



Avaliação dos efeitos da melatonina sobre a produção de embriões bovinos obtidos por fecundação *in vitro* e transferência nuclear de células somáticas

Evaluation of melatonin effects on the production of bovine embryos obtained by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer

Carla Soares Alves^{1,2}, Ricardo Andrade Furtado¹, Gabriel Antônio Nogueira Nascentes³, Rodolfo Rumpf², Denise Crispim Tavares¹

Universidade de Franca¹, Franca, SP, Brasil.

Geneal Genética Animal² – Análise, Pesquisa e Laboratório S/A, Uberaba, MG, Brasil.

Instituto Federal do Triângulo Mineiro³, Uberaba, MG, Brasil

Denise Crispim Tavares¹ - Universidade de Franca, Avenida Dr. Armando Salles de Oliveira, 201, 14404-600, Franca São Paulo, Brasil

Resumo

Na reprodução assistida, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios sobre as taxas de produção de embriões. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com o antioxidante melatonina (MEL) sobre a produção de embriões bovinos obtidos por fecundação *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Os resultados mostraram que a MEL (10^{-7} M) no meio de maturação ou de cultivo embrionário *in vitro* não afetou a taxa de clivagem ou de produção de blastocistos na FIV ou na TNCS, e também não afetou a prenhez, a taxa de nascimento ou o peso dos bezerros na TNCS. O tratamento das células doadoras de núcleo com MEL (10^{-9} M) também não levou a um aumento na produção de embriões, prenhez ou taxa de nascimento na TNCS. Assim, conclui-se que a MEL não foi capaz de aumentar a eficiência da reprodução assistida bovina, nas condições experimentais utilizadas.

Palavras-chave: Antioxidante; fertilização *in vitro*; clonagem; bovinos.

Abstract

In assisted reproduction, oxidative stress can cause deleterious effects on embryo production rates. The aim of the present study was to evaluate the effect of melatonin supplementation (MEL) on the production of bovine embryos obtained by in vitro fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). The findings of this work demonstrated that melatonin enrichment (10^{-7} M) of the in vitro maturation (IVM) medium or in the embryo culture medium does not affect both cleavage and blastocyst rates in IVF or SCNT, and does not affect pregnancy, birth rate or weight calf in SCNT either. The treatment of nucleus donor cells with melatonin (10^{-9} M) could not also improve embryo production, pregnancy or birth rate in SCNT. According to these work it is concluded that melatonin is not able to ameliorate bovine assisted reproduction efficiency, under experimental conditions used.

Keywords: Antioxidant; in vitro fertilization; cloning; bovine.

Introdução

A economia nacional sofreu inúmeras modificações nas últimas décadas no setor pecuário, especialmente relacionadas ao desenvolvimento e aplicação comercial de biotecnologias da reprodução. Uma delas é a fertilização *in vitro* (FIV), uma metodologia que permite que seja produzida maior quantidade de embriões de um animal de interesse zootécnico ou comercial. Apesar do crescimento anual, em cada uma das etapas da FIV ocorre redução nas taxas de sucesso obtidas, fazendo com que a razão gestação/oócitos tenha valor abaixo do ideal. Atualmente, 30–45% dos oócitos maturados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto e, destes embriões, cerca de 40–60% são capazes de produzir gestação (Ispada *et al.*, 2016; Lustosa *et al.*, 2018).

Além da FIV, outra tecnologia promissora é a clonagem. Trata-se de uma metodologia que permite que oócitos enucleados possam se reprogramar com células somáticas diferenciadas através da transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em embriões e gerar um organismo inteiro (Wilmur *et*

¹Correspondência: denisecrispim2001@yahoo.com

Recebido: 08 de abril de 2019

Aceito: 17 de outubro de 2019



al., 1997). Contudo, apenas 1-5% dos embriões produzidos por TNCS transferidos para receptoras vem a termo, limitando consideravelmente a aplicação desta técnica (Su *et al.*, 2015).

