeitos da MLT e antioxidante mitocondrial durante a CIV no desenvolvimento e qualidade do embrião; e 5) Efeitos de tratamentos combinados com antioxidantes durante a MIV e CIV. Como conclusão para o artigo 1, a melatonina foi capaz de promover a retomada da meiose às 9 horas, porém não foi capaz de promover sua progressão até o estágio de MII avaliado às 24 horas de maturação *in vitro*. A proteína CDK1 e os níveis de AMPc tiveram perfis similares nos grupos tratados com FSH em relação a MLT, sugerindo que a MLT poderia contribuir para a

retomada da meiose atuando sobre a sinalização dependente do MPF e AMPc. No artigo 2, a melatonina não foi capaz de melhorar a maturação, o desenvolvimento e a qualidade oocitária de embriões bovinos produzidos *in vitro* quando comparada aos antioxidantes MQ e MT.

**Palavras-Chave:** N-acetil 5-metoxitriptamina; CDK1; AMPc; Mitoquinol; MitoTEMPO; *Bos taurus*.

## ABSTRACT

FERNANDES, H. **Melatonin and its effect on meiosis resumption and embryo development in cattle.** 2020. 144 f. Thesis (PhD) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2020.

Melatonin (MLT) is an indoleamine that can act on reproductive competence, has antioxidant and antiapoptotic activities and influences different cell signaling pathways. *In vitro* studies have shown beneficial effects of MLT use on *in vitro* maturation (IVM) and culture (IVC) of oocytes and embryos, respectively. In addition, MLT appears to be able to induce the resumption of meiosis, but the mechanism by which this stimulus occurs is still unknown. In this study, we investigated the involvement of maturation promoting factor (MPF) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in meiosis resumption stimulated by MLT, as well as its effect on the development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. The present study was divided into two articles. In the first article, entitled: "Melatonin and its effects on meiosis resumption", were developed the experiments: 1) The effect of different melatonin concentration on resumption and progress of meiosis and transcripts abundance in the cumulus cells; 2) Effect of melatonin on CDK1 protein; and 3) Effect of melatonin on the levels of cAMP. In the second article, entitled: "Antioxidant roles of melatonin on bovine cumulus-oocyte complexes and embryos produced *in vitro*", were developed the experiments: 1) Effect of MLT alone or in combination with gonadotrophins during IVM on maturation, ROS levels and mitochondrial function in oocytes and antioxidant enzymes transcripts in cumulus cells; 2) Effect of MLT during IVC on embryo development and quality; 3) Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVM on oocyte maturation, ROS levels, and mitochondrial function; 4) Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVC on embryo development and quality; and 5) Effects of combined treatment with antioxidants during IVM and IVC. For the first article, melatonin was able to promote the meiosis resumption at 9h, but did not influenced its progression in the stage of MII evaluated at 24h of *in vitro* maturation. The CDK1 protein and cAMP levels had similar profiles to those treated with FSH in relation to MLT, suggesting that MLT could contribute to the meiosis resumption by acting on MPF and cAMP-dependent signaling. For the second article, we concluded

that MLT failed to improve the oocyte maturation, development and quality of bovine *in vitro* produced embryos when compared with MQ and MT antioxidants.

**Keywords:** N-acetil 5-metoxitriptamina; CDK1; AMPc; Mitoquinol; MitoTEMPO; *Bos taurus*.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	2
1.1	<i>Ovário</i> .....	2
1.2	<i>Desenvolvimento folicular e aspectos morfológicos</i> .....	2
1.3	<i>Maturação e competência oocitária</i> .....	5
1.4	<i>Sistemas de cultivo in vitro</i> .....	9
1.4.1	<i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio</i> .....	10
1.5	<i>A melatonina</i> .....	11
1.6	REFERÊNCIAS .....	17
2.	ARTIGO 1 .....	37
2.1	RESUMO.....	37
2.2	ABSTRACT .....	38
2.3	INTRODUÇÃO.....	39
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.4.1	<i>Local de execução do projeto</i> .....	41
2.4.2	<i>Experimentos</i> .....	42
	Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de melatonina na retomada e progressão da meiose e abundância de transcritos nas células do cumulus .....	42
	Experimento 2: Efeito da melatonina na proteína CDK1 .....	42
	Experimento 3: Efeito da melatonina nos níveis de AMPc.....	42
2.4.3	<i>Obtenção dos ovários e complexos cumulus-oócito</i> .....	43
2.4.4	<i>Maturação in vitro</i> .....	43
2.4.5	<i>Avaliação da Meiose (retomada e progressão)</i> .....	44
2.4.6	<i>Deteção da proteína CDK1 por western blotting</i> .....	44
2.4.7	<i>Mensuração dos níveis de AMPc</i> .....	45
2.4.8	<i>Coleta das células do cumulus</i> .....	45
2.4.9	<i>Extração do RNA total pelo método de TRIzol®</i> .....	46
2.4.10	<i>Digestão com DNase I e transcrição reversa (RT)</i> .....	46
2.4.11	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT)</i> .....	47
2.4.12	<i>Análises dos dados</i> .....	49
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.5.1	<i>Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de melatonina na retomada e progressão da meiose e abundância de transcritos nas células do cumulus</i> .....	50
2.5.2	<i>Experimento 2: Efeito da melatonina na proteína CDK1</i> .....	57
2.5.3	<i>Experimento 3: Efeito da melatonina nos níveis de AMPc</i> .....	61
2.6	CONCLUSÕES .....	62
2.7	REFERÊNCIAS .....	62
3.	ARTIGO 2.....	82
3.1	ABSTRACT .....	82
3.2	INTRODUCTION .....	83
3.3	MATERIAL AND METHODS.....	85

3.3.1 Experiments .....	85
Experiment 1: Effect of MLT in combination with gonadotrophins during IVM on maturation, ROS levels and mitochondrial function in oocytes and antioxidant enzymes transcripts in cumulus cells.....	85
Experiment 2: Effect of MLT during IVC on embryo development and quality.....	85
Experiment 3: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVM on oocyte maturation, ROS levels, and mitochondrial function .....	86
Experiment 4: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVC on embryo development and quality.....	86
Experiment 5: Effects of MQ+MT treatment during IVM and IVC .....	86
3.3.2 Oocyte collection .....	86
3.3.3 In vitro maturation .....	87
3.3.4 Assessment of oocyte nuclear maturation .....	87
3.3.5 In vitro fertilization and embryo culture .....	87
3.3.6 Detection of ROS levels in oocytes .....	88
3.3.7 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number.....	88
3.3.8 Mitochondrial membrane potential (MMP) .....	89
3.3.9 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) .....	89
3.3.10. Differential staining of embryo cells (ICM/TE) .....	90
3.3.11 Statistical analysis .....	91
3.4. RESULTS.....	91
3.4.1 Experiment 1: Effect of MLT in combination with gonadotropins during IVM on maturation, ROS levels and mitochondrial function in oocytes and antioxidant enzymes transcripts in oocytes and cumulus cells .....	91
3.4.2. Experiment 2: Effect of MLT during IVC on embryo development and quality.....	96
3.4.3. Experiment 3: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVM on oocyte maturation, ROS levels, and mitochondrial function.....	99
3.4.4. Experiment 4: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVC on embryo development and quality.....	103
3.4.5. Experiment 5: Effects of MQ+MT treatment during IVM and IVC .....	107
3.5. DISCUSSION.....	109
3.6. CONCLUSION .....	111
3.7. REFERENCES .....	112



# Introdução

---

## **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Ovário**

Em mamíferos, durante o desenvolvimento fetal, os ovários em formação são povoados pelas células germinativas primordiais (PGCs), de origem extragonadal, que migram do saco vitelino mesentérico até as cristas genitais. Resumidamente, o processo de formação do oócito inclui sete etapas: 1) geração das PGCs; 2) migração das PGCs para as cristas genitais (futuras gônadas); 3) colonização das gônadas pelas PGCs; 4) diferenciação das PGCs em oogônias (múltiplas divisões mitóticas); 5) proliferação das oogônias; 6) início da meiose e 7) bloqueio no estágio de diplóteno da prófase I da meiose, morfologicamente denominado como vesícula germinativa (HAFEZ; HAFEZ, 2004; PEPLING, 2006; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Em bovinos, cerca de 95% dos oócitos formados durante o desenvolvimento intrauterino sofrem atresia até o momento do nascimento, restando aproximadamente 135000 oócitos que só irão retomar o desenvolvimento quando a fêmea atingir a puberdade, o que ocorre entre o primeiro e segundo ano de vida do animal (PEREIRA et al., 2017; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Ao se desenvolver, o ovário passa a ser envolto mais externamente por um epitélio superficial, 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.

### **1.2 Desenvolvimento folicular e aspectos morfológicos**

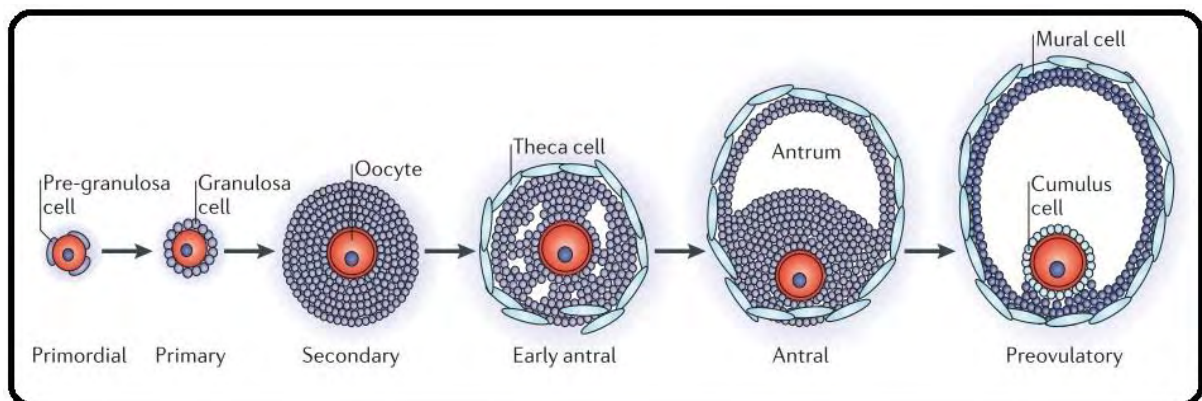
O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas e uma lâmina basal, que delimita o folículo e o estroma ovariano adjacente. Sua classificação é dada de

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, passando a antral e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (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.

**Figura 1. Estágios do desenvolvimento folicular em mamíferos.** (Fonte: LI, 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 cuboides das mesmas (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  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 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 de crescimento como BMP4 e BMP7 (DRUMMOND, 2005). As junções comunicantes, existentes entre as células da granulosa e o oócito, facilitam a comunicação bidirecional e permitem a transferência de nutrientes e metabólitos. Como ainda não expressam os receptores de FSH e LH, 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 glicoproteica 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, esteroides e fatores de crescimento proteicos, além de fatores indefinidos, 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; HENNET; COMBELLES, 2012). 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 do folículo dominante, quando alcançado na fase de estro, é caracterizado por altos picos de secreção de LH pela hipófise, em resposta ao estrógeno folicular, garantindo ao 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 *oophorous* (DUGGAVATHI; MURPHY, 2009). No oócito, ocorre a progressão da meiose I, iniciada e bloqueada ainda durante a vida intra-uterina, e expulsão do primeiro corpúsculo polar (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 bovinos, o processo total de crescimento folicular, desde o estágio primordial até folículo ovulatório, compreende cerca de 80 a 100 dias (BRITT, 1992). Além disso, o ciclo estral nesta espécie tem duração de 21 dias e, geralmente somente um oócito é ovulado em condições normais (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

### **1.3 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, 2004). 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.

A maturação nuclear consiste na progressão do ciclo meiótico, desde vesícula germinativa (VG; prófase da meiose I), passando pela metáfase I (MI) e 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 haploide), 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 fertilização (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 VG para MII. Os microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto presentes no citoplasma promovem esta remodelação estrutural e agem sobre a segregação cromossômica. Alguns autores consideram ainda de forma separada da maturação citoplasmática a chamada maturação molecular, que se coordena uma série de eventos específicos intrínsecos ao processo de maturação. Ela consiste no processo de transcrição, armazenamento e processamento de RNAm maternos, 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, fertilização e subsequente ativação oocitária e início do desenvolvimento embrionário (ROTH; HANSEN, 2005). Em

bovinos, a transcrição gênica do oócito cessa antes da ovulação e, por isso, o desenvolvimento embrionário inicial é dependente do acúmulo de RNAs e proteínas sintetizados durante o processo de maturação e capacitação oocitária. Somente a partir de 16 blastômeros, o genoma embrionário bovino é ativado e o embrião passa a processar seus próprios transcritos (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; LONERGAN et al., 2002, 2003).

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 fertilização e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (LI; ALBERTINI, 2013; XU; GREVE, 1988).

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 intraocitários de adenosina monofosfatocíclica (AMPc) (COTICCHIO et al., 2015).

O AMPc é sintetizado a partir do trifosfato de adenosina (ATP) pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC) (HORNER et al., 2003) e provém principalmente das células da granulosa e do cumulus adjacentes, sendo transportado pelas junções comunicantes até o interior do oócito (GILCHRIST et al., 2016). Altos níveis intraocitários de AMPc ativam a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), que por sua vez, inibe a ativação do MPF (fator promotor da maturação), mantendo o oócito em bloqueio meiótico (CONTI et al., 2012).

O monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) também está relacionado ao controle do bloqueio meiótico via inibição de fosfodiesterases (PDE3A) presentes no oócitos, e que são responsáveis por hidrolizar o AMPc (NORRIS et al., 2009; VACCARI et al., 2009).

A retomada da meiose é ativada em resposta a uma onda ovulatória de LH (DUMONT et al., 2005) e que leva a uma queda dos níveis foliculares de GMPc (SHUHAIBAR et al., 2015). Conseqüentemente, é provável que a concentração de AMPc intraocitária diminua devido a interrupção da ação inibitória do GMPc sobre a PDE3A no oócito (GILCHRIST et al., 2016; NORRIS et al., 2009; VACCARI et al., 2009). Além disso, a queda nos níveis de AMPc causa a inativação da PKA e ativação

do MPF (ADHIKARI et al., 2012; ADHIKARI; LIU, 2014; EPPIG et al., 2004; JONES, 2004).

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

O MPF é um heterodímero das proteínas serina-treonina cinases composto por uma subunidade catalítica, a cinase dependente de ciclina1 (CDK1 ou p34<sup>cdc2</sup>), e outra subunidade regulatória, a ciclina B1. Na forma ativa do MPF, há a fosforilação da treonina 14 (T14) e tirosina 15 (Y15) e desfosforilação da treonina 161 (T161) do CDK1, e sua associação com a ciclina B1, enquanto que a desfosforilação da T14 e Y15 e fosforilação da T161 mantém o bloqueio meiótico (MPF inativo). Além disso, uma mudança no nível de ciclina B1 por sua síntese e degradação é de fundamental importância para a atividade do MPF (GUPTA et al., 2016; OH et al., 2013; PRASAD et al., 2015; TIWARI et al., 2018; TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010).

A atividade do MPF apresenta variações ao longo da MIV de oócitos bovinos, sendo baixa nos oócitos em VG e aumentada após o rompimento do envelope nuclear. Entre as 9 e 12 horas de MIV, o MPF apresenta seu primeiro pico de atividade em MI, seguido de declínio durante a progressão de MI para MII, sendo reativado ao final das 24h de MIV (KUBELKA et al., 2000; QUETGLAS et al., 2010).

A retomada meiótica pela ativação do MPF (CDK1) induz a condensação da cromatina e ruptura da vesícula germinativa (MEHLMANN, 2005; PANDEY et al., 2010), o ciclo celular progride até o estágio de MII com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, tornando o oócito apto à fertilização (KUBIAK et al., 2008; TIWARI; CHAUBE, 2016; TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010).

As MAPKs, proteínas da família serina/treonina cinases, também denominadas de ERK (cinases reguladas por sinal extracelular) são importantes na transdução de sinais extracelulares para respostas celulares. As vias da MAPK envolvem uma série de fosforilações das cascatas de proteínas cinases que desempenham um papel crítico na regulação da proliferação celular, atuando em diversos substratos incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (KUBELKA et al., 2000; ZHANG; LIU, 2002). Em oócitos de mamíferos, duas isoformas da MAPKs estão presentes, a



ERK1 (p44) e ERK2 (p42), sendo esta última a mais abundantemente expressa em oócitos bovinos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Durante a maturação do oócito, a atividade da MAPK é necessária para a manutenção da atividade do MPF, formação do fuso e manutenção do bloqueio em MII (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em oócitos bovinos, a ativação da MAPK ocorre com a proximidade do rompimento da VG, apresentando um aumento gradual até 12h de maturação e se mantém estável ou com leve declínio até o seu final (KUBELKA et al., 2000; QUETGLAS et al., 2010). Isso sugere que a MAPK é essencial em eventos pós-rompimento da VG e não para retomada da meiose (LEFEBVRE et al., 2002).

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. Neste processo, as células secretam ácido hialurônico para formar uma matriz extracelular muco-elástica com proteínas derivadas do soro e do folículo (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

A expansão do 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). Como exemplos, temos os genes *AREG*, *BTC*, *EREG*, *ADAMTS1*, *HAS2*, *PTGS2*, *PTX3* e *TNFAIP6*, relacionados a expansão da células do cumulus (BLAHA et al., 2015; PROCHAZKA et al., 2011), tendo correlação direta com o nível de maturação e competência oocitária (LI et al., 2015).

#### **1.4 Sistemas de cultivo *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 fertilização 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, 2004).

Embriões viáveis podem ser obtidos a partir de uma ampla gama de estados fisiológicos e endócrinos das doadoras, desde que o meio e as condições de cultivo sejam apropriados para manter os padrões essenciais do metabolismo, crescimento e expressão molecular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). No entanto, somente 30 a 40% dos oócitos maturados *in vitro* desenvolvem-se até o estágio de blastocisto e a qualidade desses embriões é inferior aos produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002a, 2002b).

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).

#### **1.4.1 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio**

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 (ROS). 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 ROS neste sistema (TATEMOTO et al., 2004). A geração de ROS é um fenômeno causador de estresse oxidativo e que, conseqüentemente, 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).

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-oócito tiveram aumento significativo nas concentrações do antioxidante glutaciona peroxidase (GPX) intracelular, enquanto que o conteúdo de GPX de oócitos desnudos foi acentuadamente diminuído, e a exposição destes últimos à ROS 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).

ROS 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 ROS pelo sequestro de seu excedente, promovendo um equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) 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-carotenoides, entre outros (AGARWAL et al., 2012).

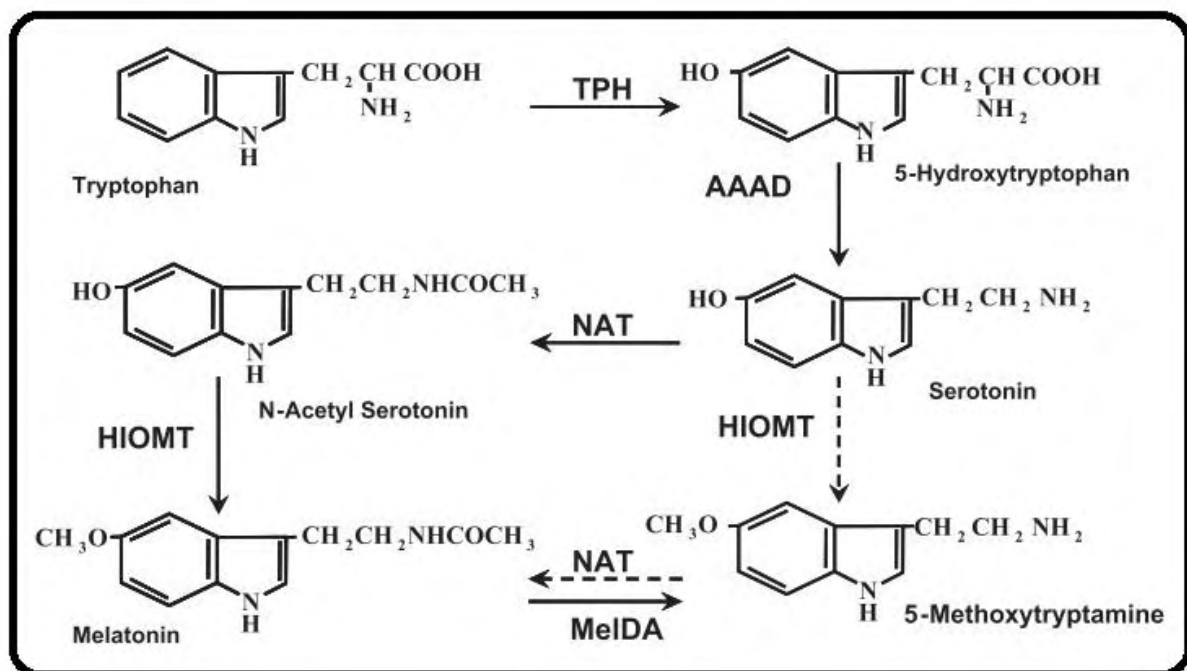
### **1.5 A melatonina**

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina; MLT) 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 e colaboradores (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 MLT (HASTINGS; MAYWOOD; REDDY, 2008). Uma das principais funções do ritmo de secreção de MLT 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 (ARENDDT, 1998; REVEL et al., 2009).

A síntese de MLT (figura 2) se inicia a partir do aminoácido triptofano, o qual é convertido inicialmente em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofanhidroxilase (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 MLT (revisado por Tan et al., 2012).

**Figura 2. Vias de biossíntese clássicas de MLT em vertebrados.** TPH, triptofanhidroxilase; AAAD, descarboxilase de aminoácidos aromáticos; NAT, aril-alquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferase; MeIDA, melatonina deacetilase; a linha tracejada representa uma via de menor importância de biossíntese de MLT (Fonte: Tan et al., 2012).



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

Assim, não somente os pinealócitos, localizados na glândula pineal, são responsáveis pela biossíntese de MLT, 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 MLT (REITER et al., 2013b), mas o ritmo noturno de MLT no sangue é, quase que exclusivamente, devido à sua secreção pela glândula pineal (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

As funções da MLT 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 esteroideogênica gonadal (WEBLEY; LUCK, 1986; WOO et al., 2001).

Com uma infinidade de ações nas células, a MLT pode agir de forma indireta, através de receptores de membrana, ou de forma direta, independente de receptores (REITER et al., 2007). Os receptores de MLT,  $MT_1$  e  $MT_2$ , pertencem à família dos receptores acoplados à 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  $MT_1$ , e inibição de liberação de dopamina pela retina para  $MT_2$  (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). Além disso, um terceiro receptor de MLT denominado de  $MT_3$ , pertencente a um grupo de redutases, está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo. A expressão do RNAm e/ou proteínas dos receptores  $MT_1$  e  $MT_2$  foram identificados em tecidos reprodutivos em humanos (WOO et al., 2001), bovinos

(SAMPAIO et al., 2012; WANG et al., 2014a, 2012) e camundongos (HE et al., 2015; SOARES et al., 2003).

A capacidade deste hormônio em modular diferentes funções fisiológicas, não depende somente dos níveis (concentrações) internos circulantes de MLT, mas também da ativação e expressão adequada de seus receptores. A expressão do receptor  $MT_1$  foi reportada como reduzida em ovários de ratas após o nascimento (LEE et al., 2001), e significativamente superior no tecido ovariano durante o proestro quando comparadas com ratas no metaestro (SOARES et al., 2003). Isso demonstra que a MLT pode desempenhar um importante papel na foliculogênese, ovulação e regulação do ciclo estral.

A MLT é um poderoso agente antioxidante e antiapoptótico, devido à sua ação de eliminação direta de derivados de oxigênio tóxicos e à sua capacidade de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio 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, definido como um desequilíbrio entre espécies oxidantes celulares, tais como ROS e antioxidantes, e tem efeito tóxico direto nas células, o que acarreta em peroxidação lipídica, oxidação proteica e dano ao DNA (TAMURA et al., 2014).

Em contraste a outros antioxidantes que são de natureza hidrofílica ou lipofílica, a MLT 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., 2013a).

Como um antioxidante, a MLT 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 MLT que são formados quando esta indolamina funciona como sequestrante de radicais livres, também são antioxidantes eficazes, podendo ser inclusive mais eficientes que a própria MLT na desintoxicação de derivados de oxigênio prejudiciais (GALANO; TAN; REITER, 2013). Assim, a MLT 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 MLT 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 MLT 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 MLT é capaz de aumentar a atividade da GPX 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 enzimática da SOD e GPX em outras espécies (TAMURA et al., 2009).

Na fisiologia reprodutiva, a MLT também desempenha importante papel na regulação das funções ovarianas (REITER et al., 2013a, 2009), 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 MLT 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 MLT 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 MLT 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, do cumulus (AMIREAULT; DUBÉ, 2005; EL-RAEY et al., 2011) e o oócito (SAKAGUCHI et al., 2013).

Devido ao incremento nos dados relativos a outros papéis da MLT, 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 MLT também melhorou a qualidade dos oócitos e, conseqüentemente, as taxas de fertilização e de gestação, principalmente por seu efeito antioxidante (TAMURA et al., 2008).

Em estudos de cultivo *in vitro*, a MLT 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; TAMURA et al., 2008; WANG et al., 2013a), bovinos (PANG et al., 2018b; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014a, 2017; ZHAO et al., 2018), 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 MLT no meio de maturação reduz ROS (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 MLT ( $10^{-10}$ M) aumentaram sua eficiência na reconstrução de embriões suínos clonados. Além disso, os embriões clonados incubados com MLT 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 MLT ( $10^{-9}$  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).

