



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NO MEIO DE  
CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
SISTEMAS DE ALTA E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO**

**ISABELLA RODRIGUES DOS SANTOS OLIVEIRA**

BRASÍLIA/ DF  
2025

**ISABELLA RODRIGUES DOS SANTOS OLIVEIRA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NO MEIO DE  
CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
SISTEMAS DE ALTA E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dra. Sônia Nair Bão

BRASÍLIA/DF  
2025

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

OLIVEIRA, IRS **Efeito da suplementação com melatonina no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em sistemas de alta e baixa tensão de oxigênio.** Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, 2025, 51 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passada a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, Isabella Rodrigues dos Santos. **Efeito da suplementação com melatonina no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em sistemas de alta e baixa tensão de oxigênio.** Brasília: Instituto de Ciências Biológicas- Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, 2025, 51 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas (Universidade de Brasília).

1. Antioxidantes; metabolismo celular; viabilidade embrionária; biotecnologia reprodutiva; estresse celular. I. OLIVEIRA, I. R. S.. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA / INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA NO MEIO DE  
CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
SISTEMAS DE ALTA E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO**

**ISABELLA RODRIGUES DOS SANTOS OLIVEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, COMO  
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL.**

APROVADA POR:

---

SÔNIA NAIR BÃO

Doutor (Biologia Animal/UnB)

(ORIENTADOR)

---

RAFAEL GIANELLA MONDADORI

Doutor (Universidade Federal de Pelotas/UFPel)

(EXAMINADOR EXTERNO)

---

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

(EXAMINADOR EXTERNO)

---

IVO PIVATO

Doutor (Universidade Federal de Pelotas/ UnB)

(SUPLENTE)

Brasília, 20 de março de 2025.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me concedeu força, perseverança e sabedoria para trilhar esse caminho desafiador. Sem Sua graça e amparo, nada disso teria sido possível.

À minha amada Thuany, que me apoiou em todos os momentos.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de alegria e também nos desafios. Em especial, ao meu filho, que é minha maior inspiração e motivação diária.

Aos meus amigos, que estiveram sempre presentes com palavras de incentivo, apoio e compreensão, tornando essa jornada mais leve, em especial a Gerlanea Thaisa.

Aos meus professores, que compartilharam seu conhecimento e me ajudaram a crescer acadêmica e profissionalmente.

À Margareti Medeiros, que segurou em minha mão em todos os momentos críticos desde a graduação.

Ao Carlos Frederico Martins, meu orientador por todo o suporte, paciência e compreensão durante esse processo, tornando os desafios mais fáceis de enfrentar.

À minha orientadora, Sônia Nair Bão, pela parceria, paciência e compreensão ao longo dessa trajetória. Sua dedicação e orientação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Embrapa, pelo apoio e estrutura que contribuíram significativamente para o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial toda equipe do CTZL, estagiários e funcionários.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta jornada, minha eterna gratidão!

A minha profunda gratidão à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo apoio contínuo à pesquisa científica e à FINEP pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Sem o apoio dessas instituições, este projeto não teria sido possível.

Agradeço também a todos os envolvidos neste processo, que, com seu empenho e dedicação, contribuíram significativamente para o sucesso desta pesquisa.

*"O que fazemos é apenas uma gota no oceano,  
mas sem ela o oceano seria menor." (Madre Teresa de Calcutá)*

## Resumo

A melatonina pode promover diversos benefícios para os embriões bovinos em cultivo *in vitro*, incluindo efeitos anti-apoptóticos, modulação da expressão gênica e redução da produção de espécies reativas de oxigênio (O<sub>2</sub>). Neste contexto, este estudo avaliou o efeito da suplementação com melatonina a 10<sup>-9</sup>M no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos sob diferentes tensões de oxigênio (alta - 20% e baixa - 5%). Os zigotos produzidos por fecundação *in vitro* com sêmen de touro com fertilidade conhecida no laboratório foram distribuídos em quatro grupos experimentais: alta tensão de O<sub>2</sub> com e sem melatonina e baixa tensão de O<sub>2</sub> com e sem melatonina. A taxa de blastocisto, nível de expressão gênica, metabolismo lipídico e funcionalidade mitocondrial foram mensuradas para identificar o efeito da melatonina nos sistemas de cultivo embrionário. Os resultados de taxa de clivagem e blastocistos foram analisados pelo teste Qui-quadrado, e as outras variáveis pelo teste Tukey com nível de significância de 5% (P ≤ 0,05). Os resultados indicaram que a suplementação com melatonina em alta tensão de O<sub>2</sub> promoveu aumento na taxa de blastocistos (39,80 ± 2,14%), sendo superior ao tratamento sem melatonina (34,04 ± 1,72%), e também aos tratamentos da baixa tensão de O<sub>2</sub> (31,67 ± 2,52 vs. 31,39 ± 2,10, respectivamente para os tratamentos com e sem melatonina). O tratamento com melatonina em baixa tensão de O<sub>2</sub> apresentou taxa de clivagem superior a todos os outros tratamentos (P ≤ 0,05). Neste estudo analisamos a expressão genica comparando as diferentes condições de tensão de oxigênio e a influência da melatonina. Foram estabelecidos seis grupos de comparação para avaliação. A análise da expressão gênica revelou uma maior expressão de SOD1 no grupo baixa tensão de O<sub>2</sub> em comparação ao grupo alta tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina (p= 0,0190). O gene SOD2 apresentou maior expressão no grupo alta tensão de O<sub>2</sub> com melatonina em relação ao grupo sem melatonina, ao grupo da baixa tensão de O<sub>2</sub> com melatonina e sem melatonina (p< 0,0001 para todas). O KRT8 seguiu o mesmo padrão, com maior expressão em alta tensão de O<sub>2</sub> com melatonina comparado ao grupo controle, baixa tensão de O<sub>2</sub> com melatonina e baixa tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina (p<0,0001). O IFN-τ revelou um aumento significativo no grupo alta tensão de O<sub>2</sub> com melatonina em relação ao grupo controle em alta tensão de O<sub>2</sub> (p= 0,0344) e baixa tensão de O<sub>2</sub> com melatonina (p= 0,0283). O grupo baixa tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina apresentou maior expressão do gene quando comparado a baixa tensão de O<sub>2</sub> com melatonina, a alta tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina e a alta tensão com melatonina (p< 0,0005). O PLAC8 a expressão foi maior em alta tensão de O<sub>2</sub> no grupo com melatonina comparado ao grupo controle (p= 0,0307) e baixa tensão com melatonina (p=0,0253). Além disso, a baixa tensão sem melatonina apresentou maior expressão em relação

a baixa tensão com melatonina e alta sem melatonina ( $p < 0,0001$ ). Esses achados sugerem que a melatonina modula a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo, na manutenção da integridade celular e no metabolismo energético de embriões cultivados *in vitro*. Além disso, a melatonina reduziu significativamente o acúmulo lipídico nos embriões cultivados sob alta tensão de  $O_2$  ( $p=0,0174$ ), mas apresentou efeito contrário em baixa tensão de  $O_2$  em relação ao tratamento controle ( $p < 0,05$ ). De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a melatonina apresenta uma importante ação antioxidante, sendo eficaz para a otimização do cultivo embrionário em condições de alta tensão de  $O_2$ . Além disso, ela possui uma discreta ação no sistema com baixa tensão de  $O_2$ , pois o estresse oxidativo parece ser menos pronunciado nesse ambiente, levando a uma menor necessidade de ativação de mecanismos compensatórios. Desta forma, o uso da melatonina é importante para os sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Antioxidantes; metabolismo celular; viabilidade embrionária; biotecnologia reprodutiva; estresse celular.

## Abstract

Melatonin may promote several benefits for bovine embryos in *in vitro* culture, including anti-apoptotic effects, modulation of gene expression, and a reduction in the production of reactive oxygen species ( $O_2$ ). In this context, this study evaluated the effect of melatonin supplementation at  $10^{-9}M$  in the *in vitro* culture medium of bovine embryos under different oxygen tensions (high - 20% and low - 5%). Zygotes produced by *in vitro* fertilization with semen from bulls of known fertility in the laboratory were divided into four experimental groups: high  $O_2$  tension with and without melatonin and low  $O_2$  tension with and without melatonin. Blastocyst rate, gene expression level, lipid metabolism and mitochondrial functionality were measured to determine the effect of melatonin on embryo culture systems. The results for cleavage rate and blastocysts were analyzed using the chi-squared test, and the other variables were analyzed using the Tukey test with a significance level of 5% ( $P \leq 0.05$ ). The results showed that melatonin supplementation at high  $O_2$  tension promoted an increase in the blastocyst rate ( $39.80 \pm 2.14\%$ ), which was higher than the treatment without melatonin ( $34.04 \pm 1.72\%$ ) and also than the low  $O_2$  tension treatments ( $31.67 \pm 2.52$  vs.  $31.39 \pm 2.10$ , respectively, for the treatments with and without melatonin). The melatonin treatment at low  $O_2$  tension had a higher cleavage rate than all other treatments ( $P \leq 0.05$ ). The results showed that melatonin supplementation at high  $O_2$  tension promoted an increase in the blastocyst rate ( $39.80 \pm 2.14\%$ ), which was higher than the treatment without melatonin ( $34.04 \pm 1.72\%$ ) and also than the low  $O_2$  tension treatments ( $31.67 \pm 2.52$  vs.  $31.39 \pm 2.10$ , respectively, for the treatments with and without melatonin). The low  $O_2$  tension melatonin treatment had a higher cleavage rate than all other treatments ( $P \leq 0.05$ ). In this study, we analyzed gene expression by comparing different oxygen tension conditions and the influence of melatonin. Six comparison groups were established for evaluation. Gene expression analysis revealed that SOD1 gene expression was higher in the low  $O_2$  tension group compared to the high  $O_2$  tension group without melatonin ( $p=0.0190$ ). The SOD2 gene showed greater expression in the high  $O_2$  tension with melatonin group compared to the control, low  $O_2$  tension with melatonin and low control groups ( $p < 0.0001$  for all). KRT8 followed the same pattern with greater expression in the high  $O_2$  tension with melatonin group compared to the control, low  $O_2$  tension with melatonin and low  $O_2$  tension without melatonin groups ( $p < 0.0001$ ). IFN- $\tau$  showed a significant increase in the high  $O_2$  tension with melatonin group compared to the control group at high  $O_2$  tension ( $p=0.0344$ ) and low  $O_2$  tension with melatonin ( $p=0.0283$ ). The low  $O_2$  tension without

melatonin group showed higher gene expression compared to low O<sub>2</sub> tension with melatonin, high O<sub>2</sub> tension without melatonin and high tension with melatonin (p< 0.0005). PLAC8 expression was higher in the high O<sub>2</sub> tension with melatonin group compared to the control group (p=0.0307) and low tension with melatonin (p=0.0253). In addition, low tension without melatonin showed greater expression compared to low tension with melatonin and high tension without melatonin (p< 0.0001). These results suggest that melatonin modulates the expression of genes involved in oxidative stress, maintenance of cell integrity, and energy metabolism in embryos cultured *in vitro*. In addition, melatonin significantly reduced lipid accumulation in embryos cultured under high O<sub>2</sub> tension (p=0.0174), but had the opposite effect at low O<sub>2</sub> tension compared to the control treatment (p<0.05). According to the results obtained, it can be concluded that melatonin has an important antioxidant action and is effective in optimizing embryo cultivation under conditions of high O<sub>2</sub> tension. In addition, it has a discrete action in the low O tension system, since oxidative stress seems to be less pronounced in this environment, leading to less need to activate compensatory mechanisms. In this way, the use of melatonin is important for *in vitro* bovine embryo production systems.