Sabe-se que os embriões bovinos produzidos *in vitro* diferem dos produzidos *in vivo* em muitos aspectos. Uma possibilidade para explicar a baixa eficiência da produção *in vitro* de embriões pode ser devido as altas concentrações de oxigênio, bem maiores do que as condições *in vivo*, levando a aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de EROs ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema, levando à geração de radicais livres (Agarwal *et al.*, 2006). Na clonagem, a radiação UV e a privação de soro para sincronização do ciclo celular podem aumentar a formação de EROs (Su *et al.*, 2015).

Uma substância promissora para diminuir o estresse oxidativo é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL), um hormônio anfifílico que age como um potente antioxidante *in vivo*, evitando assim o estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos (Tsantarliotou *et al.*, 2007). A mimetização *in vitro* da situação *in vivo* poderia auxiliar a melhorar a qualidade e competência embrionária (Wrenzycki, 2018). Dessa forma, o tratamento com MEL durante a MIV e o CIV poderia aumentar a maturação oocitária e a produção *in vitro* de embriões, respectivamente. Além disso, este é o primeiro trabalho descrito na literatura a avaliar se esta substância poderia fornecer proteção aos danos celulares gerados nos fibroblastos utilizados para a TNCS. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a influência da MEL na produção de embriões bovinos por FIV e TNCS.

Material e Métodos

Os experimentos propostos neste trabalho foram realizados na Universidade de Franca (Franca, São Paulo) e na empresa Geneal (Uberaba, Minas Gerais), sendo a última habilitada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A MEL foi diluída na concentração de 10^{-7} M (Papis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015). Os fibroblastos foram tratados com 10^{-7} M e 10^{-9} M de MEL.

Fertilização *in vitro* (FIV):

Os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro local e transportados até o laboratório em soro fisiológico, aquecido a 37°C. Os ovários foram sendo coletados até todos os objetivos do trabalho serem concluídos. Não foi mensurado o número de dias de coletas de ovários em abatedouro, as raças coletadas, o número de manipulações, nem o número de ovários. O líquido folicular (folicúlos entre 2 e 8 mm) foi aspirado e os oócitos encontrados foram selecionados e maturados em meio MIV, sendo este composto de TCM 199 Earles enriquecido de soro fetal bovino (SFB), amicacina, glutamina, hormônio folicúlo estimulante e luteinizante, podendo também conter cisteamina quando o objetivo do experimento foi comparar a MEL com esse antioxidante. Os oócitos permaneceram neste meio por 24 h, em incubadoras à 38,8°C com 5% de CO₂ e 20% O₂. Após a MIV, estes foram transferidos para meio de fecundação (FEC) suplementado com hipotaurina, epinefrina, penicilamina e heparina. Para a FIV foram utilizadas doses de sêmen congeladas de um mesmo touro da raça Nelore com resultados conhecidos. Após a descongelação (36°C por 30 seg), os espermatozoides foram submetidos a tratamento com gradiente de Percoll 45% - 90% (Parrish *et al.*, 1995) e fecundados com dose inseminante calculada (concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL). Após 18 h, os zigotos foram transferidos para o meio de cultivo (CIV) composto por fluido sintético de oviduto modificado (SOF) (Holm *et al.*, 1999) suplementado com mio-inositol, piruvato, SFB e amicacina. No terceiro dia de cultivo foram avaliadas as taxas de divisão celular (clivagem) e no sétimo dia (D7) os embriões foram classificados de acordo com o guia da Sociedade Internacional de Transferência Embrionária (IETS). Devido ao alto custo das receptoras, a taxa de prenhez não foi avaliada na FIV, sendo avaliada apenas na TNCS.

Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) – Clonagem:

Vacas cíclicas foram utilizadas como doadoras de oócitos, sendo estes obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom. Após a maturação por 21 h, os oócitos foram desnudados com hialuronidase, selecionados quanto a presença do primeiro corpúsculo polar (maturação) e corados com Bisbenzimidazol 33342 por 15 min. Em microscópio equipado com micromanipulador, estes foram enucleados com o auxílio de luz UV. Para reconstrução, um fibroblasto foi adicionado no espaço



perivitelínico do oócito enucleado. Em seguida, foi feita a eletrofusão com manitol (640 kV; 30 μ sec; 2 pulsos), a ativação com ionomicina/ciclohexamida e o cultivo em SOF modificado suplementado com glicose, piruvato, probumina e amicacina a 38,5°C com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. No D7, os embriões foram classificados e transferidos. A prenhez foi avaliada por ultrassonografia transretal (Aloka SSD-500, 5MHz, Aloka Co.) e monitorada mensalmente até o final da gestação.