Estudos recentes demonstraram que oócitos bovinos maturados com MLT ( $10^{-9}$ M) obtiveram melhora na taxa de maturação nuclear e citoplasmática, e que os efeitos benéficos afetam a capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário (PANG et al., 2018b; YANG et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Além disso, a MLT ( $3 \times 10^{-11}$ M) foi capaz de promover a secreção de progesterona e estradiol em CCOs e melhorou o desenvolvimento embrionário de partenotos bovinos (WANG et al., 2017).

A MIV de oócitos com ou sem MLT, porém vitrificados na presença da mesma, tiveram uma maior capacidade de se desenvolver após ativação partenogenética em bovinos (ZHAO et al., 2016). Da mesma forma, blastocistos de CIV com adição de MLT foram mais criotolerantes, com aumento da taxa de eclosão e queda na mortalidade após descongelamento (WANG et al., 2014b).

Em todos os casos anteriormente citados, a MLT nunca foi estudada sozinha durante a PIV, pois tanto a MIV, quanto a CIV, continham pelo menos um hormônio gonadotrófico (FSH e/ou LH) além de soro fetal bovino. Tal associação tende a



mascarar o provável efeito da MLT, visto que o soro contém inúmeros componentes indefinidos, incluindo a própria MLT (COELHO et al., 2013; TIAN et al., 2014).

Visando investigar o real efeito da MLT, estudos anteriores observaram que a MLT suplementada ao meio de MIV foi capaz de induzir a retomada da meiose de oócitos bovinos cultivados em meio definido sem outros hormônios ou presença de soro no meio de cultivo, bem como promoveu o desenvolvimento embrionário *in vitro* em níveis similares aos de oócitos maturados em meio completo com soro, gonadotrofinas e estradiol (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). Além disso, o estímulo à meiose sem a presença de gonadotrofinas e soro também foi observado em oócitos murinos (FERNANDES, 2015) e suínos (CRUZ, 2016). No entanto, o mecanismo pelo qual a MLT poderia ser capaz de induzir a retomada da meiose ainda não foi esclarecido.

Apesar de incógnita, a atuação da MLT no estímulo à meiose poderia estar relacionada a uma possível ação desta indolamina sobre a via do MPF. Em oócitos de carpas, há relatos de que a MLT levou à formação dos componentes do MPF (CDK1 e ciclina B) que estão envolvidos no controle da meiose, tanto *in vitro* (CHATTORAJ et al., 2005; MAITRA; CHATTORAJ; BHATTACHARYYA, 2005), quanto *in vivo* (MONIRUZZAMAN; HASAN; MAITRA, 2016). Em mamíferos, a MLT foi capaz de inibir o acúmulo de AMPc nas células da granulosa de ratas em proestro (SOARES et al., 2003), sugerindo que sua influência na retomada da meiose poderia atuar nesta via, visto que é o AMPc elevado que mantém a PKA ativa, o que por sua vez impede a ativação do MPF. Contudo, novos estudos são necessários para investigar tal hipótese em mamíferos.

No cenário atual, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar as condições de produção embrionária. Apesar da ampla utilização da MLT em várias destas etapas de produção *in vitro*, entender como e por qual via de ação seu efeito benéfico atua sobre a maturação dos oócitos e subsquente desenvolvimento embrionário seria de grande interesse.

## 1.6 REFERÊNCIAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZÚÑIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 151–158, 2002.

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 2014.
- ADHIKARI, D. et al. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 11, p. 2476–2484, 1 jun. 2012.
- ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 480–487, jan. 2014.
- ADRIAENS, I. et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2–3, p. 333–343, dez. 2006.
- 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.
- AMIREAULT, P.; DUBÉ, F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 358–365, 2005.
- ANWAR, M. J. et al. An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, maio 2015.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of reproduction**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 1998.
- BABURINA, Y. et al. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a messenger of protection of the mitochondrial function during melatonin treatment in aging. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 94–103, 2017.
- 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.
- BAKHTARI, A.; ROSS, P. J. DPPA3 prevents cytosine hydroxymethylation of the maternal pronucleus and is required for normal development in bovine embryos.

**Epigenetics**, v. 9, n. 9, p. 1271–1279, 2014.

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.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693–701, 2007.

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.

BLAHA, M. et al. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated *in vitro* with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 113, 6 dez. 2015.

BOMFIM, M. M. et al. Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts.

**Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 12, p. 1296–1305, 2017.

BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, abr. 2001.

BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Am. Assoc. Bovine Pract.**, n. January 1992, p. 39–43, 1992.

CAIXETA, E. S. et al. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during *in vitro* maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 6, p. 890–899, 2013.

CALDER, M. et al. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 1077–1085, abr. 2005.

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.; SEMIZ, 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.

CAVALLARI, F. D. C. et al. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 180–186, 7 jun. 2019.

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.

CHEN, Y.-C. et al. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380–401, 6 jan. 2013.

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.

COELHO, L. A. et al. Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus-oocyte complex: changes after pinealectomy. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 490–499, 2015.

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.
- CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, jun. 2012.
- 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. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro***. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.
- DEGHANI-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.
- DORÉE, M.; HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 12, p. 2461–2464, 2002.
- 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.
- DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.
- 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-RAEY, M. et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 4, p. 250–262, 2011.
- ELVIN, J. A. et al. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. **Molecular Endocrinology**, 2 jul. 1999.
- 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. et al. **Regulation of mammalian oocyte maturation**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2004.
- 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.
- FARAHAVAR, A. et al. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 17, p. 2579–2583, 2010.
- FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação de oócitos murinos**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2015.
- 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.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.
- 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.
- FUSHII, M.; YAMADA, R.; MIYANO, T. *In vitro* growth of bovine oocytes in oocyte-

- cumulus cell complexes and the effect of follicle stimulating hormone on the growth of oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, 2020.
- GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245–257, 2013.
- 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.
- GILCHRIST, R. B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R143–R157, nov. 2016.
- 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.
- GUPTA, A. et al. Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases During Meiotic Resumption From Diplotene Arrest in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 7, n. September, p. 1–7, set. 2016.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Baureri, SP: Manole, 2004.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, mar. 2011.
- 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.
- HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; REDDY, A. B. Two decades of circadian time. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 812–9, jun. 2008.
- 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.
- HE, C. et al. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under *in vitro* conditions. **International Journal of**

**Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–16, 2016.

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.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.

HORNER, K. et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v. 258, n. 2, p. 385–396, 2003.

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.

IBRAHIM, A. A. et al. MitoQ ameliorates testicular damage induced by gamma irradiation in rats: Modulation of mitochondrial apoptosis and steroidogenesis. **Life Sciences**, v. 232, n. July, p. 116655, 2019.

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.

ITOH, M. T. et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 7–13, 1998.

ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 402–408, 1999.

IWATA, H. et al. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 424–432, 2011.

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.

JOU, M. J. et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389–403, 2007.

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. Ivm, 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.
- KOMNINO, E. R. et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.
- KOTLER, M. et al. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **Journal of pineal research**, v. 24, n. 2, p. 83–89, 1998.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13\_suppl, p. E14–E23, 10 out. 2004.
- KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292–302, 1 fev. 2000.
- KUBIAK, J. Z. et al. On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 2–3, p. 201–217, 2008.
- LEE, C. J. et al. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 2, p. 126–132, 2001.
- LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **The Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 4, p. 603–613, 13 maio 2002.
- LEÓN, J. et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 1, p. 1–9, 2005.
- LERNER, A. B. et al. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587–2587, maio 1958.
- LERNER, A. B.; CASE, J. D.; HEINZELMAN, R. V. STRUCTURE OF MELATONIN 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 22, p. 6084–6085, nov. 1959.
- 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.
- LI, S. H. et al. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2015.

- LIANG, S. et al. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1821, 26 out. 2016.
- 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.
- LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 369–378, mar. 2003.
- 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>>
- MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 6 jan. 2013.
- 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.
- 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.
- MARQUES, T. C. et al. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. n. August 2016, p. 226–236, 2018.
- MASCIARELLI, S.; HORNER, K.; LIU, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 196–205, 2004.
- MAURIZ, J. L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of pineal research**, v. 54, n. 1, p. 1–14, jan. 2013.
- 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.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791–799, 2005.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. **Journal of Pineal Research**, v. 15, n. 2, p. 59–69, 1993.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; RAGGI, M. A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 21–28, ago. 2012.

MONIRUZZAMAN, M.; HASAN, K. N.; MAITRA, S. K. Melatonin actions on ovaprim (synthetic GnRH and domperidone)-induced oocyte maturation in carp. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 285–296, 2016.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in sertoli cells. **Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 133–145, 2000.

NAKAMURA, Y. et al. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 1012–1016, 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.

NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869–1878, 1 jun. 2009.

O'MALLEY, Y. et al. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39766–39775, 2006.

OH, J. S. et al. Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 5, p. 1081–5, 2013.

PANDEY, A. N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular**

- biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521–8, 15 out. 2010.
- PANDEY, A. N.; CHAUBE, S. K. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured *in vitro*.
- Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 240, n. 1, p. 15–25, 2015.
- 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.
- PANG, Y. et al. Beneficial role of melatonin in protecting mammalian gametes and embryos from oxidative damage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2320–2335, 2018a.
- PANG, Y. et al. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 4, p. 648–660, abr. 2018b.
- 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.
- PARK, H. J. et al. Melatonin improves oocyte maturation and mitochondrial functions by reducing bisphenol a-derived superoxide in porcine oocytes *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.
- PASQUARIELLO, R. et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 4, p. 971–981, 2019.
- 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.
- PEREIRA, G. R. et al. Relationship of post-weaning growth and age at puberty in crossbred beef heifers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 413–420, maio 2017.
- PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v. 33, n. 14–26, p. 1–13, 2015.
- PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, abr. 2001.
- PRASAD, S. et al. Changes in signal molecules and maturation promoting factor levels associate with spontaneous resumption of meiosis in rat oocytes. **Cell Biology**

**International**, v. 39, n. 6, p. 759–769, 2015.

PROCHAZKA, R. et al. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 425–435, 1 abr. 2011.

QUETGLAS, M. D. et al. Effect of Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibition on Expression, Localization and Activity of Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) in Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 1074–1081, 2010.

REIS, A. et al. APC<sup>c</sup>dh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. **Nat Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 539–540, 2006.

REITER, R. et al. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7231–7272, 2 abr. 2013a.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654–664, ago. 1993.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 444–458, nov. 2000.

REITER, R. J. et al. **Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions.** **Advances in medical sciences**, 2007. Disponible em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-39749108884&partnerID=tZOtx3y1>>

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. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: The requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 269–274, 2011.

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. et al. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 321–8, ago. 2014.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking

- molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127–51, jan. 2010.
- REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70–81, 2016.
- REVEL, F. G. et al. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. **Neuroendocrinology**, v. 90, n. 1, p. 1–14, 2009.
- 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, 2002a.
- 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, 2002b.
- ROBERT, C. et al. Quantification of Cyclin B1 and p34 cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biology of reproduction**, v. 67, p. 1456–1464, 2002.
- RODRIGUES-CUNHA, M. C. et al. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1685–1694, out. 2016.
- 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.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–86, 2000.
- SAKAGUCHI, K. et al. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 674–82, 17 jan. 2013.
- 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**, v. 10, n. 1, p. 103, 2012.
- SANTIQUET, N. W. et al. Transporting cumulus complexes using novel meiotic arresting conditions permits maintenance of oocyte developmental competence. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 8, p. 1079–1086, 2017.

- 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.
- SHUHAIBAR, L. C. et al. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5527–5532, 28 abr. 2015.
- SILVA, E. et al. Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 6, p. 975–983, 2015.
- 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.
- 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, ago. 2010.
- TAKADA, L. et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 124–127, 2012.
- TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 2012.
- TAMURA, H. et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 135–141, nov. 1998.
- 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. Melatonin and female reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2014.

TAN, D.-X. et al. Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 2, p. 113–121, set. 2012.

TAN, D. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

TAN, D.; CHEN, L.; POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr j**, 1993.

TAN, D. X. et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 607–623, 2010.

TAN, D. X. et al. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 2, p. 127–138, 2013.

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. 341–354, 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.

TIWARI, M. et al. Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian



- Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 123–129, jan. 2018.
- TIWARI, M.; CHAUBE, S. K. Moderate increase of reactive oxygen species triggers meiotic resumption in rat follicular oocytes. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 42, n. 5, p. 536–546, 2016.
- TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, jun. 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.
- TSANTARLIOTOU, M. P. et al. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 1s, p. 488–489, 3 abr. 2007.
- VACCARI, S. et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 595–604, 1 set. 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.
- VENEGAS, C. et al. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 217–227, 2012.
- 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, 2014a.
- WANG, F. et al. Melatonin Improves the Quality of *In vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93641, 2 abr. 2014b.
- WANG, S. et al. The effects of melatonin on bovine uniparental embryos development *in vitro* and the hormone secretion of COCs. **PeerJ**, v. 2017, n. 7, p. 1–

23, 2017.

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.

WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, n. 2, p. 711–717, 1986.

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.

WOO, M. M. M. et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789–4797, 2001.

WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. SUPPL.1, p. 38–43, set. 2013.

WUNSCH, A.; SONNTAG, B.; SIMONI, M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. **Annales d'Endocrinologie**, v. 68, n. 2–3, p. 160–166, jun. 2007.

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, M. et al. Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 27 nov. 2017.

YANG, S. G. et al. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

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.

YUAN, Y.; WHEELER, M. B.; KRISHER, R. L. Disrupted Redox Homeostasis and

- Aberrant Redox Gene Expression in Porcine Oocytes Contribute to Decreased Developmental Competence1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–10, 2012.
- ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, p. 131–146, 2014.
- ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 1 mar. 2002.
- ZHAO, X.-M. et al. Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 23, n. 04, p. 525–536, 29 ago. 2015.
- ZHAO, X.-M. et al. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. e12445, jan. 2018.
- ZHAO, X. M. et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 2, p. 132–141, 2016.
- ZHAO, Y. et al. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 1, p. 79–88, ago. 2013.

# Artigo 1

---

## 2. ARTIGO 1

### A melatonina e seu efeito na retomada da meiose em bovinos

Fernandes, H.<sup>1</sup>; Schefer, L.<sup>1</sup>; Paschoal, D.M.<sup>1</sup>; Castro, F.C.<sup>1</sup>; Leal, C.L.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of Sao Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

#### 2.1 RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar o envolvimento do componente CDK1 do fator promotor da maturação (MPF) e da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) na retomada da meiose estimulada pela MLT. No experimento 1, complexos cumulus-oócito (CCOs) foram maturados por 9 ou 24 h com MLT ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$ M) ou FSH (controle) e tiveram a taxa de retomada (9 h) e progressão da meiose (24 h) avaliadas, além da abundância de transcritos para *GPX4*, *SOD1*, *SOD2*, *HAS1*, *HAS2*, *PTX3* e *FSHR* nas células do cumulus. No segundo experimento, CCOs submetidos a 0, 6, 9 e 12 h de MIV na presença de MLT ( $10^{-9}$ M) ou FSH foram avaliados quanto à presença da proteína CDK1 total (unidade catalítica do MPF) por western blotting. No experimento 3, os níveis de AMPc oocitários foram mensurados nos tempos de 0, 1, 2, 3, 6 e 9 h de MIV na presença de MLT ou FSH. Como resultado, no experimento 1, a MLT ( $10^{-9}$ M;  $32,6 \pm 6,6\%$  MI) e FSH ( $33,9 \pm 9,0\%$  MI;  $P > 0,05$ ), foram superiores para a retomada da meiose quando comparadas ao controle negativo (sem tratamento; CN;  $4,2 \pm 2,4\%$  MI,  $P < 0,05$ ) após 9h de MIV. Já às 24h, a progressão da meiose foi superior para o grupo tratado com FSH ( $P < 0,05$ ) quando comparado a todos os outros grupos tratados com MLT. Houve um aumento dos transcritos para o grupo tratado com FSH para os genes *GPX4*, *SOD2*, *HAS1*, *HAS2* e diminuição para *FSHR* em comparação ao CN. Ainda, houve diminuição dos transcritos para *PTX3* ( $P < 0,05$ ) do tratamento com FSH quando comparado ao CN e a  $10^{-11}$ M de MLT. No experimento 2, o tratamento com MLT não diferiu do grupo FSH mostrando que a CDK1 total está presente desde o início da maturação é estável ao longo da mesma. Já no experimento 3, o perfil de variação dos níveis de AMPc durante as horas iniciais de MIV foi semelhante ( $P > 0,05$ ) para MLT e FSH. Desse modo, podemos concluir que a melatonina foi capaz de promover a retomada da meiose, porém não foi capaz de

promover sua progressão até o estágio de MII avaliado às 24 horas de maturação *in vitro*. A proteína CDK1 e os níveis de AMPc tiveram perfis similares aos do FSH, sugerindo que a MLT poderia contribuir para a retomada da meiose atuando sobre a sinalização dependente do MPF e AMPc.

**Palavras-Chave:** N-acetil 5-metoxitriptamina; MPF; CDK1; AMPc; maturação *in vitro*; *Bostaurus*

## 2.2 ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the involvement of CDK1 compound of maturation promoting factor (MPF) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in meiosis resumption stimulated by MLT. In experiment 1, cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 9 or 24h for IVM with MLT ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M) or FSH (control) and the rate of meiosis resumption and progression and transcripts abundance for *GPX4*, *SOD1*, *SOD2*, *HAS1*, *HAS2*, *PTX3* and *FSHR* in cumulus cells was assessed. In the second experiment, COCs submitted to 0, 3, 6, 9 and 12 h IVM in the presence of MLT or FSH were evaluated for the presence of the total CDK1 protein (MPF catalytic subunit) by western blotting. In experiment 3, cAMP levels were measured in oocytes at 0, 1, 2, 3, 6 and 9 h IVM in the presence of MLT or FSH. As a result, in experiment 1, the MLT ( $10^{-9}$ M;  $32,6 \pm 6,6\%$  MI) and FSH ( $33,9 \pm 9,0\%$  MI;  $P > 0,05$ ), although they were higher for meiosis resumption when compared with negative control (no treated, NC;  $4,2 \pm 2,4\%$  MI,  $P < 0,05$ ) after 9h of IVM. At 24h, the meiosis progression was higher for the group treated with FSH ( $P < 0,05$ ) when compared with all other groups treated with MLT. There was an increase in transcripts for the group treated with FSH for the genes *GPX4*, *SOD2*, *HAS1* and *HAS2*, and decrease for *FSHR* when compared with NC. Even, there was a decrease in transcripts for *PTX3* ( $P < 0,05$ ) for treatment with FSH when compared with NC and  $10^{-11}$ M de MLT. In the experiment 2, the treatment with MLT did not differ between FSH group, showing that the total CDK1 is present since the beginning of the maturation and is stable during it. For experiment 3, the profile variation of cAMP levels during the initial hours of IVM was similar ( $P > 0,05$ ) for MLT and FSH. Thereby, we can conclude that the melatonin was able to promote the meiosis resumption at 9h, but did not influence its progression

into the stage of MII evaluated at 24h of *in vitro* maturation. The CDK1 protein and cAMP levels had similar profiles to those of FSH, suggesting that MLT could contribute to the meiosis resumption by acting on MPF and cAMP-dependent signaling.

**Keywords:** N-acetyl-5-methoxytryptamine; MPF; CDK1; cAMP; *in vitro* maturation; *Bostaurus*

## 2.3 INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias aplicadas à reprodução animal, a produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma ferramenta estratégica e de grande relevância ao agronegócio mundial, pois possibilita a obtenção de animais de alto mérito genético em um curto período de tempo. Em 2013, dos mais de meio milhão de embriões bovinos obtidos exclusivamente *in vitro* em todo o mundo, 70,8% foram produzidos no Brasil (PERRY, 2015), reafirmando a importância econômica desta biotécnica.

A técnica de PIV envolve uma série de etapas que vão desde a obtenção, seleção e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, seguida de fertilização *in vitro* (FIV), e por fim, o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões obtidos até o estágio de blastocisto para transferência a receptoras sincronizadas ou criopreservação para transferência futura. 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). Deste modo, a melhoria na eficiência tanto da MIV, quanto da CIV, asseguraria uma maior produção de embriões com qualidade superior.

A melatonina (MLT) é uma indolamina sintetizada principalmente na pineal e que atua no controle do ciclo circadiano e da estacionalidade reprodutiva de algumas espécies. Suas funções incluem a atividade antioxidante e antiapoptótica, além de influenciar diferentes vias de sinalização celular (REITER et al., 2009; TAMURA et al., 2009). Além da pineal, onde foi inicialmente descoberta, diversos outros órgãos, tecidos e células também têm a capacidade de produzir MLT (REITER et al., 2013a). A MLT já foi detectada inclusive em fluido folicular de ovários humanos (NAKAMURA

et al., 2003; NILES et al., 1999), bovinos (COELHO et al., 2013; TIAN et al., 2014) e suínos (SHI et al., 2009) e seus receptores 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., 2014a, 2012).

Estudos *in vitro* têm apontado efeitos benéficos da utilização de MLT na maturação oocitária e CIV de embriões, embora os resultados sejam por vezes contraditórios. Há relatos de que a suplementação com MLT durante a MIV aumentou (EL-RAEY et al., 2011; PANG et al., 2018b; ZHAO et al., 2015), diminuiu (FARAHAVAR et al., 2010) ou ainda, não teve efeito (TAKADA et al., 2010) sobre a taxa de maturação nuclear (estágio de metáfase da meiose II - MII). Já para oócitos maturados com MLT e que prosseguiram no CIV de embriões, alguns autores não constataram diferenças significativas (TAKADA et al., 2010, 2012; TSANTARLIOTOU et al., 2007), enquanto outros encontraram efeitos benéficos (LIANG et al., 2016; SAMPAIO et al., 2012; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2014a, 2014b; ZHAO et al., 2018). E por fim, quando somente adicionada no desenvolvimento embrionário, a MLT foi capaz de aumentar a taxa de eclosão de blastocistos (KOMNINOY et al., 2016).

Estudos anteriores observaram que a MLT suplementada ao meio de MIV foi capaz de induzir a retomada da meiose de oócitos bovinos cultivados em meio definido sem outros hormônios ou presença de soro no meio de cultivo, bem como promoveu o desenvolvimento embrionário *in vitro* em níveis similares aos de oócitos maturados em meio completo com soro, gonadotrofinas e estradiol (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). Além disso, o estímulo à meiose sem a presença de gonadotrofinas e soro também foi observado em oócitos murinos (FERNANDES, 2015) e suínos (CRUZ, 2016). No entanto, o mecanismo pelo qual a MLT seria capaz de induzir a retomada da meiose ainda não foi esclarecido.

No interior do folículo ovariano, o bloqueio meiótico é mantido através de sinais parácrinos inibidores oriundos das células da granulosa e do cumulus (NORRIS et al., 2009), além de altos níveis intraocitários de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (COTICCHIO et al., 2015). O acúmulo deste AMPc garante a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (MASCIARELLI; HORNER; LIU, 2004) e, conseqüentemente, mantém o fator promotor da maturação (MPF) inativo (ADHIKARI; LIU, 2014).



Assim, a baixa atividade do MPF mantém o oócito em bloqueio meiótico no estágio de diplóteno da prófase I (PANDEY; CHAUBE, 2015; PRASAD et al., 2015; TIWARI; CHAUBE, 2016). Após estímulo hormonal, a retomada da meiose é mediada pela queda nos níveis de AMPc, seguido de inativação da PKA e ativação do MPF (ADHIKARI et al., 2012; ADHIKARI; LIU, 2014; EPPIG et al., 2004; JONES, 2004).

O MPF é composto de duas subunidades, uma catalítica, a cinase dependente de ciclina 1 (CDK1 ou p34<sup>cdc2</sup>) e outra regulatória, a ciclina B1 (DORÉE; HUNT, 2002). A subunidade CDK1 desempenha um papel fundamental na retomada da meiose em oócitos imaturos e nenhuma outra CDK pode compensar a perda da função de CDK1 (ADHIKARI et al., 2012). Além disso, a ativação da CDK1 pela remoção da fosforilação inibitória é suficiente para promover a retomada da meiose (REIS et al., 2006).

A retomada meiótica pela ativação do MPF (CDK1) induz a condensação da cromatina e ruptura da vesícula germinativa (MEHLMANN, 2005; PANDEY et al., 2010), o ciclo celular progride até o estágio de meiose II com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, tornando o oócito apto à fertilização (KUBIAK et al., 2008; TIWARI; CHAUBE, 2016; TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010).

O mecanismo de atuação da MLT no estímulo à meiose, apesar de ainda desconhecido, poderia ser relacionado a uma possível ação sobre a via do MPF. Em carpas, a MLT levou à formação dos componentes do MPF envolvidos no controle da meiose, tanto *in vitro* (CHATTORAJ et al., 2005; MAITRA; CHATTORAJ; BHATTACHARYYA, 2005), quanto *in vivo* (MONIRUZZAMAN; HASAN; MAITRA, 2016). Já em mamíferos, a MLT foi capaz de inibir o acúmulo de AMPc (SOARES et al., 2003), sugerindo que sua influência na retomada da meiose poderia atuar nesta via.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar se a retomada da meiose estimulada pela MLT envolve a ativação do componente (CDK1) do MPF e modulação dos níveis de AMPc durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

## **2.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.4.1 Local de execução do projeto***

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD), junto ao Departamento de Medicina

Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo (USP) localizado em Pirassununga-SP. Este estudo possui aprovação pelo comitê de ética local (Número de protocolo: 1603160518).