**Keywords:** Antioxidants; cell metabolism; embryo viability; reproductive biotechnology; cell stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Expressão relativa de mRNA dos genes SLC2A1 (A), SOD 1(B), SOD 2 (C), KRT8 (D), Interferon Tau (E) e PLAC-8 (F) em embriões bovinos tratados com melatonina ou sem melatonina (controle) em alta tensão e baixa tensão de O<sub>2</sub>. A quantificação foi realizada por RT-qPCR, e os valores foram normalizados por genes de referência. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Asterisco (\*) indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P≤0,05)..... 33
- Figura 2-** Efeito da melatonina na atividade mitocondrial e no acúmulo lipídico em embriões bovinos sob diferentes condições de tensão de oxigênio. A unidade do eixo Y representa a intensidade de fluorescência dos marcadores *Mitotracker* (para mitocôndrias) e *Bodipy* (para lipídios). Asterisco (\*) indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P≤0,05).. ..... 34
- Figura 3-** Expressão diferencial de marcadores celulares em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* sob diferentes condições de oxigênio e suplementação com melatonina. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, evidenciando marcações específicas para estruturas celulares. O marcador vermelho (*mitotraker*) indica a intensidade das mitocôndrias, enquanto a coloração verde (*bodipy*) representa a marcação de lipídeos nos blastocistos. A suplementação com melatonina em alta tensão de oxigênio (A) resultou em maior intensidade de marcação em comparação ao grupo sem melatonina (B), em baixa tensão de oxigênio, a presença de melatonina (C) também demonstrou aumento na expressão celular em relação ao grupo controle (D). Escala de 100 μm..... 35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Informações dos primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise de qPCR em tempo real. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Efeito da suplementação com melatonina sob condição de alta e baixa tensão de O <sub>2</sub> sobre as taxas de clivagem e blastocistos (m ±EP). ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cdna	DNA complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COCs	Complexo Cúmulus ovócito
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FEC	Fecundação
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GPx	Glutationa Peroxidase
IFN- $\tau$	Interferon-tau
LH	Hormônio Luteinizante
KRT-8	Queratina
MTK	Mitotraker
MIV	Maturação <i>in Vitro</i>
NADPH	Adenina nucleotídeo fosfato
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OPU	Aspiração folicular guiada por ultrassom
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PLAC-8	Placenta- <i>specific</i>
PIV	Produção de embriões <i>in Vitro</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SOD	Superóxido Dismutase
SLC2A1	Transportador de Solutos Família 2 Membro 1



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	Produção de embriões <i>in vitro</i> .....	19
2.2	Melatonina.....	20
2.2.1	Estresse oxidativo .....	21
2.3	Sistemas de Alta e Baixa Tensão de Oxigênio para produção de embriões bovinos.....	23
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>43</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos principais países detentores do maior rebanho de bovinos do mundo, além de figurar entre os maiores produtores de carne globalmente. Com vastas extensões de terras propícias para a pecuária e um clima favorável, o país possui uma indústria pecuária robusta e diversificada. A criação de gado é uma atividade econômica de grande importância para diversas regiões brasileiras, contribuindo significativamente para a economia nacional, gerando empregos e renda para milhões de pessoas em todo país (Abiec; 2019).

Nos últimos anos, o Brasil tem se destacado como referência mundial na produção de embriões *in vitro* (PIV). A PIV vem experimentando um crescimento exponencial, refletindo as transformações significativas na indústria pecuária dos rebanhos de corte e leite, permitindo a rápida disseminação de características desejáveis e a otimização da produtividade e qualidade dos animais. Esta tendência evidencia o papel fundamental do Brasil não apenas como um dos maiores produtores de carne do mundo, mas também como um centro de excelência na tecnologia da reprodução animal (Gonçalves e Viana, 2020).

A PIV tem experimentado um crescimento exponencial nos últimos anos, consolidando-se como a principal biotecnologia reprodutiva utilizada na bovinocultura. Em 2022 (Viana, 2024), mais de dois milhões de embriões bovinos foram produzidos mundialmente, sendo que aproximadamente 80% desses foram gerados por meio de técnicas *in vitro*. Esse avanço deve-se, em grande parte, ao aprimoramento das metodologias de maturação, fecundação e cultivo embrionário, bem como ao desenvolvimento de protocolos mais eficientes de criopreservação, permitindo maior viabilidade dos embriões transferidos. Além disso, a adoção em larga escala da PIV tem impulsionado não apenas o mercado de embriões, mas também o comércio internacional de material genético, refletindo uma mudança significativa na dinâmica da reprodução assistida em animais de produção (Viana, 2024).

Apesar dos avanços alcançados, a PIV ainda enfrenta desafios significativos que limitam sua eficácia e aplicação em larga escala. Um dos principais obstáculos está na obtenção de ovócitos de qualidade, uma vez que fatores como a condição fisiológica da fêmea doadora e os procedimentos de aspiração folicular podem impactar negativamente o material genético inicial. Além disso, replicar adequadamente o ambiente natural para o cultivo embrionário é um desafio constante (Aguila et al., 2020; Velazquez et al., 2023).

Durante o processo *in vitro*, os embriões são expostos a condições ambientais adversas, como variações de temperatura, pH e concentrações de gás, que podem interferir no seu

desenvolvimento. A composição do meio de cultivo também é uma limitação, pois frequentemente não reproduz de forma ideal as condições bioquímicas do trato reprodutivo da fêmea, resultando em alterações metabólicas que comprometem a viabilidade dos embriões (Velazquez et al., 2023). Entre os fatores que agravam essas limitações, o estresse oxidativo ocupa papel central, prejudicando o desenvolvimento embrionário por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas instáveis podem causar danos às membranas celulares, proteínas e DNA, reduzindo as taxas de clivagem e formação de blastocistos, além de comprometer a qualidade final dos embriões (Keane et al., 2024).

A baixa eficiência na criopreservação também representa um desafio significativo, especialmente devido à menor criotolerância dos embriões *in vitro* em comparação com os produzidos *in vivo* (Sorvenigo et al., 2017; Agarwal et al., 2022). O acúmulo de lipídeos citoplasmáticos e a presença de água na blastocele são fatores que agravam os desafios enfrentados durante a criopreservação de embriões bovinos *in vitro* (Amstislavsky et al., 2018). Esses elementos favorecem a formação de cristais de gelo durante o congelamento, resultando em danos estruturais que comprometem a viabilidade embrionária. Os lipídeos, acumulados devido a alterações metabólicas no ambiente de cultivo *in vitro*, podem interferir na funcionalidade mitocondrial, prejudicar a produção de energia e aumentar a suscetibilidade ao estresse oxidativo (Aardema et al., 2022). Essa condição reduz significativamente a criotolerância dos embriões *in vitro* em comparação com os produzidos *in vivo*, que apresentam menores quantidades de lipídeos e, conseqüentemente, maior resistência aos processos de congelamento e descongelamento (Chen et al., 2023). Esses desafios ressaltam a necessidade de aprimorar os protocolos de PIV, incorporando abordagens inovadoras que mitiguem o estresse oxidativo e otimizem a qualidade dos embriões (Wang et al., 2023).

A Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um hormônio amplamente conhecido por sua função reguladora do ciclo sono-vigília, também desempenha um papel crucial como antioxidante e protetor celular (Slominski, et al., 2017). Sua ação antioxidante ocorre por meio da neutralização direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da ativação de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase e a catalase (Li et al., 2022). Essa capacidade de reduzir o estresse oxidativo tem despertado interesse no uso da melatonina em técnicas de reprodução assistida, incluindo o cultivo de embriões bovinos *in vitro*, onde o ambiente artificial frequentemente favorece o acúmulo de EROs (Li et al., 2022).

No cultivo de embriões bovinos, a suplementação com melatonina ajuda a criar um ambiente mais estável e favorável ao desenvolvimento embrionário. A melatonina protege as membranas celulares, proteínas e DNA contra danos oxidativos, reduzindo a ocorrência de

apoptose (morte celular programada) e promovendo a integridade celular. Além disso, ela melhora a funcionalidade mitocondrial, contribuindo para uma produção mais eficiente de energia, essencial para o desenvolvimento dos embriões. Esses efeitos positivos resultam em taxas mais elevadas de clivagem e formação de blastocistos, bem como na obtenção de embriões de maior qualidade (Mahipal et al., 2024).

Além de seus efeitos antioxidantes, a melatonina também exerce propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas, que ajudam a mitigar os danos causados por condições adversas no meio de cultivo. Sua presença no meio de cultivo pode melhorar a criotolerância dos embriões, reduzindo os efeitos negativos associados ao acúmulo de lipídeos no citoplasma e à formação de cristais de gelo durante a criopreservação. Dessa forma, a melatonina não apenas melhora o desenvolvimento inicial dos embriões, mas também aumenta sua viabilidade e eficiência reprodutiva, tornando-se uma ferramenta promissora para otimizar os protocolos de produção *in vitro* (Ji et al., 2023; Mahipal et al., 2024).

Os sistemas de produção de embriões têm avançado significativamente, incorporando técnicas que aperfeiçoam a eficiência reprodutiva em diversas espécies. A PIV, que inclui a maturação, fecundação e cultivo embrionário em ambiente controlado, tem sido amplamente utilizada para maximizar o potencial genético dos rebanhos. Um fator crítico nesse processo é a tensão de oxigênio, que influencia diretamente o desenvolvimento embrionário. A alta tensão de O<sub>2</sub> pode aumentar o estresse oxidativo, afetando a viabilidade embrionária e reduzindo as taxas de blastocisto. Por outro lado, a baixa tensão de O<sub>2</sub>, simulando condições fisiológicas do trato reprodutivo materno, tem sido associada a uma melhor qualidade embrionária e maior taxa de desenvolvimento até estágios avançados. Além disso, estratégias como a suplementação com antioxidantes, incluindo a melatonina, têm sido exploradas para mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo durante a PIV. Assim, o controle rigoroso das condições de cultivo, incluindo a modulação da tensão de O<sub>2</sub>, é essencial para otimizar a produção embrionária e melhorar os índices de prenhez (Rizos et al., 2022; de Lima et al., 2023).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Produção de embriões *in vitro*

A fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos é considerada uma das biotecnologias mais avançadas para o aprimoramento genético de rebanhos, permitindo assim o aceleração do ganho genético dentro de um rebanho seja ele de um gado de corte ou de leite (Fujii et al., 2021).

Com a FIV, uma única fêmea que possua um alto valor genético do rebanho, pode produzir vários embriões em um único ciclo de produção, aumentando significativamente o número de descendentes quando comparado a outras técnicas de reprodução, como a inseminação artificial, onde a fêmea produzirá apenas um bezerro por ano. Outra vantagem da FIV é que com o aproveitamento das fêmeas de alto valor genético, pode-se transferir estes embriões produzidos ou armazená-los congelados até que se tenha reprodutoras competentes para a transferência desses embriões (Oliveira et al., 2020; Arshad et al., 2021).

A FIV também apresenta alguns gargalos, que impactam diretamente sua eficácia. O alto custo da técnica é um obstáculo principalmente para pequenos produtores. Um dos principais desafios está na variabilidade da qualidade dos ovócitos coletados, que depende de fatores como a saúde e a nutrição das doadoras, além das técnicas de aspiração folicular (OPU). Ovócitos de baixa qualidade comprometem todas as etapas subsequentes, desde a maturação *in vitro* (MIV) até o desenvolvimento embrionário (Facioli et al., 2020).

Outro problema crítico é o estresse oxidativo dos embriões produzidos *in vitro* quando comparado com a produção de embriões *in vivo*. Espécies reativas de oxigênio (EROS) podem comprometer diretamente a qualidade embrionária durante o cultivo. Esse estresse pode levar a grandes danos celulares afetando a viabilidade e o desenvolvimento desses embriões. Pesquisas recentes demonstram que a utilização de antioxidantes pode ajudar a mitigar esses efeitos, dando assim aos embriões um ambiente que seja mais propício ao seu desenvolvimento (Guo et al. 2022; Huang et al., 2023).

Na fecundação *in vitro* (FIV), a poliespermia e falhas na ativação ovocitária representam desafios recorrentes. Essas dificuldades estão associadas à qualidade dos espermatozoides e à interação inadequada entre os gametas, comprometendo tanto a formação quanto a viabilidade dos zigotos. Além disso, a reprogramação epigenética, frequentemente alterada em condições *in vitro*, pode resultar em problemas durante o desenvolvimento pós-implantação e afetar a saúde dos bezerros gerados (Zafar et al., 2021).