Delineamento Experimental

Experimento 1: Avaliação da melatonina x cisteamina na MIV da FIV: Os oócitos foram divididos aleatoriamente em três grupos e maturados em meio MIV com cisteamina, MEL ou cisteamina + MEL. Todos os grupos foram submetidos à FIV, sendo avaliadas a clivagem e a produção embrionária. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

Experimento 2: Avaliação da melatonina no CIV da FIV: Após a maturação e fecundação, os embriões foram cultivados com ou sem MEL. Foi avaliada a clivagem e a produção de embriões. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste *t*-Student.

Experimento 3: Avaliação da melatonina no CIV em baixa tensão de O₂ na FIV: Parte dos oócitos foi maturado e cultivado sem MEL (grupo controle). O restante dos oócitos foi maturado e cultivado com MEL, sendo divididos em dois grupos cultivados em alta (20%) e baixa (5%) tensão de O₂. Todos os oócitos foram fertilizados e os embriões foram avaliados (clivagem e produção embrionária). Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

Experimento 4: Avaliação da melatonina na MIV da clonagem: Os oócitos foram maturados com ou sem MEL. Todos os grupos foram submetidos à técnica de TNCS. Foram avaliadas as taxas de liberação do primeiro corpúsculo polar, eletrofusão, produção de embrião, prenhez com 30 e 90 dias, número de bezerros nascidos, sobrevivência e peso dos mesmos. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste *t*-Student ou Mann-Whitney.

Experimento 5: Avaliação da melatonina no CIV da clonagem: Os oócitos foram submetidos a técnica de clonagem. As estruturas produzidas foram divididas em dois grupos cultivados com e sem MEL. Os embriões que apresentaram melhor avaliação morfológica foram transferidos. Foram avaliadas as taxas de prenhez com 30 e 90 dias, proporção de bezerros viáveis, sobrevivência e peso dos mesmos. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste *t*-Student ou Mann-Whitney.

Experimento 6: Avaliação da citotoxicidade da melatonina em fibroblastos bovinos: Os ensaios de citotoxicidade, utilizados para analisar a viabilidade celular dos fibroblastos bovinos tratados com MEL, foram realizados pelo ensaio colorimétrico de XTT (Roche Diagnostics) após 24 h de tratamento, de acordo com as recomendações do fabricante. A MEL foi avaliada em diferentes concentrações (10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1 e 10 M) nas duas formas de sincronização, confluência e soro-privação. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator e teste de Tukey.

Experimento 7: Avaliação da melatonina nos fibroblastos e no CIV na clonagem: Os oócitos foram maturados e enucleados. Metade das estruturas foi reconstruída com fibroblastos não-tratados e a outra parte com células tratadas com MEL. Para avaliar a possível interação entre o tratamento da célula e do embrião, os embriões produzidos foram cultivados sem ou com MEL (10⁻⁷ M). A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney para avaliar a taxa de eletrofusão, ANOVA para a taxa de blastocistos e Kruskal-Wallis para a taxa de prenhez. Para o tratamento dos fibroblastos, foram utilizadas duas concentrações 10⁻⁷ M e 10⁻⁹ M, sendo que apenas os embriões do último grupo com melhor avaliação morfológica foram transferidos. Foram avaliadas as taxas de prenhez com 30 e 90 dias, número de bezerros viáveis, sobrevivência e peso dos mesmos.

Resultados

Sete experimentos independentes foram realizados utilizando 10.636 oócitos, sendo 4.366 destinados para avaliar a ação da MEL na FIV e 6.270 na clonagem. Na FIV foram produzidos 1.959



embriões. Na clonagem, 4.131 oócitos foram manipulados e obteve-se 1.384 embriões. Na FIV, ao avaliar a clivagem e a produção embrionária, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos maturados com cisteamina, com MEL ou com ambas substâncias (Tab. 1). Também não foram observadas diferenças significativas entre os embriões cultivados com ou sem MEL (Tab. 2), independente do cultivo ter sido realizado em alta ou em baixa tensão de O₂ (Tab. 3). Da mesma forma, na clonagem também não foram observadas diferenças significativas ao maturar os oócitos (Tab. 4) ou cultivar os embriões (Tab. 5) com ou sem MEL, em nenhum dos parâmetros avaliados.