#### **2.4.2 Experimentos**

##### **Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de melatonina na retomada e progressão da meiose e abundância de transcritos nas células do cumulus**

Neste experimento, os CCOs foram maturados *in vitro* em meio de maturação semi-definido com MLT ( $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M e  $10^{-7}$ M) ou somente com FSH (0,5 µg/mL; controle positivo). Um controle negativo foi maturado sem adição de nenhum hormônio para determinar a retomada espontânea da meiose. A taxa de retomada e progressão da meiose foi avaliada às 9 e 24 h de MIV, pela determinação da proporção de oócitos que apresentaram quebra da vesícula germinativa e chegaram ao estágio de metáfase I (MI) para a retomada; e metáfase II (MII) para a progressão da meiose. Para avaliação, os oócitos foram corados com Hoechst 33342 e analisados em microscópio de epifluorescência. As células do cumulus dos oócitos correspondentes de cada tratamento foram avaliadas quanto à abundância relativa de transcritos para enzimas antioxidantes (*GPX4*, *SOD1* e *SOD2*), de expansão (*HAS1*, *HAS2* e *PTX3*) e o receptor de FSH (*FSHR*) por PCR em tempo real.

##### **Experimento 2: Efeito da melatonina na proteína CDK1**

O efeito da MLT ( $10^{-9}$ M) sobre a proteína CDK1 (unidade catalítica do MPF) foi avaliada por western blotting. Os CCOs foram coletados às 0, 6, 9 e 12 horas do cultivo de MIV e os oócitos desnudados e armazenados para análise posterior. O grupo controle foi avaliado da mesma forma, sendo maturado apenas com FSH.

##### **Experimento 3: Efeito da melatonina nos níveis de AMPc**

Os CCOs dos grupos tratados com MLT ( $10^{-9}$ M) ou somente com FSH foram coletados, desnudados e armazenados para posterior mensuração dos níveis de AMPc nas horas iniciais da maturação. As amostras foram coletadas nos tempos de 0, 1, 2,3, 6 e 9 horas de MIV.

### **2.4.3 Obtenção dos ovários e complexos cumulus-oócito**

Os ovários foram obtidos em abatedouros comerciais na região de Pirassununga-SP e transportados em garrafa térmica até o laboratório em solução salina estéril (NaCl 0,9%) a 36°C. Já no laboratório, os ovários foram lavados em solução salina, seguidos de álcool 70% e, por fim, mantidos em solução salina aquecida a 36°C para aspiração folicular. Folículos de 2-6 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de agulha 18G e seringa descartável de 10 mL (BD). O líquido folicular obtido foi depositado em tubos cônicos de 50 mL (Corning®) mantidos em repouso por cerca de 20 minutos no banho seco a 36°C para que os CCOs possam sedimentar. Os CCOs foram selecionados em placas de Petri (100 mm, estéril, Corning®) com o auxílio de lupa estereoscópica e transferidos ao meio de lavagem H199(12350-039; Gibco®) acrescido de gentamicina (50 µg/mL; G1272, Sigma-Aldrich®). Foram selecionados para o desenvolvimento do projeto somente os CCOs classificados com graus I e II, com cumulus compacto e pelo menos 3 a 4 camadas de células da granulosa e citoplasma uniforme.

### **2.4.4 Maturação *in vitro***

Para a maturação *in vitro* (MIV), os CCOs foram cultivados em gotas de 100 µL (20-30 oócitos por gota) de meio de maturação semi-definido em placas de 4 poços (estéril, Ingamed). O meio de maturação (MM) utilizado foi o TCM-199 sem HEPES (11150-059; Gibco®) acrescido de piruvato de sódio (0,25 mM; P5280, Sigma-Aldrich®), gentamicina (50 µg/mL; G1272, Sigma-Aldrich®) e 3 mg/mL de BSA (A9647, Sigma-Aldrich®). Ao MM foram adicionados diferentes suplementos hormonais [(0,5 µg/ml de FSH (Intervet) ou MLT (M5250, Sigma-Aldrich®)] de acordo com cada experimento. O cultivo dos CCOs foi realizado em incubadora a 38,5°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade controlada por períodos específicos de acordo com o experimento.

#### **2.4.5 Avaliação da Meiose (retomada e progressão)**

Para avaliação do estágio da meiose, os oócitos foram inicialmente desnudados de suas células do cumulus em vórtex por 5 minutos em tubos de 2 mL contendo 100 µL de solução salina fosfatada livre de cálcio e magnésio (PBS) com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; P8136, Sigma-Aldrich®; PBS+PVA), recuperados e logo em seguida fixados em paraformaldeído 4% (P6146, Sigma-Aldrich®) e Triton X-100 0,5% (22686, USB) em PBS por 20 minutos. Os oócitos desnudos foram lavados três vezes em PBS+PVA, corados por 15 minutos com Hoechst 33342 (10µg/mL; B2261, Sigma-Aldrich®) e, posteriormente, avaliados sob microscópio de epifluorescência (Eclipse TS100; Nikon). Os oócitos foram classificados de acordo com a configuração nuclear em: imaturos (vesícula germinativa; VG), metáfase I (MI) ou maturados (metáfase II; MII). A retomada da meiose, avaliada as 9 h de MIV, considerou a proporção de oócitos que estavam em MI, em relação ao total de oócitos em cultivados. A progressão da meiose (oócitos maturados) foi avaliada ao final da MIV (24 h) e considerou-se a proporção de oócitos que concluíram a maturação atingindo o estágio de MII em relação ao total de oócitos em cultivo.

#### **2.4.6 Detecção da proteína CDK1 por western blotting**

Oócitos desnudos em pools de 50 foram coletados (4 repetições em duplicata) e lisados com 10 µL de solução de lise para extração proteica, constituída por 98 µL de tampão RIPA (R0278, Sigma-Aldrich®), 1µL de inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich®) e 1µL de inibidor de fosfatase (P0044, Sigma-Aldrich®). O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 20 minutos e logo após foram adicionados 10 µL de solução corante, constituída de 90 µL de tampão de amostra SDS Tris-Glicina (LC2676, Invitrogen™) e 10 µL de 2-mercaptoetanol (21985-023, Gibco®), e em seguida fervido a 95°C por 5 minutos para desnaturação proteica e armazenados a -20°C até o uso. Para análise, as amostras (18 uL) foram aplicadas no gel de SDS-PAGE com 12% de poli(acrilamida) mantido em câmara com tampão de corrida Tris/HEPES/SDS 1x (BupH™, 28398, ThermoScientific) para separação das proteínas por eletroforese por 2 a 3 horas em corrente elétrica constante de 100 Volts. Posteriormente, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (LC2005, Invitrogen™) por 2 horas em corrente elétrica constante de 80

Volts. Após a transferência, a membrana foi lavada em *Tris buffered saline* com Tween® 20 (P1379, Sigma-Aldrich®;TBST) e mantida por 1 hora em temperatura ambiente em tampão de bloqueio (SuperBlock™, 37536, Thermo Scientific) sob leve agitação e, posteriormente, submetida à incubação com o anticorpo primário anti-CDK1 total (p34<sup>cdc2</sup>) policlonal de coelho (1:200, sc-954, Santa Cruz, CA, USA em tampão de bloqueio overnight a 4°C. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes em TBST por 5 minutos e mantida durante 1 hora em temperatura ambiente no anticorpo secundário anti-coelho (1:3000, 7074S, CellSignaling) conjugado com HRP (*horseradishperoxidase*). Por fim, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos em TBST, incubada em 1 mL do reagente quimioluminescente Clarity™ Western ECL Substrate (170-5060, Bio-Rad) por 1 minuto e analisada pelo aparelho ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### **2.4.7 Mensuração dos níveis de AMPc**

A mensuração dos níveis de AMPc foi realizada pelo método de imunoenensaio enzimático (EIA), com pools de 20 oócitos desnudados de suas células do cumulus por pipetagens sucessivas (BILODEAU-GOESEELS, 2007). Os oócitos foram rapidamente lavados em PBS+PVA e transferidos para 200 µL de 0,1N HCl. As células foram lisadas por 20 minutos em vórtex e centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -20°C até ser submetido aos ensaios de acordo com as instruções do kit (Direct cAMP ELISA Kit, ADI-900-066, Enzo).

#### **2.4.8 Coleta das células do cumulus**

Após a MIV de 9 e 24h, os CCOs foram lavados 3 vezes em solução de PBS+PVA, em seguida transferidos para uma gota de 150 µL deste mesmo meio em placa de Petri (60 mm, estéril, Corning®) e após sucessivas pipetagens, as células do cumulus (CC) foram separadas dos oócitos ( $n \pm 30$ ) e armazenadas em microtubos de 600 µL. Foram adicionados mais 150 µL de PBS+PVA na placa de Petri que continha as CC no intuito de recuperar o máximo possível dessas células. Em seguida, as CC foram centrifugadas (1000 x g a 4°C por 10 minutos) em PBS+PVA, tiveram o sobrenadante descartado e os *pellets* celulares formados foram então tratados com

1,5µL de solução inibidora RNaseOUT em PBS+PVA (1 UI/µL; RNase; 10777-019; Invitrogen™), sendo imediatamente imersos em N<sub>2</sub> e estocados em freezer -80°C para análises posteriores.

#### **2.4.9 Extração do RNA total pelo método de TRIzol®**

As amostras de CC foram submetidas à extração de RNA total segundo o protocolo do reagente TRIzol® (15596-026; Invitrogen™). Inicialmente, a amostra foi homogeneizada individualmente com 110 µL de uma solução contendo 100 µL de TRIzol®, 1,4µL Glycoblue™ (15 mg/mL; AM9516; Invitrogen™) e 8,6 µL de água ultrapura tratada com DEPC (750023, Invitrogen™) 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 overnight a -80°C. Após este período, 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 (ThermoScientific).

#### **2.4.10 Digestão com DNase I e transcrição reversa (RT)**

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.

Para a transcrição reversa (RT) e síntese do RNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (4368813, AppliedBiosystems™). 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.

#### **2.4.11 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 em CC de genes alvos relacionados à atividade antioxidante (*GPX4*, *SOD1* e *SOD2*), a expansão das CC (*HAS1*, *HAS2* e *PTX3*) e ao receptor de FSH (*FSHR*). Os primers foram desenhados a partir de sequências bovinas 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/>). Como normalizadores da expressão gênica, os primers dos genes endógenos *ACTB*, *GAPDH* e *PPIA* foram utilizados. 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)
<b>Genes endógenos</b>			
<b><i>β-ACTINA (ACTB)</i></b>	F 5' GCAGGAGTACGATGAGTCCG 3'	NM_173979.3	72
<i>Actin beta</i>	R 5' TAACGCAGCTAACAGTCCGC 3'		
<b><i>GAPDH</i></b>	F 5' CCACTCCCAACGTGTCTGTT 3'	NM_001034034.2	84
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase</i>	R 5' GCTTCACCACCTTCTTGATCTCATC 3'		
<b><i>PPIA</i></b>	F 5' GGCCTGGCATCTTGTCCAT 3'	NM_178320.2	94
<i>Peptidylpropyl Isomerase A</i>	R 5' TGCCATCCAACCACTCAGTCT 3'		
<b>Genes alvos</b>			
<b><i>GPX4</i></b>	F 5' TGTGGTGAAGCGGTATGGTC 3'	NM_174770.4	192
<i>Glutathione peroxidase 4</i>	R 5' CACGCCAGGTTCTCAGGTCT 3'		
<b><i>SOD1 (Cu,ZnSOD)</i></b>	F 5' ACACAAGGCTGTACCAGTGC 3'	NM_174615.2	105
<i>Superoxide dismutase 1</i>	R 5' TGTCACATTGCCCAGGTCTC 3'		
<b><i>SOD2 (MnSOD)</i></b>	F 5' TCCTGTTCAATCGCAGTTACAGA 3'	NM_201527.2	162
<i>Superoxide dismutase 2</i>	R 5' ACGGGTGGTGACTATCAGA 3'		
<b><i>HAS1</i></b>	F 5' CAGAGCTACTTCCACTGCGTGTC 3'	XM_024978777.1	175
<i>Hyaluronan synthase 1</i>	R 5' TGGTGTATAGCCCATGCTGA 3'		
<b><i>HAS2</i></b>	F 5' GTCTGTCAGTCTTATTTCCGATGTG 3'	NM_174079.3	167
<i>Hyaluronan synthase 2</i>	R 5' AGACTCAGCACTCGGTTTCGTTAG 3'		
<b><i>PTX3</i></b>	F 5' GCTATCGGTCCATAATGCTTGT 3'	NM_001076259.2	114
<i>Pentraxin 3</i>	R 5' CTTTCTTTGAATCCCAGGTGC 3'		
<b><i>FSHR</i></b>	F 5' AGCCCCTTGTCACTCTATGTC 3'	NM_174061.1	105
<i>Follicle stimulating hormone receptor</i>	R 5' GTTCCTCACCGTGAGGTAGATGT 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. Os testes foram realizados com cDNA de CC sem



tratamento prévio e a melhor diluição eleita foi na razão de 1:16. Já para os *primers*, foi eleita a concentração a 250 nM como mais eficiente.

Cada reação de amplificação foi preparada com 6 µL do reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (4367659; AppliedBiosystems™), 250nM de cada *primer*(F e R) em 4 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (10977-015, Invitrogen™), 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, 55°C por 20 segundos e 60°C por 60 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 7500 Fast Real Time PCR System (AppliedBiosystems™).

Os valores de expressão obtidos dos genes alvos foram normalizados pela expressão dos genes endógenos selecionados (ACTB, GAPDH e PPIA) 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 três genes endógenos. Em seguida, calculou-se a diferença entre a média dos Cts de cada gene alvo e a média geométrica dos Cts dos genes endógenos ( $\Delta Ct$ ). Posteriormente, fez-se a média dos  $\Delta Ct$ s para o grupo controle ( $\Delta Ct$  médio) e calculou-se a diferença entre este e o  $\Delta Ct$  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 gene e tipo celular estudado até o momento (CC).

#### **2.4.12 Análises dos dados**

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPadPrism® versão 5.0. Para as comparações entre taxas de maturação, os dados em porcentagem foram

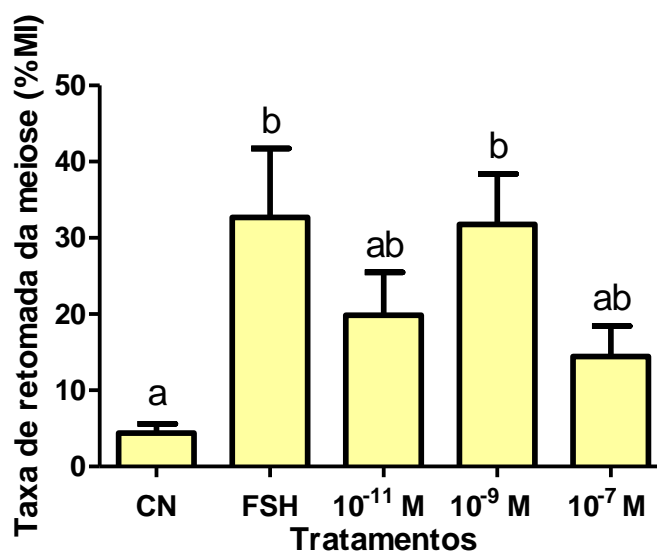
transformados pelo arco-seno antes da análise. Os demais dados foram analisados sem transformação (densitometria das bandas proteicas do western blotting e níveis de AMPc). Inicialmente os dados foram testados quanto à normalidade por Shapiro-Wilk. Quando apresentaram normalidade, foi adotado o procedimento One-way ANOVA do programa GraphPadPrism® versão 5.0 e aplicado o teste de Tukey para evidenciar diferenças entre os tratamentos. Já para os dados que não apresentaram normalidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, admitindo-se para ambos os casos, 5% de significância. Todos os experimentos foram desenvolvidos com três a cinco repetições.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ***2.5.1 Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de melatonina na retomada e progressão da meiose e abundância de transcritos nas células do cumulus***

A taxa de retomada da meiose foi avaliada às 9 horas de MIV pela determinação da proporção de oócitos que se apresentavam em metáfase I (MI). Na figura 3 podem ser observados os resultados obtidos.

**Figura 3. Representação gráfica da taxa de retomada da meiose em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 9 horas com FSH ou diferentes concentrações de MLT.** Dados mostram as médias  $\pm$  EMP para controle negativo (CN), FSH (controle positivo) e  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$ M de MLT (n=5 repetições).

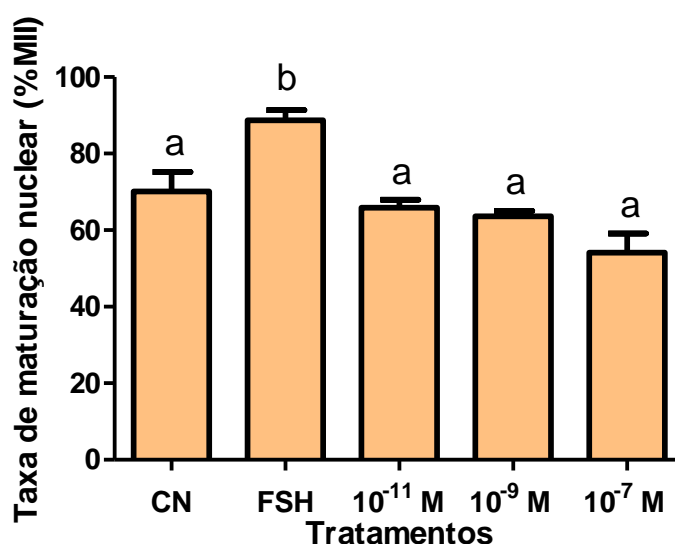


A taxa de retomada da meiose foi similar entre  $10^{-9}$ M de MLT ( $32,6 \pm 6,6\%$  MI) e FSH ( $33,9 \pm 9,0\%$  MI;  $P > 0,05$ ), as quais foram superiores ao grupo CN ( $4,2 \pm 2,4\%$  MI,  $P < 0,05$ ) após 9 horas de MIV. As demais concentrações de MLT ( $10^{-11}$  e  $10^{-7}$  M) obtiveram taxas intermediárias de retomada da meiose ( $20,5 \pm 5,6\%$  e  $14,9 \pm 4,0\%$  MI, respectivamente) que não diferiram em relação aos outros grupos ( $P > 0,05$ ). Tais resultados sugerem que a MLT sozinha, na concentração de  $10^{-9}$  M, é capaz de estimular a taxa de retomada na meiose após 9 horas de MIV em níveis similares aos da gonadotrofina FSH. Em ambos os grupos, as taxas de retomada foram maiores que o controle negativo (não tratado, sem adição de hormônios), que indicaria o nível de retomada espontânea da meiose. O CN foi utilizado para descartarmos a possibilidade dos efeitos observados na meiose pudessem ser apenas resultado de maturação espontânea pela remoção dos gametas do ambiente folicular (SIRARD, 2001).

Estudos prévios também mostraram que a MLT foi capaz de estimular a meiose em camundongos (FERNANDES, 2015) e suínos (CRUZ, 2016), assim como induzir sua retomada, sem adição de soro e/ou hormônios em bovinos (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). Assim, é possível inferir que neste nosso estudo, a retomada da meiose pode ser estimulada pela MLT em oócitos bovinos, confirmando resultados anteriores.

Neste experimento também avaliamos a progressão da meiose até sua conclusão às 24 h de MIV (% de metáfase II, MII) nos mesmos grupos de tratamento. Os resultados estão descritos na figura 4.

**Figura 4. Representação gráfica da taxa de maturação nuclear (MII) de oócitos bovinos após 24 horas de maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos.** Dados mostram as médias  $\pm$  EMP para controle negativo (CN), FSH (controle positivo) e  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$ M de MLT (n=4 repetições).



Para a taxa de progressão da meiose avaliada após 24 horas de maturação *in vitro*, o grupo tratado com FSH apresentou a maior taxa de oócitos em MII (86,3  $\pm$  0,7% MII,  $P < 0,05$ ) e todos os outros grupos tratados com MLT obtiveram taxas menores que o FSH (65,9  $\pm$  2,1%, 62,2  $\pm$  0,4%, 53,5  $\pm$  5,0% MII para  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  M, respectivamente) e foram similares ao CN (70,1  $\pm$  5,1% MII,  $P > 0,05$ ), que também foi menor que FSH. Desta maneira, sob as condições estudadas, a MLT não se mostrou capaz de desempenhar seus efeitos positivos na meiose ao longo de sua progressão, pois suas taxas de MII foram similares somente com o grupo de maturação espontânea (CN).

Há relatos dos efeitos benéficos da MLT na MIV, porém nestes estudos, a MLT sempre foi utilizada em associação com outros hormônios, como FSH e LH, e também, com adição de soro fetal bovino (EL-RAEY et al., 2011; TIAN et al., 2014; ZHAO et al., 2015). Desta forma, buscamos avaliar o efeito isolado da MLT, investigando se ela teria capacidade de estimular a meiose em uma condição *in vitro*. De maneira similar aos dados obtidos neste experimento, a MLT não teve efeito sobre a maturação nuclear final em oócitos bovinos maturados em meio definido (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016; TAKADA et al., 2010).

De uma maneira geral, os resultados indicam que a MLT pode exercer seus efeitos positivos na meiose durante a retomada, mas não na progressão para os estágios finais. Essa observação indica que para a conclusão da meiose é necessária a associação de gonadotrofina ao meio de cultivo. A adição de gonadotrofinas ao meio de maturação *in vitro* é amplamente utilizada e essencial para a aquisição da competência oocitária (CAIXETA et al., 2013; CALDER et al., 2003; FUSHII; YAMADA; MIYANO, 2020; SIRARD, 2001; WRENZYCKI; STINSHOFF, 2013).

Em relação à avaliação dos transcritos para genes relacionados à atividade antioxidante, expansão e receptor de FSH em CC por qPCR-RT tanto às 9h, como as 24h de MIV, os resultados estão apresentados na figura 5 e 6, respectivamente.

Figura 5. Representação gráfica da expressão relativa de transcritos relacionados à atividade antioxidante (*GPX4*, *SOD1* e *SOD2*), expansão das células do cumulus (*HAS1*, *HAS2* e *PTX3*) e ao receptor de FSH (*FSHR*) de CC expostas à diferentes tratamentos com MLT durante 9h de MIV. Letras diferentes indicam  $P < 0,05$ .