Outro obstáculo significativo na produção de embriões bovinos pela FIV é o acúmulo de gotas lipídicas. Embriões produzidos *in vitro* possuem mais gotas lipídicas que embriões produzidos *in vivo*, o que afeta a criopreservação e a sobrevivência pós-descongelamento. O estresse oxidativo e a formação de cristais de gelo durante a criopreservação estão associados a esse acúmulo lipídico, que prejudica a resistência dos embriões (Saraiva et al., 2023).

Superar esses gargalos requer a integração de novas tecnologias, como o uso de antioxidantes para mitigar o estresse oxidativo, a otimização dos meios de cultivo e o uso de ferramentas moleculares para monitorar a qualidade embrionária. Apesar das limitações, os avanços contínuos na produção de embriões *in vitro*, têm o potencial de aumentar significativamente sua eficiência, consolidando seu papel como uma tecnologia-chave na reprodução bovina.

## 2.2 Melatonina

A Melatonina (N- acetil-5-metoxitriptamina) um antioxidante natural (Wang et al., 2023) é sintetizada pela glândula pineal e outros locais extra pineais como pele (Slominski, et al., 2017), células neurais (Suofu et al., 2017), ovócitos (He et al., 2016) e é derivada do aminoácido triptofano. Possui diversas funções fisiológicas importantes como o controle dos ritmos circadianos (Yasmin et al., 2021), regulação da reprodução sazonal, indução do sono e melhora da resposta imune (Talpur et al., 2018). Sua função principal tem correlação com suas ações antioxidantes que protegem os organismos do estresse oxidativo, incluindo o sistema reprodutivo (Mishra et al., 2016). Tem sido empregada em várias funções terapêuticas em humanos (Sánchez-Barceló et al., 2010) incluindo o aprimoramento da qualidade dos ovócitos e de embriões em diversas espécies animais (Tosini et al., 2014; Olcese et al., 2020).

A melatonina também pode influenciar as funções ovarianas, evidenciado pelo fato de sua concentração no fluido folicular ser superior à do plasma. Na espécie bovina, essa concentração varia de 25 a 30 pg/mL, dependendo do diâmetro do folículo (Tian et al., 2014). Este composto modifica a atividade esteroidogênica das células da granulosa e a função folicular, aumentando a expressão do RNAm dos receptores do hormônio luteinizante (LH) nessas células (Woo et al., 2001; Tian et al., 2014), desempenhando um papel significativo na ovulação e na produção da progesterona.

A constatação de que a melatonina exerce uma ação antioxidante removendo os radicais livres das células, contribui para a ampliação da compreensão de seus mecanismos benéficos sobre a fisiologia reprodutiva (Chen et al., 2023). Durante o processo de ovulação, a presença

adequada de melatonina no organismo, pode modular as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) (Li et al., 2022), que são geradas abundantemente durante esse processo e podem desempenhar um papel essencial na ruptura do folículo. Contudo, um excesso de EROS durante este momento da ovulação pode desencadear um estresse oxidativo, fator que possui o potencial de ocasionar danos às células da granulosa e aos ovócitos dentro do folículo (Yang et al., 2021).

A melatonina exerce uma influência direta sobre as EROS, estimulando a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona redutase, enquanto inibe a ação de enzimas pró-oxidantes, como a ciclo-oxigenase (Anisimov et al., 2006). Embora as ações diretas de eliminação dos radicais livres pela melatonina ocorram independentemente da interação com receptores específicos, seus efeitos estimuladores sobre as enzimas antioxidantes provavelmente são mediados por receptores de membranas, sítios de ligação nucleares ou no citosol (Yang et al., 2023).

A melatonina também exerce uma ação reparadora sobre moléculas oxidadas, aumentando as concentrações de enzimas envolvidas na reparação do DNA, como a APEX1, em condições de estresse oxidativo e nitroso ativo (Perez et al., 2018). Além disso, a melatonina atua na mitigação dos efeitos adversos do envelhecimento das mitocôndrias, preservando a homeostase do glutatona (GSH) e a produção de adenosina trifosfato (ATP), uma vez que o DNA mitocondrial é suscetível à ação dos radicais livres (Yang et al., 2017).

### **2.2.1 Estresse oxidativo**

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os agentes antioxidantes é conhecido como estresse oxidativo ou desequilíbrio redox. Durante o processo de criopreservação, os embriões também estão sujeitos a danos oxidativos (Soto-Heras et al., 2019). Uma das principais causas da baixa eficiência na produção de embriões *in vitro* é a produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), associada à redução da concentração intracelular de glutatona (GSH) (Soto-Heras et al., 2018).

O termo “espécies reativas de oxigênio” abrange os radicais livres e seus intermediários não radicais. Os radicais livres são caracterizados por conter um ou mais elétrons desemparelhados, o que confere sua alta reatividade devido à camada de elétrons incompleta. Esses radicais podem originar-se de vários elementos, sendo os mais relevantes em sistemas biológicos aqueles relacionados ao oxigênio e ao nitrogênio (Burton et al., 2011; He et al., 2016). Entre os radicais livres mais comuns do oxigênio estão o superóxido, o peróxido de hidrogênio e a radical hidroxila (Nadri et al., 2022)

Nas condições basais, as EROS são geradas durante o metabolismo aeróbico e desempenham papéis essenciais nos processos fisiológicos que mantêm diversas funções biológicas. No entanto, um excesso de EROS pode ter efeitos prejudiciais sobre as funções celulares, resultando em desequilíbrio redox. Portanto, como tentativa de alcançar estabilidade, as células captam elétrons de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos ou moléculas próximas, desencadeando uma cascata de reações que resulta em danos celulares e, em casos extremos, apoptose (Wang et al., 2023). Além disso, as EROS também desempenham um papel como sinais na regulação da expressão gênica para controlar diversas funções celulares (Mahipal et al., 2021).

Do ponto de vista fisiológico, o equilíbrio entre EROS e os antioxidantes desempenham um papel crucial em processos reprodutivos, como a foliculogênese, maturação ovariana, esteroidogênese ovariana, ovulação, formação e função do corpo lúteo, luteólise, função das células germinativas, embriogênese, implantação embrionária, manutenção da gestação e início de parto (Aoiadni et al., 2020). Isso se reflete na presença de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase, no oviduto dos mamíferos. Essas enzimas desempenham um papel crucial no controle da geração de EROS no trato genital, o que pode ser um fator determinante para o sucesso da fertilização e da implantação (Marques et al., 2018; Nadri et al., 2022).

A preservação do equilíbrio redox tanto intra quanto extracelular é essencial para fornecer ambientes propícios à expressão metabólica e gênica durante o desenvolvimento embrionário (Cruz et al., 2014; Wang et al., 2023).

A geração e disseminação intracelular de EROS são reguladas por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos altamente complexos e interconectados. Esses sistemas atuam inibindo a formação e a ação oxidativa das EROS, além de reparar os danos causados pelos metabólitos decorrentes do desequilíbrio redox (Aranda et al., 2021).

As células são resguardadas contra danos oxidativos induzidos por EROS por diversos antioxidantes não enzimáticos provenientes da dieta, tais como tocoferol (vitamina E), zinco, ácido ascórbico (vitamina C), hipotaurina, selênio, ácido lipóico, carotenoides e compostos tióis (Wang et al., 2023).

O sistema de defesa enzimática inclui a SOD, que catalisa a conversão do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; as peroxirredoxinas, que degradam o peróxido de hidrogênio; a catalase, que atua sobre o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; e o sistema glutatona redutase/peroxidase, que representa o principal mecanismo de defesa contra as EROS (Nadri et al., 2022). A glutatona, um potente

antioxidante é essencial para manter o equilíbrio redox tanto dentro quanto fora das células. Ela está disponível nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Tian et al., 2017; Xu et al., 2019).

A proteção oferecida pela glutathiona contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) depende da interação de duas enzimas. A glutathiona peroxidase, uma enzima antioxidante que contém selênio, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e dos peróxidos lipídicos na presença de GSH, convertendo-a em GSSG. Posteriormente, a glutathiona redutase reduz a GSSG de volta a GSH utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que é gerado principalmente pela via das pentoses fosfato. Qualquer desequilíbrio nesse processo diminui a concentração intracelular de GSH promovendo o estresse oxidativo (Xu et al., 2019).

A relação do estado redox intra e extracelular influencia diretamente no desenvolvimento embrionário com a síntese de GSH e de DNA. Outra síntese importante nesse processo é a secreção de GSH que no líquido tubário indica que o equilíbrio redox do ambiente intra e extracelular também desenvolve uma importante função no desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* (Perez et al., 2019).

### **2.3 Sistemas de Alta e Baixa Tensão de Oxigênio para produção de embriões bovinos.**

A utilização de alta tensão de oxigênio (20%) na produção *in vitro* de embriões bovinos tem sido amplamente estudada devido à sua influência sobre o metabolismo celular. O aumento da disponibilidade de oxigênio favorece a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais, em concentrações elevadas, podem resultar em danos oxidativos ao DNA e às membranas celulares, comprometendo a viabilidade embrionária (Rizos & Lonergan, 2018).

Estudos indicam que embriões cultivados sob alta tensão de oxigênio apresentam menor taxa de clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto quando comparados aos embriões cultivados sob baixa tensão. Esse efeito é atribuído à maior produção de radicais livres, que afetam processos celulares essenciais, como a sinalização intracelular e a estabilidade do citoesqueleto (Galli & Lazzari, 2016).

Outro aspecto relevante é a modificação epigenética dos embriões expostos a altas tensões de oxigênio. A hiperoxigenação pode alterar padrões de metilação do DNA, influenciando a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético e na resistência ao estresse oxidativo, o que pode impactar a viabilidade embrionária a longo prazo (Hansen, 2020).

A exposição a 20% de oxigênio também afeta a dinâmica mitocondrial dos embriões bovinos, resultando em um aumento da taxa de consumo de oxigênio. Embora isso possa sugerir uma maior atividade metabólica, o excesso de radicais livres gerados pode prejudicar a integridade mitocondrial e comprometer a produção de ATP, essencial para o desenvolvimento embrionário (Anjos et al., 2025).

A alta tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos tem sido relacionada a múltiplos benefícios para o seu desenvolvimento. Estudos indicam que a alta tensão pode aumentar a atividade mitocondrial, promovendo uma maior produção de ATP e, conseqüentemente, melhorando o metabolismo celular (Hashimoto et al., 2017). Além disso, a alta tensão de oxigênio pode favorecer a expansão do blastocisto e aumentar a taxa de eclosão, otimizando o potencial de implantação (Rodriguez et al., 2020). Embora níveis excessivos de oxigênio possam elevar o estresse oxidativo, protocolos adequados de cultivo, incluindo o uso de antioxidantes, minimizam esse efeito adverso, garantindo um ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário (Lonergan et al., 2018).

Diferentes estratégias têm sido propostas para mitigar os efeitos negativos da alta tensão de oxigênio, incluindo o uso de antioxidantes, como a glutathiona e a vitamina E, no meio de cultura. No entanto, os resultados são variáveis e dependem da concentração utilizada, do estágio de desenvolvimento embrionário e das condições específicas de cultivo (Rizos & Lonergan, 2018).

A utilização de baixa tensão de oxigênio (5%) tem sido considerada mais fisiológica, pois se aproxima das condições encontradas *in vivo* no trato reprodutivo da fêmea bovina. Estudos indicam que essa abordagem favorece o desenvolvimento embrionário ao reduzir o estresse oxidativo e melhorar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Galli & Lazzari, 2016).

A redução da tensão de oxigênio promove um ambiente mais favorável à manutenção da homeostase redox celular, minimizando a produção de EROs e preservando a integridade das membranas celulares. Como consequência, embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio apresentam maior taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e melhor viabilidade após a transferência para receptoras (Hansen, 2020).