Nenhuma das concentrações de MEL testadas foi citotóxica para os fibroblastos, independente da forma de sincronização de ciclo celular utilizada (Fig. 1).

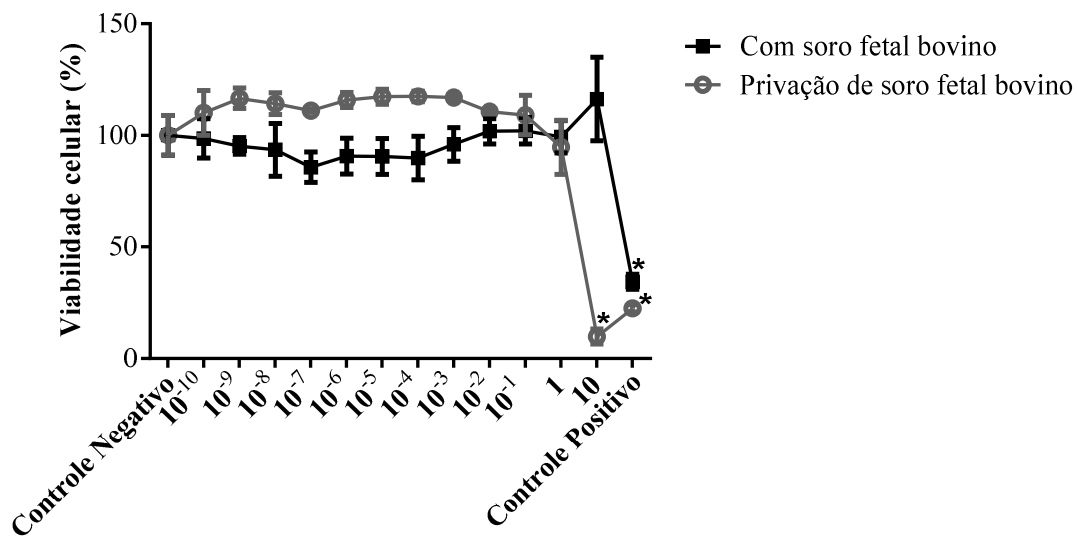


Figura 1: Viabilidade dos fibroblastos bovinos após 24 horas de tratamento com MEL (10^{-10} a 10 M), com e sem soro-privação, avaliada pelo ensaio colorimétrico do XTT.

Análise de variância (ANOVA) de um fator e Tukey. Controle negativo (sem tratamento) e positivo (dimetilsulfóxido 25%). Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular, CI₅₀, 1,26 M com privação de soro fetal bovino e >10 M sem privação de soro fetal bovino. *Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,0001$)

Tabela 1: Avaliação da melatonina na maturação *in vitro* na produção de embriões por fertilização *in vitro*.

Grupos	Parâmetros		
	Oócitos	Clivagem	Blastocistos
MIV Controle	467	382 (81,2±7,6%)	192 (39,4±11,3%)
MIV melatonina	449	386 (86,3±9,7%)	217 (47,0±12,3%)
MIV melatonina e cisteamina	430	365 (84,2±9,4%)	184 (40,0±13,5%)
Valor -p		0,727	0,643

O valor-p indica o resultado obtido na análise de variância (ANOVA) de um fator.

Tabela 2: Avaliação da melatonina no cultivo *in vitro* na produção de embriões por fertilização *in vitro*.

Grupos	Parâmetros		
	Oócitos	Clivagem	Blastocistos
CIV controle	261	234 (90,5±4,0%)	127 (50,1±6,0%)
CIV melatonina	289	253 (87,6±0,7%)	149 (52,3±3,0%)
Valor-p		0,442	0,340

O valor-p indica o resultado obtido por meio do teste *t*-Student.