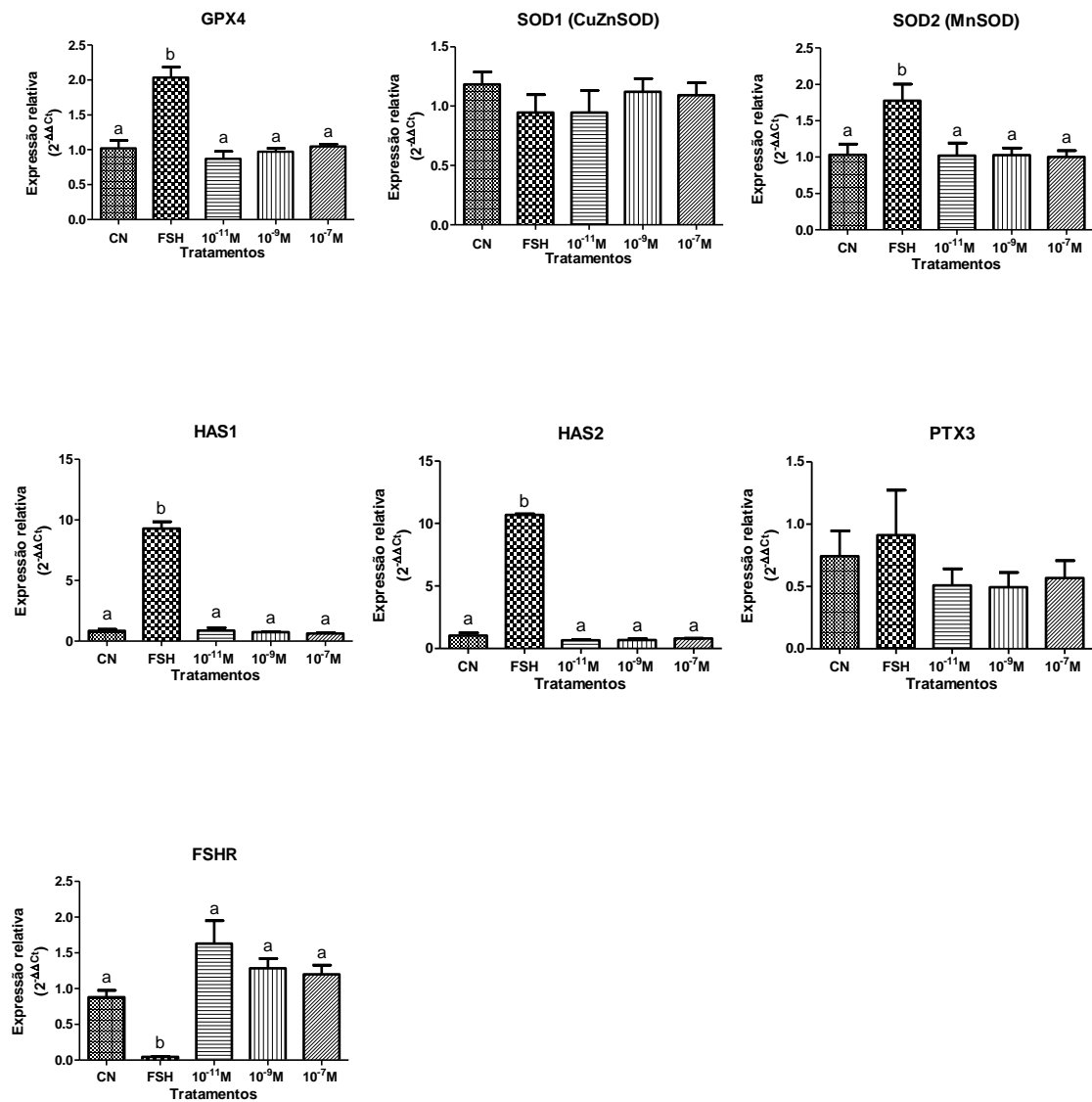
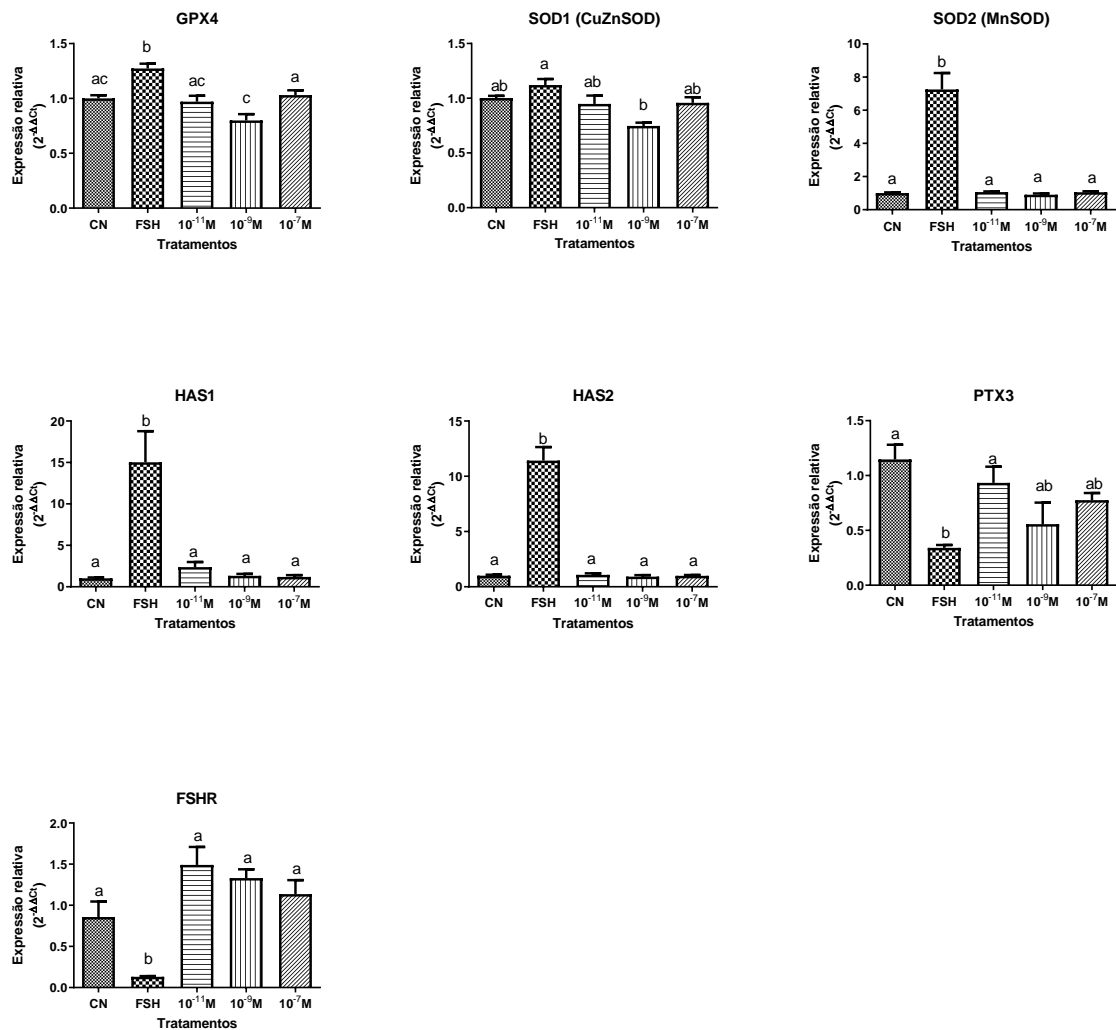


Figura 6. Representação gráfica da expressão relativa de transcritos relacionados à atividade antioxidante (*GPX4*, *SOD1* e *SOD2*), expansão das células do cumulus (*HAS1*, *HAS2* e *PTX3*) e ao receptor de FSH (*FSHR*) de CC expostas à diferentes tratamentos com MLT durante 24h de MIV. Letras diferentes indicam  $P < 0,05$ .



Os transcritos relacionados à atividade antioxidante foram aumentados ( $P < 0,05$ ) para FSH quando comparados aos grupos com MLT e ao CN para os genes *GPX4* e *SOD2*, enquanto que *SOD1* não variou entre os grupos ( $P > 0,05$ ) às 9 horas de MIV. Para os transcritos relacionados à expansão das CC, *HAS1* e *HAS2*, o grupo FSH foi cerca de 10 vezes mais abundante ( $P < 0,0001$ ) em relação ao CN e aos grupos com MLT, enquanto que *PTX3* foi similar entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) às 9 horas de MIV. No entanto, para os transcritos do gene *FSHR*, o tratamento com FSH diminuiu

sua abundância ( $P < 0,05$ ) em comparação com o CN e aos grupos de MLT às 9 horas de MIV. Com isso, concluímos que sob as condições estudadas, a MLT não alterou a expressão gênica em CC durante as 9 horas iniciais de MIV.

Às 24 horas de MIV, o tratamento com FSH manteve o mesmo padrão, onde houve a elevação dos transcritos ( $P < 0,05$ ) para os genes antioxidantes (*GPX4* e *SOD2*) e de expansão (*HAS1* e *HAS2*) e, redução para o gene *FSHR*. Ainda, houve diminuição dos transcritos para *PTX3* ( $P < 0,05$ ) do tratamento com FSH quando comparado ao CN e a  $10^{-11}$ M de MLT às 24 horas de MIV. Em relação a MLT, poucos efeitos foram observados, onde apenas o gene antioxidante *SOD1* teve seus transcritos diminuídos no tratamento com  $10^{-9}$ M de MLT em relação ao FSH.

Os resultados mostraram que o FSH interfere com aumento na expressão de antioxidantes e expansão das CC e, diminuição do seu próprio receptor. Já a MLT, não causou variações importantes em nenhum dos genes, nem mesmo naqueles relacionados à atividade antioxidante, de forma que parece não atuar sobre a expressão dos genes estudados, ao menos nas CC.

Enzimas antioxidantes atuam no controle interno do balanço redox da célula (TAKAHASHI, 2012) e em alguns casos, a MLT é capaz de alterar sua expressão. A MLT foi capaz de aumentar a expressão de genes antioxidantes em blastocistos (*GPX* e *SOD2*) (REMIÃO et al., 2016) e em oócitos bovinos (*GPX* e *SOD1*), o que pode diminuir os níveis de ROS (PANG et al., 2018a). Porém em CC bovinas, a MLT não foi capaz de aumentar a expressão dos genes antioxidantes *GPX4*, *SOD1* e *SOD2* às 24 horas de maturação (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016), corroborando com nossos resultados.

A expansão das células do cumulus surgem em resposta ao estímulo gonadotrófico, sendo um importante marcador da maturação oocitária (CAIXETA et al., 2013; CALDER et al., 2005). Tian e colaboradores (2014) observaram aumento na expressão dos genes de expansão *HAS1/2* e *PTX3* quando a MLT foi utilizada durante a MIV em bovinos. Neste estudo, o aumento da expressão destes genes está relacionado a ação da MLT sobre as CC, promovendo a MIV. Nossos resultados mostraram que o uso isolado da MLT durante a MIV não foi capaz de alterar a expressão destes genes citados, somente houve um aumento na expressão do grupo controle tratado com FSH para *HAS1/2* como esperado. Deste modo, a associação da MLT com FSH durante a MIV contribui para a expansão das CC.



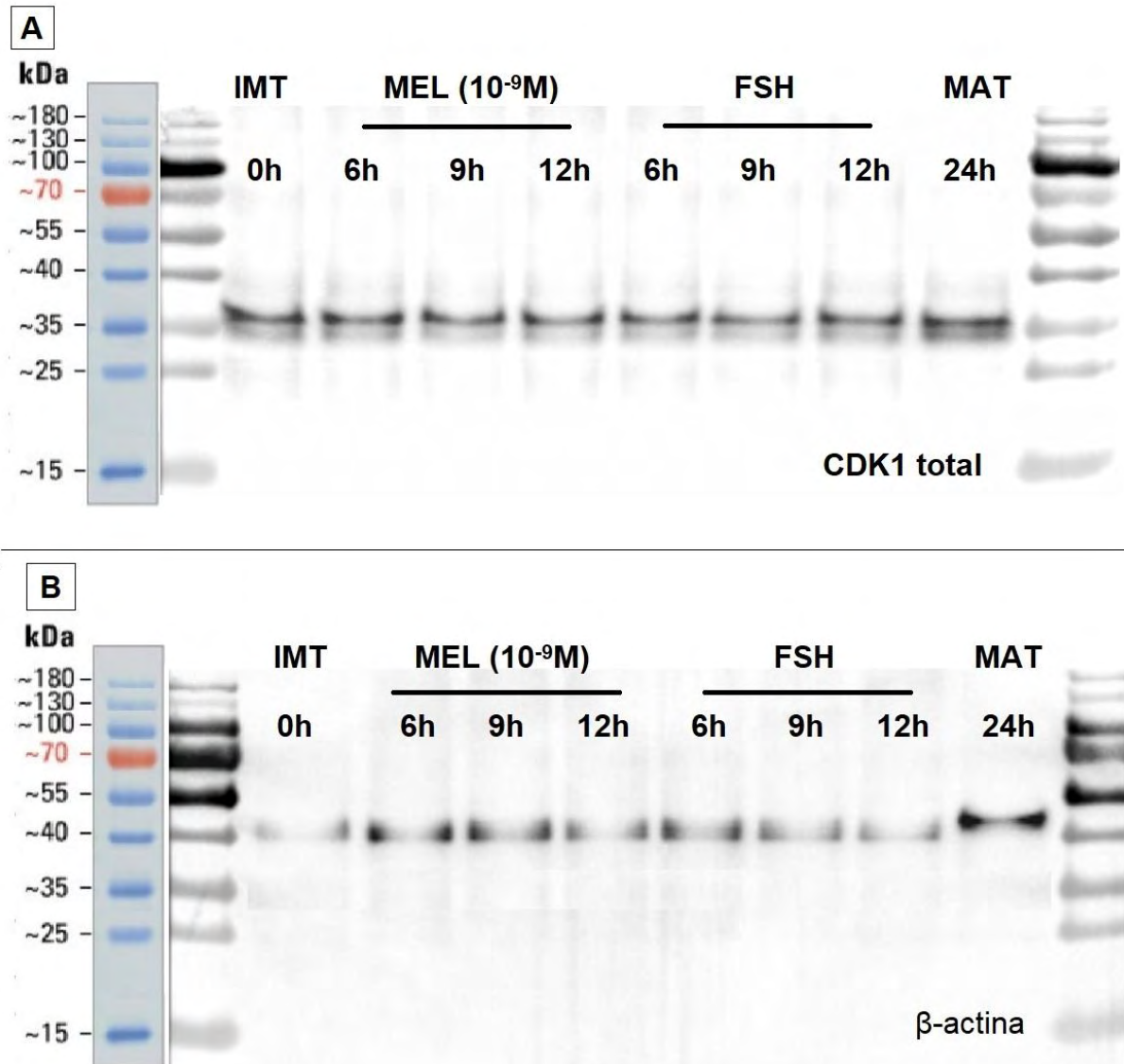
A MLT pode atuar como um antioxidante, alterando o padrão de expressão gênica ou até mesmo na atividade enzimática da *SOD* e *GPX* no intuito de controlar o nível de ROS, mas também por ação direta na célula (independente de receptores) (REITER et al., 2013b; TAMURA et al., 2009). Desta forma, a ausência de alteração no padrão de expressão gênica apresentada em nossos resultados, não garante que a MLT não está atuando no sistema. Contudo, outros parâmetros, como a mensuração da atividade enzimática de antioxidantes como o *GPX* ou outros antioxidantes e a mensuração dos níveis de ROS, seriam necessários para confirmar tal atuação. Além disso, não há informação disponível sobre a atuação da MLT em CC às 9 horas e, para as 24 horas de MIV, as informações são limitadas e na maioria dos casos, as análises são realizadas ou somente com o oócito ou com o CCO todo (MARQUES et al., 2018; WANG et al., 2014b; ZHAO et al., 2018).

O tratamento com FSH influenciou a expressão das células do cumulus para os transcritos relacionados à expansão e ao seu próprio receptor (WUNSCH; SONNTAG; SIMONI, 2007), mas também afetou a expressão de genes relacionados à atividade antioxidante. Sabe-se que o FSH é capaz de estimular genes relacionados à maturação oocitária e à expansão das células do cumulus tais como *AREG*, *BTC*, *EREG*, *ADAMTS1*, *HAS2*, *PTGS2*, *PTX3* e *TNFAIP6* (BLAHA et al., 2015; PROCHAZKA et al., 2011). Deste modo, os nossos resultados corroboram os encontrados na literatura. Para a expressão de enzimas antioxidantes, *SOD2* teve sua expressão aumentada em células do cumulus às 24 horas de MIV (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016), assim como mostrado em nossos resultados. Além disso, somente outro estudo mostrou um aumento de *SOD3* quando células de Sertoli de ratos foram tratadas com FSH (MRUK; CHENG, 2000). Neste sentido, mais estudos são necessários para investigar essa possível ação do FSH sobre a expressão de enzimas antioxidantes.

### **2.5.2 Experimento 2: Efeito da melatonina na proteína CDK1**

Conforme demonstrado na figura abaixo, a CDK1 encontra-se presente em oócitos maturados com MLT da mesma forma que com FSH, em todos os horários de MIV analisados.

**Figura 7. Imunodeteccção de (A) CDK1 total e (B)  $\beta$ -actina por western blotting em oócitos bovinos após diferentes tempos de MIV tratados com MLT ( $10^{-9}\text{M}$ ) ou FSH. Pools de 50 oócitos foram utilizados no tempo 0 (oócitos imaturos, sem tratamento prévio; IMT), 6, 9, 12 horas nos dois tratamentos estudados e 24 horas (oócitos maturados em MC - MAT) para extração da proteína (três repetições).**

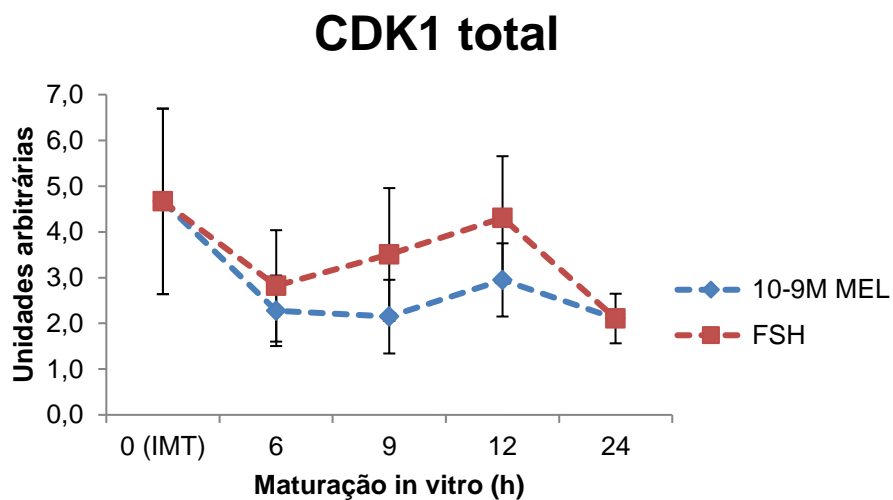


**Tabela 2. Quantificação relativa da proteína CDK1 total em oócitos bovinos em diferentes períodos de maturação *in vitro* [0 (oócitos imaturos, sem tratamento prévio), 6, 9, 12 (tratamentos com  $10^{-9}$ M de MLT e FSH) e 24 horas (oócitos maturados em MC)].** Dados indicam as médias  $\pm$  EMP em relação a proporção de CDK1 total com  $\beta$ -actina. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPadPrism® e a significância adotada foi de 5% ( $P>0,05$ ) para três repetições realizadas.

MIV (h)	N total	Tratamentos	
		10 <sup>-9</sup> M MLT Unidades arbitrárias Média $\pm$ EMP	FSH Unidades arbitrárias Média $\pm$ EMP
0	150	4,7 $\pm$ 2,0 (oócitos imaturos)	
6	150	2,3 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1,2
9	150	2,1 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 1,5
12	150	2,9 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 1,3
24	150	2,1 $\pm$ 0,5 (MIV em MC)	

Resultados analisados por ANOVA: two-way seguido de pós-teste de Bonferroni (GraphPAdPrism®). Os grupos 0 (oócitos não maturados/não submetidos a tratamentos e utilizados como referência do ponto de partida da maturação) e 24 horas (oócitos maturados em MC para referência/controle da técnica) tiveram seus valores de referência utilizados para ambos os tratamentos. Dados referentes a três repetições com  $P>0,05$ .

**Figura 8. Representação gráfica da abundância relativa da proteína CDK1 total em relação ao endógeno  $\beta$ -actina em oócitos bovinos em diferentes períodos de maturação *in vitro* [(0 - oócitos imaturos, sem tratamento prévio (IMT), 6, 9,12 (tratamentos com  $10^{-9}$ M de MLT e FSH) e 24 horas (oócitos maturados em MC)].** Os grupos 0 (oócitos não maturados/não submetidos a tratamentos e utilizados como referência do ponto de partida da maturação) e 24 horas (oócitos maturados em MC para referência/controlado da técnica) tiveram seus valores de referência utilizados para ambos os tratamentos. Dados indicam as médias  $\pm$  EMP e a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPadPrism® e a significância adotada foi de 5% ( $P>0,05$ ) para três repetições realizadas.



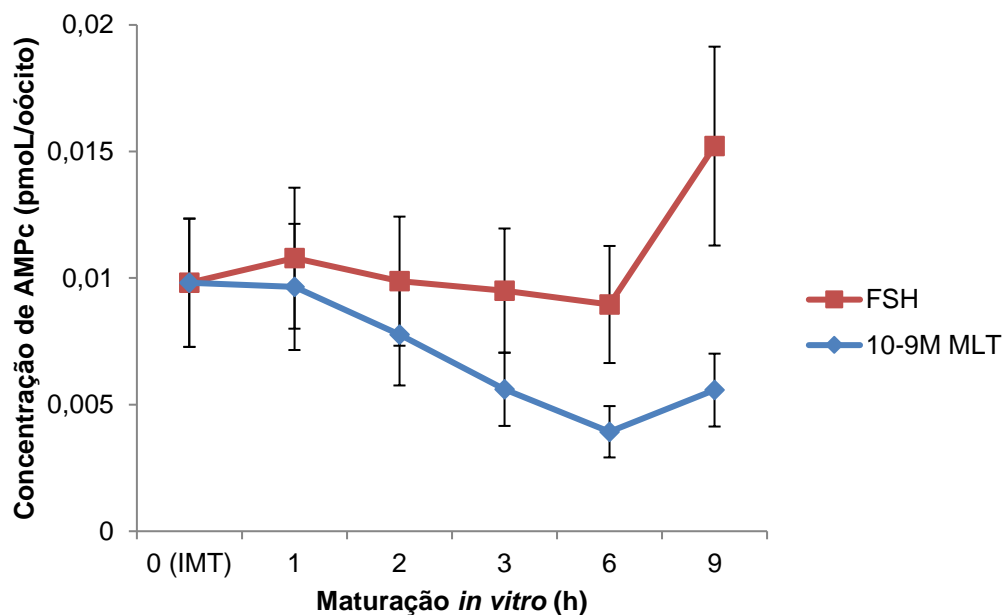
Durante a maturação *in vitro*, os grupos utilizados nos horários de 0 e 24 horas foram únicos em cada horário, ou seja, não foram submetidos aos tratamentos. Tais grupos foram incluídos como referência do ponto de partida da maturação (0 hora, oócitos imaturos, portanto, não submetidos a nenhum tratamento) ou do final da maturação (24 horas em MC), reiterando que este último foi usado como controle interno da técnica (oócitos maturados apresentam ativação do CDK1 do MPF). Os grupos de 0 e 24 horas apresentaram, respectivamente,  $4,7 \pm 2,0$  e  $2,1 \pm 0,5$  para a quantificação relativa para CDK1 total ( $P>0,05$ ). O grupo  $10^{-9}$ M de MLT ( $2,3 \pm 0,8$ ;  $2,1 \pm 0,8$  e  $2,9 \pm 0,8$ ) e o tratamento com FSH ( $2,8 \pm 1,2$ ;  $3,5 \pm 1,5$  e  $4,3 \pm 1,3$ ), às 6, 9 e 12 horas de MIV, não diferiram significativamente entre eles em nenhum dos horários avaliados ( $P>0,05$ ). Durante a MIV, os níveis da proteína CDK1 tiveram um perfil similar entre FSH e MLT, sem diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ). Desta forma, os resultados mostram que a CDK1 total está presente desde o início da

maturação (0 hora) é estável ao longo da mesma, conforme já relatado anteriormente (QUETGLAS et al., 2010; ROBERT et al., 2002) e não sofre efeitos do tratamento com melatonina que sejam distintos do perfil observado para o controle FSH nas horas iniciais (6, 9 e 12 horas).

### 2.5.3 Experimento 3: Efeito da melatonina nos níveis de AMPc

Para ambos os grupos analisados, o perfil de variação dos níveis de AMPc durante as horas iniciais de MIV foi semelhante ( $P>0,05$ ) para os tratamentos com FSH e MLT tanto entre os horários no mesmo tratamento, como entre os tratamentos a cada horário (figura 9).

**Figura 9. Variação temporal dos níveis de AMPc durante 0 (imaturo, IMT), 1, 2, 3, 6 e 9 horas de MIV nos tratamentos com  $10^{-9}$ M de MLT e FSH em oócitos bovinos.** Dados mostram as médias  $\pm$  EMP e a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® (ANOVA: two-way seguido de pós-teste de Bonferroni) e a significância adotada foi de 5% ( $P>0,05$ ) para quatro repetições analisadas



Os oócitos do grupo imaturo (0 hora) foram coletados logo após a aspiração folicular e obtiveram os níveis iniciais de AMPc de 0,0098 pmol/oócito. Tanto o

tratamento com FSH, quanto com  $10^{-9}$ M de MLT, não diferiram entre os diferentes horários de coleta ( $P>0,05$ ).

Quando comparado os diferentes tratamentos em cada horário específico, também não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P>0,05$ ).

Como os níveis de AMPc não diferiram entre os tratamentos ( $P>0,05$ ), observa-se que a MLT desencadeia o mesmo perfil nos níveis de AMPc, o que seria condizente com os resultados anteriores de uma retomada da meiose em proporções similares às observadas com o FSH. Soares al. (2003) demonstrou que células da granulosa de ratas em proestro e que receberam tratamento com MLT foram capazes de inibir o acúmulo de AMPc nestas células, sugerindo que esta via poderia influenciar a retomada da meiose. Desta forma, acredita-se que a MLT pode atuar nos níveis de AMPc, porém, mais estudos são necessários para compreender melhor esta via de ação.

## 2.6 CONCLUSÕES

A melatonina foi capaz de promover a retomada da meiose, porém não é capaz de estimular sua progressão até o estágio de MII. Na expressão de transcritos nas células da cumulus, FSH influenciou a expressão de antioxidantes sem efeito da MLT. A proteína CDK1 e os níveis de AMPc tiveram perfis similares aos do FSH, sugerindo que a MLT sozinha poderia contribuir para a retomada da meiose atuando sobre a sinalização dependente do MPF e AMPc.

## 2.7 REFERÊNCIAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZÚÑIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*.

**Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 151–158, 2002.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 2014.

ADHIKARI, D. et al. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. **Human Molecular**

- Genetics**, v. 21, n. 11, p. 2476–2484, 1 jun. 2012.
- ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 480–487, jan. 2014.
- ADRIAENS, I. et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2–3, p. 333–343, dez. 2006.
- 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.
- AMIREAULT, P.; DUBÉ, F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 358–365, 2005.
- ANWAR, M. J. et al. An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, maio 2015.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of reproduction**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 1998.
- BABURINA, Y. et al. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a messenger of protection of the mitochondrial function during melatonin treatment in aging. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 94–103, 2017.
- 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.
- BAKHTARI, A.; ROSS, P. J. DPPA3 prevents cytosine hydroxymethylation of the maternal pronucleus and is required for normal development in bovine embryos. **Epigenetics**, v. 9, n. 9, p. 1271–1279, 2014.
- 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.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP

pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693–701, 2007.

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.

BLAHA, M. et al. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated *in vitro* with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 113, 6 dez. 2015.

BOMFIM, M. M. et al. Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts.

**Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 12, p. 1296–1305, 2017.

BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, abr. 2001.

BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Am. Assoc. Bovine Pract.**, n. January 1992, p. 39–43, 1992.