Além disso, a baixa tensão de oxigênio influencia positivamente a expressão gênica embrionária, favorecendo a ativação de vias metabólicas associadas à resistência ao estresse e

ao desenvolvimento embrionário eficiente. Estudos demonstram que embriões cultivados sob 5% de oxigênio apresentam padrões de metilação mais semelhantes aos embriões desenvolvidos *in vivo*, o que pode refletir em melhores taxas de implantação e prenhez (Rizos & Lonergan, 2018).

Outro benefício observado é a melhora na eficiência do metabolismo mitocondrial dos embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio. A menor produção de radicais livres permite uma utilização mais eficiente dos substratos energéticos disponíveis no meio de cultura, promovendo um desenvolvimento mais robusto e resiliente (Ueno et al., 2011).

Estudos indicam que o cultivo em baixa tensão de oxigênio promove maior eficiência na formação de blastocistos e melhora a qualidade embrionária, com maiores taxas de sobrevivência após a vitrificação. Além disso, a baixa tensão está associada à regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo energético, ao estresse oxidativo e à apoptose, contribuindo para um ambiente mais adequado ao desenvolvimento embrionário. Assim, o controle da tensão de oxigênio é uma estratégia crucial para otimizar a produção *in vitro* de embriões bovinos (Chen et al., 2023; Baez et al., 2024).

Diante dessas evidências, a adoção de protocolos de cultivo utilizando baixa tensão de oxigênio tem se mostrado uma estratégia promissora para a otimização da produção *in vitro* de embriões bovinos. No entanto, a padronização desses protocolos e a avaliação dos efeitos a longo prazo ainda são áreas que requerem maior investigação (Galli & Lazzari, 2016).

### 3. JUSTIFICATIVA

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) é uma biotecnologia amplamente utilizada, especialmente no melhoramento genético e na reprodução animal. Apesar de seus avanços, a técnica enfrenta desafios que comprometem a eficiência do cultivo embrionário, como o estresse oxidativo, alterações metabólicas e dificuldades na replicação do ambiente uterino natural. Essas limitações afetam a qualidade e viabilidade dos embriões produzidos, destacando a necessidade de estratégias que minimizem esses impactos. Nesse contexto, a melatonina surge como uma molécula promissora devido às suas propriedades antioxidante anti-inflamatória e reguladora metabólica.

A melatonina tem sido amplamente estudada como um modulador do cultivo embrionário, demonstrando efeitos benéficos na mitigação do estresse oxidativo, fator crítico para o desenvolvimento *in vitro* de embriões. Sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) protege estruturas celulares sensíveis, como membranas, proteínas e DNA, promovendo um ambiente mais estável para o desenvolvimento embrionário. No entanto, a influência de diferentes concentrações de melatonina, especialmente em condições de alta e baixa tensão de oxigênio, ainda não está completamente elucidada, o que justifica estudos adicionais nessa área.

Os níveis de oxigênio desempenham um papel crucial no cultivo de embriões, pois tanto a alta tensão quanto a baixa tensão de oxigênio podem desencadear alterações metabólicas que comprometem o desenvolvimento embrionário. A alta tensão de oxigênio está associada ao aumento do estresse oxidativo, enquanto a baixa tensão pode limitar a disponibilidade energética para as células em desenvolvimento. A melatonina, ao regular mecanismos antioxidantes e mitocondriais, pode atuar de forma diferenciada dependendo das condições tensionais do cultivo, indicando uma necessidade de avaliação sistemática de suas concentrações em diferentes cenários.

Portanto, compreender como a melatonina atua em condições de alta e baixa tensão de oxigênio durante o cultivo de embriões bovinos é essencial para o desenvolvimento de protocolos mais eficazes. Essa abordagem tem o potencial de melhorar a eficiência da PIV, aumentar a qualidade dos embriões e ampliar sua aplicabilidade comercial. Além disso, os resultados desse estudo podem contribuir para o avanço do conhecimento científico sobre a interação entre antioxidantes e o ambiente de cultivo embrionário, oferecendo *insights* para outras áreas da reprodução animal.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo geral

1.1.1 Avaliar o efeito da melatonina para produção de embriões bovinos em sistemas de baixa e alta tensão de oxigênio.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de blastocistos quando a melatonina foi incluída no cultivo de embriões em baixa e alta tensão de O<sub>2</sub>;
- Avaliar a qualidade dos embriões bovinos por meio da expressão dos genes relacionados a regulação da capacitação da glicose (SLC2A1), ao estresse oxidativo (SOD-1 e SOD-2), ao reconhecimento materno (IFN- $\tau$ ), à diferenciação do trofotoderma (PLAC-8) e à placentação, (KRT-8), quando cultivados em sistemas de alta e baixa tensão de oxigênio com a suplementação de melatonina;
- Avaliar o efeito da melatonina sobre o estresse oxidativo e composição lipídica dos embriões bovinos cultivados em sistemas de alta e baixa tensão de tensão de oxigênio suplementados com melatonina

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental

Para buscar uma melhoria na qualidade embrionária e aumentar a taxa de produção de blastocistos foram testados o uso da melatonina durante o cultivo de embriões bovinos em sistema de alta tensão de O<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>), baixa tensão de O<sub>2</sub> com mistura carbogênica (5% de CO<sub>2</sub>; 5% de O<sub>2</sub>; 90% de N<sub>2</sub>). Foram testados os seguintes tratamentos:

- 1- Uso da melatonina na concentração de 10<sup>-9</sup>M no cultivo embrionário em baixa tensão de O<sub>2</sub>;
- 2- Uso da melatonina na concentração de 10<sup>-9</sup>M no cultivo embrionário em alta tensão de O<sub>2</sub>;
- 3- Controle (1) sem melatonina em alta tensão de O<sub>2</sub>;
- 4- Controle (2) sem melatonina em baixa tensão de O<sub>2</sub>.

As taxas de clivagem, blastocistos, atividade mitocondrial, metabolismo lipídico e expressão de genes ligados ao estresse oxidativo e qualidade embrionária foram avaliados para determinar o efeito dos tratamentos.

### 5.2 Produção *in vitro* de embriões

Ovários bovinos de fêmeas foram coletados em abatedouros locais e transportados em solução salina (0,9%) a 35°C para o laboratório. No laboratório, os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos com 3 a 8 mm de diâmetro com o auxílio de seringas e agulhas 40x12mm, armazenados em tubos cônicos de poliestireno com capacidade de 15 mL e mantidos em banho-maria a 36°C por 10 minutos para decantação. Grupos de 30 a 35 CCOs com qualidade grau 1 e 2 caracterizados por citoplasma homogêneo e presença de três ou mais células do cúmulo e foram selecionados e incubados em gotas de 300 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em tubos criogênicos de 2 ml, por 22 a 24 horas em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa saturada sem condensação. O meio de maturação foi composto por TCM 199 sais de Earles (Gibco BRL®) suplementado com 10 % de SFB (Gibco BRL®), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH Sigma®), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH Sigma®), 1 µg/mL L-glutamina (Sigma®), 100 UI/ml penicilina (Sigma®) e 50 µg/mL estreptomicina (Sigma®).

Após o período de maturação, os CCOs foram lavados em meio de fecundação e transferidos para placas com gotas de 100 µL de meio fecundação (FEC) e cobertas com óleo

mineral. O meio de fecundação utilizado foi o TALP, suplementado com 2 mM de penicilina (Sigma®), 1 mM de hipotaurina (Sigma®), 250 mM de epinefrina (Sigma®) e 10 µg/ml de heparina (Sigma®). Para a fecundação *in vitro* (FIV) foi utilizado sêmen comercial convencional congelado de touro da raça Nelore com fertilidade *in vitro* testada. Após o descongelamento em banho-maria a 35°C por 30 segundos, a motilidade e vigor espermático foram avaliados, e o sêmen depositado sobre a coluna de gradiente mini Percoll 45-90% e centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. O sedimento de espermatozoides foi ressuspensionado em 1 mL de meio CAP e novamente centrifugado a 9000 rpm por 3 minutos. O pellet final foi ressuspensionado em 100 µL de meio de fecundação. Cada gota com os ovócitos foi fecundada com a concentração final de  $1,0 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL. Após a fecundação, as placas foram incubadas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa saturada sem condensação por 18 horas.

Os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados por sucessivas pipetagens, lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de SOF, fluido sintético do oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sodium tri citrato (Sigma®), 2,77 mM myo-inositol (Sigma ®) e 5 % de SFB (SOFaa) (Holm et al., 1999). Uma parte dos zigotos foram cultivados por sete dias a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com tratamentos com e sem melatonina. Da mesma forma, a outra parte dos zigotos foram cultivados em câmara de hipóxia (Modular Incubator Chamber-MIC-101, Billups-Rothenberg, Inc) com mistura carbogênica (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e balanço em nitrogênio), e umidade relativa saturada sem condensação, utilizando os mesmos tratamentos. Após 72 horas de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem e taxa de blastocistos foi avaliada após sete dias (D7) de cultivo, sendo o dia zero (D0) o dia da FIV.

### **5.3 Avaliação da funcionalidade mitocondrial e quantificação lipídica por microscopia Confocal**

Um total de 10 embriões de cada tratamento foi selecionado para coloração com os corantes *MitoTracker* (MTK) e *Bodipy*, com o objetivo de avaliar parâmetros relacionados à funcionalidade mitocondrial e ao metabolismo lipídico. O corante *Mitotracker* foi preparado na concentração de 400 nM (0,2 µL da alíquota de MTK para 500 µL de meio SOF) e estabilizado por 15 minutos em um eppendorf aberto na estufa. Após esse período, os embriões foram retirados da placa de cultivo, lavados em duas gotas de PBS + PVP (a 35–37°C) e colocados no eppendorf contendo o *Mitotracker* por 30 minutos na estufa. Em seguida, os embriões foram retirados, lavados novamente com PBS + PVP e fixados por uma hora em uma solução de

paraformoldeído a 4%. Após a fixação, os embriões foram transferidos para um eppendorf contendo paraformoldeído a 1% até que fossem corados com *Bodipy*. Após esse período, os embriões foram lavados novamente em duas etapas com PBS + PVP e colocados em uma solução de 0,2% de Triton por 30 minutos à temperatura ambiente (25–27°C). Após essa etapa, os embriões foram submetidos a mais dois banhos em PBS + PVP. O corante *Bodipy* foi então diluído, adicionando-se 50 µL de etanol absoluto à alíquota com o corante, seguido de 950 µL de PBS + PVP, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL. Os embriões foram incubados por 1 hora na solução de *Bodipy* e, após a incubação, lavados três vezes em PBS + PVP com pipetagem máxima para remover o background. Finalmente, os embriões foram colocados individualmente em gotas de 5 a 8 µL de SlowFade, em lâminas e levados para o microscópio confocal (Leica SP8 Multiphoton Microscope), sendo avaliados com os seguintes parâmetros: para o *Bodipy*, utilizou-se o laser Argon 488, com emissão/excitação em 493/503; e para o *Mitotracker*, o laser 638, com emissão/excitação em 644/665. A análise foi realizada no *ImageJ*, onde os canais de fluorescência foram separados (*Split Channels*) e as regiões de interesse (*ROIs*) selecionadas manualmente. A intensidade média de fluorescência foi quantificada utilizando a função *Measure*, subtraindo a fluorescência de fundo. Os dados foram normalizados e analisados estatisticamente no GraphPad Prism, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### 5.4 Expressão gênica

A qualidade embrionária foi avaliada por expressão de genes relacionados ao metabolismo celular (SLC2A1), ao estresse oxidativo (SOD 1 e SOD2), ao reconhecimento materno (IFN- $\tau$ ), ao metabolismo celular (PLAC8), à placentação (KRT8) e regulação da apoptose (KRT8) pelo método de transcrição reversa quantitativa em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Para mensuração da expressão dos genes analisados foram utilizados três *pools* de 15 blastocistos para cada tratamento.