Tabela 3: Avaliação da melatonina na produção de embriões por fertilização *in vitro* em baixa tensão de oxigênio.

Grupos	Parâmetros		
	Oócitos	Clivagem	Blastocistos
MIV controle CIV controle	538	439 (82,0±2,8%)	237 (45,1±7,3%)
MIV melatonina CIV melatonina	509	416 (83,1±7,4%)	198 (39,8±6,5%)
MIV melatonina CIV melatonina (baixa tensão)	508	410 (80,4±5,1%)	232 (45,3±5,3%)
Valor-p		0,778	0,432

O valor-p indica o resultado obtido na análise de variância (ANOVA) de um fator

Tabela 4: Avaliação da melatonina na maturação *in vitro* na produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas.

Grupos	Parâmetros							
	Liberção 1°Cp (%)	Fusão (%)	Blastocistos (%)	Prenhez 30 dias (%)	Prenhez 90 dias (%)	Parto (%)	Sobrevivência (%)	Peso (kg)
MIV Controle	475 (71,0±5,8)	223 (63,6±8,4)	89 (48,5±3,6)	22 (48,9±18,0)	20 (43,9±16,7)	8 (19,9±10,5)	5 (14,0±14,0)	46,4±5,7
MIV melatonina	440 (74,1±6,3)	283 (75,3±10,6)	96 (33,2±15,0)	15 (40,5±26,9)	10 (18,8±13,1)	3 (5,1±6,4)	2 (3,5±4,0)	35,0±7,1
Valor-p	0,572	0,135	0,096	0,622	0,056	0,053	0,199	0,118

Os dados foram expressos em média±desvio padrão e o valor-p indica o resultado obtido por meio do teste *t*-Student ou Mann-Whitney.

Tabela 5: Avaliação da melatonina no cultivo *in vitro* na produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas.

Grupos	Parâmetros					
	Blastocistos	Prenhez 30 dias	Prenhez 90 dias	Parto	Sobrevivência	Peso (kg)
CIV Controle	143 (30,5±10,9%)	29 (34,4±15,2%)	11 (14,0±17,3%)	6 (6,4±11,3%)	4 (4,7±9,3%)	48,0±6,7
CIV Melatonina	146 (32,9±9,6%)	24 (31,0±17,8%)	10 (12,1±18,0%)	6 (8,4±15,4%)	5 (7,6±14,9%)	41,8±10,5
Valor-p	0,700	0,616	0,655	0,950	0,718	0,344

Os dados foram expressos em média±desvio padrão e o valor-p indica o resultado obtido por meio do teste *t*-Student ou Mann-Whitney.



Ao comparar a eletrofusão e a produção de embriões entre os tratamentos do fibroblasto com MEL a 10^{-7} M e a 10^{-9} M, foi possível observar que a eletrofusão era menor no grupo tratado na concentração de 10^{-7} M (Tabela 6). Em virtude desse resultado, optou-se por avaliar a influência da MEL nos fibroblastos na concentração de 10^{-9} M e continuar o tratamento dos embriões com 10^{-7} M. Não se observou diferenças significativas na taxa de eletrofusão. Após a ativação, as estruturas foram novamente divididas em dois grupos, cultivados ou não com MEL. Não foram observadas diferenças significativas ao se avaliar a porcentagem de prenhez, partos, sobrevivência e peso (Tab. 7).

Tabela 6: Comparação entre a eletrofusão e produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas ao se utilizar melatonina no fibroblasto a 10^{-7} M e a 10^{-9} M.

Grupos	Eletrofusão	Tratamento dos embriões	Blastocistos
Controle	75,8±10,1% a	Controle	33,8±12,8%
		Melatonina	37,0±12,4%
Melatonina 10^{-7} M	61,0±7,7% b	Controle	24,1±11,4%
		Melatonina	37,7±12,5%
Melatonina 10^{-9} M	75,1±11,1% a	Controle	38,7±12,4%
		Melatonina	39,2±15,1%
Valor-p	0,031		0,276

O valor-p indica o resultado obtido por meio do teste de Kruskal-Wallis. Diferença estatística significativa (**a**≠**b**; $p<0,05$).