CAIXETA, E. S. et al. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during *in vitro* maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 6, p. 890–899, 2013.

CALDER, M. et al. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 1077–1085, abr. 2005.

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.; SEMIZ, 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.

CAVALLARI, F. D. C. et al. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 180–186, 7 jun. 2019.

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.

CHEN, Y.-C. et al. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380–401, 6 jan. 2013.

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.

COELHO, L. A. et al. Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus-oocyte complex: changes after pinealectomy. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 490–499, 2015.

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.

CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, jun.

2012.

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. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro***. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.

DEGHANI-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.

DORÉE, M.; HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 12, p. 2461–2464, 2002.

DRUMMOND, A. E. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. **Cell and tissue research**, v. 322, n. 1, p. 107–115, out. 2005.

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

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.

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 cytotstatic factor arrest in mouse oocytes. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 2, p. 227–31, 25 abr. 2005.

EL-RAEY, M. et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 4, p. 250–262, 2011.

ELVIN, J. A. et al. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the

- Mammalian Ovary. **Molecular Endocrinology**, 2 jul. 1999.
- 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. et al. **Regulation of mammalian oocyte maturation**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2004.
- 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.
- FARAHAVAR, A. et al. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 17, p. 2579–2583, 2010.
- FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação de oócitos murinos**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2015.
- 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.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.
- 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.
- FUSHII, M.; YAMADA, R.; MIYANO, T. *In vitro* growth of bovine oocytes in oocyte-cumulus cell complexes and the effect of follicle stimulating hormone on the growth of oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, 2020.
- GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245–257, 2013.

- 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.
- GILCHRIST, R. B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R143–R157, nov. 2016.
- 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.
- GUPTA, A. et al. Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases During Meiotic Resumption From Diplotene Arrest in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 7, n. September, p. 1–7, set. 2016.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Baueri, SP: Manole, 2004.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, mar. 2011.
- 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.
- HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; REDDY, A. B. Two decades of circadian time. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 812–9, jun. 2008.
- 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.
- HE, C. et al. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under *in vitro* conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–16, 2016.
- 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.
- HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for

- oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.
- HORNER, K. et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v. 258, n. 2, p. 385–396, 2003.
- 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.
- IBRAHIM, A. A. et al. MitoQ ameliorates testicular damage induced by gamma irradiation in rats: Modulation of mitochondrial apoptosis and steroidogenesis. **Life Sciences**, v. 232, n. July, p. 116655, 2019.
- 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.
- ITOH, M. T. et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 7–13, 1998.
- ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 402–408, 1999.
- IWATA, H. et al. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 424–432, 2011.
- 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.
- JOU, M. J. et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389–403, 2007.
- K. NA, J. KIM, J. LEE, T. YOON, K. CHA, D. L. Effect of Melatonin of Mouse GV Oocytes and apoptosis of Cummulus 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.
- KOMNINO, E. R. et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

- KOTLER, M. et al. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **Journal of pineal research**, v. 24, n. 2, p. 83–89, 1998.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13\_suppl, p. E14–E23, 10 out. 2004.
- KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292–302, 1 fev. 2000.
- KUBIAK, J. Z. et al. On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 2–3, p. 201–217, 2008.
- LEE, C. J. et al. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 2, p. 126–132, 2001.
- LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **The Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 4, p. 603–613, 13 maio 2002.
- LEÓN, J. et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 1, p. 1–9, 2005.
- LERNER, A. B. et al. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587–2587, maio 1958.
- LERNER, A. B.; CASE, J. D.; HEINZELMAN, R. V. STRUCTURE OF MELATONIN 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 22, p. 6084–6085, nov. 1959.
- 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.
- LI, S. H. et al. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2015.
- LIANG, S. et al. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1821, 26 out. 2016.
- 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.

LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 369–378, mar. 2003.

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>>

MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 6 jan. 2013.

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.

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.

MARQUES, T. C. et al. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. n. August 2016, p. 226–236, 2018.

MASCIARELLI, S.; HORNER, K.; LIU, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 196–205, 2004.

MAURIZ, J. L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of pineal research**, v. 54, n. 1, p. 1–14, jan. 2013.

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.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791–799, 2005.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian

- tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. **Journal of Pineal Research**, v. 15, n. 2, p. 59–69, 1993.
- MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; RAGGI, M. A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 21–28, ago. 2012.
- MONIRUZZAMAN, M.; HASAN, K. N.; MAITRA, S. K. Melatonin actions on ovaprim (synthetic GnRH and domperidone)-induced oocyte maturation in carp. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 285–296, 2016.
- MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in sertoli cells. **Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 133–145, 2000.
- NAKAMURA, Y. et al. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 1012–1016, 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.
- NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869–1878, 1 jun. 2009.
- O'MALLEY, Y. et al. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39766–39775, 2006.
- OH, J. S. et al. Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 5, p. 1081–5, 2013.
- PANDEY, A. N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521–8, 15 out. 2010.
- PANDEY, A. N.; CHAUBE, S. K. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured *in vitro*. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 240, n. 1, p. 15–25, 2015.
- 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.
- PANG, Y. et al. Beneficial role of melatonin in protecting mammalian gametes and embryos from oxidative damage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2320–2335, 2018a.
- PANG, Y. et al. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 4, p. 648–660, abr. 2018b.
- 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.
- PARK, H. J. et al. Melatonin improves oocyte maturation and mitochondrial functions by reducing bisphenol a-derived superoxide in porcine oocytes *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.
- PASQUARIELLO, R. et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 4, p. 971–981, 2019.
- 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.
- PEREIRA, G. R. et al. Relationship of post-weaning growth and age at puberty in crossbred beef heifers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 413–420, maio 2017.
- PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v. 33, n. 14–26, p. 1–13, 2015.
- PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, abr. 2001.
- PRASAD, S. et al. Changes in signal molecules and maturation promoting factor levels associate with spontaneous resumption of meiosis in rat oocytes. **Cell Biology International**, v. 39, n. 6, p. 759–769, 2015.
- PROCHAZKA, R. et al. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 425–435, 1 abr. 2011.

- QUETGLAS, M. D. et al. Effect of Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibition on Expression, Localization and Activity of Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) in Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 1074–1081, 2010.
- REIS, A. et al. APCcdh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. **Nat Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 539–540, 2006.
- REITER, R. et al. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7231–7272, 2 abr. 2013a.
- REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654–664, ago. 1993.
- REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 444–458, nov. 2000.
- REITER, R. J. et al. **Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions.** **Advances in medical sciences**, 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-39749108884&partnerID=tZOtx3y1>>
- 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. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: The requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 269–274, 2011.
- 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. et al. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 321–8, ago. 2014.
- REITER, R. J.; TAN, D.-X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127–51, jan. 2010.
- REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70–81, 2016.
- REVEL, F. G. et al. Melatonin controls seasonal breeding by a network of

- hypothalamic targets. **Neuroendocrinology**, v. 90, n. 1, p. 1–14, 2009.
- 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, 2002a.
- 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, 2002b.
- ROBERT, C. et al. Quantification of Cyclin B1 and p34 cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biology of reproduction**, v. 67, p. 1456–1464, 2002.
- RODRIGUES-CUNHA, M. C. et al. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1685–1694, out. 2016.
- 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.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–86, 2000.
- SAKAGUCHI, K. et al. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 674–82, 17 jan. 2013.
- 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**, v. 10, n. 1, p. 103, 2012.
- SANTIQUET, N. W. et al. Transporting cumulus complexes using novel meiotic arresting conditions permits maintenance of oocyte developmental competence. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 8, p. 1079–1086, 2017.
- 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.
- SHUHAIBAR, L. C. et al. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5527–5532, 28 abr. 2015.

SILVA, E. et al. Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice.

**Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 6, p. 975–983, 2015.

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.

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, ago. 2010.

TAKADA, L. et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 124–127, 2012.

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

TAMURA, H. et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 135–141, nov. 1998.

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

TAN, D.-X. et al. Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 2, p. 113–121, set.

2012.

TAN, D. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

TAN, D.; CHEN, L.; POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr j**, 1993.

TAN, D. X. et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 607–623, 2010.

TAN, D. X. et al. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 2, p. 127–138, 2013.

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. 341–354, 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.

TIWARI, M. et al. Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 123–129, jan. 2018.

TIWARI, M.; CHAUBE, S. K. Moderate increase of reactive oxygen species triggers meiotic resumption in rat follicular oocytes. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 42, n. 5, p. 536–546, 2016.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in

- mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, jun. 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.
- TSANTARLIOTOU, M. P. et al. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 1s, p. 488–489, 3 abr. 2007.
- VACCARI, S. et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 595–604, 1 set. 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.
- VENEGAS, C. et al. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 217–227, 2012.
- 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, 2014a.
- WANG, F. et al. Melatonin Improves the Quality of *In vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93641, 2 abr. 2014b.
- WANG, S. et al. The effects of melatonin on bovine uniparental embryos development *in vitro* and the hormone secretion of COCs. **PeerJ**, v. 2017, n. 7, p. 1–23, 2017.
- 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.
- WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, n. 2, p. 711–717, 1986.
- 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.
- WOO, M. M. M. et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789–4797, 2001.
- WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. SUPPL.1, p. 38–43, set. 2013.
- WUNSCH, A.; SONNTAG, B.; SIMONI, M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. **Annales d'Endocrinologie**, v. 68, n. 2–3, p. 160–166, jun. 2007.
- 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, M. et al. Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 27 nov. 2017.
- YANG, S. G. et al. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- 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.
- YUAN, Y.; WHEELER, M. B.; KRISHER, R. L. Disrupted Redox Homeostasis and Aberrant Redox Gene Expression in Porcine Oocytes Contribute to Decreased Developmental Competence<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–10, 2012.
- ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, p. 131–146, 2014.
- ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in

mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 1 mar. 2002.

ZHAO, X.-M. et al. Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 23, n. 04, p. 525–536, 29 ago. 2015.

ZHAO, X.-M. et al. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. e12445, jan. 2018.

ZHAO, X. M. et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 2, p. 132–141, 2016.

ZHAO, Y. et al. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 1, p. 79–88, ago. 2013.



## **Artigo 2**

---

### 3. ARTIGO 2

#### **Antioxidant roles of melatonin on bovine cumulus-oocyte complexes and embryos produced *in vitro***

**Fernandes, H.<sup>1,2</sup>; Goheen, B.<sup>2</sup>; Rajput, S. K.<sup>2</sup>; Aaltonen, J.<sup>3</sup>; Herrick, J.<sup>3</sup>.; Leal, C.L.V.<sup>1</sup>; Krisher, R.L.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of Sao Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Colorado Center for Reproductive Medicine, Lone Tree, CO, USA.

<sup>3</sup> Omaha's Henry Doorly Zoo & Aquarium, Omaha, NE, USA.

#### **3.1 ABSTRACT**

In this study, we proposed to investigate the effects of MLT alone or in comparison to Mitoquinol (MQ) and MitoTEMPO (MT) during IVM on oocyte maturation and during IVC on embryo development and quality. Antioxidant and mitochondrial function effects on oocytes and embryos were assessed as well. In experiment 1, cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 24 h for IVM with MLT and/or associations with gonadotropins: 1) NC (negative control; no gonadotrophins); 2) FSH; 3) FSH+MLT; 4) FSH+LH and 5) FSH+LH+MLT. Oocytes (OO) were evaluated for maturation rate (metaphase II - MII), Mitochondrial Membrane Potential (MMP), ROS levels, mitochondrial DNA copy number (mtDNA) and transcript abundance for PRDX6, SOD1, SOD2, CAT and NRF2 was assessed for oocytes and cumulus cells. In experiment 2, presumptive zygotes were cultivated with MLT (0, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-9</sup> and 10<sup>-7</sup>M) and embryos evaluated for cleavage rate, blastocyst development and quality (ICM/TE), mtDNA copy number and transcript abundance for TXNRD1, GLRX2, NRF2, GCLM, GCLC, OCT4, BMP15 and GLUT1). In the third experiment, COCs were *in vitro* matured in three treatments: no antioxidant (control), MLT or Mitoquinol plus MitoTeMPO. Oocytes were evaluated for MII, MMP, ROS, mtDNA and transcripts abundance were assessed as in the experiment 1. In experiment 4, IVC included three treatments: no antioxidant, MLT or Mitoquinol plus MitoTeMPO. Embryos were evaluated for cleavage rate, blastocysts development and quality (ICM/TE), mtDNA and transcript abundance for the same genes used in experiment 2. In experiment 5, four treatments were tested with MQ+MT: IVM/IVC - no antioxidants, IVM+/IVC - antioxidants added only during IVM, IVM/IVC+ - added only during

IVC and IVM+/IVC+ - added in IVM and IVC. Embryos were evaluated for cleavage rate, blastocyst development and quality (ICM/TE), mtDNA and transcripts abundance as in experiment 2. In experiment 1, only FSH+LH increased mitochondrial activity measured by MMP ( $6819063 \text{ FI} \pm 663739$  vs  $5442059 \text{ FI} \pm 245097$  for negative control (NC),  $p < 0.05$ ) and also increased NRF2 transcripts when compared to NC group in oocytes ( $p < 0.05$ ). In the second experiment, no difference was found in the assessed performed. For the third experiment, MLT increased the mtDNA copy ( $511113 \pm 24203$  vs  $400654 \pm 22715$  number for control,  $p < 0.05$ ) and the association of MQ+MT increased the MMP ( $8942093 \text{ FI} \pm 1103751$  vs  $3950851 \text{ FI} \pm 321507$ ,  $p < 0.05$ ) in oocytes when compared to FSH control ( $p < 0.05$ ). In the fourth experiment, MQ+MT increased TXNRD1 transcripts in embryos when compared to control ( $p < 0.05$ ). In the last experiment, mtDNA copy was increased in embryos treated with MQ+MT during both IVM and IVC compared to control ( $2327.8 \pm 175.1$  vs  $1816.3 \pm 92.8$ ,  $p < 0.05$ ). For all the others unlisted results, no difference was found ( $p > 0.05$ ). Thus, we concluded that MLT failed to improve the oocyte maturation, development and quality of bovine *in vitro* produced embryos and when compared with MQ and MT antioxidants, the combined treatment with mitochondrial antioxidants showed better response.

**Keywords:** N-acetyl-5-methoxytryptamine; mitochondria; Mitoquinol; MitoTEMPO; oxidative stress; embryonic quality; *Bos taurus*.

### 3.2 INTRODUCTION

The *in vitro* production (IVP) of embryos is a strategic tool in mammalian assisted reproductive technology (ART) which enables to obtain animals of high genetic merit in a short period of time. However, although widely used, IVP embryos are still of lower quality in comparison with *in vivo*. Some studies have suggested that the developmental rates and quality of IVP embryos would be closely related not only to the intrinsic quality of oocytes but also to *in vitro* culture conditions (LONERGAN et al., 2002; RIZOS et al., 2002b, 2002a). Thus, improving the efficiency of both *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) would ensure a higher production of higher quality embryos.

ROS generation is a phenomenon that causes oxidative stress and consequently, harms the development of *in vitro* oocytes and subsequent embryonic development (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009). The normal intracellular metabolism in mitochondria, through

oxidative phosphorylation, is a major site of energy production of the cell and consequently results in greater production of ROS (FINKEL; HOLBROOK, 2000; ZHANG; ZHANG, 2014). Furthermore, *in vitro* conditions generate additional oxidative stress to the cell due a higher oxygen exposition when compared to *in vivo* production (TATEMOTO et al., 2004).

Several studies have reported that the addition of melatonin (MLT) to IVP media causes positive effects such as improvement in nuclear and cytoplasmic maturation, cleavage, blastocyst and hatching rates in bovine (KOMNINOY et al., 2016; PANG et al., 2018b; WANG et al., 2014a, 2014b; ZHAO et al., 2018). MLT is an indolamine synthesized primarily in pineal gland and controls the circadian cycle and the reproductive seasonality in some species (REITER et al., 2009; TAMURA et al., 2009). MLT can act as a powerful antioxidant agent due to its direct elimination of toxic oxygen derivatives and its ability to reduce the formation of reactive oxygen species (ROS) preventing damage to all macromolecules and cell compartments (HARDELAND et al., 2011; REITER et al., 2000; TAN et al., 2002).

In bovine, MLT has been detected in follicular fluid (COELHO et al., 2013; TIAN et al., 2014) and its receptors are located in reproductive tissues as oocytes and cumulus cells (SAMPAIO et al., 2012; WANG et al., 2014a). In this way, as an antioxidant, MLT protects the nuclear and mitochondrial DNA, fatty acids and proteins from damage induced by free radicals (REITER et al., 2000). It is also reported that MLT protects cumulus cells from nuclear fragmentation and increases the expression of antioxidant enzymes as well as decreases ROS levels in bovine oocytes (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016).

MLT can be produced by all cells of mammalian tissues and different concentrations can be maintained in different subcellular compartments (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; MENENDEZ-PELAEZ; REITER, 1993). Due to its amphiphilic characteristic, extracellular MLT can penetrate cell membranes, easily reaching the subcellular structures (BABURINA et al., 2017). Furthermore, high levels of MLT produced by mitochondria are used to protect this cellular organelle against oxidative stress and preserve its physiological functions (TAN et al., 2013).

Likewise, others antioxidants are being used in IVP in order to ameliorate the embryo production rate. As example, Mitoquinol is a mitochondria-targeted antioxidant that reduces ROS production in bovine aortic endothelial cell mitochondria (O'MALLEY et al., 2006). Also, its antioxidant/anti-apoptotic effects was shown when tested in rat testicular gamma irradiated cells (IBRAHIM et al., 2019). MitoTEMPO is a another antioxidant, specific scavenger of mitochondrial superoxide and it showed improvement in blastocyst development in porcine

embryos *in vitro* (YANG et al., 2018). In addition, positive effects of MitoTEMPO and MLT in induced ROS production oocytes help to improve the *in vitro* maturation in porcine.

Therefore, we investigated the effects of MLT alone and in comparison to Mitoquinol and MitoTEMPO during IVM on oocyte maturation and IVC on the development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. Antioxidant effects of MLT as well as its effects on mitochondrial function were also assessed in oocytes and embryos.

### 3.3 MATERIAL AND METHODS

This study was performed at the National Foundation for Fertility Research - Colorado Center for Reproductive Medicine (CCRM), Lone Tree, Colorado – USA. All reagents used in this project were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri – USA), when not, specified.

#### 3.3.1 Experiments

##### **Experiment 1: Effect of MLT in combination with gonadotrophins during IVM on maturation, ROS levels and mitochondrial function in oocytes and antioxidant enzymes transcripts in cumulus cells**

In this experiment,  $10^{-9}$ M MLT was used in different associations with gonadotropins (FSH - 0.1  $\mu$ g/mL and LH - 0.25  $\mu$ g/mL) to define the best support for oocyte maturation to be used in the embryonic development experiments. COCs (n=50 treatment/replicate) were *in vitro* matured for 24h in five treatments: FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (no gonadotrophin and MLT; NC). At the end of IVM, the oocytes were evaluated for maturation rate (metaphase II - MII), ROS levels, mtDNA copy number, mitochondrial membrane potential (MMP). Transcript abundance for antioxidant genes (SOD1, SOD2, CAT and NFR2) were assessed in cumulus cells by qPCR. This experiment was carried out in four replicates with a total of 968 oocytes.

##### **Experiment 2: Effect of MLT during IVC on embryo development and quality**

COCs were matured in control BO-IVM (IVF Bioscience; a commercial maturation medium) and submitted to IVF. The zygotes generated were subjected to IVC with MLT (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M) for 7 days and then were evaluated for cleavage and blastocyst rates, cell count number assay (ICM/TE) and mtDNA copy number. This experiment was carried out in four replicates with a total of 438 embryos.

**Experiment 3: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVM on oocyte maturation, ROS levels, and mitochondrial function**

In this experiment, COCs were *in vitro* matured in three treatments: FSH (control; no antioxidant added), FSH+MLT ( $10^{-9}$ M) and FSH in association with mitochondrial antioxidants - Mitoquinol (0,025 $\mu$ M; MQ) + MitoTEMPO (2  $\mu$ M; MT). After 24 h IVM, oocytes were evaluated for maturation rate, ROS levels, mtDNA copy number, mitochondrial membrane potential (MMP), and transcript abundance for antioxidant genes (SOD1, SOD2, CAT and NFR2) were assessed in oocytes and cumulus cells, by qPCR. This experiment was carried out in five replicates with a total of 797 oocytes.

**Experiment 4: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVC on embryo development and quality**

Zygotes generated after IVM (BO-IVM) were subjected to IVC with three treatments: no antioxidant (control), MLT ( $10^{-11}$ M) or MQ+MT (0,025 $\mu$ M + 2  $\mu$ M – as used in experiment 3) for 7 days. Embryos were evaluated for cleavage and blastocyst rates, cell count number assay (ICM/TE), mtDNA copy number and transcripts for the same genes used in experiment 2. This experiment was carried out in four replicates with a total of 287 embryos.

**Experiment 5: Effects of MQ+MT treatment during IVM and IVC**

Four treatments were tested with MQ+MT: IVM/IVC - no antioxidants, IVM+/IVC - antioxidants added only during IVM, IVM/IVC+ - added only during IVC and IVM+/IVC+ - added in IVM and IVC. Embryos were evaluated for cleavage and blastocyst rates and mtDNA copy number. This experiment was carried out in five replicates with a total of 432 embryos.

***3.3.2 Oocyte collection***

Bovine ovaries were collected from a commercial slaughterhouse and transported to the laboratory in warm sterile saline solution (0.9% NaCl). In the laboratory, the ovaries were washed in sterile saline solution with penicillin-streptomycin (50UI and 50ug/mL, respectively; 15140122; Gibco™) and quickly in 70% ethanol. Follicles with 2 to 8 mm were aspirated and all the contents were deposited in 50 mL tubes and decanted for 15 minutes at 38°C. Also, COCs were acquired from DeSoto Biosciences, Inc. (Seymour, TN, USA), when necessary. In both cases, only grade I and II COCs were used for the experiments.

### ***3.3.3 In vitro maturation***

For the maturation experiments, the *in vitro* maturation (IVM) of selected bovine COCs were cultured in bovine oocyte maturation medium (bOMM) exactly as previously described (SANTIQUET et al., 2017). Groups of 50 COCs were randomly distributed into 5 well plates (16004u; Vitrolife) with 400 uL of medium per well and incubated for 22-24 h at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air. FSH (0.1 µg/mL) and/or LH (0.25 µg/mL) and antioxidants (MLT, M5250; MitoTEMPO - 2 µM, SML0737; Mitoquinol - 0,025µM, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) in specified concentrations were supplemented to bOMM medium according to treatments groups. For the IVM used in the embryo production experiments, 50 COCs were matured in 2 mL of equilibrated BO-IVM medium (IVF Bioscience, Falmouth, Cornwall, UK) in sealed tubes gassed with 5% CO<sub>2</sub> in air and maintained at ~38.5°C in a portable incubator during overnight shipment to our laboratory (22-24h).

Bovine COCs were cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air during pre-IVM shipment, and 7.5% CO<sub>2</sub> in air for subsequent IVF followed by 7.5% CO<sub>2</sub> and 6.5% O<sub>2</sub> for embryo culture. The gas concentrations used for embryo culture (7.5% CO<sub>2</sub> and 6.5% O<sub>2</sub>) are increased to compensate for the elevation of our laboratory (1830 m above sea level) and are equivalent to 6% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> at sea level. All incubations were conducted 38.5°C.

### ***3.3.4 Assessment of oocyte nuclear maturation***

To determine nuclear status, oocytes were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), washed three times in PBS with 0.5% BSA (180542; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) and mounted on a glass slide in ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (P36971; Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Oocytes were visualized using a fluorescent microscope (Olympus BX52) and classified into two groups: metaphase I (MI) stage oocytes, corresponding to oocytes that did resume meiosis but did not complete nuclear maturation; and metaphase II (MII) stage oocytes, corresponding to oocytes that matured successfully.

### ***3.3.5 In vitro fertilization and embryo culture***

Cryopreserved bull spermatozoa were thawed and separated on a 45/90% discontinuous gradient (PureSperm®100, Nidacon, Mölndal, Sweden). Spermatozoa were washed, counted, and diluted to a final concentration of  $2 \times 10^6$  spermatozoa/mL in the fertilization well plates (Nunc™ 4-Well Dishes; 144444; Thermo Fisher Scientific). Fifty COCs were added to the 400µL well of BO-IVF medium (IVF Bioscience, Falmouth, Cornwall, UK) under 400 uL of

mineral oil (MI500; Spectrum Chemical), and coincubated with spermatozoa ( $2 \times 10^6$ ) for 20 h. After fertilization, oocytes were denuded by vortexing and cultured in IVC 1 medium (50 presumptive zygotes per 400  $\mu$ L well). Approximately 96 h (D4) post insemination, zygotes were checked for cleavage. Embryos with more than four cells were moved to IVC 2 medium and after 7 days of culture (D7; 174 h), the development to the blastocyst stage was assessed. Both IVC 1 and 2 medium were made as described previously (SANTIQUET et al., 2017) and, when mentioned, specific drugs were supplemented to these media for treatments groups.