O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O volume total de RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA por meio do conjunto comercial First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) – SuperScript® III (200 U/µL) e primer Oligo-dT (0,5 µg/µL) no volume final de 40 µL. As reações foram realizadas a 65°C por 5 minutos e 50°C por 50 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85°C por 5 minutos. Os nomes e sequências dos primers de cada gene estão listados na Tabela 1. A análise do qPCR foi realizada usando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima

para cada gene (76 – 110%) por cálculos usando as curvas padrões relativas do programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems).

Tabela 1- Informações dos primers específicos usados para amplificação de fragmentos de genes para análise de qPCR em tempo real.

Gene	Iniciadores	Fragmento
<b>IFN-<math>\tau</math></b>	5' - TGCAGTACAAAGGAGAGGTGA - 3'	~150
	5' - GAGTCTTCAAGTGGTGAAGAA - 3'	
<b>KRT8</b>	5' - GCCGCTCACTGACTGAATGA - 3'	~120
	5' - GGGCTGCTTGTGAGTAGTTG - 3'	
<b>PLAC8</b>	5' - GAGGGTTGCTGACAGTTTGT - 3'	~130
	5' - CAGACATGACAGCAGCAAGT - 3'	
<b>SLC2A1</b>	5' - ATCCACAGTGGCACAGTTGAG - 3'	~140
	5' - GGCTGAGGGTGGAAATGGTG - 3'	
<b>SOD1</b>	5' - GCGGTGGAAGCTGAACTCTC - 3'	~110
	5' - CGTGGCCAGGGAGGAAACAA - 3'	
<b>SOD2</b>	5' - AGAAGGAGCCAGGAGGAGTG - 3'	~135
	5' - TTGGGTGATGTCAGTTGAGG - 3'	
<b>GAPDH</b> (referência)	5' - GGAAGGTGAAGGTCGGAGT - 3'	~150
	5' - GGAAGATGGTGTGATGGGATTT - 3'	

## 5.5 Análise estatística

O experimento foi realizado com 20 repetições de produção de embriões *in vitro* para os dois sistemas de tensão de oxigênio com e sem suplementação com melatonina. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism 10. As variáveis de atividade mitocondrial, metabolismo lipídico e expressão de genes entre os tratamentos nos sistemas de alta e baixa tensão de O<sub>2</sub> foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ). Variáveis binomiais como taxas de clivagem e blastocisto foram comparadas usando o método Qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).

A média  $\pm$  o erro da média ( $m \pm EM$ ) foram usadas para expressar os dados.

## 6. RESULTADOS

Os embriões cultivados sob alta tensão de oxigênio com suplementação de melatonina apresentaram taxa de blastocisto superior ao seu grupo controle ( $39,80 \pm 2,14\%$  vs.  $34,04 \pm 1,72\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ; Tabela 2), bem como aos outros grupos da baixa tensão de oxigênio ( $31,67 \pm 2,52\%$  vs.  $31,39 \pm 2,10\%$ , respectivamente com e sem melatonina).

O tratamento com melatonina em baixa tensão de  $O_2$  apresentou taxa de clivagem superior a todos os outros tratamentos ( $p < 0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito da suplementação com melatonina sob condição de alta e baixa tensão de  $O_2$  sobre as taxas de clivagem e blastocistos (m  $\pm$ EP).

Tratamentos	Ovócitos	Taxa de clivagem (%)	Taxa de blastocitos D7 (%)
Alta $O_2$ com Melatonina	589	$78,50 \pm 3,00$ (461/589) <sup>b</sup>	$39,80 \pm 2,14$ (233/589) <sup>a</sup>
Alta $O_2$ sem Melatonina	584	$76,93 \pm 2,43$ (447/584) <sup>b</sup>	$34,04 \pm 1,72$ (198/584) <sup>b</sup>
Baixa $O_2$ com Melatonina	533	$82,32 \pm 2,16$ (437/533) <sup>a</sup>	$31,67 \pm 2,52$ (164/533) <sup>b</sup>
Baixa $O_2$ sem Melatonina	554	$76,33 \pm 1,83$ (417/554) <sup>b</sup>	$31,39 \pm 2,10$ (174/554) <sup>b</sup>

a,b Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ).

A análise da expressão gênica revelou que em alta tensão de  $O_2$ , o uso da melatonina gerou uma maior expressão dos genes SOD2 ( $p < 0,0001$ ; Figura 1C), KRT-8 ( $p < 0,0001$ ; Figura 1D), IFN- $\tau$  ( $p = 0,0344$ ; Figura 1E) e PLAC-8 ( $p = 0,0307$ ; Figura 1F) em relação aos grupo alta sem melatonina. Ainda houve uma maior expressão dos genes em relação ao tratamento com melatonina em alta tensão de  $O_2$  e a baixa tensão com melatonina nos genes SOD2 ( $p < 0,0001$ ; Figura 1C), KRT-8 ( $p < 0,0001$ ; Figura 1D), IFN- $\tau$  ( $p = 0,0283$ ; Figura 1E) e PLAC-8 ( $p = 0,0253$ ; Figura 1F).

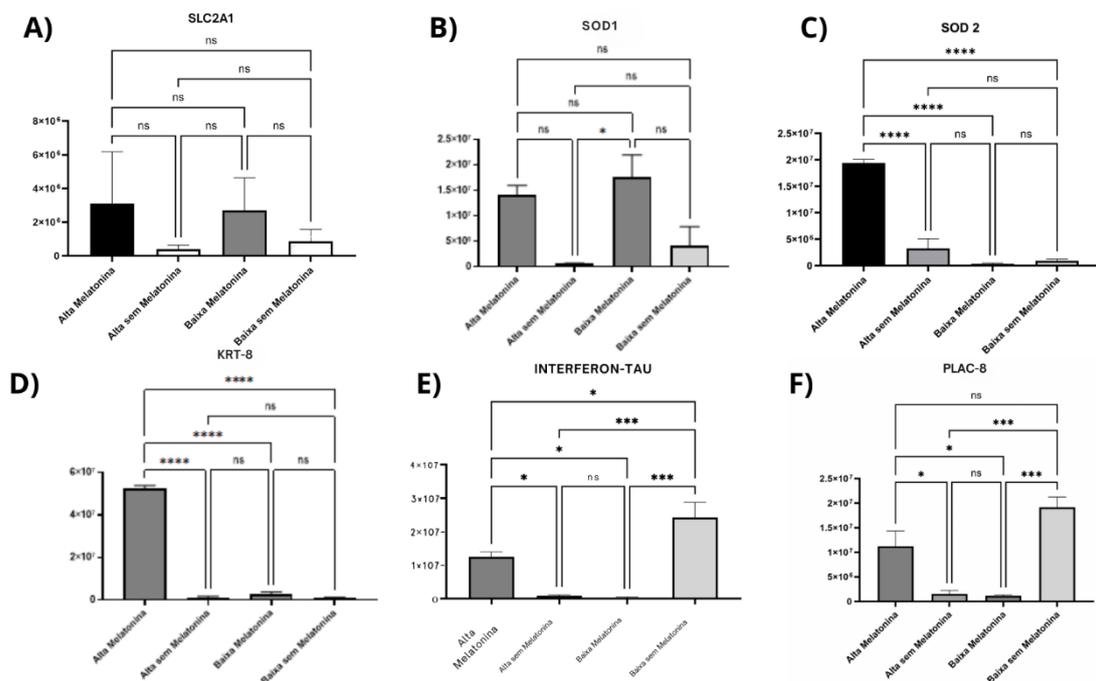
Em baixa tensão de oxigênio, os genes PLAC-8 ( $p = 0,0008$ ; Figura 1F) e IFN- $\tau$  ( $p = 0,0005$ ; Figura 1E) foram mais expressos no grupo sem melatonina.

Em comparação ao tratamento baixa tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina, o gene PLAC-8 (p=0,0009; Figura 1F) foi mais expresso em relação ao tratamento em alta tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina

Para o gene SOD1, o tratamento com melatonina em baixa tensão de O<sub>2</sub> foi mais expresso somente em comparação com o tratamento sem melatonina em alta tensão de O<sub>2</sub> (p=0,0190; Figura 1B).

Para o tratamento alta tensão com melatonina, os genes KRT-8 (p<0,0001; Figura 1D) e SOD2 (p<0,0001; Figura1C) em relação ao grupo baixa tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina. Em baixa tensão de O<sub>2</sub> sem melatonina, o gene IFN- $\tau$  (p=0,0005; Figura 1E) foi mais expresso em comparação ao tratamento alta tensão O<sub>2</sub> de sem melatonina. Para o mesmo gene, a expressão em baixa sem melatonina foi mais expressa em relação a alta com melatonina (p=0,0332)

Em nenhum tratamento foi observada diferenças na expressão gene SLCA1 (P>0,05; Figura 1A).

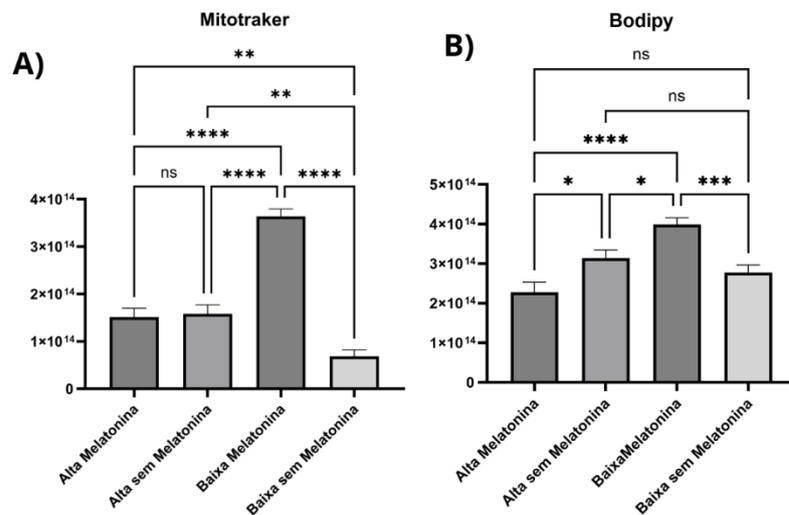


**Figura 1-** Expressão relativa de mRNA dos genes SLC2A1 (A), SOD 1(B), SOD 2 (C), KRT-8 (D), Interferon Tau (E) e PLAC-8 (F) em embriões bovinos tratados com melatonina ou sem melatonina (controle) em alta tensão e baixa tensão de O<sub>2</sub>. A quantificação foi realizada por RT-qPCR, e os valores foram normalizados por genes de referência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O símbolo (\*) indicam diferenças significativas

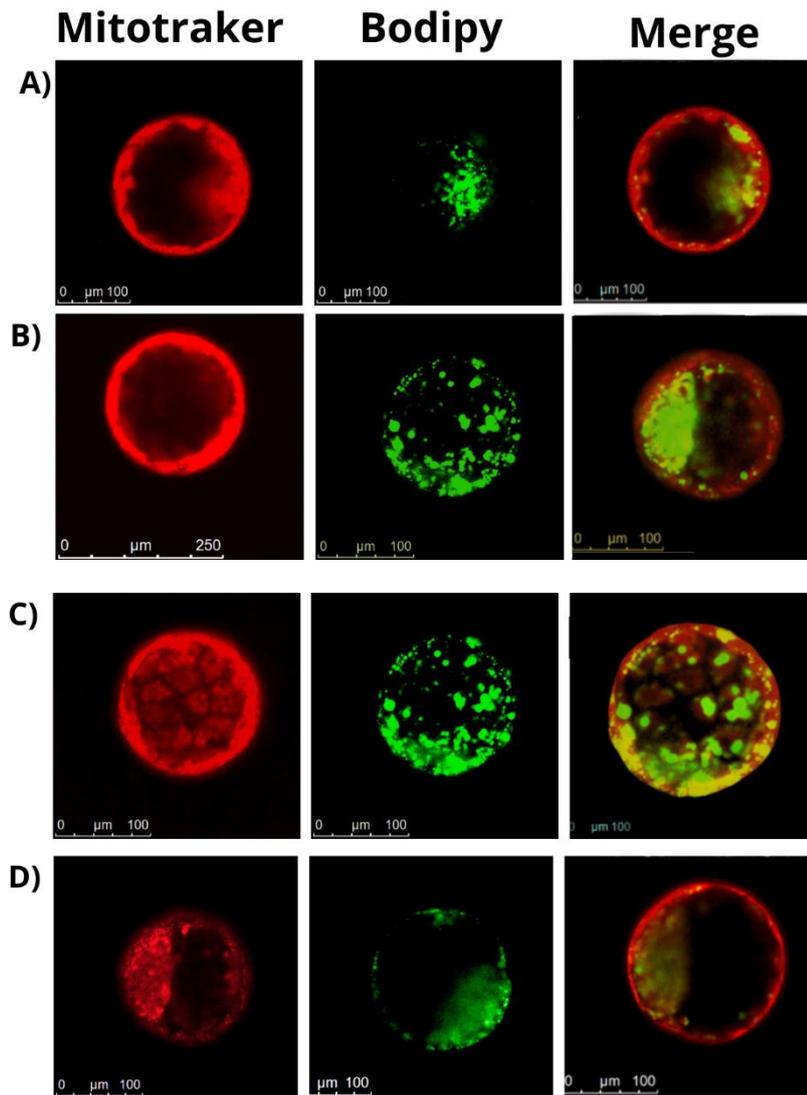
entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ), quanto mais símbolos (\*\*, \*\*\*) maior significância estatística. Ns indicam diferença não significativa ( $P > 0,05$ ).