Discussão

Embora a concentração plasmática de MEL em bovinos varie entre $2,1 \times 10^{-11}$ M a $3,87 \times 10^{-9}$ M (Berthelot *et al.*, 1990) e no líquido folicular entre $1,1-1,3 \times 10^{-10}$ M (Tamura *et al.*, 2009), objetivando aumentar a eficiência na produção embrionária, vários trabalhos já foram realizados avaliando diferentes concentrações de MEL nos meios MIV e CIV. Tais estudos sugerem que concentração ideal de MEL seria 10^{-7} M (Papis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015). Dessa forma, no presente estudo, essa concentração foi utilizada em todos os experimentos. Além desta, no tratamento dos fibroblastos para a clonagem também foi testada a dose de 10^{-9} M.

Ao suplementar o meio MIV com MEL, Tsantariotou *et al.* (2007; 10^{-5} M, 10^{-3} M e 10^{-2} M de MEL) e Takada *et al.* (2012; 10^{-9} M de melatonina) não encontraram diferenças na clivagem e no desenvolvimento embrionário em bovinos. Antagonicamente, Tian *et al.* (2014; 10^{-9} M a 10^{-7} M de melatonina) e Yang *et al.* (2017; 10^{-9} M de melatonina) descreveram aumento destes parâmetros em oócitos maturados com MEL. Além destes, Pang *et al.* (2017; 10^{-9} M de melatonina) também demonstraram maior índice de extrusão do primeiro corpúsculo polar e taxa de formação de blastocisto quando os oócitos eram tratados com MEL antes da FIV.

Atualmente, antioxidantes como a cisteamina tem sido utilizados na tentativa de diminuir o estresse oxidativo e aumentar a maturação dos oócitos e a produção de embriões (Nikseresht *et al.*, 2017). No presente trabalho, ao avaliar a ação da MEL na MIV da FIV e comparar a mesma com a cisteamina, foi possível verificar que os resultados obtidos foram similares. A capacidade antioxidante da MEL e da cisteamina já são bastante conhecidas (Tamura *et al.*, 2009; Nikseresht, *et al.*, 2017). De acordo com Reiter *et al.* (2016) a MEL pode apresentar sinergismo com outros antioxidantes, porém não foi observada interação positiva quando a MEL e a cisteamina foram utilizadas em conjunto no presente estudo.

Na clonagem, a utilização da MEL na MIV não alterou o índice de extrusão do primeiro corpúsculo polar, a eletrofusão, a produção de embriões, a prenhez com 30 e 90 dias, número de bezerras nascidas, sobrevida e o peso destes. Contrariamente, An *et al.* (2019) relataram que a MEL diminui o estresse oxidativo dos ovócitos e beneficia o subsequente desenvolvimento *in vitro* de embriões clonados de bovinos.

Com relação ao cultivo *in vitro*, alguns autores observaram que a MEL melhora o desenvolvimento embrionário *in vitro* em suínos, búfalos e camundongos (Kang *et al.*, 2009; Manjunatha *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012). Em bovinos, Wang *et al.* (2014) observaram maior clivagem e produção de blastocistos após o tratamento de embriões com 10^{-7} M de MEL. Já Papis *et al.* (2007) afirmam que os efeitos benéficos da MEL dependem da tensão de O_2 utilizada, só sendo observados quando os embriões são cultivados em alta tensão de O_2 .

Tabela 7: Tratamento dos fibroblastos e dos blastocistos na produção de embriões por transferência nuclear com melatonina a 10^{-9} M

Tratamento das células	Fusão	Tratamento dos Blastocistos	n	Blastocistos	Blastocistos transferidos	Parâmetros				Peso (kg)
						Prenhez 30 dias	Prenhez 90 dias	Parto	Sobrevida	
Controle	1018 (77,2±9,0)	Controle	487	165 (34,0±13,3%)	83	38 (52,8±29,8%)	21 (22,1±21,5%)	10 (9,9±17,5%)	4 (3,3±9,2%)	40,0±9,6
		Melatonina	483	176 (36,7±12,3%)	87	31 (33,1±26,3%)	20 (23,1±24,0)	12 (12,7±15,0%)	5 (5,7±11,5%)	44,8±2,9
Melatonina 10^{-9} M	1016 (75,1±11,1%)	Controle	469	183 (38,7±12,4%)	98	46 (44,7±27,0%)	25 (22,9±23,1%)	16 (14,9±21,9%)	5 (4,5±8,9%)	48,8±9,0
		Melatonina	493	199 (39,2±15,1%)	88	34 (35,5±25,3%)	22 (19,0±22,6%)	10 (7,5±15,7%)	4 (4,5±12,4%)	46,8±2,5
Valor-p	0,452			0,525		0,053	0,914	0,358	0,867	0,310