### ***3.3.6 Detection of ROS levels in oocytes***

ROS levels in oocytes were measured using the CellROX™ Green (C10444; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, oocytes from each treatment were collected at 22-24h post *in vitro* maturation, denuded and washed three times in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) supplemented with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP; P0930). Oocytes were then incubated with 5  $\mu$ M CellROX™ Green in DPBS+PVP for 30 min at 38.5°C. Subsequently, oocytes were washed three times in DPBS+PVP and placed on glass slides with ProLong™ Diamond with DAPI and covered with coverslips. Digital photographs were obtained 5 sec after excitation of oocytes at 480 nm and emission at 510 nm on a fluorescent microscope. Intensity of florescence in each oocyte was measured by ImageJ version 1.43u software, which indicated the ROS levels in each oocyte.

### ***3.3.7 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number***

Single oocytes or embryos were collected as one sample (five samples per treatment/replicate). Total genomic DNA was isolated from single samples and the mtDNA copy number was determined using real-time PCR. For DNA extraction, samples were incubated in X-Tract™ DNA Extraction Buffer (QE09050; Lucigen, Middleton, WI, USA) at 65°C for 15 min, followed by heating at 98°C for 5 min. The lysate was diluted in Milli Q water to a final volume of 40  $\mu$ L. Primers specific for the coding region of mtDNA (12S – Forward: 5-GGGCTACATTCTCTACACCAAG-3 and Reverse: 5-GTGCTTCATGGCCTAATTCAAC-3) were used for the quantification of the mtDNA copy number, whereas GAPDH primers (Forward: 5- ATATAGCTGCCTGACCTTTCTG-3 and Reverse: 5- GGATTGGGAGCAACAGGTATTA-3) as specific housekeeping gene were used for standardization. Relative mtDNA copy number was calculated as  $2^{*\Delta C_t}$  method.



### 3.3.8 Mitochondrial membrane potential (MMP)

Oocytes previously matured were stained for the mitochondrial MitoTracker® Orange CMTMRos (M7510; Invitrogen), a probe that selectively stains active mitochondria (oxidized) and is retained during cell fixation to determine the mitochondrial membrane potential. A working solution of MitoTracker® Orange CMTMRos at 250 nM was prepared according to manufacturer's specifications and used to stain oocytes for 30 min at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air. After staining, oocytes were rinsed in PBS with 0.1% PVP before fixation in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. Around 10 oocytes per treatment were placed on a glass slide in ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI and covered with coverslips. The slides were stored at 4°C until confocal microscopy was performed. Imaging was made using Olympus Fluoview Version 4.12 (setting X4, laser sensitivity: DAPI (30%), rhod-2 (10%), and objective 60 x). The pictures obtained were evaluated for fluorescence intensity in each oocyte as measured by ImageJ version 1.43u software.

### 3.3.9 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Cumulus cells and oocytes obtained separately from COCs after 22-24h IVM and, blastocysts collected on Day 7 of culture were frozen at -80°C in DPBS+PVP. RNA was extracted using the PicoPure™ RNA Isolation Kit (KIT0204; Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with on-column DNase treatment (Qiagen, Valencia, CA, USA). cDNA was synthesized using iScript™ cDNA Synthesis Kit (1708891; BIO-RAD, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Primers were designed using Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) from bovine sequences available in the GenBank database and their sequences are in the table 1 below. The transcript abundance in cumulus cells and oocytes for antioxidant enzymes (*PRDX6*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT* and *NRF2*) were analyzed. Also, for embryos, transcripts for oxidative stress (*TXNRD1*, *GLRX2*), *NRF2* pathway (*NRF2*, *GCLM*), glutathione pathway (*GCLC*) and quality markers (*OCT4*, *BMP15*, *GLUT1*) were analyzed. Real time Quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on cDNA samples in duplicate. The target genes were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and an Applied Biosystems ViiA 7 Real Time PCR system as described previously (SILVA et al., 2015; YUAN; WHEELER; KRISHER, 2012). As endogenous control of the reaction, the constitutive gene GAPDH was used.

**Table 1. Primers sequences used for gene expression analysis.**

Genes	Sequence (5'–3')	GenBank Accession #	Fragment size (bp)
<b>Endogenous gene</b>			
<b>GAPDH</b>	F 5' TCA TCA TCT CTG CAC CTT CTG 3'	NM_001034034.2	154
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	R 5' ATG CCA AAG TGG TCA TGG A 3'		
<b>Target genes</b>			
<b>CAT</b>	F 5' CTGGGACCCAACCTATCTCCA3'	NM_001035386.2	148
<i>catalase</i>	R 5' GAT GCTCGGGAGCACTAAAG 3'		
<b>NRF2</b>	F 5' TCC AAC CTT TGT CGT CAT CA 3'	NM_001011678.2	174
<i>nuclear factor, erythroid 2 like 2</i>	R 5' TTG CCC GTA GCT CAT CTC TT 3'		
<b>TXNRD1</b>	F 5' GTGTGAATGTGGGTTGCATACC3'	NM_174625.5	100
<i>thioredoxin reductase 1</i>	R 5' TCCTCGACGTTCCACCCATA 3'		
<b>GLRX2</b>	F 5' CCC GCA CTA AGA CCA TGT A 3'	NM_001040523.2	153
<i>glutaredoxin 2</i>	R 5' CTG CAT TTC CCA AAG ATG A 3'		
<b>PRDX6</b>	F 5'CCA CTG GCA GGA ACT TTG AT 3'	NM_174643.1	137
<i>peroxiredoxin 6</i>	R 5' TTC CTC TTC AGG GAT GGT TG 3'		
<b>SOD1</b>	F 5' ACACAAGGCTGTACCAGTGC 3'	NM_174615.2	105
<i>superoxide dismutase 1</i>	R 5' TGTCACATTGCCAGGTCTC 3'		
<b>SOD2</b>	F 5' GGA TCC CCT GCA AGG AAC AA 3'	NM_201527.2	110
<i>superoxide dismutase 2</i>	R 5' TGG CCT TCA GAT AAT CGG GC 3'		
<b>GCLM</b>	F 5'TGGAGCAGCTGTATCAGTGG 3'	NM_001038143.1	198
<i>glutamate-cysteine ligase modifier subunit</i>	R 5' GAATGTCAGGGATGCTCTCC3'		
<b>GCLC</b>	F 5'CAA CCC TTT GGA GAC CAG AA 3'	NM_001083674.1	113
<i>glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>	R 5'CCG TTT CCT CAT GTT GTC CT 3'		
<b>OCT4</b>	F 5' AACGGCAGATAGTCGTTTGG 3'	NM_174580.3	106
<i>octamer-binding transcription factor 4</i>	R 5' CTCCTAAAGCAGAAGAGGATCAC 3'		
<b>BMP15</b>	F 5' CACATACAGACCCTGGACTTTC 3'	NM_001031752.1	106
<i>bone morphogenetic protein 15</i>	R 5' GGTGGGAATGAGTTAGGTGAAG 3'		
<b>GLUT1</b>	F 5'ATC CTC ATT GCC GTG GTG CT 3'	NM_174602.2	134
<i>glucose transporter 1</i>	R 5' ACG ATG CCA GAG CCG ATG GT3'		

\* F: forward sequence; R: reverse sequence

### 3.3.10. Differential staining of embryo cells (ICM/TE)

Quantification of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells was performed on expanded, hatching or fully hatched blastocysts at D7 of development. Blastocysts were

fixed in 4% paraformaldehyde, washed three times in PBS+PVP and incubated with antibodies. Antibodies against SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2; AN579; rabbit monoclonal, anti-human; Biogenex, Fremont, CA, USA) to detect ICM cells and CDX2 (caudal type homeobox 2) (MU392A-UC; mouse monoclonal anti-human; Biogenex, Fremont, CA, USA) to detect TE cells were used, as described previously (BAKHTARI; ROSS, 2014). Stained embryos were analyzed and had their cells counted using an Olympus BX52 microscope and MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software.

### ***3.3.11 Statistical analysis***

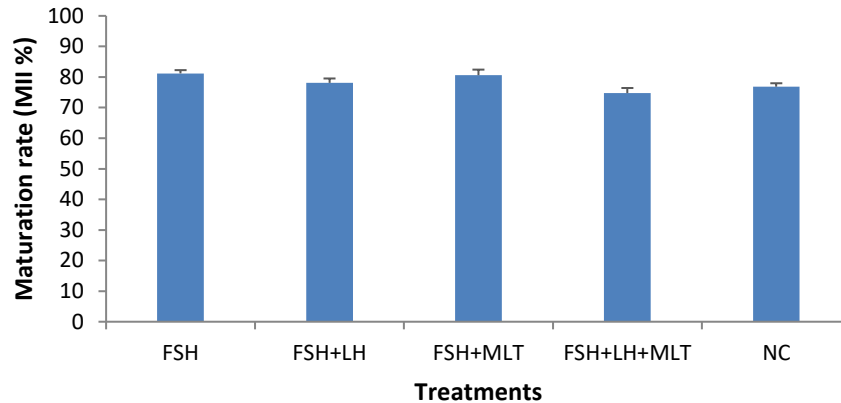
Data were analyzed using GraphPad Prism® software 8.0.1 version. For maturation, blastocyst development and cell number, ROS, mtDNA and MMP, one-way ANOVA was performed with treatment as a fixed factor. A Tukey multiple comparison test was used. When necessary, Duncan test was applied to evidence differences between treatments. For qPCR, relative expression ratios were obtained by the comparative threshold cycle method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). One-way ANOVA were performed with treatment as a fixed factor. A Bonferroni post-test was used. Differences were determined to be significant when  $p < 0.05$ .

## **3.4. RESULTS**

### ***3.4.1 Experiment 1: Effect of MLT in combination with gonadotropins during IVM on maturation, ROS levels and mitochondrial function in oocytes and antioxidant enzymes transcripts in oocytes and cumulus cells***

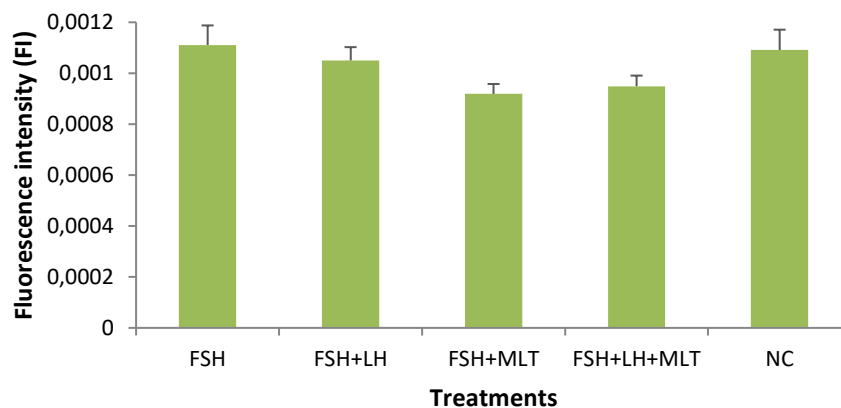
In this first experiment, treatments were assessed to define the best support for oocyte maturation to be used in the embryonic development experiments. The results for the maturation rates showed that treatments FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and NC ( $78.1\% \pm 1.4$ ,  $80.6\% \pm 1.8$ ,  $74.7\% \pm 1.7$  and  $76.8\% \pm 1.1$ , respectively) did not differ ( $p > 0.05$ ) when compared to control FSH ( $81.2\% \pm 1.1$ ), as shown in figure 1.

**Figure 1. Maturation rate in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates,  $p < 0.05$ ).



Next, the same treatments were assessed for reactive oxygen species (ROS) levels, measured as fluorescence intensity (FI). Measurements showed that FSH+MLT treatment ( $0.00092 \text{ FI} \pm 0.00003$ ) had the lowest observed value but did not differ ( $p > 0.05$ ) from the FSH ( $0.00111 \text{ FI} \pm 0.00007$ ) and other treatments ( $0.00105 \text{ FI} \pm 0.00005$ ,  $0.00095 \text{ FI} \pm 0.00004$  and  $0.00109 \text{ FI} \pm 0.00007$  for FSH+LH, FSH+LH+MLT and NC, respectively) as shown in figure 2.

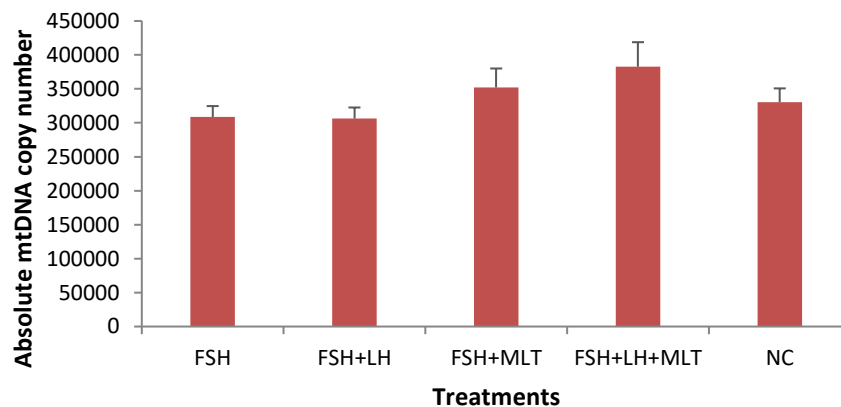
**Figure 2. Reactive oxygen species (ROS) levels in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For the mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, the same treatments ( $n=20$  oocytes/treatment) were evaluated by qPCR technique. The treatments showed  $308591 \pm 16068$ ,  $306220 \pm 16381$ ,  $352099 \pm 27937$ ,  $382701 \pm 36062$  and  $330472 \pm 20244$  mtDNA copies

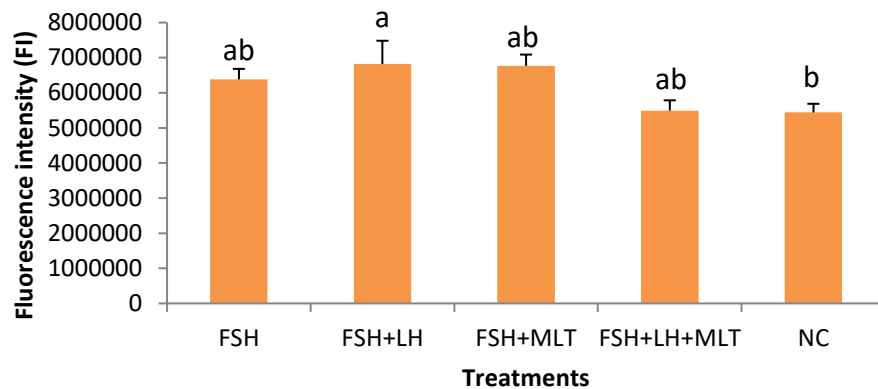
for FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and NC, respectively, however there was no difference between the groups ( $p>0.05$ , figure 3).

**Figure 3. Mitochondrial DNA quantification of bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p<0.05$ .



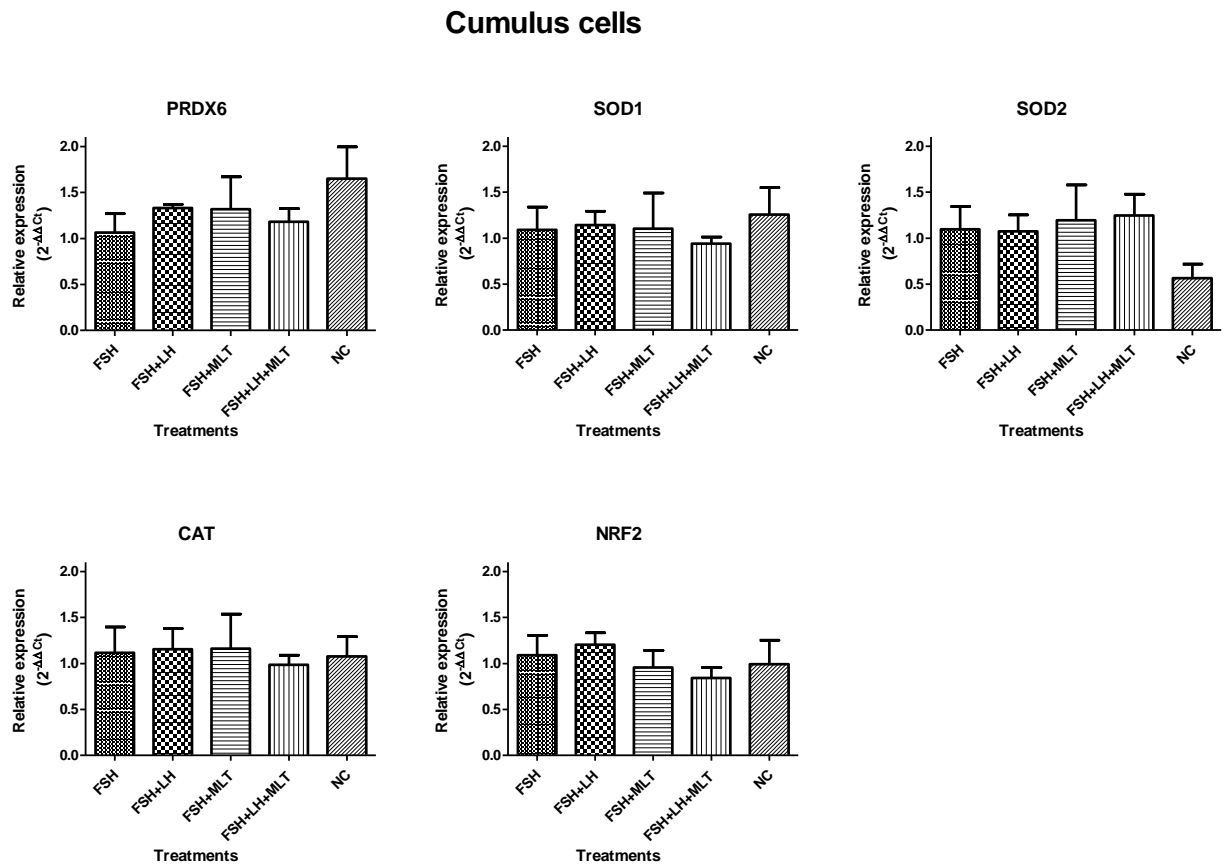
To assess mitochondrial activity, oocytes ( $n=30$  oocytes/treatment) had their fluorescence intensity evaluated by ImageJ software. At 24h IVM, FSH+LH group showed the highest value ( $6819063 \text{ FI} \pm 663739$ ,  $p<0.05$ ) when compared to not treated NC group ( $5442059 \text{ FI} \pm 245097$ ). For the other treatments, no difference was found for FSH+LH+MLT and FSH+MLT ( $5492593 \text{ FI} \pm 293111$  and  $6768667 \text{ FI} \pm 320082$ , respectively) when compared to control FSH ( $6382222 \text{ FI} \pm 299022$ ,  $p>0.05$ ) as observed in figure 4.

**Figure 4. Mitochondrial membrane potential (MMP) in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Dunnett test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



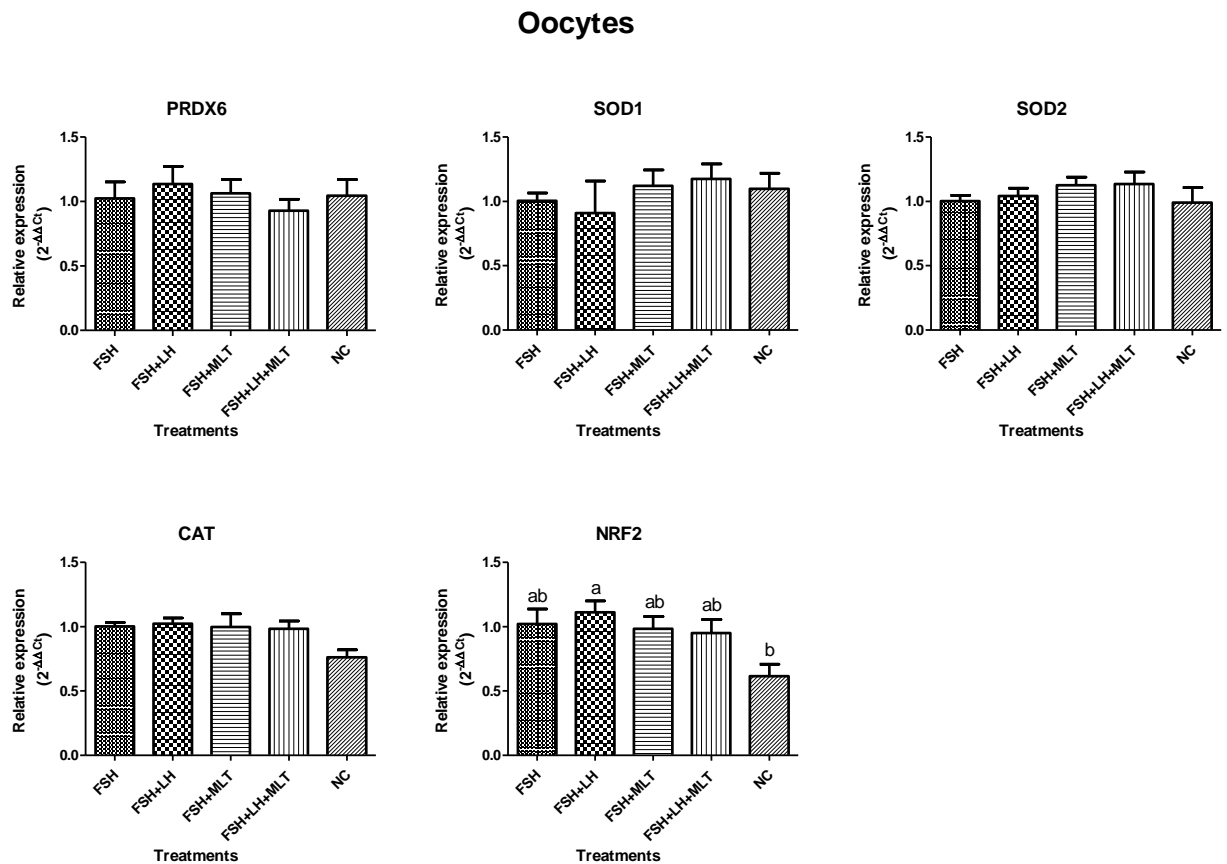
For gene expression analysis, the results showed no difference ( $p > 0.05$ ) between the treatments used for any of the transcripts studied in cumulus cells (figure 5).

**Figure 5.** Graphical representation of relative expression of transcripts related to antioxidant genes (*PRDX6*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT* and *NRF2*) of bovine cumulus cells treated *in vitro* for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC). Data show the means  $\pm$  SEM (4 replicates) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and were analyzed with One-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For oocytes, the results showed difference ( $p < 0.05$ ) for the *NRF2* gene between FSH+LH and NC groups. For the other genes, none of the treatments affected ( $p > 0.05$ ) the transcript abundance in oocytes (figure 6).

**Figure 6.** Graphical representation of relative expression of transcripts related to antioxidant genes (*PRDX6*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT* and *NRF2*) of bovine oocytes treated *in vitro* for 24 h with FSH, FSH+LH, FSH+MLT, FSH+LH+MLT and negative control (NC). Data show the means  $\pm$  SEM (4 replicates) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and were analyzed with One-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



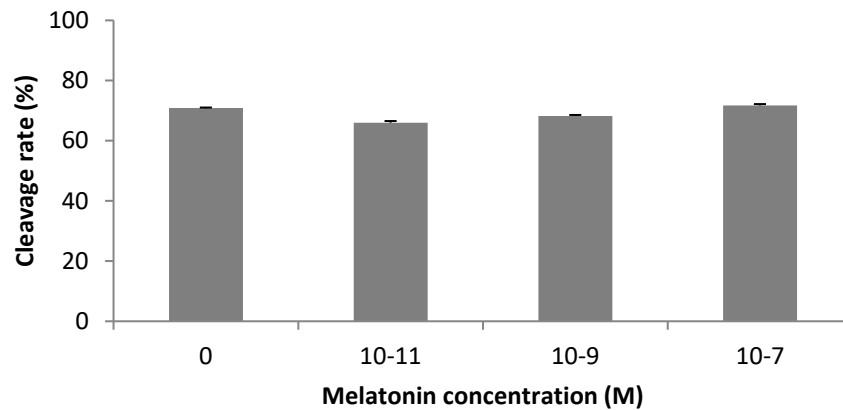
### 3.4.2. Experiment 2: Effect of MLT during IVC on embryo development and quality

Initially, the best treatment selected in the experiment 1 would be used for COCs maturation, however, there was no statistical difference for any of the trials performed. Thus, we decided to use BO-IVM medium for a common maturation.

For cleavage rate, analyzed at day 3 of IVC, the treatments with MLT ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$  M with  $66.0\% \pm 0.5$ ,  $68.3\% \pm 0.3$  and  $71.7\% \pm 0.4$ , respectively) showed no difference ( $p > 0.05$ ) when compared to control (0M MLT;  $70.8\% \pm 0.2$ ), as observed in figure 7.

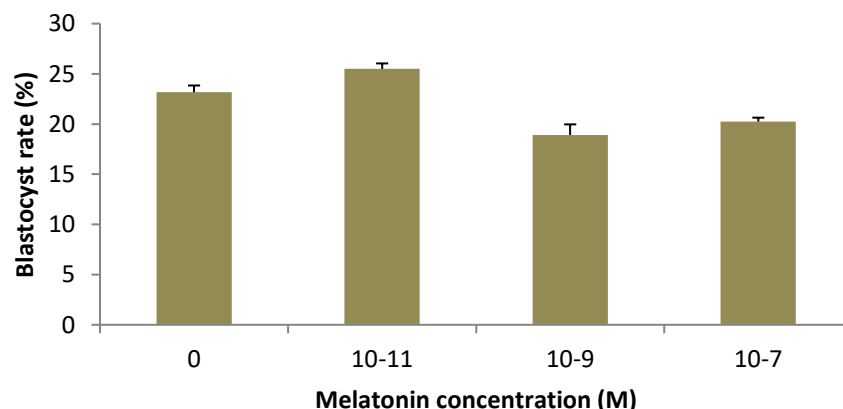


**Figure 7. Cleavage rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 3 days (72 hours) with MLT (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For blastocyst rate, the group treated with the lowest MLT concentration ( $10^{-11}$ M) showed higher production ( $25.5\% \pm 0.5$ ) when compared to the control (0M MLT),  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M MLT ( $23.2\% \pm 0.7$ ,  $18.9\% \pm 1.1$  and  $20.2\% \pm 0.4$ , respectively), but again, no difference was detected ( $p > 0.05$ , figure 8).