A avaliação da funcionalidade mitocondrial demonstrou que a suplementação com melatonina aumentou a atividade mitocondrial em baixa tensão de  $O_2$  ( $p=0,0001$ ; Figura 2A; Figura 3C-D) e foi superior aos outros tratamentos. Na alta tensão de  $O_2$  não houve diferença entre o grupo tratamento e grupo controle ( $P > 0,05$ ; Figura 2A; Figura 3A-B). Além disso, os grupos da alta tensão de  $O_2$  apresentaram maior atividade mitocondrial que o grupo sem melatonina da baixa tensão de  $O_2$  ( $p=0,0003$ ; Figura 2A; Figura 3).

Além disso, a melatonina reduziu significativamente o acúmulo lipídico nos embriões cultivados sob alta tensão de  $O_2$  ( $p=0,0174$ ; Figura 2A; Figura 3A-B), mas apresentou efeito contrário em baixa tensão de  $O_2$  em relação ao seu tratamento controle e também relação ao tratamento controle da alta tensão de  $O_2$  sem melatonina ( $p=0,0002$ ; Figura 2B; Figura 3B-C).



**Figura 2-** Efeito da melatonina na atividade mitocondrial (A) e no acúmulo lipídico (B) em embriões bovinos sob diferentes condições de tensão de oxigênio. A unidade do eixo Y representa a intensidade de fluorescência dos marcadores *Mitotraker* (para mitocôndrias) e *Bodipy* (para lipídios). Asterisco (\*) indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ), ns indicam diferenças não significativas ( $P > 0,05$ )



**Figura 3-** Expressão diferencial de marcadores celulares em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* sob diferentes condições de oxigênio e suplementação com melatonina. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, evidenciando marcações específicas para estruturas celulares. O marcador vermelho (*mitotraker*) indica a intensidade das mitocôndrias, enquanto a coloração verde (*bodipy*) representa a marcação de lipídeos nos blastocistos. A suplementação com melatonina em alta tensão de oxigênio (A) resultou em maior intensidade de marcação em comparação ao grupo sem melatonina (B), em baixa tensão de oxigênio, a presença de melatonina (C) também demonstrou aumento na expressão celular em relação ao grupo controle (D). Escala de 100 µm.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a adição de melatonina ao meio de cultivo em condições de alta tensão de O<sub>2</sub> melhora a taxa de produção de blastocistos no D7, bem como a qualidade embrionária, a expressão de genes ligados a qualidade embrionária e reduzindo a concentração lipídica nos embriões. Além disso, foi observado que a melatonina não auxiliou para aumentar a quantidade de blastocistos em sistema de cultivo embrionário com baixa tensão de O<sub>2</sub>. Entretanto, demonstrou efeito positivo para aumentar a atividade mitocondrial e metabolismo embrionário nesse sistema. Esses achados reforçam a hipótese de que a melatonina exerce um papel crucial na proteção contra os efeitos deletérios das EROs, que estão mais presentes em ambientes com maior disponibilidade de oxigênio e também pode atuar positivamente no sistema de cultivo embrionário com menor concentração de O<sub>2</sub>, melhorando a expressão de genes relacionados a qualidade embrionária.

Neste estudo foi possível observar uma maior taxa de blastocistos, proporcionando mais em comparação com os outros tratamentos (Tabela 2), que conseqüentemente podem proporcionar um maior número de prenhez. Essa melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário pode ser atribuída a redução do estresse oxidativo, preservação da integridade mitocondrial e modulação a expressão gênica relacionada à sobrevivência celular quando a melatonina foi utilizada no cultivo embrionário. De acordo com Torres-Osorio et al. (2019) e Kandil et al. (2024), o incremento da produção embrionária está associada não apenas a ação antioxidante da melatonina, mas também a sua capacidade de atravessar membranas celulares e mitocondriais, proporcionando proteção direta a estruturas essenciais para o metabolismo e desenvolvimento celular.

Já no sistema de cultivo embrionário com baixa tensão de O<sub>2</sub>, a suplementação do meio de cultivo com melatonina promoveu um aumento na taxa de clivagem ( $82,32 \pm 2,16$  vs  $76,33 \pm 1,83$ ) relação a todos tratamentos, porém não influenciou a taxa de produção de blastocistos dentro do sistema. Esse resultado sugere que, nesse sistema, a menor disponibilidade de oxigênio já é suficiente para minimizar o estresse oxidativo, reduzindo a necessidade de um efeito protetor adicional da melatonina.

Nos embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio, o gene SOD1 não apresentou diferença em sua expressão entre o tratamento com melatonina e sem melatonina ( $P > 0,05$ ; Figura 1B), porém foi mais expresso que o tratamento controle (sem melatonina) do sistema de alta tensão de O<sub>2</sub> ( $p = 0,0190$ ; Figura 1B).

De acordo com Yonghui et al. (2021), além de sua função antioxidante direta, a melatonina potencializa a ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), otimizando o metabolismo energético das células e reduzindo a taxa de apoptose (Yonghui et al., 2021). A superóxido dismutase 1 (SOD1) é uma enzima antioxidante fundamental na defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ROS), prevenindo danos oxidativos que podem comprometer a viabilidade embrionária (Halliwell & Gutteridge, 2015; Wang et al., 2021).

Já a superóxido dismutase 2 (SOD2), localizada na matriz mitocondrial, é uma das principais defesas celulares contra o estresse oxidativo, catalisando a conversão de radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), protegendo as células contra danos mitocondriais (Wang et al., 2021). No presente estudo, a expressão de SOD2 foi significativamente maior no grupo tratado com melatonina sob alta tensão de  $O_2$  em comparação ao grupo sem melatonina ( $P < 0,0001$ ; Figura 1C) e também aos outros tratamentos da baixa tensão de  $O_2$ . Esse achado reforça a ação antioxidante da melatonina, que pode regular a resposta mitocondrial ao estresse oxidativo, favorecendo um ambiente celular mais estável para o desenvolvimento embrionário. Estudos prévios indicam que a expressão de SOD2 pode ser modulada de acordo com os níveis basais de estresse oxidativo, sendo mais pronunciada em ambientes celulares sob maior tensão de  $O_2$ . Em condições de menor estresse oxidativo, a melatonina pode atuar mais como reguladora do que como indutora da expressão de SOD2, auxiliando no equilíbrio do metabolismo mitocondrial sem necessariamente estimular uma resposta compensatória (De Lima et al., 2023).

Outro aspecto relevante do uso da melatonina no cultivo embrionário em condições de alta tensão de  $O_2$  desse estudo foi a expressão diferencial dos genes KRT-8, PLAC-8 e Interferon-tau dentro do mesmo sistema com 20% de oxigênio e do gene PLAC-8, mais expresso em comparação a todos os tratamentos (Figura 1). Uma maior expressão observada desses genes marcadores de qualidade embrionária sugere que a melatonina promove melhorias qualitativas, como maior viabilidade embrionária e competência para a implantação. Outros estudos indicam que a melatonina favorece a homeostase celular e a funcionalidade mitocondrial, fatores diretamente relacionados à qualidade embrionária (Khan et al., 2023).

Contrariamente, os embriões cultivados em baixa tensão de  $O_2$  sem melatonina apresentaram uma maior expressão dos genes Interferon-tau ( $P = 0,0005$ ; Figura 1E) e PLAC-8 ( $P = 0,0008$ ; Figura 1F). Esse resultado sugere que, nesse sistema, a menor disponibilidade de oxigênio já é suficiente para minimizar o estresse oxidativo, reduzindo a necessidade de um efeito protetor adicional da melatonina. A baixa tensão de  $O_2$  na produção de embriões *in vitro*

é amplamente estudada por mimetizar o ambiente fisiológico do trato reprodutivo da fêmea, proporcionando um meio mais favorável ao desenvolvimento embrionário. De acordo com Zeng et al. (2024) e Báez et al. (2024), a baixa tensão de O<sub>2</sub> está associada à regulação da expressão de genes ligados ao metabolismo energético, ao estresse oxidativo e à apoptose, contribuindo para um ambiente mais adequado ao desenvolvimento embrionário. Assim, o controle da tensão de oxigênio se destaca como uma estratégia essencial para otimizar a produção *in vitro* de embriões bovinos.

O interferon tau (IFNT) é uma citocina essencial secretada pelo trofotoderma durante o estágio de blastocisto, desempenhando um papel crucial na sinalização endometrial para a manutenção da função do corpo lúteo. Sua ação inibe a expressão dos receptores de ocitocina no endométrio, reduzindo a liberação pulsátil de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ), um dos principais agentes luteolíticos. Dessa forma, o IFNT impede a regressão do corpo lúteo, promovendo a síntese contínua de progesterona e assegurando a manutenção da gestação. (Bazer et al., 2017; Forde & Lonergan, 2017). A melatonina, por sua vez, possui propriedades antioxidantes e reguladoras do estresse oxidativo celular (Tan et al., 2015), podendo influenciar a atividade transcricional do IFNT e modificar o microambiente molecular do trofotoderma. Por outro lado, em alta tensão de O<sub>2</sub>, a melatonina parece exercer um efeito protetor, prevenindo possíveis danos oxidativos ao trofotoderma e favorecendo a manutenção da expressão de IFNT. O estresse oxidativo gerado por elevadas concentrações de O<sub>2</sub> pode comprometer a viabilidade embrionária, e a melatonina, ao atuar como um antioxidante, pode mitigar esses efeitos, resultando em maior expressão de IFNT e, potencialmente, em melhores condições para o reconhecimento materno da gestação (Lockley., 2020; Loh et al., 2021).

Em baixa tensão de O<sub>2</sub>, a redução da expressão de IFNT no grupo tratado com melatonina sugere que essa molécula pode modular negativamente a produção dessa citocina nessas condições. Isso pode estar relacionado ao fato de que a hipóxia pode estimular a expressão de genes envolvidos na adaptação embrionária ao ambiente intrauterino, promovendo mecanismos de sobrevivência que favorecem a implantação (Guzeloglu-Kayisli et al., 2019).

A queratina 8 (KRT-8) é um dos principais filamentos intermediários do citoesqueleto epitelial e está diretamente envolvida na diferenciação do trofotoderma, camada responsável pela formação do trofoblasto e pelo processo de implantação embrionária (Vijayaraj et al., 2009). Além disso, a queratina 8 tem sido associada ao desenvolvimento do epiblasto e do trofotoderma, estruturas essenciais para a progressão embrionária e o sucesso da implantação (Tsantarliotou et al., 2007). O aumento da expressão de KRT-8 em embriões tratados com melatonina sob alta tensão de O<sub>2</sub>, sugere que essa molécula pode modular positivamente a

morfogênese embrionária, tornando o embrião mais resistente ao estresse oxidativo e mecanicamente mais preparado para a implantação.