Os dados foram expressos em média±desvio padrão e o valor-p indica o resultado obtido por meio do teste de Mann-Whitney (% Fusão), ANOVA (% Blastocistos) ou Kruskal-Wallis (% Prenhez).



Contrariamente, no presente trabalho, não foram observadas diferenças na clivagem e na produção de embriões ao adicionar a MEL (10^{-7} M) no meio CIV da FIV, independentemente de ser utilizada alta ou baixa tensão de O_2 . Tais achados estão em concordância com Takada *et al.* (2012) que também não encontraram alterações ao analisar a influência da tensão de O_2 . No cultivo de embriões de clone, também não foram observadas diferenças estatísticas na produção de blastocistos, prenhez com 30 ou 90 dias, número de partos, sobrevivida e peso entre os grupos controle e tratado (10^{-7} M).

Inversamente, Su *et al.* (2015) cultivaram embriões bovinos oriundos de TNCS com MEL e verificaram que o tratamento (10^{-7} M) aumentava a produção de blastocistos, a prenhez com 90 dias, a taxa de nascimento e de sobrevivência. Contudo, estes autores obtiveram oócitos de abatedouro, utilizaram fibroblastos fetais de gado holandês e receptoras Angus, e além disso, realizaram *feeding* com 72 h.

Os ensaios de citotoxicidade para analisar a viabilidade celular dos fibroblastos bovinos tratados com MEL demonstraram não haver citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, independente da forma de sincronização do ciclo celular.

Ao utilizar os fibroblastos para a reconstrução dos embriões de clone, utilizou-se inicialmente 10^{-7} M de MEL, porém uma queda na taxa de eletrofusão foi observada. Deste modo, optou-se por continuar os experimentos tratando os fibroblastos com 10^{-9} M. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na produção de embriões, prenhez com 30 e 90 dias, parto, sobrevivência e peso dos animais ao tratar os fibroblastos com 10^{-9} M. Esse é o primeiro estudo realizado onde a MEL é utilizada para tratar as células doadoras de núcleo na clonagem bovina.

Em suínos, Pang *et al.* (2013) avaliaram o efeito da MEL em diferentes concentrações em fibroblastos fetais e em embriões de clone. Nos fibroblastos, a dose que levou a maior produção de blastocistos foi 10^{-10} M e nos embriões foi 10^{-9} M. O tratamento combinado dos fibroblastos e dos embriões resultou em taxa de formação de blastocistos maior em relação ao grupo controle. Diferentemente de Pang *et al.* (2013), no presente estudo, o tratamento combinado dos fibroblastos e dos embriões não aumentou os resultados na reprodução bovina.

Os efeitos de antioxidantes suplementando os meios de MIV e CIV não são consistentes e levam a conclusões contraditórias (Papis *et al.*, 2007). É possível verificar que os resultados da MEL ainda são controversos e parecem depender de diferentes fatores como o tipo celular, dose, tempo de exposição ao fármaco, diferenças nas condições de cultivo e modelo experimental (Crocomo *et al.*, 2012). Além disso, alguns trabalhos descrevem melhora da produção de embriões bovinos após a utilização da MEL em *Bos taurus*. Contudo, sabe-se que existem diferenças morfológicas e funcionais consideráveis entre *Bos indicus* e *Bos taurus* e que essas divergências entre estes grupos genéticos podem afetar a aplicação de ferramentas adequadas e fornecer resultados discrepantes em relação à avaliação da MEL (Sartori *et al.*, 2016).