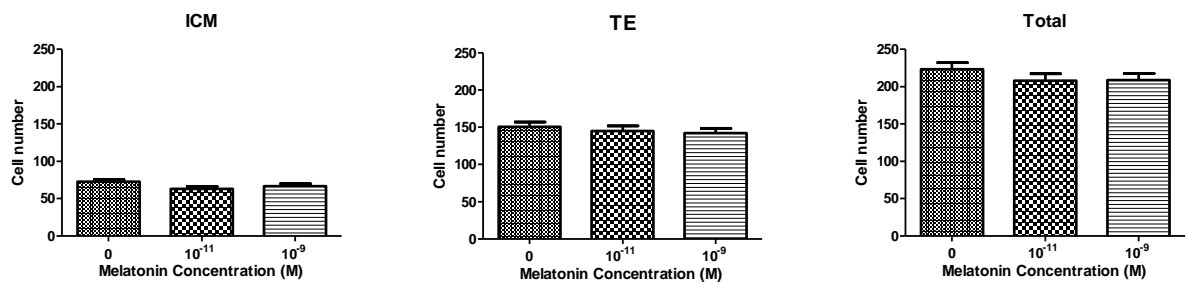
**Figure 8. Embryo production rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 7 days (168 hours) with MLT (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (6 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For the cell number assay, the ICM cells in the control group (0M MLT;  $72.6 \pm 3.2$ ) had no difference ( $p > 0.05$ ) when compared with the other treatments ( $63.2 \pm 3.2$  and  $66.7 \pm 3.4$ , respectively for  $10^{-11}$  and  $10^{-9}$ M MLT). Both TE and total number cells showed no difference among groups ( $p > 0.05$ ): TE cells were  $150.8 \pm 6.2$ ,  $144.8 \pm 7.0$ ,  $142.2 \pm 6.4$  and total cells

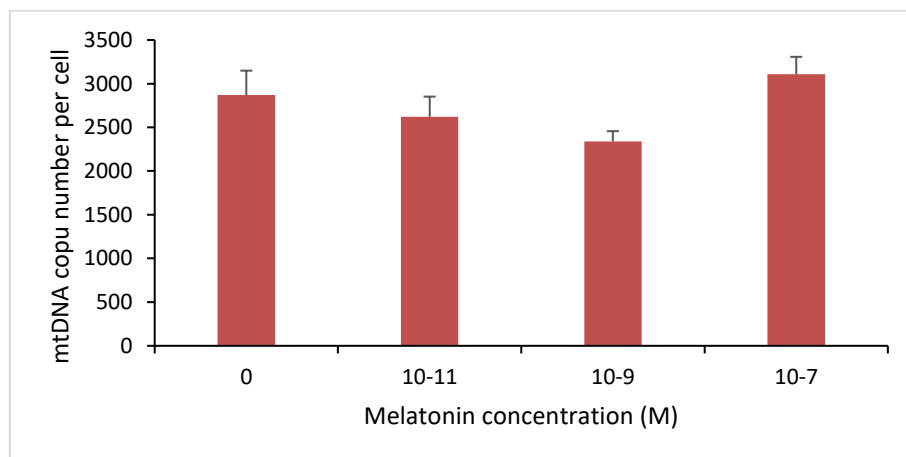
numbers were  $223.4 \pm 8.7$ ,  $208.0 \pm 9.2$ ,  $208.9 \pm 8.7$ , both of them for 0,  $10^{-11}$  and  $10^{-9}$ M MLT, respectively (figure 9).

**Figure 9. Cell count number assay in bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) with MLT (0,  $10^{-11}$  and  $10^{-9}$ M).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (6 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



The mtDNA copy number assay was performed for single blastocysts ( $n=20$  group) collected in 4 different replicates. The treatments showed  $2869 \pm 281$ ,  $2621 \pm 231$ ,  $2340 \pm 116$  and  $3107 \pm 200$  mtDNA copy number for 0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M MLT, respectively, however, no statistical difference was found ( $p > 0.05$ ) as shown in the figure 10 below:

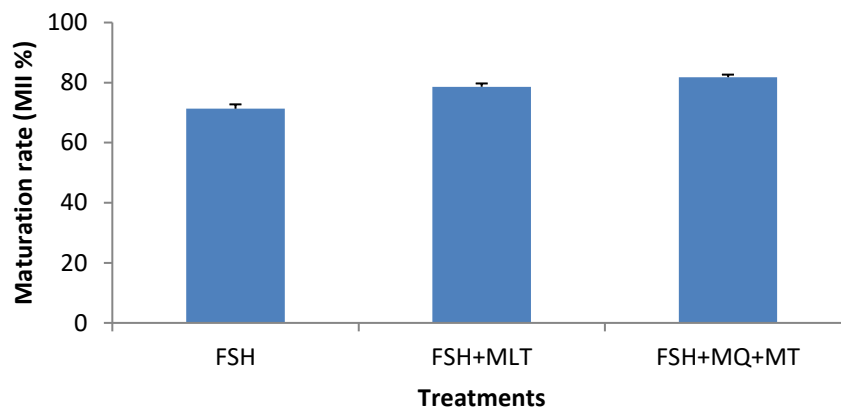
**Figure 10. Mitochondrial DNA quantification in bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) with MLT (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$ M).** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



### 3.4.3. Experiment 3: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVM on oocyte maturation, ROS levels, and mitochondrial function

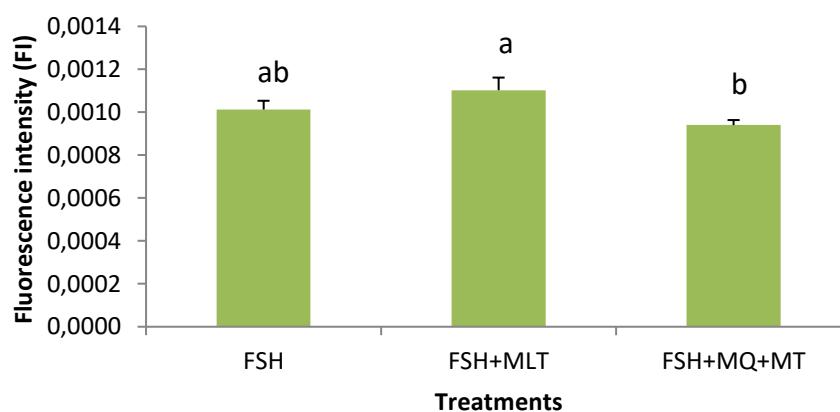
Since MLT does not presented the expect effect, it was assessed and compared with a combination of mitochondrial antioxidants which had not been studied in cattle but with some positive results in porcine and rats (IBRAHIM et al., 2019; YANG et al., 2018). Thus, in this experiment, its use was compared on IVM and the results for nuclear maturation, evaluated after 24 hours of *in vitro* maturation, did not differ between the treatments ( $p>0.05$ ) presenting values of  $71.3\% \pm 1.4$ ,  $78.6\% \pm 1.1$  and  $81.8\% \pm 0.8$  for FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT, respectively (figure 11).

**Figure 11. Maturation rate in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 hours for FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p<0.05$ .



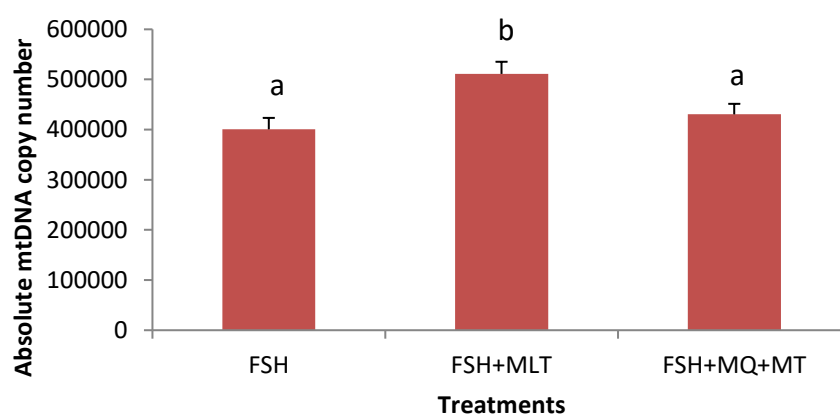
When ROS levels were analyzed, significant difference ( $p<0.05$ ) was observed between FSH+MLT ( $0.00110 \text{ FI} \pm 0.00006$ ) and FSH+MQ+MT ( $0.00094 \text{ FI} \pm 0.00002$ ) treatments, but when compared to FSH control ( $0.00101 \text{ FI} \pm 0.00004$ ,  $p>0.05$ ), no difference was found as represented in figure 12 below.

**Figure 12. Reactive oxygen species (ROS) levels in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



The amount of mtDNA copy present in each oocyte was evaluated by qPCR. Samples were individually collected with total  $n = 25$  oocytes/treatment in 5 replicates. The group FSH+MLT showed the highest amount of mtDNA ( $511113 \pm 24203$ ) when compared to the control FSH ( $400654 \pm 22715$ ) and FSH+MQ+MT ( $430480 \pm 20952$ ) treatments with  $p < 0.05$  as shown in figure 13.

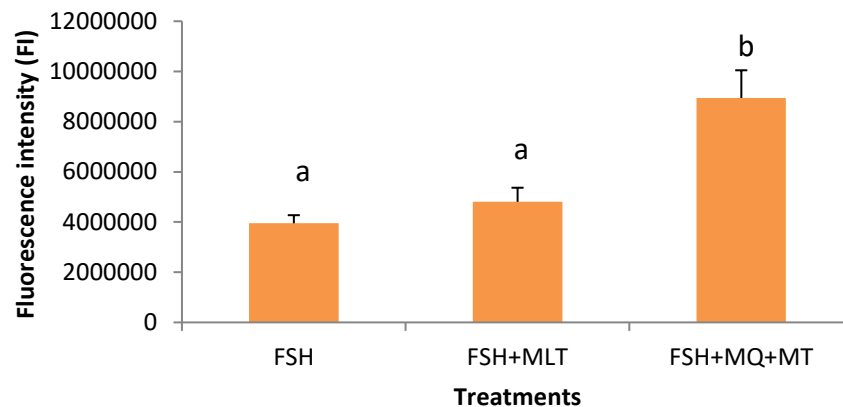
**Figure 13. Mitochondrial DNA quantification of bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For MMP, a total of  $n = 40$  oocytes in each treatment was used to measure the fluorescence intensity. FSH+MQ+MT group showed a higher fluorescence ( $8942093 \text{ FI} \pm$

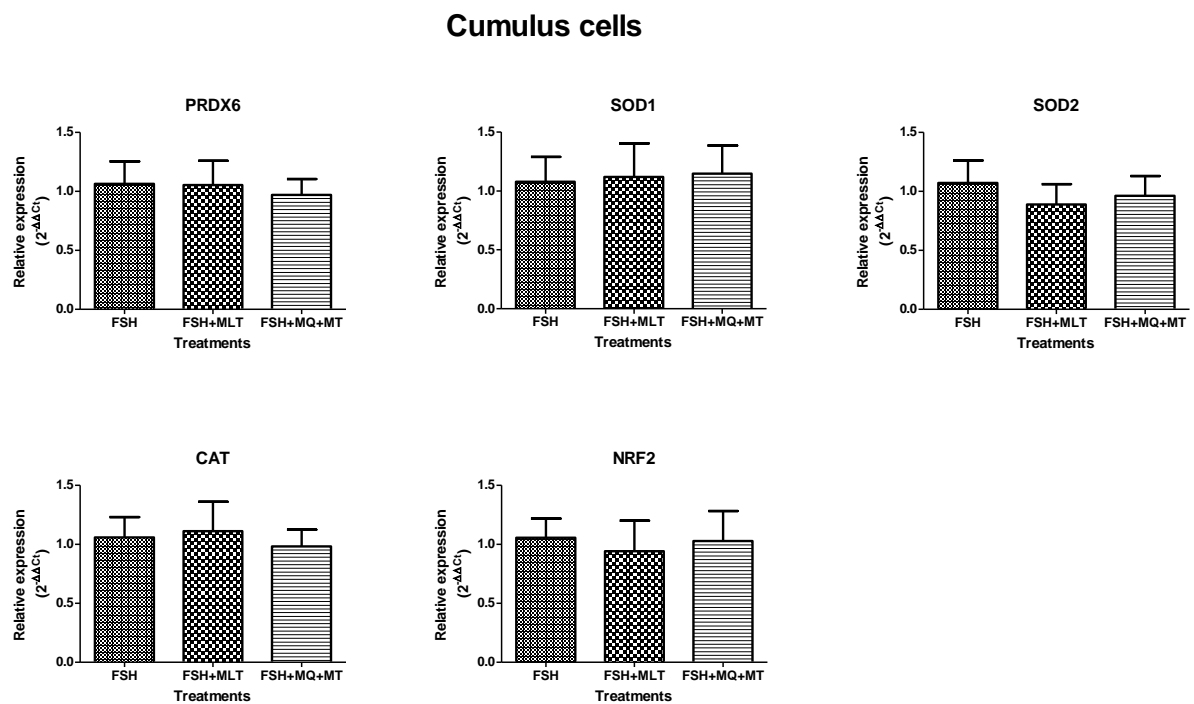
1103751,  $p < 0.05$ ) when compared to control FSH and FSH+MLT ( $3950851 \text{ FI} \pm 321507$  and  $4803333 \text{ FI} \pm 562541$ , respectively), as shown in figure 14.

**Figure 14. Mitochondrial membrane potential (MMP) in bovine oocytes *in vitro* matured for 24 h with FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .

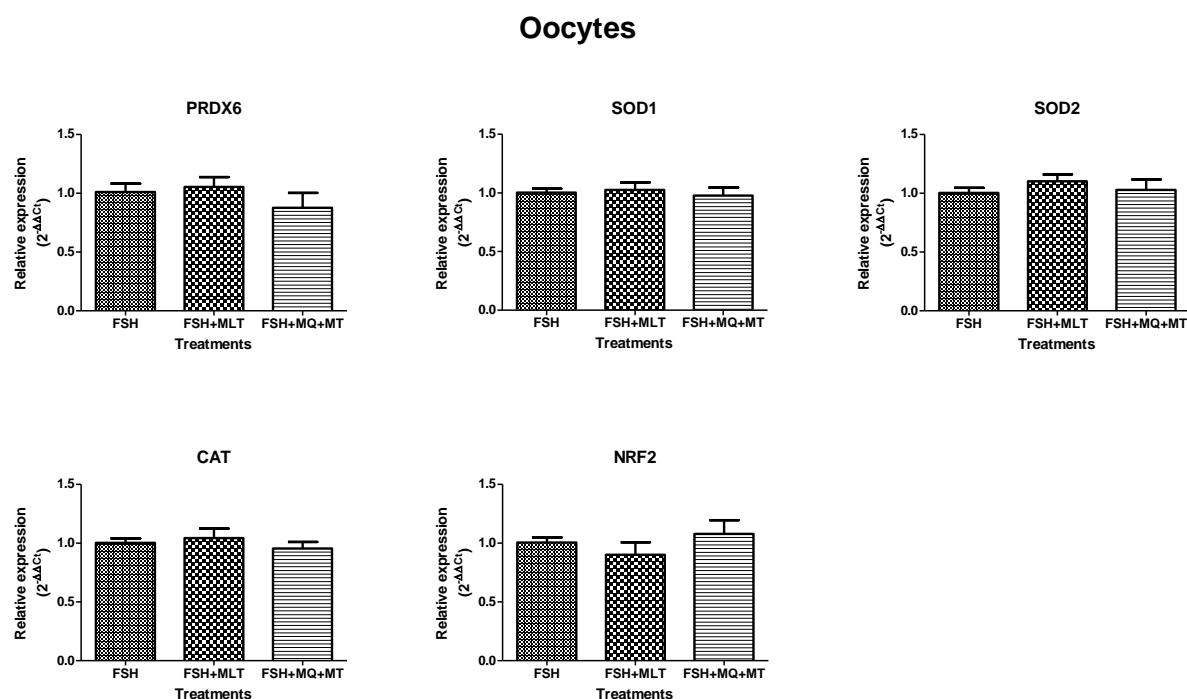


For gene expression, the results showed that MLT as well as mitochondrial antioxidants (MQ+MT) were not able to alter ( $p > 0.05$ ) the pattern of transcripts abundance for cumulus cells and oocytes when compared with FSH control during 24 h of *in vitro* maturation. Data are shown in figure 15 for cumulus cells and figure 16 for oocytes.

**Figure 15.** Graphical representation of relative expression of transcripts related to antioxidant genes (PRDX6, SOD1, SOD2, CAT and NRF2) of bovine cumulus cells treated *in vitro* for 24 h with FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT. Data show the means  $\pm$  SEM (5 replicates) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and were analyzed with One-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



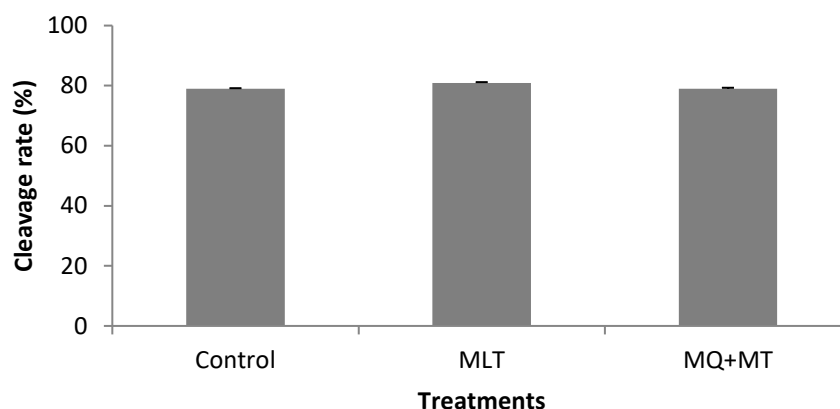
**Figure 16.** Graphical representation of relative expression of transcripts related to antioxidant genes (*PRDX6*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT* and *NRF2*) of bovine oocytes treated *in vitro* for 24 h with FSH, FSH+MLT and FSH+MQ+MT. Data show the means  $\pm$  SEM (5 replicates) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and were analyzed with One-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



#### ***3.4.4. Experiment 4: Effects of MLT and mitochondrial antioxidant during IVC on embryo development and quality***

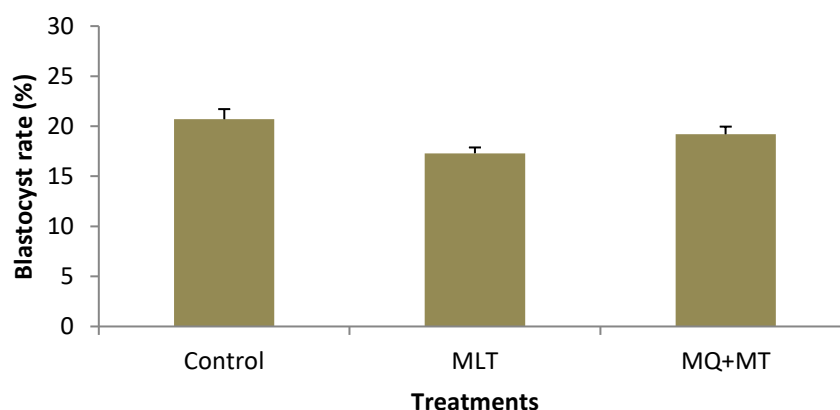
After 3 days of IVC, the cleavage rate was evaluated and no difference ( $p > 0.05$ ) was found between the control, MLT and MQ+MT with  $78.9\% \pm 0.2$ ,  $80.9\% \pm 0.3$  and  $79.0\% \pm 0.3$ , respectively. Data from 4 replicates are shown in figure 17.

**Figure 17. Cleavage rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 3 days (72 h) for Control, MLT and MQ+MT treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



The blastocysts produced after 7 days of IVC were evaluated and the control group had no difference ( $20.7\% \pm 1.0$ ,  $p > 0.05$ ) when compared with MLT ( $17.5\% \pm 0.6$ ) and MQ+MT ( $19.2\% \pm 0.8$ ) as shown in figure 18.

**Figure 18. Embryo production rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 7 days (168 hours) for Control, MLT and MQ+MT treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .

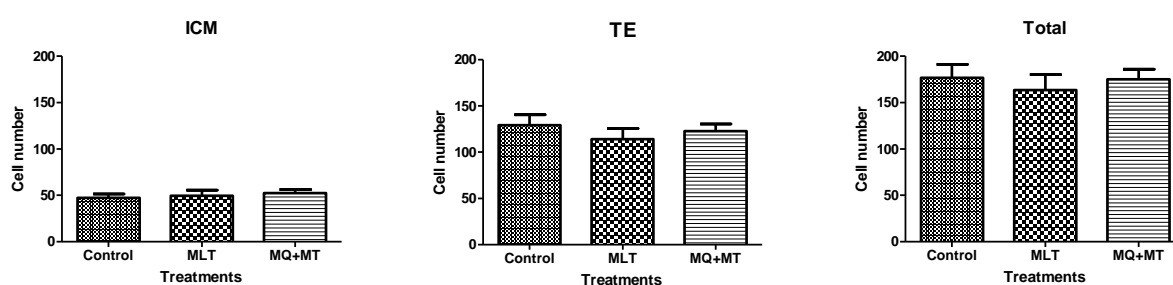


For the cell number assay regarding ICM cells, MQ+MT treatment showed  $52.4 \pm 4.0$  cells when compared to control ( $47.3 \pm 4.2$ ) and MLT ( $49.6 \pm 6.2$ ), with no statistical difference was found ( $p > 0.05$ ). For TE cells, the treatments did not differ between them with  $129.2 \pm 11.4$ ,  $113.9 \pm 11.7$  and  $122.8 \pm 7.6$  for control, MLT and MQ+MT, respectively ( $p < 0.05$ ). For total



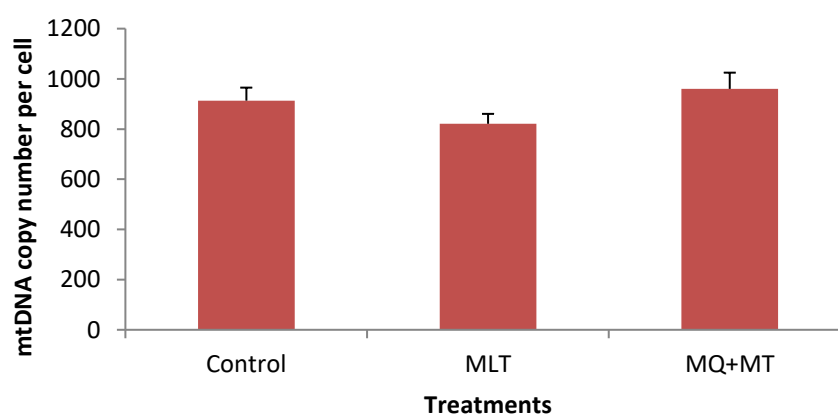
cell number, as ICM plus TE, the treatments showed no difference ( $p < 0.05$ ) with  $176.5 \pm 14.7$ ,  $163.4 \pm 16.9$  and  $175.2 \pm 10.7$  for control, MLT and MQ+MT, respectively (figure 19).