A expressão do gene Placenta-Specific 8 (PLAC-8), um marcador essencial para o desenvolvimento embrionário e a formação do trofoblasto, apresentou padrões distintos sob diferentes níveis de oxigênio e tratamento com melatonina. Nos embriões cultivados sob baixa tensão de O<sub>2</sub>, a expressão de PLAC-8 foi significativamente maior no grupo controle (sem melatonina) em comparação ao grupo tratado com melatonina (P= 0,0008). Esse achado sugere que a melatonina pode modular negativamente a transcrição de PLAC-8 em condições hipóxia, assim como esse sistema seja ao suficiente em regular positivamente esse gene em baixa tensão de oxigênio (Bastos et al., 2022). Por outro lado, em condições de alta tensão de O<sub>2</sub>, a expressão de PLAC-8 foi significativamente maior no grupo tratado com melatonina em comparação ao grupo sem melatonina (P = 0,0307). Esse resultado sugere que a melatonina pode atuar de maneira dependente da disponibilidade de oxigênio, promovendo a expressão de PLAC-8 em condições normóxicas, possivelmente favorecendo a competência embrionária e a interação materno-fetal. A melatonina é conhecida por seu papel na proteção contra o estresse oxidativo, regulando processos epigenéticos e modulando a expressão gênica durante a embriogênese (Lockley et al., 2020). A maior expressão de PLAC-8 sob alta tensão de O<sub>2</sub> pode estar relacionada à função antioxidante da melatonina, que pode favorecer a homeostase celular e otimizar a diferenciação do trofotoderma. A discrepância observada entre baixa e alta tensão de O<sub>2</sub> sugere que a melatonina pode atuar de maneira diferencial dependendo do microambiente oxidativo, influenciando a regulação transcricional de PLAC-8 e, conseqüentemente, o desenvolvimento do trofoblasto. Estudos indicam que a hipóxia pode estimular mecanismos adaptativos no embrião, incluindo a modulação de genes envolvidos na sobrevivência celular e implantação embrionária. Assim, a presença de melatonina pode reduzir essa resposta compensatória, explicando a menor expressão de PLAC-8 sob baixa tensão de O<sub>2</sub>. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais a melatonina regula a expressão de PLAC-8 e suas repercussões na viabilidade e competência embrionária ainda não estão completamente esclarecidos (Bastos et al., 2020).

Além disso, foi observado um aumento na atividade mitocondrial nos embriões cultivados com suplementação de melatonina em sistema de baixa de tensão de O<sub>2</sub>. Esse mesmo padrão observado evidencia que a melatonina promove uma melhor funcionalidade mitocondrial, que pode contribuir para uma maior produção de ATP, essencial para o desenvolvimento embrionário adequado, reduzindo os impactos negativos do estresse oxidativo

sobre a viabilidade embrionária (Lira et al., 2020). Por outro lado, uma alta atividade mitocondrial pode estar ligada a uma produção excessiva de energia.

Os resultados obtidos neste experimento também demonstram que a suplementação com melatonina durante o cultivo embrionário bovino influencia positivamente a atividade de homeostase lipídica, especialmente sob condições de alta tensão de oxigênio. O marcador *bodipy* revelou diferenças significativas na quantificação do acúmulo lipídico entre os grupos experimentais. Os embriões tratados com melatonina em alto nível de oxigênio demonstraram uma redução significativa na deposição lipídica ( $p= 0,0174$ ). Essa diminuição na quantidade de inclusões lipídicas, pode ser atribuída à ação antioxidante e moduladora do metabolismo celular desempenhada por esse antioxidante. A melatonina é reconhecida por sua capacidade de mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, preservando a homeostase celular e melhorando a eficiência bioenergética.

Contrariamente, sob condições de baixa tensão de oxigênio, a presença de melatonina proporcionou uma maior acumulação de lipídios na forma de gotículas intracitoplasmáticas. A dinâmica do metabolismo lipídico nos embriões bovinos está intimamente relacionada à funcionalidade mitocondrial e ao balanço entre lipogênese e lipólise. A presença da melatonina pode ter promovido uma menor taxa de lipólise, reduzindo o catabolismo lipídico exacerbado e otimizando a utilização dessas reservas energéticas de maneira mais controlada. O acúmulo excessivo de lipídeos em embriões bovinos está associado a uma menor taxa de desenvolvimento e viabilidade, além de reduzir a tolerância ao congelamento, fator crítico para técnicas de biotecnologia reprodutiva, como a transferência de embriões (Sudano et al., 2022). A menor quantidade de lipídeos nos embriões tratados com melatonina em alta tensão de  $O_2$  pode indicar uma otimização do metabolismo energético, favorecendo a utilização eficiente de substratos energéticos em detrimento do armazenamento excessivo. Da mesma forma, o próprio sistema com baixa tensão de oxigênio pode ter modulado de forma semelhante e proporcionado uma menor deposição de lipídeos nos embriões cultivados nesse sistema.

No contexto do melhoramento genético bovino, a qualidade embrionária é um fator determinante para o sucesso das técnicas reprodutivas. A redução do estresse oxidativo e a melhora na homeostase metabólica observadas nos embriões tratados com melatonina em alta tensão de oxigênio, e nos embriões cultivados sem melatonina em baixa tensão de oxigênio, podem resultar em taxas mais altas de desenvolvimento embrionário, maior sobrevivência pós-transferência e melhor adaptação ao congelamento.

Dessa forma, os achados do presente estudo sugerem que a melatonina pode desempenhar um papel fundamental na proteção embrionária contra o estresse oxidativo,

especialmente em condições de alta tensão de  $O_2$ , onde o impacto das EROs é mais acentuado. Entretanto, seus efeitos podem ser contexto-dependentes, variando de acordo com o nível basal de estresse oxidativo e a demanda metabólica mitocondrial.

Por outro lado, sob baixa tensão de  $O_2$ , o impacto do estresse oxidativo pode ser menos pronunciado, levando a uma menor necessidade de ativação de mecanismos compensatórios. Além disso, a hipóxia moderada pode estimular a ativação de genes de adaptação celular, favorecendo o desenvolvimento embrionário e a plasticidade metabólica (Guzeloglu-Kayisli et al., 2019) sem a necessidade da suplementação com melatonina.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a suplementação com melatonina exerce um efeito benéfico sobre a produção e qualidade embrionária, especialmente em condições de alta tensão de oxigênio. A maior taxa de blastocistos observada nesse ambiente sugere que a melatonina atua como um eficiente agente antioxidante, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e, conseqüentemente, minimizando os danos oxidativos que comprometem o desenvolvimento embrionário. Além disso, a melhora na qualidade embrionária indica que a melatonina não apenas protege as células contra o estresse oxidativo, mas também favorece um metabolismo mais equilibrado, resultando em embriões com maior potencial de desenvolvimento e viabilidade pós-transferência.

Por outro lado, os achados indicam que, sob baixa tensão de oxigênio, a suplementação com melatonina não impactou significativamente a taxa de blastocistos, sugerindo que, nesse ambiente, o estresse oxidativo não representa um fator limitante ao desenvolvimento embrionário. Isso reforça a ideia de que a principal atuação da melatonina ocorre na neutralização do excesso de EROS, sendo sua ação mais evidente em condições que favorecem o estresse oxidativo. Dessa forma, a utilização da melatonina pode ser uma estratégia promissora para otimizar a produção *in vitro* de embriões bovinos, especialmente em protocolos onde a exposição ao oxigênio atmosférico é inevitável, contribuindo para a melhoria da eficiência das biotécnicas reprodutivas e do melhoramento genético animal.

## 9. PERSPECTIVAS

Os achados deste estudo abrem novas perspectivas para a otimização dos protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIV), especialmente no que diz respeito ao manejo da tensão de oxigênio e ao uso de antioxidantes como a melatonina. A demonstração de que a melatonina melhora a taxa de blastocistos e a qualidade embrionária sob alta tensão de oxigênio reforça seu potencial como uma ferramenta viável para reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo, comum em sistemas de cultivo *in vitro*. Futuras pesquisas podem aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ação da melatonina, avaliando seu impacto sobre vias metabólicas e epigenéticas associadas ao desenvolvimento embrionário.

Além disso, estudos futuros devem explorar a aplicação da melatonina em diferentes condições experimentais, como em meios de cultivo enriquecidos com outros antioxidantes ou em combinação com estratégias que modulam o metabolismo lipídico dos embriões. Também seria relevante avaliar os efeitos dessa suplementação a longo prazo, incluindo a viabilidade embrionária após a criopreservação e o desempenho reprodutivo dos animais nascidos desses embriões. Com esses avanços, a melatonina pode se consolidar como um aditivo essencial para a biotecnologia reprodutiva, contribuindo para a eficiência do melhoramento genético e para a sustentabilidade da pecuária moderna.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEMA, H. et al. Fatty acid supplementation during in vitro embryo production determines cryosurvival characteristics of bovine blastocysts. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 837405, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.837405>.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Advances in cryopreservation techniques for in vitro-produced embryos: Current perspectives and future directions. *Animal Reproduction Science*, v. 239, p. 106938, 2022.
- AGUILA, L. et al. Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals (Basel)*, v. 10, n. 12, p. 2196, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10122196>.
- AMSTISLAVSKY, S.; OKAMOTO, M.; KIKUCHI, K. Challenges in cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: Cellular and molecular perspectives. *Animal Science Journal*, v. 89, n. 9, p. 1205-1214, 2018.
- ANISIMOV, V. N.; POPOVICH, I. G. Pro-oxidant and antioxidant properties of melatonin in the regulation of oxidative stress. *Biogerontology*, v. 7, n. 3, p. 133-145, 2006.
- ANJOS, M. M. d. et al. Effect of Alpha-Lipoic Acid on the Development, Oxidative Stress, and Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro. *Veterinary Sciences*, v. 12, n. 2, p. 120, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020120>.
- AOIADNI, M.; AL-HARBI, N. Antioxidant systems in the female reproductive tract and their impact on fertility. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 558, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00558>.
- ARANDA, R. P.; GONZALEZ, M. J. Oxidative stress management in mammalian reproduction: A focus on in vitro systems. *Theriogenology*, v. 169, p. 1-14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.02.007>. Acesso em: [data de acesso].
- ARSHAD, U.; QURESHI, M. S.; AHMAD, N. Cryopreservation and transfer of bovine embryos: Techniques and applications in livestock reproduction. *Theriogenology*, v. 176, p. 42-49, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). *Relatório Anual 2019*. Brasília: ABIEC, 2019.
- BÁEZ, F. et al. Low oxygen tension during in vitro embryo production improves the yield, quality, and cryotolerance of bovine blastocysts. *Animal Science*, v. 95, n. 1, p. e13941, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.13941>.
- BASTOS, N.M.; Ferst JG, Goulart RS, Silveira JC. The role of the oviduct and extracellular vesicles during early embryo development in bovine. *Anim Reprod*. 2022;19(1):e20220015. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0015>

BAZER, Fuller W.; WU, Guoyao; JOHNSON, Greg A. Pregnancy recognition signals in mammals: the roles of interferons and estrogens. *Animal Reproduction*, v. 14, n. 1, p. 7-29, 2017. DOI: 10.21451/1984-3143-AR888

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.01.004>.

CHEN, H. H. et al. Biphasic oxygen tension promotes the formation of transferable blastocysts in patients without euploid embryos in previous monophasic oxygen cycles. *Scientific Reports*, v. 13, p. 4330, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31472-4>.

CRUZ, M. H.; LEAL, C. L. Oxidative stress and its role in the physiology of reproduction. *Animal Reproduction*, v. 11, n. 3, p. 105-112, 2014. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/>.

DE LIMA, C. B.; LEÃO, B. C. S.; DODE, M. A. N. Effects of oxygen tension on in vitro embryo production: Benefits of low oxygen atmosphere. *Theriogenology*, v. 205, p. 1-10, 2023.