Conclusão

A suplementação do meio de maturação oocitária com MEL foi equivalente a cisteamina. A utilização de MEL no CIV não alterou os resultados da FIV independente da tensão de O_2 utilizada. Na clonagem, a utilização de MEL no meio de maturação, cultivo ou nos fibroblastos, não aumentou a produção embrionária, prenhez, nascimento e peso. A MEL não foi citotóxica para os fibroblastos bovinos, independente da dose utilizada.

Referências

- Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*, v.86, p.503-512, 2006.
- An Q, Peng W, Cheng Y, Lu Z, Zhou C, Zhang Y, Su J. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *J Cell Physiol*, v.234, p.17370-17381, 2019.
- Berthelot X, Laurentie M, Ravault JP, Ferney J, Toutain PL. Circadian profile and production rate of melatonin in the cow. *Domest Anim Endocrin*, v.7, p.315-322, 1990.
- Crocomo LF, Marques Filho WC, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Vet Zootec*, v.19, p.470-479, 2012.
- Gao C, Han HB, Tian XZ, Tan DX, Wang L, Zhou GB, Zhu SE, Liu GS. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *J Pineal*



Res, v.52, p.305-311, 2012.

Holm P, Schimidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, v.52, p.683-700, 1999.

Ispada J, Annes K, de Lima CB, Sirard MA, Milazzotto MP. A Cinética das primeiras clivagens influencia o padrão de metilação de DNA de embriões bovinos. *O Embrião*, v.58, p.14-25, 2016.

Kang JT, Kwon DK, Park HJ, Jang G, Kang SK, Lee BC. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res*, v.46, p.22-28, 2009.

Lustosa AA, Barboza NA, Barbosa YGS, Rodrigues, PKO, Magalhães-Neto FCR. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. *Pubvet*, v.12, p.1-6, 2018.

Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PS, Ravindra JP, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.12-16, 2009.

Nikseresht M, Toori MA, Rahimi HR, Fallahzadeh AR, Kahshani IR, Hashemi SF, Bahrami S, Mahmoudi R. Effect of antioxidants (β -mercaptoethanol and cysteamine) on assisted reproductive technology *in vitro*. *J Clin Diagn Res*, v.11, p.1-14, 2017.

Pang Y, Zhao S, Sun Y, Jiang X, Hao H, Du W, Zhu H. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J*, v.89, p.648-660, 2017

Pang YW, Na L, Wang P, Yu Y, Yin QD, Wang XH, Xin-Zhang, Qian-Zhang, Yang ML, Min-Guo, Wu ZH, Tian JH. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. *J Pineal Res*, v.54, p.389-397, 2013.

Papis K, Poleszczuk O, Wentka-Muchalska E, Modiński JA. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res*, v.43, p.321-326, 2007.

Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.

Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, Lin L, Bolund L, Yovich J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol Reprod*, v.83, p.690-697, 2010.

Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL Jr, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, v.86, p.32-40, 2016.

Su J, Wang Y, Xing X, Zhang L, Sun H, Zhang Y. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Pineal Res*, v.59, p.455-468, 2015.

Takada L, Martins Junior A, Mingoti GZ, Balieiro JCC, Cipolla Neto J, Coelho LA. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. *Res Vet Sci*, v.92, p.124-127, 2012.

Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*, v.92, p.328-343, 2009.

Tian XZ, Wang F, He CJ, Zhang L, Tan DX, Reiter RJ, Xu J, Ji PY, Liu GS. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. *J Pineal Res*, v.57, p.239-247, 2014.

Tsantariotou MP, Altanasio L, De Rosa A, Boccia L, Pellerano G, Gasparrini B. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. *Italian J Anim Sci*, v.6, p.488-489, 2007.

Wang F, Tian XZ, Zhou YH, Tan DX, Zhu SE, Dai YP, Liu GS. 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, p.1-7, 2014.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Wrenzycki C. Gene expression analysis and *in vitro* production procedures for bovine preimplantation embryos: past highlights, present concepts and future prospects. *Reprod Domest Anim*, v.53, p.14-19, 2018.

Yang M, Tao J, Chai M, Wu H, Wang J, Li G, He C, Xie L, Ji P, Dai Y, Yang L, Liu G. Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: mechanisms and results. *Molecules*, v.22, p.1-15, 2017.