**Figure 19. Cell count number assay in bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) for Control, MLT and MQ+MT treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



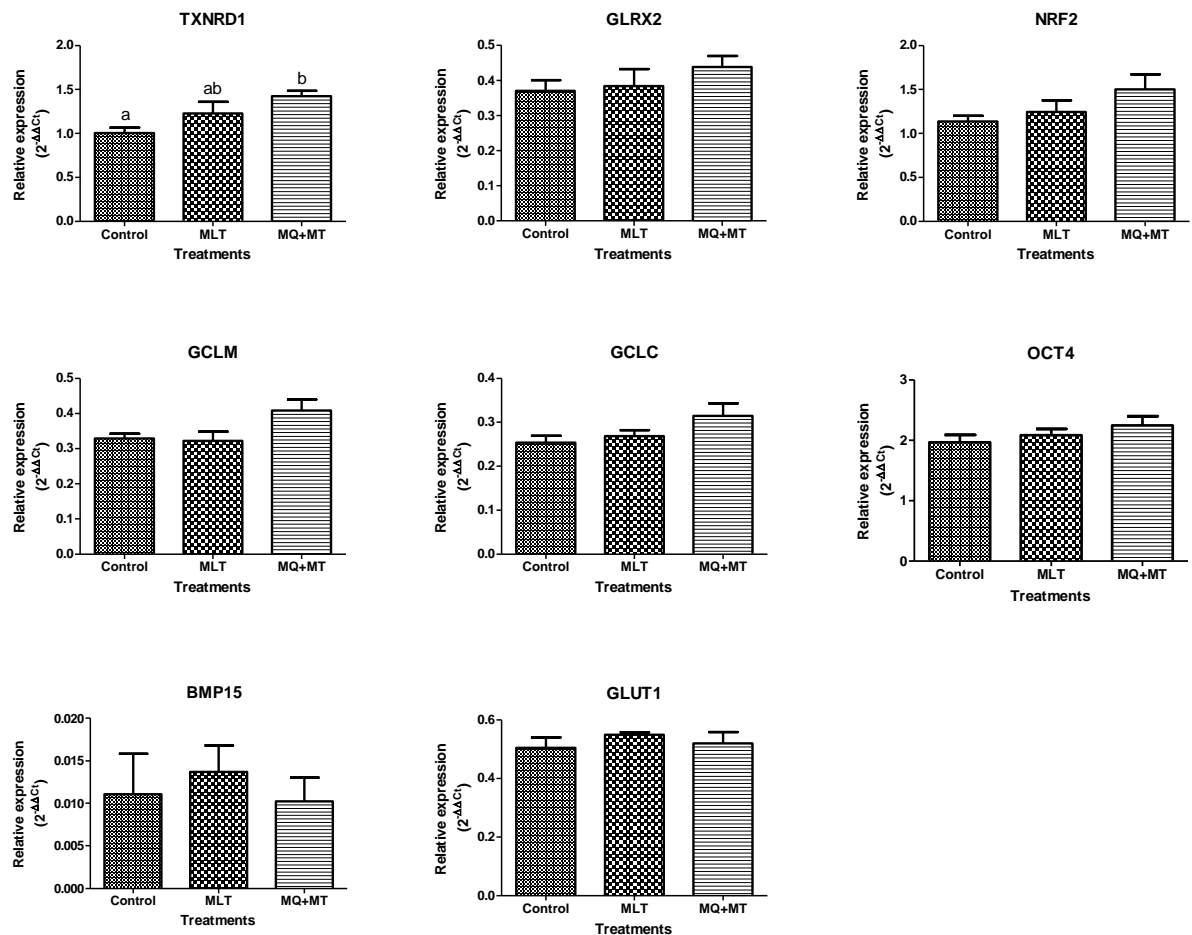
The relative quantification of mtDNA copy number assay was performed for single blastocysts frozen after 7 days of IVC. There were 20 samples for each group, collected in 4 different replicates. As seen in figure 20, no difference was observed between control, MLT and MQ+MT treatments with  $913.2 \pm 51.8$ ,  $820 \pm 39.4$  and  $960 \pm 64.6$  copies, respectively ( $p < 0.05$ ).

**Figure 20. Mitochondrial DNA quantification in bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) for control, MLT and MQ+MT treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



For gene expression, only one gene related with oxidative stress showed a change in the expression pattern. The MQ+MT treatment induced a higher expression for the TXNRD1 gene when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). For all the other genes studied, no difference was observed ( $p > 0.05$ ) between the treatments used as shown in figure 21.

**Figure 21. Graphical representation of relative expression of transcripts related to oxidative stress (*TXNRD1* and *GLRX2*); *NRF2* pathway (*NFR2* and *GCLM*); glutathione pathway (*GCLC*) and quality markers (*OCT4*, *BMP15*, *GLUT1*) for bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) for control, MLT and MQ+MT treatments. Data show the means  $\pm$  SEM (4 replicates) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method and were analyzed with One-way ANOVA followed by Bonferroni test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .**

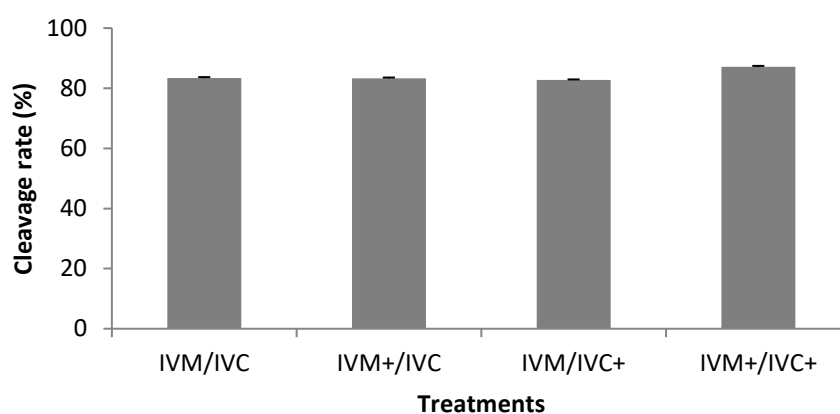


### 3.4.5. Experiment 5: Effects of MQ+MT treatment during IVM and IVC

For this last experiment, both MQ+MT was used in the same concentrations described previously, for IVM and/or IVC.

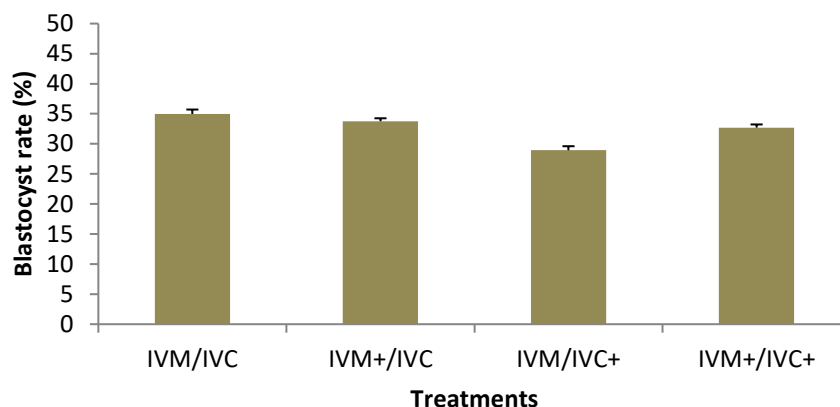
The results for cleavage rate showed no difference ( $p < 0.05$ ) between the treatments with  $83.4\% \pm 0.3$ ,  $83.3\% \pm 0.2$ ,  $82.8\% \pm 0.2$  and  $87.1\% \pm 0.3$  for IVM/IVC, IVM+/IVC, IVM/IVC+ and IVM+/IVC+, respectively (figure 22).

**Figure 22. Cleavage rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 3 days (72 h) for IVM/IVC, IVM+/IVC, IVM/IVC+ and IVM+/IVC+ treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (5 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



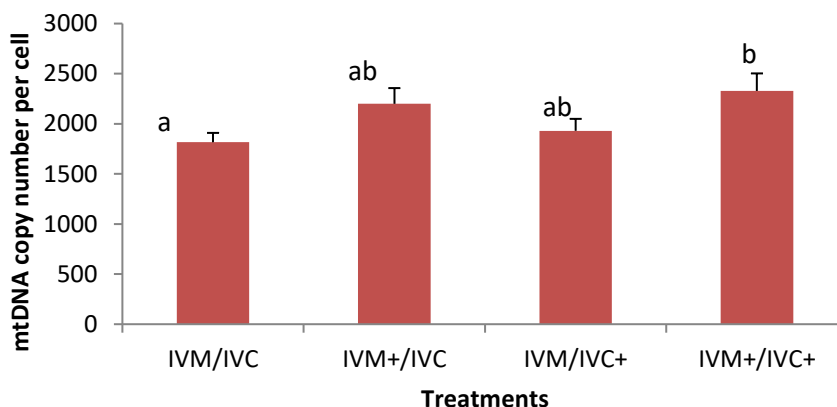
For the blastocyst rate, the IVM/IVC group showed no difference ( $35.0\% \pm 0.7$ ,  $p > 0.05$ ) when compared with other treatments ( $33.8\% \pm 0.5$ ,  $28.9\% \pm 0.7$  and  $32.7\% \pm 0.5$  for IVM+/IVC, IVM/IVC+ and IVM+/IVC+, respectively, as shown in figure 23).

**Figure 23. Embryo production rate in bovine embryos *in vitro* cultured for 7 days (168 hours) for IVM/IVC, IVM+/IVC, IVM/IVC+ and IVM+/IVC+ treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



Single blastocysts were frozen after 7 days of IVC and analyzed for mtDNA copy number assay. There were 20 samples for each group, collected in 4 different replicates. In this analysis, when the antioxidants were used in both culture periods (IVM+/IVC+;  $2327.8 \pm 175.1$ ), the mtDNA copy number increased in embryos compared to untreated control (IVM/IVC;  $1816.3 \pm 92.8$ ,  $p < 0.05$ ). For the other treatments (IVM+/IVC C and IVM/IVC+ with  $2199.3 \pm 157.2$  and  $1930.1 \pm 119$ , respectively,  $p > 0.05$ ) no difference was found as observed in figure 24.

**Figure 24. Mitochondrial DNA quantification in bovine blastocysts after 7 days of IVC (168 hours) for IVM/IVC, IVM+/IVC, IVM/IVC+ and IVM+/IVC+ treatments.** Data show the means  $\pm$  SEM for the different treatments (4 replicates) and were analyzed with One-way ANOVA followed by Tukey test using GraphPad Prism software. The significant difference was set at  $p < 0.05$ .



### 3.5. DISCUSSION

In the current study, we have evaluated the effect of melatonin alone or compared to association of gonadotrophins, Mitoquinol and MitoTEMPO during IVM on oocyte maturation and during IVC on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. Antioxidant effects of MLT as well as its effects on mitochondrial function were also assessed in oocytes and embryos.

The results showed in the first experiment demonstrate that MLT was not able to change any of the parameters analyzed during the IVM of bovine cumulus-oocyte complexes under the conditions studied. Positive effects of MLT during the IVM have been reported (PANG et al., 2018b; TIAN et al., 2014; ZHAO et al., 2018), but also no effect was found during IVM (TAKADA et al., 2010, 2012; TSANTARLIOTOU et al., 2007). This variability of results between studies could be associated to the unknown origin of the ovaries obtained at the slaughterhouse.

For mitochondrial activity, Marques et al. (2018) observed no effect for MMP when MLT ( $10^{-9}$ M) was added during IVM at the same concentration used in our study, in agreement with our observations. However, FSH+LH had an increase when compared to NC, but did not differ to control FSH. This could be related to the absence of hormones and consequent lower mitochondrial activity.

NRF2 pathway is involved in oxidative stress response and can activate antioxidant enzymes (MA, 2013). Rodrigues-cunha et al. (2016) observed an increase on the expression of antioxidant enzyme (SOD2) when FSH was used during the IVM for bovine cumulus cells. In our results, although the antioxidants enzymes studied did not differ in cumulus cells as well as in oocytes, a similar treatment with FSH+LH increased NRF2 transcripts when compared with non-treated NC group. There seems to be relationship between these gonadotropins and expression of antioxidant genes, and further studies are needed to investigate this possible action.

When MLT was studied during IVC in the second experiment, no effect was observed for the embryo production, cell number and mtDNA levels. Although Marques et al. (2018) had observed an improvement on the cleavage and blastocyst rates when MLT was used in IVC, no difference was found in the total cell number as observed in the present study. In addition, no difference was found either in the blastocyst production for embryos treated with MLT in porcine (NAKANO; KATO; TSUNODA, 2012). Thus, these results obtained in our study suggest that the beneficial effects of MLT on the embryonic development may depend on the culture conditions.

In the third experiment, MLT was compared against an association of MQ and MT, which are mitochondria-targeted antioxidants and showed positive effects during *in vitro* production (IBRAHIM et al., 2019; PARK et al., 2018; YANG et al., 2018). MLT did not change the maturation rate, ROS levels, MMP and gene expression for cumulus cells and oocytes after 24h of IVM when compared to control. However, MLT was able to increase the mtDNA copy number and MQ+MT increased MMP.

During IVM, mtDNA number increases due mainly to the higher energy requirements necessary to ensure the acquisition of developmental competence, directly related with embryonic development, being a useful indicator of oocyte quality (IWATA et al., 2011). Also, the addition of antioxidants during IVM helps aged oocytes to increased mtDNA levels (PASQUARIELLO et al., 2019). In accordance with our data, MLT was able to increase mtDNA levels (HE et al., 2016), confirming the improvement in the quality of oocytes regarding this parameter.

Studies have reported that MLT can reduce ROS production during IVM in bovine (CAVALLARI et al., 2019; RODRIGUES-CUNHA et al., 2016) and some of them at the same concentration used in this experiment ( $10^{-9}$ M)(PANG et al., 2018b; YANG et al., 2017; ZHAO et al., 2016). When we used a combination of other two antioxidants (MQ+MT) they were able to decrease de ROS production relative to MLT, but not to control. MLT and MQ+MT are

antioxidants with powerful free radical scavenging activities and protect the cell from oxidative stress (REITER et al., 2014; YANG et al., 2018), but in our studied conditions, the association of MQ+MT appeared to better decrease ROS levels, so they could be more effective than MLT. There are no studies directly comparing these antioxidants, so more studies are needed to better characterize their possible roles during *in vitro* culture.

Regarding MMP, some studies indicated that MMP was increased when oocytes were treated with MLT (LIANG et al., 2016; MARQUES et al., 2018; ZHAO et al., 2016), stimulating a higher mitochondrial activity. Although MLT increased the mtDNA number, it did not significantly increase MMP in this study. On the other hand, MQ+MT antioxidants increased the mitochondrial activity, suggesting superior potential to support the subsequent fertilization and embryo development. Thus, when all the results were analyzed together, MQ+MT showed better potential to benefit oocytes during IVM than MLT for the conditions studied in this experiment.

For the fourth experiment and as observed in experiment 2, MLT did not affect embryo production, cell number and mtDNA levels, but neither did MQ+MT. The only effect was of MQ+MT that increased transcripts for *TXNRD1* in embryos in comparison with the control group. *TXNRD1* is an antioxidant enzyme that contributes to the cell redox homeostasis and has been used as quality marker in many species (BOMFIM et al., 2017; SILVA et al., 2015; YUAN; WHEELER; KRISHER, 2012). When MQ+MT was compared to control, so this effect could indicate that this treatment could be more effective against the oxidative stress during IVC.

In the last experiment, the combined association of MQ+MT during IVM and/or IVC did not affect cleavage and embryo production, but increased the mtDNA copy when compared to control with no treatment along the IVP. The increase of mtDNA copy for the group treated with MQ+MT during both IVM and IVC suggests its superior quality when compared to the non-treated control.

### **3.6. CONCLUSION**

Under the conditions studied, MLT and MQ+MT failed to improve oocyte maturation, development and quality of *in vitro* produced embryos. MLT did not show to be effective as antioxidant and had limited effects on mitochondrial function during IVP under the conditions studied. MQ+MT had some effect on embryo mitochondrial function when used throughout *in vitro* culture and in oocytes during IVM.

### 3.7. REFERENCES

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZUÑIGA, 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.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 2014.
- ADHIKARI, D. et al. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 11, p. 2476–2484, 1 jun. 2012.
- ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 480–487, jan. 2014.
- ADRIAENS, I. et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2–3, p. 333–343, dez. 2006.
- 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.
- AMIREAULT, P.; DUBÉ, F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 358–365, 2005.
- ANWAR, M. J. et al. An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, maio 2015.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of reproduction**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 1998.
- BABURINA, Y. et al. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a messenger of protection of the mitochondrial function during melatonin treatment in aging. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 94–103, 2017.
- 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.



- BAKHTARI, A.; ROSS, P. J. DPPA3 prevents cytosine hydroxymethylation of the maternal pronucleus and is required for normal development in bovine embryos. **Epigenetics**, v. 9, n. 9, p. 1271–1279, 2014.
- 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.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693–701, 2007.
- 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.
- BLAHA, M. et al. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated *in vitro* with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 113, 6 dez. 2015.
- BOMFIM, M. M. et al. Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 12, p. 1296–1305, 2017.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, abr. 2001.
- BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Am. Assoc. Bovine Pract.**, n. January 1992, p. 39–43, 1992.
- CAIXETA, E. S. et al. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during *in vitro* maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 6, p. 890–899, 2013.
- CALDER, M. et al. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 1077–1085, abr. 2005.
- 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.; SEMIZ, 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.
- CAVALLARI, F. D. C. et al. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 180–186, 7 jun. 2019.
- 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.
- CHEN, Y.-C. et al. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380–401, 6 jan. 2013.
- 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.
- COELHO, L. A. et al. Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus-oocyte complex: changes after pinealectomy. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 490–499, 2015.
- 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.
- CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and

- ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, jun. 2012.
- 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. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro***. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.
- 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.
- DORÉE, M.; HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 12, p. 2461–2464, 2002.
- 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.
- DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.
- 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 cytotostatic factor arrest in mouse oocytes. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 2, p. 227–31, 25 abr. 2005.
- EL-RAEY, M. et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 4, p. 250–262, 2011.
- ELVIN, J. A. et al. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. **Molecular Endocrinology**, 2 jul. 1999.

- 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. et al. **Regulation of mammalian oocyte maturation**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2004.
- 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.
- FARAHAVAR, A. et al. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 17, p. 2579–2583, 2010.
- FERNANDES, H. **A melatonina e seu efeito citoprotetor na maturação de oócitos murinos**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2015.
- 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.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.
- 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.
- FUSHII, M.; YAMADA, R.; MIYANO, T. *In vitro* growth of bovine oocytes in oocyte-cumulus cell complexes and the effect of follicle stimulating hormone on the growth of oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, 2020.
- GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245–257, 2013.
- 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.

- GILCHRIST, R. B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R143–R157, nov. 2016.
- 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.
- GUPTA, A. et al. Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases During Meiotic Resumption From Diplotene Arrest in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 7, n. September, p. 1–7, set. 2016.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Baueri, SP: Manole, 2004.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, mar. 2011.
- 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.
- HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; REDDY, A. B. Two decades of circadian time. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 812–9, jun. 2008.
- 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.
- HE, C. et al. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under *in vitro* conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–16, 2016.
- 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.
- HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.
- HORNER, K. et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v. 258, n. 2, p. 385–396, 2003.

- 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.
- IBRAHIM, A. A. et al. MitoQ ameliorates testicular damage induced by gamma irradiation in rats: Modulation of mitochondrial apoptosis and steroidogenesis. **Life Sciences**, v. 232, n. July, p. 116655, 2019.
- 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.
- ITOH, M. T. et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 7–13, 1998.
- ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 402–408, 1999.
- IWATA, H. et al. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 424–432, 2011.
- 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.
- JOU, M. J. et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389–403, 2007.
- 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. Ivm, 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.
- KOMNINO, E. R. et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.
- KOTLER, M. et al. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **Journal of pineal research**, v. 24, n. 2, p. 83–89, 1998.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13\_suppl, p. E14–E23, 10 out. 2004.
- KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine

- Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity 1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292–302, 1 fev. 2000.
- KUBIAK, J. Z. et al. On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 2–3, p. 201–217, 2008.
- LEE, C. J. et al. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 2, p. 126–132, 2001.
- LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **The Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 4, p. 603–613, 13 maio 2002.
- LEÓN, J. et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 1, p. 1–9, 2005.
- LERNER, A. B. et al. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587–2587, maio 1958.
- LERNER, A. B.; CASE, J. D.; HEINZELMAN, R. V. STRUCTURE OF MELATONIN 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 22, p. 6084–6085, nov. 1959.
- 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.
- LI, S. H. et al. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2015.
- LIANG, S. et al. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1821, 26 out. 2016.
- 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.
- LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 369–378, mar. 2003.

- 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>>
- MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 6 jan. 2013.
- 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.
- 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.
- MARQUES, T. C. et al. Melatonin reduces apoptotic cells , SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. n. August 2016, p. 226–236, 2018.
- MASCIARELLI, S.; HORNER, K.; LIU, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A–deficient mice as a model of female infertility. **Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 196–205, 2004.
- MAURIZ, J. L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin’s anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of pineal research**, v. 54, n. 1, p. 1–14, jan. 2013.
- 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.
- MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791–799, 2005.
- MENENDEZ-PELAEZ, A.; REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. **Journal of Pineal Research**, v. 15, n. 2, p. 59–69, 1993.
- MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; RAGGI, M. A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 21–28, ago. 2012.
- MONIRUZZAMAN, M.; HASAN, K. N.; MAITRA, S. K. Melatonin actions on ovaprim (synthetic GnRH and domperidone)-induced oocyte maturation in carp. **Reproduction**, v.



151, n. 4, p. 285–296, 2016.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in sertoli cells. **Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 133–145, 2000.

NAKAMURA, Y. et al. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 1012–1016, 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.

NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869–1878, 1 jun. 2009.

O'MALLEY, Y. et al. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39766–39775, 2006.

OH, J. S. et al. Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 5, p. 1081–5, 2013.

PANDEY, A. N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521–8, 15 out. 2010.

PANDEY, A. N.; CHAUBE, S. K. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured *in vitro*. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 240, n. 1, p. 15–25, 2015.

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.

PANG, Y. et al. Beneficial role of melatonin in protecting mammalian gametes and embryos from oxidative damage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2320–2335, 2018a.

PANG, Y. et al. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 4, p. 648–660, abr. 2018b.

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.

- PARK, H. J. et al. Melatonin improves oocyte maturation and mitochondrial functions by reducing bisphenol a-derived superoxide in porcine oocytes *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.
- PASQUARIELLO, R. et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 4, p. 971–981, 2019.
- 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.
- PEREIRA, G. R. et al. Relationship of post-weaning growth and age at puberty in crossbred beef heifers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 413–420, maio 2017.
- PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v. 33, n. 14–26, p. 1–13, 2015.
- PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, abr. 2001.
- PRASAD, S. et al. Changes in signal molecules and maturation promoting factor levels associate with spontaneous resumption of meiosis in rat oocytes. **Cell Biology International**, v. 39, n. 6, p. 759–769, 2015.
- PROCHAZKA, R. et al. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 425–435, 1 abr. 2011.
- QUETGLAS, M. D. et al. Effect of Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibition on Expression, Localization and Activity of Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) in Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 1074–1081, 2010.
- REIS, A. et al. APC<sup>cdh1</sup> activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. **Nat Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 539–540, 2006.
- REITER, R. et al. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7231–7272, 2 abr. 2013a.
- REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654–664, ago. 1993.
- REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 444–458, nov. 2000.
- REITER, R. J. et al. **Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions.** *Advances in medical sciences*, 2007. Disponível em:

<<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-39749108884&partnerID=tZOtx3y1>>  
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. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: The requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin.

**Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 269–274, 2011.

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. et al. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 321–8, ago. 2014.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127–51, jan. 2010.

REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70–81, 2016.

REVEL, F. G. et al. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. **Neuroendocrinology**, v. 90, n. 1, p. 1–14, 2009.

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, 2002a.

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, 2002b.

ROBERT, C. et al. Quantification of Cyclin B1 and p34 cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biology of reproduction**, v. 67, p. 1456–1464, 2002.

RODRIGUES-CUNHA, M. C. et al. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1685–1694, out. 2016.

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.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist

programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–86, 2000.

SAKAGUCHI, K. et al. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 674–82, 17 jan. 2013.

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**, v. 10, n. 1, p. 103, 2012.

SANTIQUET, N. W. et al. Transporting cumulus complexes using novel meiotic arresting conditions permits maintenance of oocyte developmental competence. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 8, p. 1079–1086, 2017.

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.

SHUHAIBAR, L. C. et al. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5527–5532, 28 abr. 2015.

SILVA, E. et al. Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 6, p. 975–983, 2015.

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.

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, ago. 2010.

TAKADA, L. et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 124–127, 2012.

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

2012.

TAMURA, H. et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 135–141, nov. 1998.

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

TAN, D.-X. et al. Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 2, p. 113–121, set. 2012.

TAN, D. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

TAN, D.; CHEN, L.; POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr j**, 1993.

TAN, D. X. et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 607–623, 2010.

TAN, D. X. et al. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 2, p. 127–138, 2013.

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-D-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. 341–354, 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.
- TIWARI, M. et al. Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 123–129, jan. 2018.
- TIWARI, M.; CHAUBE, S. K. Moderate increase of reactive oxygen species triggers meiotic resumption in rat follicular oocytes. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 42, n. 5, p. 536–546, 2016.
- TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, jun. 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.
- TSANTARLIOTOU, M. P. et al. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 1s, p. 488–489, 3 abr. 2007.
- VACCARI, S. et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 595–604, 1 set. 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.
- VENEGAS, C. et al. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 217–227, 2012.
- 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, 2014a.
- WANG, F. et al. Melatonin Improves the Quality of *In vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of

- Relevant Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93641, 2 abr. 2014b.
- WANG, S. et al. The effects of melatonin on bovine uniparental embryos development *in vitro* and the hormone secretion of COCs. **PeerJ**, v. 2017, n. 7, p. 1–23, 2017.
- 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.
- WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, n. 2, p. 711–717, 1986.
- 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.
- WOO, M. M. M. et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789–4797, 2001.
- WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. SUPPL.1, p. 38–43, set. 2013.
- WUNSCH, A.; SONNTAG, B.; SIMONI, M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. **Annales d'Endocrinologie**, v. 68, n. 2–3, p. 160–166, jun. 2007.
- 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, M. et al. Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 27 nov. 2017.
- YANG, S. G. et al. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- 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.
- YUAN, Y.; WHEELER, M. B.; KRISHER, R. L. Disrupted Redox Homeostasis and Aberrant Redox Gene Expression in Porcine Oocytes Contribute to Decreased Developmental

- Competence1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–10, 2012.
- ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, p. 131–146, 2014.
- ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 1 mar. 2002.
- ZHAO, X.-M. et al. Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 23, n. 04, p. 525–536, 29 ago. 2015.
- ZHAO, X.-M. et al. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. e12445, jan. 2018.
- ZHAO, X. M. et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 2, p. 132–141, 2016.
- ZHAO, Y. et al. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 1, p. 79–88, ago. 2013.