FACIOLI, F. L. et al. The outcome and economic viability of embryo production using IVF and SOV techniques in the Wagyu breed of cattle. *Veterinary Sciences*, v. 7, n. 2, p. 58, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci7020058>.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, v. 154, n. 6, p. F33-F43, 2017. DOI: [10.1530/REP-17-0432](https://doi.org/10.1530/REP-17-0432)

FUJII, T.; YAMAGISHI, N.; TAKAHASHI, M. Advances in bovine in vitro fertilization: Applications for genetic improvement in dairy and beef cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 225, p. 106725, 2021.

GALLI, C.; LAZZARI, G. The Manipulation of Gametes and Embryos in Farm Animals. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 123-130, 2016.

GONÇALVES, R. F.; VIANA, J. H. M. Advances in in vitro embryo production: Impacts on livestock breeding and global meat production. *Animal Reproduction*, v. 17, n. 4, p. 435-442, 2020.

GUO, Y.; WANG, Y.; LI, J. Antioxidant supplementation improves developmental competence and reduces oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 191, p. 112-120, 2022.

GUZELOGLU-KAYISLI, O. et al. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factors in the regulation of trophoblast migration and invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 82, n. 5, e13117, 2019

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: *Oxford University Press*, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HANSEN, P. J. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. *Journal of Animal Science*, v. 98, n. 4, p. 1-12, 2020.

HASHIMOTO, S. Role of oocyte maturation environment in the development of in vitro-produced bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, v. 63, n. 5, p. 381-386, 2017.

HE, C. et al. Melatonin and its receptor MT1 are involved in the regulation of oocyte maturation in mammals. *Journal of Pineal Research*, v. 60, n. 3, p. 217-229, 2016.

HUANG, L.; ZHANG, X.; ZHAO, Y. The role of antioxidants in alleviating oxidative stress in in vitro-produced embryos: Mechanisms and applications. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 21, p. 14, 2023.

JI, P.; LIU, Y.; YAN, L.; JIA, Y.; ZHAO, M.; LV, D.; YAO, Y.; MA, W.; YIN, D.; LIU, F.; GAO, S.; WUSIMAN, A.; YANG, K.; ZHANG, L.; LIU, G. Melatonin improves the vitrification of sheep morulae by modulating transcriptome. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1212047>.

JIANG, Yonghui; SHI, Huangcong; LIU, Yue; ZHAO, Shigang; ZHAO, Han. Applications of melatonin in female reproduction in the context of oxidative stress. *Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, Article ID 6668365, 11 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/6668365>.

KANDIL, O. M.; RAHMAN, S. M. A. E.; ALI, R. S.; et al. Effect of melatonin on developmental competence, mitochondrial distribution, and intensity of fresh and vitrified/thawed in vitro matured buffalo oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 22, p. 39, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01209-7>.

KEANE, J. A.; EALY, A. D. An overview of reactive oxygen species damage occurring during in vitro bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. *Animals (Basel)*, v. 14, n. 2, p. 330, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani14020330>.

LI, X.; ZHAO, Y.; LIU, H. Reactive oxygen species in ovulation: Regulation and impact on oocyte quality. *Theriogenology*, v. 185, p. 1-10, 2022.

LIRA, Alan da Silva et al. Uso da melatonina na produção in vitro de embriões bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 21, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/Qv7jRLLZ7QR4gSd4hgBCTt/?format=pdf&lang=e>

LOCKLEY, S. W. Journal of Pineal Research guideline for authors: Measuring melatonin in humans. *Journal of Pineal Research*, v. 69, n. 2, e12664, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jpi.12664>.

LOH, D.; REITER, R. J. Melatonin: Regulation of biomolecular condensates in neurodegenerative disorders. *Antioxidants (Basel)*, v. 10, n. 9, p. 1483, 17 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10091483>.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORRIEDO, S. M. The role of the maternal environment in determining early bovine embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 1, p. 118-125, 2018.

MA, Q. R.; AL-KAHTANI, A. M.; KHALIL, A. A. Mechanisms of oxidative stress in reproduction: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, n. 3, p. 453-467, 2022.

MAHIPAL SINGH, R.; KUMAR, P. Role of reactive oxygen species in reproductive physiology: A comprehensive review. *Reproductive Biology*, v. 21, n. 4, p. e12376, 2021.

MAHIPAL SINGH, A. et al. Effect of oxidative stress on in vitro embryo production in dairy cattle and its role in cryopreservation. *Cell and Tissue Research*, v. 381, n. 3, p. 463-479, 2024.

MARQUES, T. C. et al. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, n. 1, p. 226-236, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13097>.

MISHRA, S.; PALAI, T. K. Role of antioxidants in mitigating oxidative stress in reproductive systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 14, p. 88, 2016.

NADRI, Q. R.; AL-KAHTANI, A. M.; KHALIL, A. A. Mechanisms of oxidative stress in reproduction: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, n. 3, p. 453-467, 2022.

OLCESE, J. M. Melatonin and Female Reproduction: An Expanding Universe. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, v. 11, p. 85, 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00085.

OLIVEIRA, C. S.; MONTEIRO, F. M.; BARUSELLI, P. S. Advances in bovine in vitro embryo production: Implications for the genetic improvement of livestock. *Animal Reproduction*, v. 17, n. 3, e20200032, 2020.

PEREZ, C. C.; RODRIGUES, M. T. The role of glutathione in oxidative stress and embryo development. *Theriogenology*, v. 134, p. 57-65, 2019.

PEREZ, G.; SALAZAR, C.; RODRIGUEZ, J. Melatonin enhances DNA repair enzyme APEX1 expression under oxidative stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 120, p. 10-19, 2018.

RIZOS, D.; LONERGAN, P. Impact of Oxygen Concentration on Bovine Embryo Development. *Theriogenology*, v. 113, p. 63-68, 2018.

RIZOS, D.; MAILLO, V.; LONERGAN, P. The role of oxygen tension during in vitro embryo production: From basic research to clinical applications. *Animal Reproduction Science*, v. 248, p. 107033, 2022.

RODRIGUEZ, A. L.; SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Impact of oxygen tension on early bovine embryo development in vitro: From cellular to molecular pathways. *Theriogenology*, v. 150, p. 193-200, 2020.

SARAIVA, N. V.; SILVA, T. F.; PEREIRA, M. M. Lipid accumulation in in vitro-produced bovine embryos: Implications for cryopreservation and post-thaw survival. *Theriogenology*, v. 203, p. 120-128, 2023.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. et al. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Current Medical Chemistry*, v. 17, n. 19, p. 2070-2095, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986710791233689>.

SLOMINSKI, A. T. et al. Melatonin: A cutaneous perspective on its production, metabolism, and functions. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 4, p. 803-809, 2017.

SORVENIGO, M. et al. Challenges in cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: A focus on cryotolerance. *Theriogenology*, v. 99, p. 1-10, 2017.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, v. 118, p. 23-29, 2018.

SOTO-HERAS, S.; ROURA, M.; PARAMIO, M. T. Effects of oxidative stress on in vitro embryo production: Analysis of its impact and potential preventive strategies. *Theriogenology*, v. 150, p. 1-9, 2019.

SUDANO, M. J. et al. Effect of fetal bovine serum concentration on in vitro production and cytoplasmic lipid accumulation in embryos crossed *Bos taurus indicus* x *Bos taurus*. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 1, p. 123-134, 2022.

SUOFU, Y. et al. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 38, p. E7997-E8006, 2017.

TAN, D. X. et al. Melatonin and its metabolites: New insights into their function in oxidative stress and inflammation. *Journal of Pineal Research*, v. 59, n. 3, p. 345-365, 2015.

TALPUR, H. S. et al. Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, n. 4, p. 831-849, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13188>.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; ZHANG, L. Melatonin concentration in bovine follicular fluid: Association with follicle size and steroidogenesis. *Theriogenology*, v. 82, n. 3, p. 397-402, 2014.

TIAN, X.; WANG, W. Redox regulation in mammalian oocyte maturation and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 15, p. 50, 2017.

TORRES-OSORIO, Y.; VIVIANA, U.; RODRIGO, E.; ZULUAGA, J. J.; LÓPEZ-HERRERA, A. Oxidative stress and antioxidant use during in vitro mammal embryo production: Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, v. 10, n. 2, p. 433-459, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>.

TOSINI, G.; OWINO, S.; GUILLAUME, J. L. Melatonin and its receptors in the control of oocyte and embryo quality: Mechanisms and applications. *Reproductive Sciences*, v. 21, n. 6, p. 687-693, 2014.

TSANTARLIOTOU, M. P. et al. Melatonin and seasonal reproduction in ewes: a review. *Theriogenology*, v. 58, n. 8, p. 1807-1822, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.07.018>.

UENO, M. et al. Reduction of oxygen concentration during in vitro culture improves blastocyst development in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 5, p. 741-748, 2011.

VELAZQUEZ, M. A. Nutritional Strategies to Promote Bovine Oocyte Quality for In Vitro Embryo Production: Do They Really Work? *Veterinary Sciences*, v. 10, p. 604, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci10100604>.

VIJAYARAJ, P.; KRÖGER, C.; REUTER, U.; WINDOFER, A.; MAGIN, T. M. Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor. *Journal of Cell Biology*, v. 187, n. 2, p. 175-184, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200904095>.

VIANA, J. H. M. Development of the world farm animal embryo industry over the past 30 years. *Theriogenology*, v. 230, p. 151–156, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.09.012>.

Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol*. 2021 Dec;236(12):7966-7983. doi: 10.1002/jcp.30468. Epub 2021 Jun 14. PMID: 34121193.

WANG, J.; LI, X.; ZHAO, Y. Melatonin as a natural antioxidant: Mechanisms and therapeutic applications in oxidative stress-related conditions. *Antioxidants*, v. 12, n. 4, p. 867, 2023.

WANG, J.; WANG, X. Q.; LIU, R. P.; LI, Y. H.; YAO, X. R.; KIM, N. H.; XU, Y. N. Melatonin supplementation during in vitro maturation of porcine oocytes alleviates oxidative stress and endoplasmic reticulum stress induced by imidacloprid exposure. *Animals (Basel)*, v. 13, n. 16, p. 2596, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13162596>.

WOO, M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. S.; PANG, S. F. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells: Melatonin enhances progesterone production and stimulates LH receptor mRNA expression. *Journal of Pineal Research*, v. 30, n. 3, p. 134-138, 2001.

YANG, L.; CHEN, Y.; LIU, Y.; XING, Y. MIAO, C.; ZHAO, Y.; CHANG, X.; ZHANG, Q. The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 617843, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.617843>.

YANG, D.; MU, Y.; WANG, J.; ZOU, W.; ZOU, H.; YANG, H.; ZHANG, C.; FAN, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; CHEN, B.; ZHANG, Z. Melatonin enhances the developmental potential of immature oocytes from older reproductive-aged women by improving mitochondrial function. *Heliyon*, v. 9, n. 9, p. e19366, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19366>.

YANG, Y.; WU, H.; DUAN, J. Melatonin protects mitochondrial DNA from oxidative damage by preserving glutathione homeostasis. *Reproductive Sciences*, v. 24, n. 12, p. 1673-1683, 2017.

- YASMIN, F.; SHAMSI, A.; SHAH, S. Circadian rhythm: Implications for health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 667479, 2021. DOI: 10.1016/j.ncl.2019.04.004.
- XU, Y.; SHI, R.; WU, D. Glutathione and embryo development: A review of current insights. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 1125, 2019.
- ZAFAR, M. I.; LU, S.; LI, H. Sperm-oocyte interplay: An overview of spermatozoon's role in oocyte activation and current perspectives in diagnosis and fertility treatment. *Cell Bioscience*, v. 11, p. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00520-1>.
- ZENG, W.; XIAO, D.; CHEN, R.; LU, Y.; LIANG, W.; SUN, H. A novel method for gas mixing and distribution in multi-chamber embryo incubators. *Technology and Health Care*, v. 32, n. S1, p. 169-181, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/THC-248015>.